

# Funktionalisierung von Nanocontainern für die biochemische und medizinische Anwendung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

- Fachbereich Chemie der Universität Hamburg -

vorgelegt von

Anna-Marlena Kreuziger

aus Hamburg

**2016**

Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Mews

Tag der Disputation: 23.09.2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg im Zeitraum von Februar 2012 bis Juli 2016 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Horst Weller angefertigt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Möglichkeiten durch Nanokonzepte in der medizinischen Forschung . . .	3
<b>2. Theorie I - Aufbau von Nanocontainern</b>	<b>6</b>
2.1. Nanopartikel . . . . .	7
2.2. Toxizität von anorganischen Nanoteilchen . . . . .	8
2.3. Polymerhülle am Nanocontainer . . . . .	9
2.4. Diblockcopolymer Poly(isopren- <i>block</i> -ethylenoxid) . . . . .	10
2.5. Verkapselung von Nanopartikeln mit PI- <i>b</i> -PEO . . . . .	13
2.6. Funktionalisierung der Nanocontainer . . . . .	14
2.7. Bioorthogonale Kopplung . . . . .	16
<b>3. Theorie II - Physikalische Grundlagen zu Quantum Dots</b>	<b>22</b>
3.1. Quantenmechanische Betrachtung von Quantum Dots . . . . .	22
3.2. Fluoreszenz . . . . .	27
3.3. CdSe/CdS/ZnS - <i>core/shell/shell</i> Nanopartikel . . . . .	28
<b>4. Motivation</b>	<b>30</b>
<b>5. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>31</b>
5.1. Diblockcopolymer Poly(isopren- <i>block</i> -ethylenoxid) . . . . .	31
5.2. Nanocontainer - Nanopartikel mit Polymer verkapseln . . . . .	39
5.3. Organische Kopplungsmethoden an Polymere . . . . .	45
5.4. CDI-Aktivierung . . . . .	45
5.5. Darstellung von PI- <i>b</i> -PEO-Glycosiden über CDI-Aktivierung . . . . .	51
5.6. Darstellung von PI- <i>b</i> -PEO-Glycosiden über Click-Chemie . . . . .	53
5.7. Vorarbeiten zur Festphasensynthese . . . . .	57
5.8. Darstellung von PI- <i>b</i> -PEO-Biotin . . . . .	62
5.9. Biochemische Kopplung - NeutrAvidin als Bindeglied zwischen Nanocon- tainer und Aptamer . . . . .	64
5.10. Nanocontainer mit Biotin . . . . .	65
5.11. Darstellung der Nanocontainer mit NAvi sowie Kopplung der Aptamere	68
5.12. Nachweis der bioorthogonalen Kopplung über Agarosegele . . . . .	70

5.13. Kontrollen auf unspezifische Wechselwirkungen von NAvi-NC mit DNA-Aptameren ohne Biotin . . . . .	73
5.14. Bioorthogonal über NAvi gekoppelte Aptamere an Nanocontainern - Überprüfung der Bindungsfähigkeit zu E- und P-Selektin . . . . .	77
5.15. Gewebeschnitte - <i>in vivo</i> Experimente . . . . .	80
5.16. SPR-Messungen an Nanocontainer-Mannoheptulose . . . . .	84
5.17. Zellaufnahmen an HEPG2-Zellen mit Nanocontainern mit GalNAc und Mannoheptulose . . . . .	87
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>7. Summary</b>	<b>90</b>
<b>8. Experimentalteil</b>	<b>92</b>
8.1. Verwendete Geräte . . . . .	92
8.2. Methoden . . . . .	94
8.3. Materialien . . . . .	96
8.4. Liste Polymere . . . . .	97
8.5. Verhalten der Diblockcopolymeren <b>1</b> . . . . .	97
8.6. Nanopartikel . . . . .	99
8.7. Synthesen an Diblockcopolymeren . . . . .	100
8.8. Poly(isopren- <i>block</i> -ethylenoxid) (PI- <i>b</i> -PEO)-Phosphoramidit <b>30</b> . . . . .	108
8.9. NeutrAvidin an biotinylierte Diblockcopolymeren verkapselte Nanopartikel	110
8.10. Aptamere an Neutravidin Nanocontainer . . . . .	110
8.11. Agarosegel . . . . .	111
8.12. Dot Blot . . . . .	111
8.13. <i>in vivo</i> Maus - Gewebeschnitte . . . . .	112
8.14. Verdünnungsreihen DBC-Mannoheptulose zur SPR-Messung . . . . .	112
<b>9. Sicherheit</b>	<b>114</b>
<b>Literatur</b>	<b>117</b>
<b>A. HPLC DNA Analytik mit Urea Puffer</b>	<b>I</b>

<b>B. Datenblätter</b>	<b>II</b>
<b>C. Dot Blot</b>	<b>II</b>
<b>D. Agarosegele</b>	<b>IV</b>
<b>E. GHS</b>	<b>V</b>
<b>F. Danksagung</b>	<b>XV</b>
<b>G. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>XVIII</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AGT</b>	$O^6$ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
<b>AM</b>	Affinitätsmolekül
<b>AIBN</b>	Azobis(isobutyronitril)
<b>Au-NP</b>	Gold-Nanopartikel
<b>BG</b>	$O^6$ -(4-Aminomethylbenzyl)guanin
<b>BSA</b>	Rinderalbumin - <i>bovine serum albumin</i>
<b>c</b>	Konzentration
<b>Con A</b>	Concanavalin A
<b>CDI</b>	1,1'-Carbonyldiimidazol
<b>cmc</b>	<i>critical micelle concentration</i>
<b>D</b>	Hydrodynamischer Durchmesser
<b>DABCO</b>	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
<b>DETA</b>	Diethylentriamin
<b>DBC</b>	Diblockcopolymer
<b>DLS</b>	Dynamische Lichtstreuung
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure - <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>DsRed</b>	<i>red fluorescent protein</i> (Discosoma)
<b>DZG</b>	Dichtegradientenzentrifugation
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EPR</b>	<i>enhanced permeability and retention</i>
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum - <i>fetal calf serum</i>
<b>FLIM</b>	<i>fluorescent lifetime imaging</i>
<b>FRET</b>	Förster-Resonanzenergietransfer
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GPC</b>	Gel-Permeations-Chromatographie
<b>HDA</b>	Hexadecylamin
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HOMO</b>	<i>highest occupied molecular orbital</i>

<b>HWHM</b>	<i>half width at half-maximum</i>
<b>LAP</b>	lebende anionische Polymerisation
<b>LUMO</b>	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
<b>MWCO</b>	<i>molecular weight cut-off</i>
<b>n</b>	Stoffmenge
<b>NAvi</b>	NeutrAvidin
<b>NC</b>	Nanocontainer
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i>
<b>NP</b>	Nanopartikel
<b>nt</b>	Nukleotide
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MH</b>	$\alpha$ -D-Mannoheptulose
<b>PDI</b>	Polydispersitätsindex
<b>PEO</b>	Polyethylenoxid
<b>pFp</b>	Pentafluorophenyl
<b>PI</b>	Polyisopren
<b>PI-<i>b</i>-PEO</b>	Poly(isopren- <i>block</i> -ethylenoxid)
<b>PI-DETA</b>	Polyisopren-Diethylentriamin
<b>rh E-Sel.</b>	rekombinantes humanes E-Selektin
<b>RB</b>	Nanocontainer mit QDQRs mit Biotinendgruppen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAvi</b>	Nanocontainer mit QDQRs mit Biotin und NeutrAvidin
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RU</b>	Nanocontainer mit QDQRs mit Hydroxy- od. Aminoendgruppe
<b>scrSDA</b>	Kontrollaptamer
<b>SDA</b>	Selektin-DNA-Aptamer
<b>SP</b>	Spitzenforschung
<b>SPIO</b>	<i>superparamagnetic iron oxide</i>
<b>SPR</b>	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie - <i>surface plasmon resonance</i>
<b>ssDNA</b>	einzelsträngige DNA - <i>single-stranded DNA</i>
<b>Strep.</b>	Streptavidin

<b>STZ</b>	Streptozotocin
<b>TMS</b>	Tetramethylsilan
<b>TOP</b>	Trioctylphosphin
<b>TOPO</b>	Trioctylphosphinoxid
<b>QU</b>	Nanocontainer mit QDs mit Hydroxy- oder Aminoendgruppe
<b>QD</b>	Quantum Dot
<b>QDQR</b>	Quantum Dot Quantum Rod
<b>QD</b>	Quantum Dot
<b>QNAvi</b>	Nanocontainer mit QDs mit Biotin und NeutrAvidin
<b>QY</b>	Fluoreszenzquantenausbeute
<b>W</b>	Waschlösung

# 1. Einleitung

Das Interesse an der Erforschung und Entwicklung neuer Therapien sowie frühzeitiger Diagnostik in der Krebsforschung ist sehr hoch.<sup>[1]</sup> Laut der im Jahr 2012 erhobenen Statistik der WHO starben weltweit 8.2 Mio. Menschen an Krebs und 14 Mio. Neuerkrankte wurden registriert. Die häufigsten Krebserkrankungen mit tödlichem Ausgang treten bei den inneren Organen wie Lunge, Leber, Magen und Darm auf.<sup>[2]</sup>

Neben Herzerkrankungen und Diabetes stellt Krebs die häufigste Todesursache der westlichen Bevölkerung dar. Die Entstehung, Entwicklung sowie Verbreitung (Metastasierung) von Krebs im Körper lassen noch viele Fragen offen, deren Beantwortung sich durch Nanomaterialien aus einer neuen Perspektive betrachten lässt. Mit der Nanotechnologie werden im Bereich der Diagnostik und Therapie neue und innovative Wege beschritten, da Nanopartikel über außergewöhnliche physikalische Eigenschaften verfügen. Allgemein handelt es sich dabei um Teilchen, die so klein sind, dass sie sich im Körper z.B. für den Transport von Wirkstoffen einsetzen lassen. Ein Nanopartikel mit einer Größe von 5 nm verhält sich zu einem roten Blutkörperchen (ca. 8  $\mu\text{m}$ ) wie ein Mensch zur Zugspitze. Für die medizinische und biochemische Anwendung sind viele Dinge zu beachten, damit ein Nanopartikel seinen Zielort im Körper erreicht und nicht als Fremdstoff wahrgenommen wird. Eine Außenhülle um die Nanopartikel ist der Schlüssel für eine erfolgreiche Tarnung. Zudem ist eine Funktionalisierung mit Erkennungsmolekülen oder Wirkstoffen möglich, um spezifisch am Zielort mit den Zellen zu interagieren.

Nanotechnologie hat nicht nur im Forschungsbereich der Physikalischen Chemie einen hohen Stellenwert eingenommen, bereits im alltäglichen Leben sind Nanopartikel in Kosmetika, Hochleistungsmaterialien im Flugzeugbau, kratzfesten Autolacken, der Solartechnologie sowie LED-Technik und vielen weiteren Bereichen zu finden. Das besondere an Nanomaterialien ist, dass ein bereits bekanntes Material durch Minimierung und Kontrolle über dessen Form ganz neue Eigenschaften hervorbringt. Die Möglichkeiten und der Nutzen durch die Nanotechnologie übersteigt alle toxikologischen Bedenken, die dennoch beachtet werden müssen.<sup>[3]</sup>

Im medizinischen Bereich wird die Nanotechnologie bereits erfolgreich durch den Ein-

satz von Eisenoxidnanopartikeln (SPIOs) in der Diagnostik als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) genutzt. Auch können SPIOs effektiv in der Therapie von Tumoren mittels Hyperthermie genutzt werden. Hier führt ein magnetisches Wechselfeld zu einer starken Bewegung der Nanopartikel, wodurch eine lokale Erhitzung des Gewebes entsteht und dieses zerstört wird.<sup>[4]</sup>

Die Nanomedizin lässt sich grob in die drei Bereiche a) Verbesserung bestehender Therapien, b) medizinische Grundlagenforschung und c) Biotechnologie unterteilen. Allgemein sind die Fortschritte in der Analytik durch Nanotechnologie als Vorteil für alle Bereiche ergänzend zu erwähnen, wie zum Beispiel Mikrofluidiksysteme beim "*Lap-on-a-chip*", das biologische Analysen an einzelnen Zellen durch Kanäle zulässt, die sich nur um wenige Mikrometer unterscheiden. Weitere erfolgreiche Beispiele der Nanomedizin sind Silbernanopartikel zur antiseptischen Wundheilung, Oberflächenbeschichtungen von Prothesen, selbst heilende Knochen und vieles mehr.<sup>[5]</sup>

## 1.1. Möglichkeiten durch Nanokonzepte in der medizinischen Forschung

Neue Therapien in der Krebsforschung messen sich an zwei Maßstäben. Zum Einen die Begrenzung der Wirkung auf eine lokale Umgebung und zum Anderen das der Wirkstoff den Zielort unverändert erreicht ohne metabolisiert zu werden.<sup>[6]</sup> Ziel ist es Nebenwirkungen zu verringern.

Zur Entstehung eines Tumors ist bereits eine einzige genetisch mutierte Zelle ausreichend, um ein Tumorwachstum auszulösen. Diese Zellen haben keinen natürlichen Apoptosemechanismus und teilen sich fortlaufend, dabei verdrängen die Krebszellen die gesunden Zellen und befallene Organe, die in der Folge zunehmend ihre Funktion einstellen. Tumore wachsen zunächst bis zu einer diffusionslimitierten Größe von bis zu 2 mm<sup>3</sup>.<sup>[7]</sup> Sie brauchen eine Grundversorgung durch Glucose, Sauerstoff und Aminosäuren, um zu wachsen. Ohne neue Blutgefäße ist dies nicht weiter möglich und im Inneren sterben deshalb die Zellen ab. Es bildet sich ein nekrotischer Kern aus. Dabei finden Wachstum und Zerfall im gleichen Maß statt, die Abfallprodukte werden über Diffusion abtransportiert. Dieser Zustand kann über mehrere Jahre bestehen bleiben. Bei größeren Tumoren haben sich neue Blutgefäße gebildet (Angiogenese), dies sind unstrukturiert und weisen eine poröse Struktur auf im Gegensatz zu normalen Gefäßen, weil das Wachstum schnell und unkontrolliert verläuft.<sup>[6-8]</sup>

Chemo- und Strahlentherapien beruhen auf dem Prinzip, das Krebszellen schneller wachsen und schnellere Reaktionen zeigen als normale Zellen, dennoch werden bei diesen Therapieformen auch viele gesunde Zellen geschädigt und viele unerwünschte Nebenwirkungen hervorgerufen.<sup>[7]</sup>

Die Nanomedizin eröffnet die Chance traditionelle Therapien zu unterstützen oder sogar zu ersetzen. Dabei sind sowohl diagnostische Früherkennungen sowie minimal invasive Therapien im Fokus der zukünftigen medizinischen Anwendung. Auf der Forschungsebene wird dabei unterschieden zwischen reinen Transportmizellen ohne anorganische Nanopartikel (Liposomen),<sup>[9,10]</sup> Nanocontainern und funktionalisierten Nanocontainern mit spezifischer Bindungsfähigkeit oder sogar mehreren Funktionen, wie beispielsweise gezielter Wirkstofffreisetzung durch Änderung des pH-Werts, der Temperatur oder des Drucks.<sup>[4,5,11]</sup>

Die Anforderungen an jedes dieser neuen Nanosysteme ist den Bedingungen im biologischen Organismus unterlegen. Dabei spielen sowohl Zirkulationszeiten als auch die Ausscheidung über Leber, Niere sowie Erkennung durch Makrophagen anhand der Größe und Ladung eine wesentliche Rolle.<sup>[12,13]</sup>

Ein Schritt zur erfolgreichen medizinischen Anwendung ist der Einsatz von Polyethylenoxid (PEO) bei einem Nanocontainer. Das PEO weist eine geringe Wechselwirkungen mit Proteinen auf (Stealth-Effekt) und führt zu längeren Zirkulationszeiten im Blut.<sup>[14]</sup> Die Umhüllung schützt instabile Substanzen, überführt schwer lösliche Wirkstoffe und schützt den Organismus vor giftigen Stoffen bis zum Zielort.<sup>[15]</sup> Liposomen, die mit Chemotherapeutika versehen worden sind, finden bereits klinische Anwendung, wie beispielsweise Doxorubicin Liposomal (Handelsname Doxil<sup>®</sup>), das seit 1995 durch die FDA zugelassen ist.<sup>[16]</sup> Es zeigten sich längere Zirkulationszeiten und eine stärkere Aufnahme des Wirkstoffes in die Tumorzellen, der in die DNA interkaliert und die Zellfunktionen stören, in dem die Transkription bestimmter Proteine verhindert wird.<sup>[17]</sup>

Neben primären allgemeingültigen Zielen, wie verringerter Wirkstoffmengen durch gezielte Freisetzung und geringerer Abbau (bzw. Metabolisierung), ist die Frage zu stellen welcher Zielort erreicht werden soll und wie der Nanocontainer (NC) (50-100 nm) dorthin gelangt.

Die Anwendungsstrategien von Nanomaterialien zur Diagnostik und Grundlagenforschung lassen sich beispielhaft anhand von Tumorgewebe erörtern. Nach dem Review von Gao et al.<sup>[18]</sup> wird auf drei Beispiele eingegangen.

A) Nanocontainer (NC) dringen durch die schlecht ausgebildeten porösen Blutbahnen, mit Lücken von 380-780 nm,<sup>[8]</sup> in das Tumorgewebe ein. Durch die Größe der Nanocontainer (50-150 nm) wird der sogenannte EPR (*enhanced permeability and retention*) Effekt begünstigt, der die Verteilung durch Diffusion beschreibt und besagt, dass größere Makromoleküle zwar langsam in Tumorgewebe eindringen, aber auch anschließend länger verweilen.<sup>[18-21]</sup>

B) Durch das Eindringen der NC über die Lücken des schlecht ausgebildeten Endothels

und den erwähnten begünstigenden EPR-Effekt gelangen die NC zu den Tumorzellen. Zusätzlich können die NC mit einem Affinitätsmolekül (AM) versehen werden, um spezifisch an die Tumorzellen zu binden.<sup>[18,21]</sup>

C) Im Fall einer induzierten Angiogenese verfügt das Tumorgewebe über gut ausgebildete Blutbahnen, die durch Endothelzellen ausgekleidet sind. Funktionalisierte Nanocapsules können dann in Wechselwirkung mit überexprimierten Selektinen oder Integrinen der Endothelzellen, die auf eine Tumorentwicklung hindeuten, treten. Der Vorteil der induzierten Angiogenese beim Tumor ist die Verringerung des Tumordrucks und eine verbesserte Zugänglichkeit im gesamten Tumor. Dadurch wird die Wirksamkeit von klassischen Therapien wie Chemo- und Strahlentherapie erhöht.<sup>[22]</sup>

Die Hoffnung, ist frühzeitig Veränderung der Endothelzellen durch die funktionalisierten NC festzustellen und eine Tumorbildung durch Metastasen zu erkennen. Zusätzlich besteht bei dieser Herangehensweise die Möglichkeit zur Erforschung weitere Erkrankungen und Mechanismen, die ebenfalls eine Veränderung der Endothelzellen aufweisen, wie es allgemein im Verlauf von Entzündungsreaktionen,<sup>[23]</sup> beispielsweise bei Atherosklerose, der Fall ist.

## 2. Theorie I - Aufbau von Nanocontainern

Ein Nanocontainer (NC) ist ein komplexes Konstrukt, das aus vielen einzelnen Komponenten hergestellt wird. Die einzelnen Teilabschnitte bis zum fertigen NC müssen sorgfältig abgestimmt und optimiert werden, um sie für biochemische und medizinische Anwendungen nutzen zu können.

In der theoretischen Einführung wird detailliert der Aufbau eines Nanocontainers beschrieben, sowie unterschiedliche Kopplungsstrategien zur Funktionalisierung gezeigt. Die einzelnen Bestandteile eines Nanocontainers lassen sich grob in den Kern aus Nanopartikeln, der Hülle aus Diblockcopolymeren sowie deren Funktionalisierung mit Affinitätsmolekülen bzw. deren Kopplung an den NC aufteilen (s. Abb. 1). Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist dabei die Einordnung und Betrachtung der unterschiedlichen Kopplungsstrategien zur Funktionalisierung der NC im Hinblick auf den Einsatz in biologischen Systemen. Das zukünftige Ziel ist es, ein Grundkonzept für NC zu entwickeln,

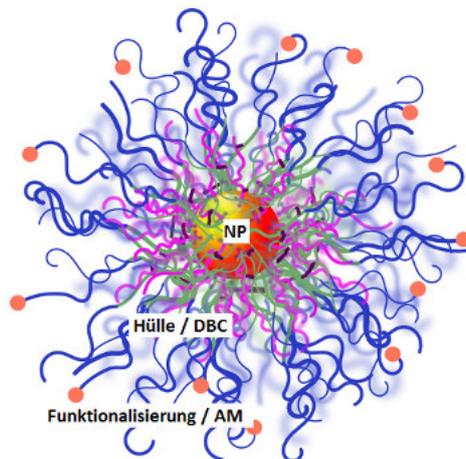


Abbildung 1: Aufbau eines Nanocontainers aus Nanopartikeln im Kern, Hülle aus Diblockcopolymeren sowie Funktionalisierung mit Affinitätsmolekülen (AM).

bei dem die Bestandteile je nach den medizinischen Anforderungen angepasst werden können. Die Vorstellung dabei ist, die Eigenschaften individuell durch die Wahl des Nanopartikels, der Hülle aus Polymeren und zuletzt die Methode der Funktionalisierung je nach der Aufgabe des Affinitätsmoleküls bzw. des Zielorts festlegen zu können. Dadurch wird ein Konzept erhalten, das flexibel verändert werden kann und schnelle Lösungswege verspricht.

## 2.1. Nanopartikel

Grundsätzlich bezeichnet Nano nur eine Größenordnung, die Strukturen in einem Bereich von etwa 1-100 nm betrachtet.<sup>[24]</sup> Nanopartikel können aus sehr unterschiedlichen Materialien bestehen. Der Begriff Partikel bezieht sich dabei auf die meist sphärische Form, wird aber auch für andere Strukturen als Sammelbegriff häufig verwendet. Anorganische kristalline Nanopartikel, oder auch Nanokristalle, können gezielt in Form, Zusammensetzung und Struktur hergestellt werden.<sup>[25]</sup> Ebenso wird „Nanopartikel“ als Begriff für Strukturen verwendet, die aus organischen Substanzen wie Polymeren oder künstlicher DNA bestehen und sich ebenfalls gezielt in Größe und Form herstellen lassen.<sup>[26]</sup>

Ein bekanntes Anwendungsbeispiel, bei dem Nanopartikel zum Einsatz kommen, ist rotes Glas, das bereits im Mittelalter seine Farbe durch Gold-Nanopartikel (Au-NP) erhalten hat. Das Metall hat durch die Minimierung auf die atomare Ebene seine physikalischen Eigenschaften im Vergleich zum makroskopischen Festkörper verändert.<sup>[27]</sup> Nanopartikel haben ihren Einzug in unser alltägliches Leben gefunden. Titandioxid Nanopartikel sind z.B. in Kosmetika und Oberflächenbeschichtungen enthalten.<sup>[28]</sup>

Eine Vielzahl an biologischen Analysemethoden basieren auf der Detektion von fluoreszierenden Markern, wie beispielsweise bei der Einfärbung von Zellkernen oder DNA-Fragmenten sowie Bindungssays mit Antikörpern. Fluoreszierende Nanopartikel aus Halbleitermaterialien sind besonderes interessant, weil durch Änderung der Größe und Form Einfluss auf die optischen und elektronischen Eigenschaften genommen wird (s. Kapitel 3).<sup>[29,30]</sup> In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Halbleiternanopartikel aus Cadmiumselenid, Cadmiumsulfid sowie Zinksulfid verwendet. Im zweiten Teil der Theorie werden dazu die physikalischen Grundlagen der sogenannten Quantum Dots (QDs) näher erläutert. Die biomedizinischen Vorteile von QDs als Fluoreszenzmarker heben sich gegenüber organischen Farbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen durch ihre hohe photochemische Stabilität, ein breites Absorptionsspektrum sowie schmale Emissionsbanden ab. Die Größe von QDs liegt im Größenbereich von fluoreszierenden Proteinen, wie das häufig verwendete *green fluorescent protein* (GFP) (mit einem Durchmesser von 3 nm und 4 nm Länge).<sup>[31]</sup>

Um überhaupt Nanopartikel in einem biologischen System nutzen zu können, ist eine stabilisierende Umhüllung besonders wichtig, zusammen mit den Partikeln werden diese dann als Nanocontainer bezeichnet. Die Hülle muss zum einen auf den Nanopartikel gut abgestimmt sein, damit seine physikalischen Eigenschaften erhalten bleiben und zum anderen auf das biologische System in dem es Einsatz finden soll.

Dabei lassen sich Nanocontainer herstellen, die gegenüber konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen viele Vorteile bieten, wie beispielsweise einer Funktionalisierung der Oberflächen durch Affinitätsmoleküle<sup>[18,32,33]</sup>, pH-Sensitivität<sup>[34]</sup> oder Hybridmaterialien aus QD und SPIOs, die sowohl fluoreszierende als auch magnetische Eigenschaften aufweisen.<sup>[35,36]</sup>

## 2.2. Toxizität von anorganischen Nanoteilchen

Anorganische Nanopartikel beinhalten häufig Schwermetalle wie Cadmium, Quecksilber, Nickel oder Blei, deren Toxizität hinreichend in der Literatur beschrieben wird.<sup>[37]</sup> Die akute Toxizität von Cadmium beruht auf der Denaturierung von Proteinen an Membrangrenzflächen über Radikalbildung, die zu einer Oxidation der Lipide führt.<sup>[37]</sup> Zum Schutz der Organe wird freies Cadmium durch ein stark cysteinhaltiges Protein gebunden, das durch die Niere abgefangen und als Komplex in der Nierenrinde sowie in der Leber und der Muskulatur eingelagert wird. Ein Abbau findet mit einer Halbwertszeit von 10-30 Jahren statt.<sup>[37,38]</sup>

Alternativen bieten Nanopartikel aus essentiellen Schwermetallen, wie beispielsweise Eisen, Kupfer oder Zink die in geringen Mengen im Körper wichtige Aufgaben erfüllen, in großer Menge aber auch eine toxische Wirkung zeigen.<sup>[39]</sup>

Im Einzelnen müssen deshalb Mechanismen und Abbau überprüft werden. Eine geeignete Umhüllung kann zur Verringerung einer akuten Toxizität beitragen. Am Beispiel von Eisenoxidnanopartikeln als Kontrastmittel konnte Artur Giemsa in seiner Dissertation zeigen, dass ein langsamer Abbau erfolgt und bei entsprechenden klinischen Mengen keine Gefahr für den Organismus anzunehmen ist.<sup>[39]</sup>

Bei Beachtung der Risiken eröffnen sich im Gegenzug neue Chancen zur verbesserten Diagnostik sowie der Einsatz geringer Mengen durch eine gesteigerte Wirksamkeit am gewünschten Einsatzort. Eine lange Zirkulationszeit der Nanopartikel durch eine Polymerverkapselung ist dabei der erste Schritt. Gekoppelte Wirkstoffe sind stabiler und

werden langsamer abgebaut. Unerwünschte Nebenwirkungen durch Metabolisierung werden somit ebenfalls verringert. Durch die Größe, Ladung und Zusammensetzung kann gesteuert werden, in welches Gewebe die Nanocontainer eintreten.<sup>[40]</sup> Die Freisetzung eines Wirkstoffes kann beispielsweise über den pH-Wert, Temperatur oder die Salzkonzentration gesteuert werden.<sup>[5]</sup> Der zukünftige Weg in der Medizin liegt vermutlich in Liposomen, die ausschließlich aus Polymeren bestehen und z.B. zum Transport von Wirkstoffen bis ins Gehirn gelangen und dort temperaturempfindlich diese freisetzen können.<sup>[41,42]</sup>

Eisenoxidnanopartikel sind bereits heute als Kontrastmittel unter dem Handelsnamen Resovist<sup>®</sup> für die Magnetresonanztomographie (MRT) im klinischen Einsatz.

Cadmiumhaltige fluoreszierende Nanopartikel dienen der wissenschaftlichen Forschung zur direkten Kontrolle durch analytische Methoden, wie Durchflusszytometrie (FACS), Fluoreszenzmikroskopie oder in Agarosegelen. Der Einsatz von cadmiumhaltigen NP im klinischen Alltag ist umstritten und nur bei anschließender Entfernung, schweren Erkrankungen oder bei Einsatz sehr geringer Mengen denkbar.

### 2.3. Polymerhülle am Nanocontainer

Zur Synthese monodisperser Nanopartikel sind hochsiedende organische Lösungsmittel, wie HDA oder TOP/TOPO, notwendig.<sup>[29]</sup> Die langkettigen und hydrophoben Lösungsmittel dienen gleichzeitig als Liganden, sodass die NP in einer kolloidalen Lösung vorliegen. Grundsätzlich gilt es die anorganischen hydrophoben Nanopartikel für eine medizinische Anwendung in ein wässriges Medium zu überführen, ohne dass die NP agglomerieren. Dazu müssen die Liganden ausgetauscht bzw. mit hydrophilen Hüllen versehen werden. Als ein geeigneter Lösungsweg sind Hüllen aus Polymeren besonders interessant.<sup>[43]</sup> Eine flexible Hülle aus Polymeren ähnelt den natürlichen Membranen von Zellen und könnte sich in Zukunft als Vorteil in der Interaktion von funktionalisierten NC mit Zelloberflächen erweisen,<sup>[13]</sup> auch die Größe und Form können dabei entscheiden sein. Besonders lange Zirkulationszeiten von 4 Tage *in vivo* konnten bei Ratten mit länglichen und flexiblen Polymermizellen, sogenannte Filomizellen mit einer Längen von 8  $\mu\text{m}$ , erreicht werden.<sup>[44]</sup> Je nach Anwendung und Zielort im Körper können die Eigenschaften der Nanocontainer somit angepasst werden.

Im Zelltest konnte die Wirksamkeit des Diblockcopolymer (DBC) Poly(isopren-*block*-ethylenoxid) (PI-*b*-PEO) zum Schutz gegen eine Toxizität cadmiumhaltiger Nanopartikel bereits mehrfach bewiesen werden.<sup>[32,45-47]</sup>

Weitere bekannte Möglichkeiten zur Verkapselung der Nanopartikel können eine Silicaschale<sup>[48,49]</sup> oder eine Verstärkung des hydrophoben Kerns der PI-*b*-PEO verkapselten NP durch Emulsionspolymerisation mit Styrol sein.<sup>[50]</sup>

Im folgenden Kapitel wird verstärkt auf das DBC PI-*b*-PEO eingegangen, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

## 2.4. Diblockcopolymer Poly(isopren-*block*-ethylenoxid)

Polymere zeichnen sich durch ihren Aufbau aus sich wiederholenden Einheiten aus. Dabei kann es sich um synthetisch erzeugte Polymere (PVC, PE, PP) oder auch um Naturstoffe (DNA, Peptide, Cellulose) handeln. In beispielsweise anionischen, kationischen oder radikalischen Reaktionen erfolgt die organische Synthese eines Polymers aus den sogenannten Monomeren. Bei Blockcopolymeren handelt es sich um Polymere, die aus unterschiedlichen Monomeren aufgebaut sind, die in Blöcken aneinander gereiht sind.<sup>[51]</sup>

Besonders geeignet zur Herstellung von Blockcopolymeren sind „lebende“ Polymerisationen. Dabei lassen sich unterschiedliche Strukturen wie Diblock-, Triblock-, Stern- und Pfropfcopolymer herstellen.<sup>[34]</sup>

Das amphiphile Diblockcopolymer PI-*b*-PEO besteht aus zwei Blöcken, Polyisopren (PI) und Polyethylenoxid (PEO) (s. Abb. 2). Die in dieser Arbeit verwendeten DBCs wurden in einer lebenden anionischen Polymerisation (LAP) mit bestimmten Blocklängenverhältnissen durch Johannes Ostermann<sup>[52]</sup> sowie Steffen Fischer synthetisiert.

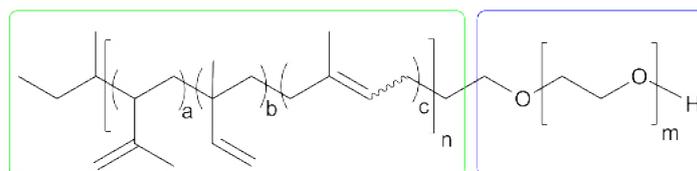


Abbildung 2: Struktur des Diblockcopolymer PI-*b*-PEO **1** , PI (Grün) und PEO (Blau).

Die LAP zeichnet sich durch ein reaktives Kettenende aus, an dem die Polymerisation unter Verbrauch des Monomers stattfindet, bis dieses in der Lösung verbraucht ist.<sup>[53]</sup> Durch die LAP kann eine gute Kontrolle über das Molekulargewicht sowie eine geringe Dispersität erreicht werden. Dazu ist eine hohe Geschwindigkeit der Initiationsreaktion im Vergleich zur Wachstumsreaktion notwendig. Das Kettenwachstum erfolgt gleichmäßig durch die weitere Zugabe des Monomers. Zur Vermeidung von ungewollten Abbruchreaktionen ist der Ausschluss von Wasser und Luftsauerstoff erforderlich. Es besteht die Möglichkeit eine funktionale Endgruppe durch Abbruchreaktion einzuführen oder die direkte Umsetzung zu einer anderen Kette zum DBC bzw. je nach Synthesevorschrift durch erneute Initiierung mit einem anderen Monomer das Kettenwachstum fortzusetzen.<sup>[51]</sup>

Bei der Verkapselung der QDs dienen die Doppelbindungen zur radikalischen Quervernetzung, um stabile Mizellen zu erhalten, sodass auch bei einer Verdünnung und dem Unterschreiten der sogenannten *critical micelle concentration* (cmc) die Polymerhülle um die Nanopartikel bestehen bleibt. Die Kettenverhältnisse von PI zu PEO liegen bei 1 zu 2 für die optimale Verkapselung der NP.

PEO eignet sich durch seine hydrophilen und biokompatiblen Eigenschaften besonders gut für medizinische Anwendungen.<sup>[14]</sup> Die sogenannte PEGlierung, abgeleitet von der Benennung Polyethylenglykol (PEG) für PEO ist eine häufig angewandte Methode, um Zirkulationszeiten zu verlängern, den Abbau von Medikamenten im Körper zu verringern sowie bei hydrophoben Wirkstoffen eine Löslichkeit in wässrigen Systemen zu bewirken.<sup>[54]</sup>

Polyethylenoxid ist ein FDA anerkanntes Polymer, das sich in einem breiten Anwendungsspektrum in Pharmazeutika, Kosmetika sowie Lebensmitteln finden lässt. Es gilt als toxikologisch unbedenklich, löst keine Immunreaktionen aus und weder die Aktivität von Proteinen noch andere Wechselwirkungen mit Zellmembranen (Stealth-Effekt) konnten bislang beobachtet werden.<sup>[55]</sup> Die einfachsten Systeme, um Nanopartikel in Wasser zu überführen sind PEO-Ketten mit einfachen Ankergruppen, wie Thiolen oder Aminen.<sup>[56]</sup>

## Selbstorganisation

Grundlegend lassen sich alle symmetrischen Strukturen in der Natur als Systeme verstehen, die sich durch spontane Selbstorganisation bilden. Als Beispiele sind DNA, Lipiddoppelschichten der Zellmembran, Proteine oder auch magnetische Domänen zu nennen. Die Entstehung von diesen Strukturen wird durch repulsive und attraktive Kräfte hervorgerufen, ohne dass sich kovalente Bindungen ausbilden.

Die Kenntnisse über die physikalischen Grundlagen zur Selbstorganisation ermöglichen es, neue sich selbst organisierende Strukturen zu entwickeln und natürliche Systeme gezielt nachahmen zu können. Der kritische Punkt der Selbstorganisation ist dabei immer der Übergang von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand. Der Übergang wird durch Änderung von Temperatur, Konzentration, pH-Wert, Salzkonzentration, mechanischer Durchmischung oder Polarität des Lösungsmittel hervorgerufen bzw. beeinflusst.<sup>[34]</sup>

Eine amphiphiles Diblockcopolymer, das aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil besteht, verhält sich ähnlich wie ein Tensid. Wird das DBC in ein Lösungsmittel gegeben, in dem nur ein Teil des Polymers löslich ist, kommt es zur Bildung von Mizellen. Die hydrophobe Kette bildet dabei z.B. den Kern und der hydrophile Teile formt eine zum Wasser gerichtete Hülle.

Zur Verkapselung von Nanopartikel in wässrigen Systemen werden amphiphile Diblockcopolymere, die aus dem hydrophoben Polyisopren und dem hydrophilen Polyethylenoxid bestehen, eingesetzt. Die sphärische mizellare Struktur wird gebildet, wenn der hydrophobe PI-Block kleiner ist als der hydrophile PEO-Block. Die Krümmung der Mizelle und somit auch ihre Größe lässt sich dadurch einstellen.<sup>[34]</sup> Durch Veränderung der Verhältnisse können sich andere Strukturen, wie Vesikel oder Zylindermizellen, ausbilden.<sup>[57]</sup> In der gezeigten Abbildung 3 ist die Bildung einer kugelförmige Mizelle in Wasser gezeigt, in der der PI-Block nach Innen und der hydrophile PEO-Teil nach Außen zeigt.

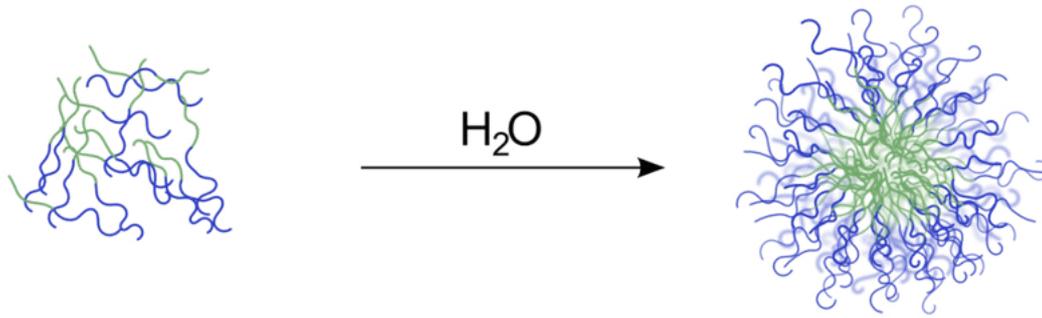


Abbildung 3: Selbstorganisation zu kugelförmigen Mizellen des amphiphilen DBCs PI(Grün)-*b*-PEO (Blau) in Wasser.

## 2.5. Verkapselung von Nanopartikeln mit PI-*b*-PEO

Ein Nanopartikel kann auf unterschiedliche Weisen verkapselt werden. Die Verkapselung der NP mit PI-*b*-PEO ist in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Weller vielfach optimiert und verbessert worden. Das genaue Verfahren wird im Methodenteil als Standard vorgestellt. Zum Verständnis der Funktionalisierung eines Nanocontainers wird hier das Grundprinzip der Verkapselung beschrieben.

Bevor die Verkapselung mit dem DBC stattfindet, erfolgt ein Austausch der Liganden (HDA oder TOP / TOPO) aus der Synthese, in dem ein sehr hoher Überschuss an Polyisopren-Diethylentriamin (PI-DETA) zugegeben wird. Die Kettenlänge des PI-DETAs wird entsprechend nach dem Polyisoprenanteil des PI-*b*-PEOs ausgewählt, das zum Einsatz bei der Verkapselung genutzt werden kann. In einem organischen Lösungsmittel, welches mischbar mit Wasser sein muss und die NP nicht beschädigt (z.B. THF), werden die PI-DETA stabilisierten NP zusammen mit dem DBC gelöst. Bei der Überführung in Wasser treten die Polyisoprenketten des PI-DETAs und des DBCs in Wechselwirkung und bilden einen schützenden hydrophoben Kern, der den direkten Kontakt der Nanopartikel mit Wasser weitgehend verhindert. Der entstandene NC ist durch das PI geschützt und durch das PEO in Wasser gelöst (s. Abb. 4). Nach einer thermisch angeregten radikalischen Quervernetzung der Polyisoprene des DBCs und des PI-DETAs werden stabile Mizellen erhalten, die nicht länger der kritischen Mizellkonzentration unterliegen und stark verdünnt werden können.<sup>[45]</sup>

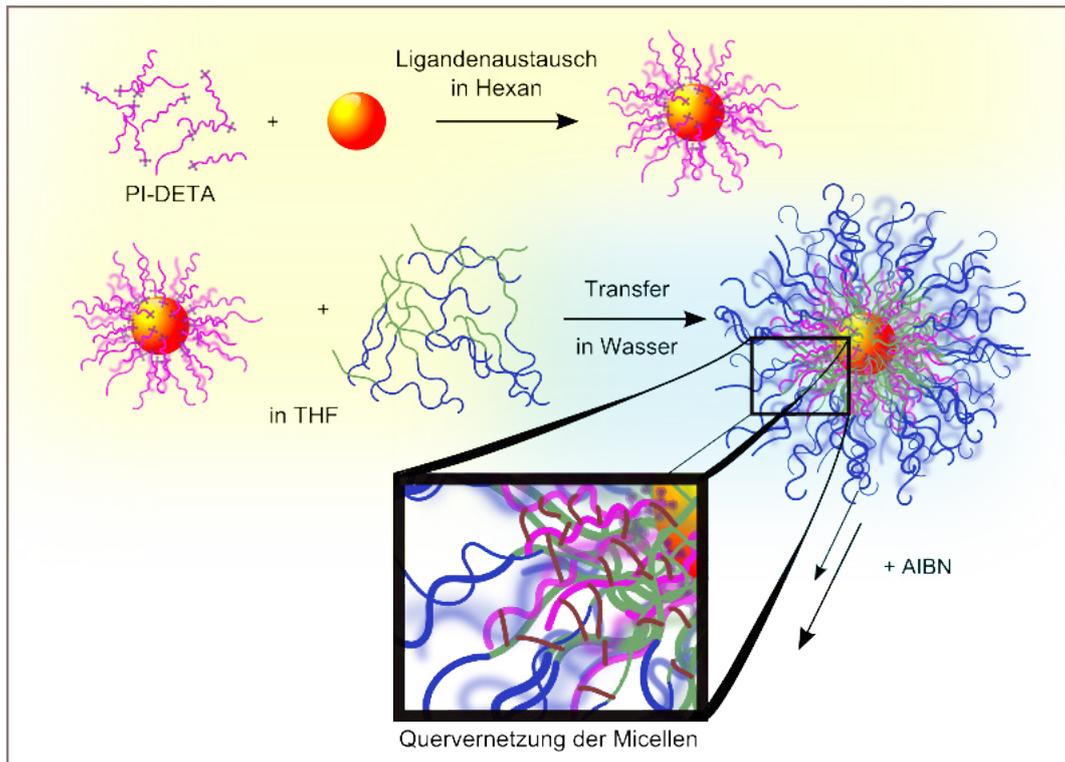


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verkapselung von NP. Im ersten Schritt findet ein Ligandenaustausch mit PI-DETA statt. Darauf folgt die mizellare Verkapselung der NP durch das amphiphile DBC. Zur Stabilisierung der NC erfolgt eine thermische radikalische Quervernetzung mit AIBN.

## 2.6. Funktionalisierung der Nanocontainer

Das übergeordnete Ziel für eine erfolgreiche Studie *in vitro* oder *in vivo* ist es einen Nanocontainer zu erschaffen, der keinerlei unspezifische Bindungen zeigt und die Zellen nicht schädigt sowie die Erhaltung der Fluoreszenz. Erst durch eine Funktionalisierung der Polymerhülle mit einem Affinitätsmolekül (AM) beispielsweise einem Glycosid, Aptamer oder Antikörper wird eine zielgerichtete Adressierung möglich.

Zur Kopplung dieser AM gibt es grundsätzlich zwei Methoden, die unterschieden werden können.

### 2.6.1. Funktionalisierung am fertigen Nanocontainer - *post-assembly*

Zum einen lässt sich eine Funktionalisierung am fertigen NC durchführen. Die Kopplung wird dabei im wässrigen System durchgeführt (s. Abb. 5). Meist werden große und empfindliche Biomoleküle, wie beispielsweise Antikörper über dieser Methode gekoppelt. Die Anzahl der gekoppelten Moleküle kann hier stark variieren. Die Analytik

mittels NMR ist erschwert, weil die Affinitätsmoleküle direkt an den NC gekoppelt werden und nur als Gesamtkonstrukt analysiert werden können. Dies ist generell möglich, erfordert aber größere Mengen.

Des Weiteren erfolgt die Kopplung meist über die Aminogruppen der Aminosäuren des Proteins, sodass mehrere Gruppen reagieren können und keine Kontrolle über die Position möglich ist. Durch diese Form der Kopplung kann es zu einer Blockierung von bindungsfähigen Sequenzen am Affinitätsmoleküle kommen oder zu einer Änderungen der Faltung, die ebenfalls zu einem Verlust der Bindungsaffinität zu der Zielstruktur führen kann.

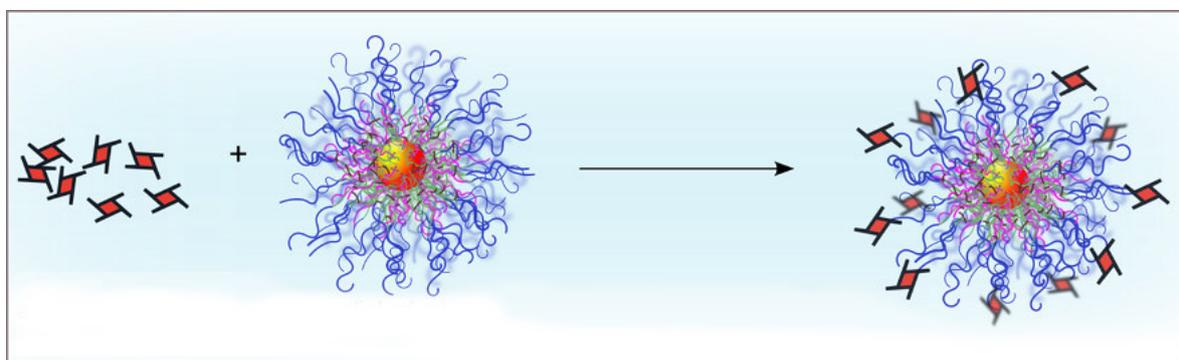


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der NC nach der Verkapselung, dass sogenannte *post-assembly*.

### 2.6.2. Funktionalisierung am Polymer vor der Verkapselung - *pre-assembly*

Ein weiterer Weg zur Funktionalisierung ist die Kopplung der AM an die DBC vor der Verkapselung der NC (s. Abb. 6). Dies erfolgt über organische Synthesen, die flexibel angepasst werden können. Freie Edukte und ungebundene AM können in der Reinigung entfernt werden. Lösungsmittel und Katalysatoren lassen sich frei wählen und so der Umsatz steigern. Zur Analytik werden nur geringe Mengen benötigt, die Umsätze lassen sich mittels NMR bestimmen. In einer Abmischung mit unfunktionalisierten Polymeren kann somit die Anzahl der AM auf der Oberfläche kalkuliert werden. Diese Methode eignet sich besonders gut für kleinere stabile Moleküle, die auch später bei der Verkapselung wenig Einfluss auf die Bildung der Mizellen ausüben und für die die radikalische Quervernetzung kein Problem darstellen.

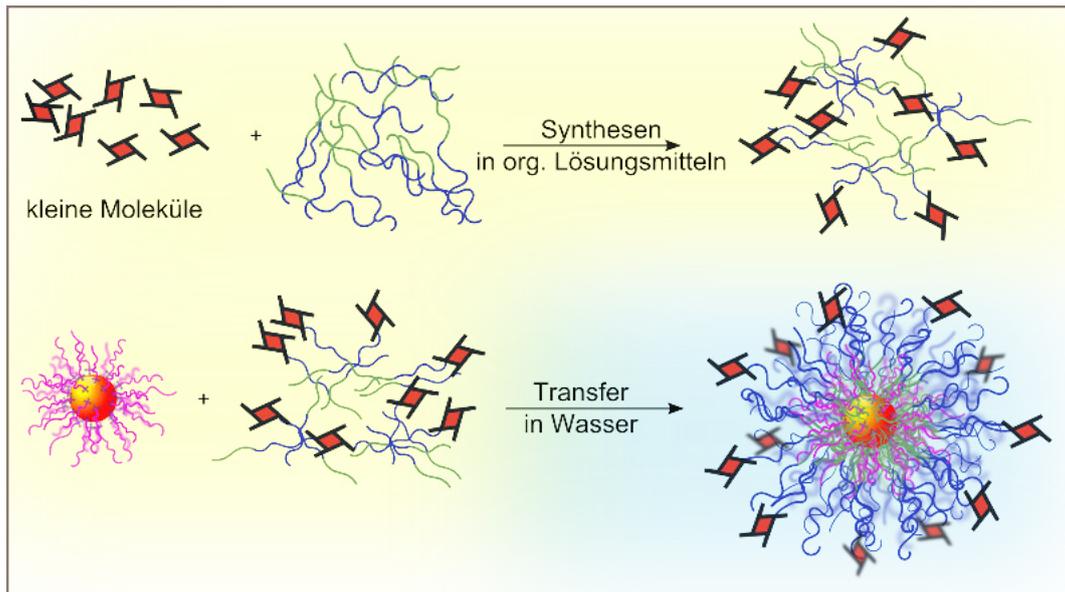


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der DBC in organischen Synthesen, um anschließend NP zu verkapseln und einen funktionalisierten NC zu erhalten.

Eine weitere schonende Variante ist eine Mischung aus beiden Methoden. Bei der bioorthogonalen Kopplung werden die Vorteile des *pre-* und *post-assemblies* vereint.

## 2.7. Bioorthogonale Kopplung

Bei der bioorthogonalen Kopplung werden größere biologische Strukturen mit dem NC wie in Abbildung 5 verbunden. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, bei dem nach der Verkapselung der Nanopartikel nur eine gezielte Kopplung, mit einzelnen funktionellen Gruppen oder kleinen Molekülen, stattfindet. Dadurch wird eine Kontrolle über die Anzahl der gekoppelten Strukturen möglich. Faltung und Bindungsfähigkeit werden weniger beeinträchtigt durch diese Methode.<sup>[58]</sup> Dazu zählen auch üblich chemische Reaktionen wie die EDC, NHS-Kopplung<sup>[59]</sup> oder Click-Chemie.<sup>[60–65]</sup>

Im Folgenden werden drei unterschiedliche Methoden vorgestellt, die zur bioorthogonalen Kopplung am NC genutzt werden können und für diese Arbeit relevant sind.

- Proteine, die eine kovalente Bindung über ein kleines AM eingehen können.
- Proteine mit einer starke nichtkovalente Wechselwirkung zu einem kleinen AM.
- Kopplung über die Hybridisierung von komplementären DNA-Strängen.

### 2.7.1. Kovalente Kopplung durch Proteine

Bei Proteinen handelt es sich um lineare Makromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Ihre Funktionen im lebenden Organismus sind sehr vielfältig beispielsweise dienen sie zum Transport und zur Speicherung von Molekülen oder Ionen. Sie kommen in Form von Antikörpern oder Katalysatoren bei der Signalübertragung und Koordinierung von Wachstumsprozessen zum Einsatz.<sup>[66]</sup>

Proteine die eine kovalente Bindung eingehen, sind in der Biochemie beispielsweise als SNAP-, Halo- oder Clip-tag bekannt. Diese Proteine haben die Eigenschaft mit einer funktionellen Gruppe oder einem Molekül zu reagieren.<sup>[67]</sup>

Den Ursprung für den SNAP-tag bildet das Reparaturenzyms *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT). Dieses ist in der Lage eine beschädigte DNA an Guanosinen durch die Markierung von *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) zu erkennen und stellt eine kovalente Bindung her.<sup>[54,68]</sup> Der Mechanismus spielt im Körper eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um ein Zusammenspiel von mehreren Vorgängen, um die defekte DNA zu reparieren.

In einem biochemischen Verfahren lassen sich Fusionsproteine aus dem SNAP und einem gewünschten Protein herstellen. Dazu werden die DNA-Sequenzen des Zielproteins mit der des SNAPs in einem Plasmid verbunden und über Bakterien als ein zusammenhängendes Protein translatiert.<sup>[69]</sup>

Es besteht die Möglichkeit, den SNAP mit einem fluoreszierenden Proteine zu verknüpfen und eine Zielstruktur anzusteuern, die einen BG-Rest trägt. Der Einsatz von solchen Markierungsenzymen ist heutiger Alltag in der biochemischen Anwendung. Es konnte die spezifische Markierung durch fluoreszierende Farbstoffe in lebenden Zellen<sup>[70]</sup> oder sogar im Tier über den SNAP-tag bereits gezeigt werden.<sup>[71]</sup> Die Markierung über ein SNAP-Fusionsprotein, das an einen Zellrezeptor bindet und anschließend über den SNAP eine Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes ermöglicht, ist schematische in Abbildung 7 dargestellt. Die Verknüpfung dieser Markierungssysteme und Nanomaterialien eröffnet auch hier die Möglichkeit deren besondere Eigenschaften für die biochemische und medizinische Forschung nutzbar zu machen.<sup>[72]</sup>

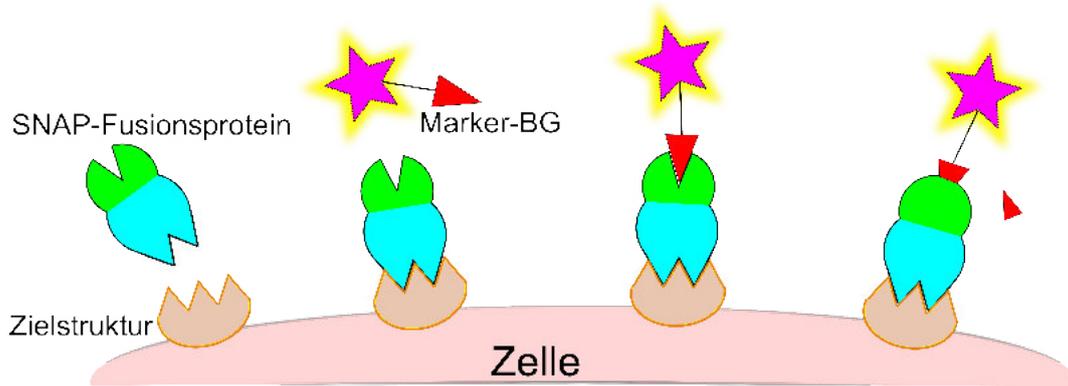


Abbildung 7: Das gewünschte Protein bindet an die Zielstruktur auf einer Zelle durch die anschließende Zugabe eines Benzylguanin gekoppelten Markers findet eine kovalente Kopplung über das SNAP-Protein mit dem BG-Marker statt.

### 2.7.2. Betrachtung von Protein-Interaktion für die Klasse der Avidine

Eine prominente Vertretung für eine der stärksten bekannten Wechselwirkungen bei Proteinen stellt die Klasse der Avidine zu Biotin, mit einem  $K_D$  Wert von  $10^{-15}$  M, dar. Erstmals untersuchten 1963 Green et. al. umfangreich die Wechselwirkung von Biotin und Avidin.<sup>[73]</sup> Biotin (Mw = 244.31 g/mol), das als Vitamin H bezeichnet wird, ist als Cofaktor an Stoffwechselprozessen beteiligt und unerlässlich für den menschlichen Körper.<sup>[74]</sup> Avidin ist ein natürlich vorkommendes Protein, das beispielsweise in Hühnereiern im Eiklar zu finden ist. Es liegt als Tetramer (67 kDa) vor und ist in der Lage, vier Biotine zu binden. Die Bindung von Biotin ist nahezu irreversibel und nur durch einen hohen Überschuss von freiem Biotin wieder zu lösen. Das natürliche Avidin ist ein positiv geladenes Glycoprotein (bei neutralem pH-Wert) mit einem pI von 10.5.<sup>[75,76]</sup> Avidin sowie der Biotin-Avidin Komplex sind über einen großen pH und Temperaturbereich sehr stabil<sup>[77]</sup> und werden aus dem Körper unverstoffwechselt wieder ausgeschieden, wodurch es bis in den Darm gelangt und die Ursache für Biotinmangelerscheinung sein kann.

Es ist möglich Avidine über *Streptomyces avidinii* Bakterien zu gewinnen. Dieses wird dann als Streptavidin (Strep.) bezeichnet.<sup>[78,79]</sup> Streptavidin (ca. 60 kDa) ist Avidin in Faltung und Struktur sehr ähnlich. Der  $K_D$  ist etwas größer ( $10^{-13}$  M) und es weist einen pI von 5-6 auf.<sup>[80]</sup> Die Ladung von Strep. ist bei neutralen bis basischen Puffersystemen negativ. Durch die Herstellung aus Bakterien trägt Strep. keine Glycoside, dies hat den Vorteil, dass unspezifische Wechselwirkungen mit Zelloberflächen Rezeptoren verringert

werden. Allerdings weist Strep. eine RYD-Aminosäuresequenz aus Arginin, Tyrosin und Asparaginsäure auf, die ähnlich ist zur sogenannten RGD-Sequenz, bestehend aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure und eine Wechselwirkung mit Zelladhäsionsmoleküle eingeht.<sup>[81]</sup> Als attraktive Alternative wird daher NeutrAvidin (NAvi) (60 kDa, pI 6.3 ThermoScience Fischer US) genutzt, dabei handelt es sich um die deglycosidierte Form des Avidins, die diese Sequenzen nicht beinhalten.<sup>[82,83]</sup> Unspezifische Wechselwirkungen mit Zelloberflächen sind somit stark minimiert im Vergleich zu Avidin und Streptavidin.

Größere biotinylierte Affinitätsmoleküle, wie Aptamer und Antikörper, können leicht und spezifisch an Nanocontainer gekoppelt werden (s. Abb. 8). Dazu werden biotinylierte Polymere zur Verkapselung der Nanopartikel eingesetzt, das NeutrAvidin dient als Bindeglied, um ein ebenfalls biotinyliertes AM zu koppeln.

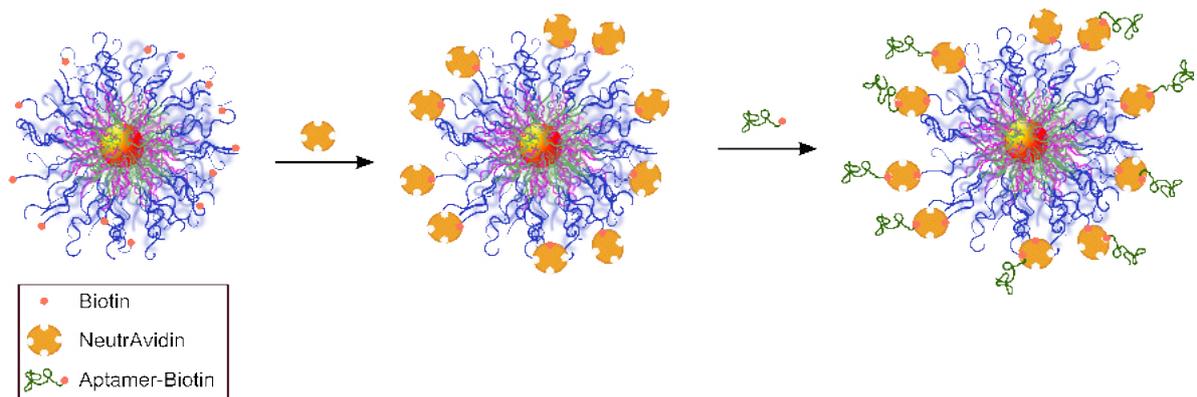


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kopplung von NeutrAvidin an einen biotinylierten Nanocontainer, sowie darauf folgende Kopplung der biotinylierten Aptamere an freie Bindungsstellen des NeutrAvidins.

### 2.7.3. Hybridisierung über DNA Gegenstränge

Desoxyribonukleinsäure (DNA) liefert genetische Informationen und enthält die Grundinformationen für die Proteinsynthesen.<sup>[84]</sup>

Ebenso wie Proteine handelt es sich bei DNA und Ribonukleinsäure (RNA) um Biopolymere, die natürlich vorkommen und wichtige Funktionen im Körper erfüllen. Die Herstellung von kurzen Proteinen (Peptiden), RNA- und DNA-Strängen ist in biochemischen Verfahren, aber auch in automatisierten Anlagen über Festphasensynthesen möglich.<sup>[85,86]</sup>

Die Monomereinheiten der DNA werden als Nukleoside bezeichnet, die aus dem Zucker Desoxyribose und einer Base gebildet werden. Die Nukleoside sind über ein Phosphat-ester miteinander verknüpft und werden dann als Nukleotide (nt) bezeichnet, die durch die vier Basen Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) sowie Guanin (G) von einander unterschieden werden.<sup>[84]</sup> Ein einzelner DNA-Strang kann durch mit einem passenden Gegenstrang über die Basenpaarung A-T und C-G zum Doppelstrang (dsDNA - doppelsträngige DNA) hybridisieren.<sup>[87]</sup> Die Stabilisierung des Doppelstrangs zur Doppelhelix erfolgt neben der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren maßgeblich durch die hydrophobe Wechselwirkung der Basen im Inneren der Helix. Die nach Außen zum Wasser gerichteten, polaren Phosphatreste verleihen der DNA eine negative Gesamtladung.<sup>[84]</sup> Die Zunahme der Entropie durch die freiwerdenden Wassermoleküle bei der Selbstorganisation zum Doppelstrang ist ein thermodynamischer Prozess, der durch Erhitzen wieder destabilisiert werden kann. Die einzelsträngige DNA (ssDNA) ist als Molekül gesehen hitzestabil. Die sogenannte Schmelztemperatur ( $T_m$ -Wert), zum thermischen, reversiblen Denaturieren des Doppelstrangs bezieht sich dabei auf die Temperatur, bei der die Hälfte der dsDNA wieder als ssDNA vorliegt. Je länger die Sequenz der dsDNA ist, desto höher ist der  $T_m$ -Wert.<sup>[84]</sup>

Auch der Einzelstrang kann über die Basenpaar mit sich selbst Faltstrukturen ausbilden, dieses Verhalten kann bei der Bindungsfähigkeit von DNA-Aptameren eine Rolle spielen. DNA- und RNA-Aptamere (ca. 100 nt) sind interessante Verbindungen, die eine spezifische Bindung ausbilden und einen Rezeptor gezielt blockieren können, zum Beispiel das rekombinante humane E-Selektin (rh E-Sel.)<sup>[88]</sup>

Kurze DNA-Sequenzen mit 20-30 nt sind kostengünstig in der Herstellung, bilden statistisch weniger Faltstrukturen mit sich selbst aus und haben eine geringere Schmelztemperatur (ca. 60 °C). Die Länge und somit geringere Schmelztemperatur ist bei der Anwendung am Nanocontainer ein wichtiger Punkt, der beachtet werden muss, um den NC bei Hybridisierung bzw. Denaturierung der DNA durch das Erhitzen nicht zu beschädigen.

Interessante Beispiele, die durch eine geschickte Wahl der DNA-Sequenzen und deren Hybridisierungen hergestellt wurden, sind Strukturen in Form von Quadraten,<sup>[89]</sup> Hybridmaterialien aus DNA und Polymeren mit amphiphilem Charakter<sup>[86,90,91]</sup> oder pH-Sensoren durch Funktionalisierung mit Farbstoffen.<sup>[92]</sup>

Als eindrucksvolles Beispiel sind beispielsweise Goldnanopartikel zu nennen, die mit DNA-Sequenzen über eine Thiolankergruppe versehen werden und zu Pyramiden angeordnet werden konnten, um deren optische Eigenschaften zu untersuchen.<sup>[93]</sup>

## 3. Theorie II - Physikalische Grundlagen zu Quantum Dots

Nanostrukturen zeichnen sich durch ihre besonderen Eigenschaften aus, die sich physikalisch zwischen denen von Atomen und Festkörpern bewegen. Fluoreszierende Quantum Dots bestehen aus einer geringen Anzahl von 100 - 10 000 Atomen und können aus einer Vielzahl von Halbleitermaterialien bestehen, wie beispielsweise Cadmiumselenid (II-VI), Indiumphosphid (III-V) oder Bleiselenid (IV-VI).<sup>[94]</sup> Die Anzahl der Oberflächenatome ist im Verhältnis zum Volumen sehr groß und ist maßgeblich für die Eigenschaften von Nanopartikel verantwortlich.<sup>[29]</sup>

Ein Quantum Dot (QD) oder auch Quantenpunkt ist in seiner räumlichen Begrenzung in allen Dimensionen gleich und wird als 0D-Struktur bezeichnet. Neben QDs gibt es z.B. Quantum Rods (Stäbchen), die durch ihre elongierte Form eine Dimension aufweisen und als 1D-Struktur bezeichnet werden. Des Weiteren lassen sich 2D-Strukturen (Scheiben und Plättchen) sowie 3D-Struktur (makroskopische Festkörper) unterscheiden.<sup>[95]</sup> QDs weisen eine größenabhängige Fluoreszenz auf, die nachfolgend anhand des Größenquantisierungseffekts näher beschrieben wird. Die Namensgebung der Quantum Dots bezieht sich dabei auf die quantenmechanische Betrachtung, mit der die physikalischen Eigenschaften aufgrund ihrer räumlichen begrenzten Ausdehnung (1-10 nm) beschrieben werden können.

### 3.1. Quantenmechanische Betrachtung von Quantum Dots

Die Quantisierung in diskrete Energieniveaus bei Atomen und Molekülen kann in Form von Orbitalen grafisch dargestellt werden und ermöglicht ebenfalls die Beschreibung von Festkörpern mit einer großen Anzahl von Atomen über das Bändermodell.

Bei der Linearkombination mehrerer benachbarter Atomorbitale (LCAO - *linear combination of atomic orbitals*) wird immer die gleiche Anzahl an Molekülorbitalen erhalten, wie Atomorbitale die dazu beitragen. Ausgehend von Grundzustand ( $T = 0$  K) wird das niedrigste unbesetzte Molekülorbital als LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) und das höchste besetzte Molekülorbital als HOMO (*highest occupied molecular orbital*) bezeichnet. Bei kristallinen Festkörpern geht die Anzahl der Atome gegen unendlich,

die nach dem LCAO-Modell zu Molekülorbitalen kombiniert werden und als kontinuierliche Bänder, in Form des Leitungs- (LB) und Valenzbandes (VB), dargestellt werden (s. Abb. 9). Die Oberkante des Valenzbandes ist dabei mit dem HOMO gleichzusetzen und das LUMO mit der Unterkante des Leitungsbandes. In einem Leiter überlappen diese Bänder, sodass sich elektrische Ladungsträger in beiden Bändern bewegen können (s. Abb. 9). Sind die Bänder von einander getrennt, wird ihre Energiedifferenz als Bandlücke dargestellt. Die Bandlückenenergie eines Halbleiters liegt zwischen 0 eV und 4 eV. Bei einer Energie über 4 eV werden Materialien als Isolatoren bezeichnet.<sup>[96,97]</sup>

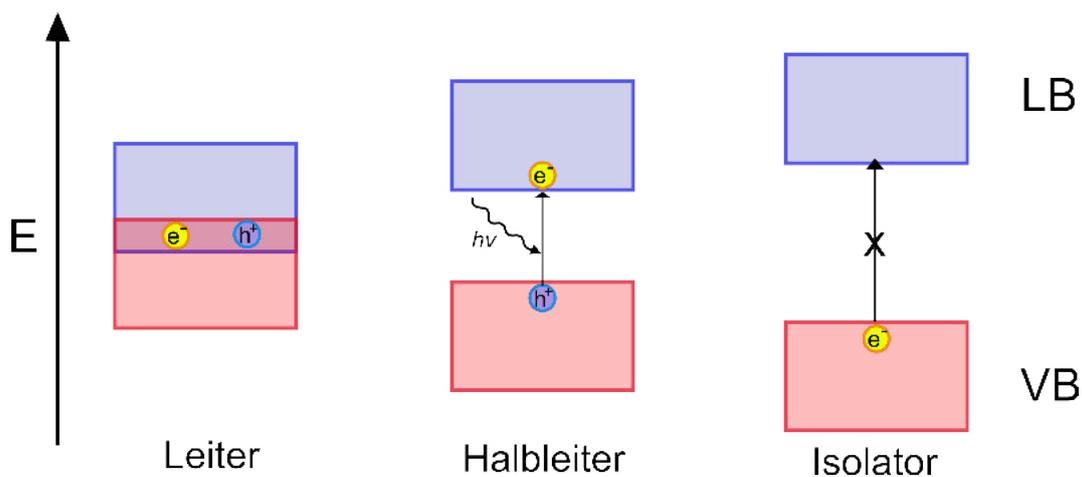


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Bändermodells bei Festkörpern mit unterschiedlichen Bandlücken und der Einteilung von Leiter, Halbleiter sowie Isolator.

Für einen makroskopischen Halbleiter gilt im Grundzustand ohne Anregung und thermischen Einfluss, dass das VB vollständig mit Elektronen gefüllt und das Leitungsband unbesetzt ist. In diesem Fall ist keine elektrische Leitfähigkeit vorhanden. Durch thermische Anregung eines Elektrons aus dem VB in das LB ist ein Stromfluss möglich, der sowohl auf das Elektron, als auch auf die zurückgelassene positive Fehlstelle (Loch) als Ladungsträger zurückzuführen ist.

Nanopartikel können weder Molekülen noch Festkörpern zugeordnet werden, sondern liegen dazwischen und weisen demzufolge Eigenschaften von beiden Klassen auf (s. Abb. 10).<sup>[29]</sup>

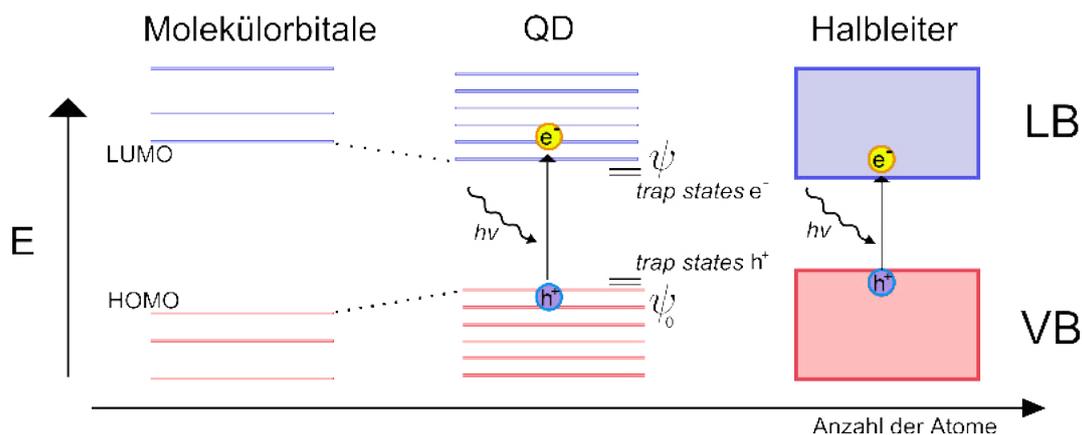


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Bändermodells bei Halbleitern als makroskopische Festkörpern sowie Quantisierung in Energieniveaus mit größerer Aufspaltung der Bandlücke in einem Quantum Dot hervorgehend aus der Linearkombination der Atomorbitale im Molekül.

### Größenquantisierungseffekt

Eine der theoretischen Grundlagen der Quantenphysik beschreibt Albert Einstein bereits 1905 in einer seiner Veröffentlichungen, die besagt, dass „(...) die Energie des Lichtes diskontinuierlich im Raume verteilt sei.“ und „(...) einer endlichen Zahl von in Raumpunkten lokalisierten Energiequanten, welche sich bewegen, ohne sich zu teilen und nur als Ganze absorbiert und erzeugt werden können.“<sup>[98]</sup>

Einstein beschreibt damit photoelektrische Phänomene durch Lichtquanten, die sich über die klassische Physik nicht erklären lassen. Demzufolge kann die Anregung eines Elektrons durch ein Photon mit einer bestimmten Wellenlänge, seine Energie nur gequantelt übertragen und verhält sich somit gleichzeitig wie ein Teilchen. Nach Louis de Broglie kann ein Teilchen über den Welle-Teilchen-Dualismus beschrieben werden,<sup>[99]</sup> wobei der Wellencharakter nur im submolekularen Bereich relevant ist.

Eine der Grundlagen der Quantenmechanik stellen Wellenfunktionen dar. Über eine Wellenfunktion ( $\psi$ ) können die Eigenschaften innerhalb eines räumlich begrenzten Systems beschrieben werden. Die Funktion beschreibt eine Welle für ein Teilchen, deren Aufenthaltswahrscheinlichkeit sich für einen begrenzten Ort und Zeitpunkt aus dem Betragsquadrat der Wellenfunktion ( $|\psi|^2$ ) berechnen lässt.<sup>[100]</sup>

In einem kristallinen Festkörper (3D-Strukturen) kann sich z.B. ein Elektron (Teilchen) im ganzen Material delokalisiert aufhalten. Bei einem Quantum Dot (OD-Struktur)

kommt es zu einer lokalen Begrenzung der Wellenfunktion, die im Nanopartikel wie beim „Teilchen-im-Kasten“ zu allen Seiten auf sehr hohe Potentialwände trifft. Dadurch kommt es zu einer Quantisierung in diskrete elektronische Niveaus, die sich über die Schrödinger-Gleichung berechnen lassen.<sup>[101]</sup>

Wie bereits in Abb. 10 angedeutet, weisen QDs eine Bandlücke auf, die durch die Quantisierung größer ist als die des makroskopischen Festkörpermateriale. Die Bandlücke verändert sich dabei stark mit dem Durchmesser des QDs und kann über den Größenquantisierungseffekt beschrieben werden.<sup>[102,103]</sup> Bei Nanopartikeln aus CdSe zeigt sich größenabhängig zwischen ca. 2 - 7 nm eine Änderung der Emissionsbande im sichtbaren Bereich des Lichtes von 420 - 650 nm (s. Abb. 11).

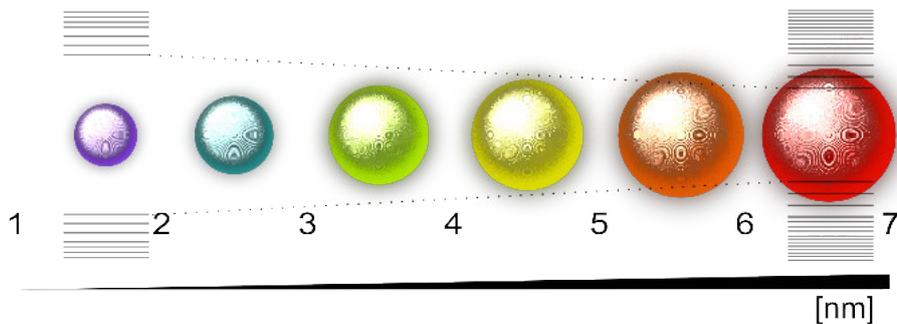


Abbildung 11: Bildliche Darstellung der Farben des emittierenden Lichtes bei Änderung der Partikelgröße von CdSe zwischen ca. 2 - 7 nm im sichtbaren Bereich mit Wellenlängen von 400-700 nm.

Je kleiner die Partikel werden, desto größer ist die Aufspaltung der Energieniveaus und der Bandlücke, die das elektronenbesetzte Valenzband und das unbesetzte Leitungsband voneinander trennt. Bei der Anregung eines Elektrons in das Leitungsband wird ein Elektron-Loch-Paar, ein sogenanntes Exziton, gebildet. Das Elektron ( $e^-$ ) und das Loch ( $h^+$ ) bewegen sich in einem bestimmten Radius zueinander. Dieser sogenannte Bohr-Radius ist eine stoffspezifische Größe. Die Anziehungskraft zwischen Elektronen und Loch lässt sich über das Coulomb-Gesetz beschreiben. Das Elektronen-Loch-Paar kann sich ungehindert im 3D-Festkörper bewegen.<sup>[104-106]</sup>

Bei der Betrachtung des Exzitons in einem Nanopartikel, dessen Durchmesser kleiner ist als der Exziton-Bohr-Radius, kommt es zu verstärkten Coulomb-Wechselwirkungen aufgrund der räumlichen Eingrenzung. Das Elektron-Loch-Paar erfährt eine Erhöhung der

kinetische Energie und die Bandlücke vergrößert sich. Die Berechnung der Änderung der Bandlücke in Abhängigkeit der Partikelgröße ist durch die Brus-Formel möglich.<sup>[107,108]</sup>

$$\Delta E = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2R^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r R} \quad (1)$$

Die Differenz der Energie ( $\Delta E$ ) der Bandlücke des Festkörpermaterials zum Nanopartikel lässt sich durch  $R$ , den Partikelradius,  $\epsilon_r$ , die Hochfrequenz-Dielektrizitätskonstante des Materials,  $m_e^*$  und  $m_h^*$ , die effektiven Massen des Elektrons und Lochs.<sup>[108,109]</sup>

Mit der Verringerung des Durchmessers der Partikel vergrößert sich die Bandlücke und das emittierende Photon weist eine höhere Energie auf. Bei einem Halbleiternanopartikel lässt sich anhand des ersten Absorptionsmaximums die Größe der Partikel abschätzen.<sup>[110]</sup>

### 3.2. Fluoreszenz

Zur Fluoreszenz kommt es wenn ein Photon ein Elektron anregt und dieses Elektron dann wieder unter Aussenden eines neuen Photons in den Grundzustand relaxiert. Das angeregte Elektron aber auch strahlungslos seine Energie als Wärme an die Umgebung in Form von Schwingungs-, Translations- und Rotationsenergie abgeben.<sup>[111]</sup>

Quantum Dots weisen ein hohes Absorptionsvermögen über einen großen Spektralbereich auf.<sup>[112]</sup> Ein Elektron kann durch ein Photon mit der Energie  $E_A = h\nu_A$  innerhalb des Leitungsbands in einen höheren angeregten Zustand angehoben werden und strahlungslos über Gitterschwingungen in den ersten angeregten Zustand ( $\psi^*$ ) des LBs relaxieren, bevor es in den Grundzustand zurück fällt. Das emittierte Photon ( $E_F = h\nu_F$ ) weist somit eine geringere Energie auf als das absorbierte Photon ( $E_A > E_F$ ). Dieser Vorgang wird als Stokes-Shift oder auch als Rotverschiebung bezeichnet (s. Abb. 12).<sup>[113]</sup>

In einem Kristallgitter kann es durch Fehlstellen oder Fremdatome zu Haftstellen (*trap states*) kommen, in denen sich sowohl Löcher als auch angeregte Elektronen aufhalten können (s. Abb. 12). Ein Elektron kann direkt aus einer Haftstelle unter Strahlung relaxieren oder durch thermische Energie wieder in den ersten angeregten Zustand ( $\psi^*$ ) angehoben werden und anschließend unter Aussendung eines Photons ( $h\nu_F$ ) relaxieren.

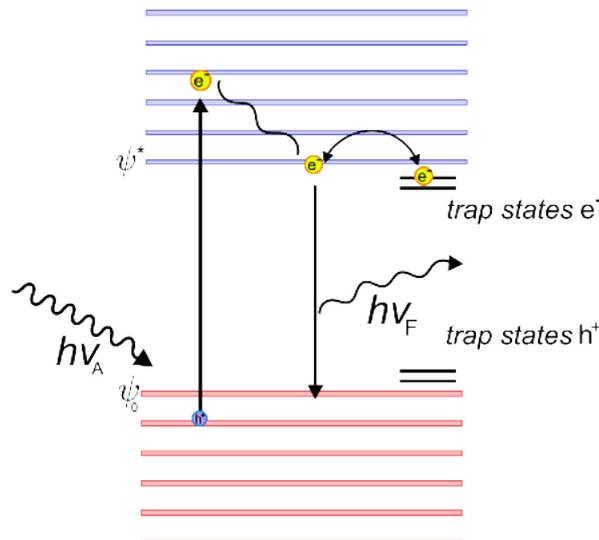


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Absorption eines Photons ( $h\nu_A$ ) unter Anregung eines Elektrons aus dem VB in das LB in einem Halbleiter-Nanopartikel, welches strahlungslos in den ersten angeregten Zustand  $\psi^*$  relaxiert und anschließend in den Grundzustand  $\psi_0$  unter Abgabe eines Photons ( $h\nu_F$ ) mit einer geringeren Energie emittiert.

Bei einheitlichen Halbleiter-NP mit gleicher Bandlücke, können Emissionsspektren in einem schmalen Wellenlängenbereich erhalten werden. Der Stokes-Shift und der hohe Absorptionskoeffizient bei niedrigen Wellenlängen ermöglicht die Anregung mehrerer QDs mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen. Daher eignen sich QDs besonders für das sogenannte Multiplexing, bei dem mehrere Bereiche mit unterschiedlichen Farben z.B. in einer Zelle markiert und gleichzeitig nebeneinander detektiert werden.<sup>[94,114,115]</sup>

### 3.3. CdSe/CdS/ZnS - *core/shell/shell* Nanopartikel

Das große Verhältnis der Oberfläche zum Volumen von NP führt dazu, dass sich Fehlstellen an der Oberfläche verstärkt auf die Eigenschaften des NPs auswirken. Die Gitterstruktur hat an der Oberfläche häufiger Defekte, die zu den *trap states* führen und strahlungslose Rekombinationen des Exzitons begünstigen können.

Durch die Kenntnisse über die Gitterparameter eines Materials ist es möglich, gezielt die optischen Eigenschaften von QDs zu verbessern. Ein Beispiel sind Kern-Schale-Schale (engl. *core/shell/shell*) QDs. Um auf einen Kern aus Cadmiumselenid eine gleichmäßige stabile Zinksulfidschicht zu erhalten, wird zunächst vorher eine Schale aus Cadmiumsulfid aufgebracht, da die Gitterparameter zwischen CdSe und CdS kleiner sind als zwischen CdSe und ZnS. Fehlstellen an der Oberfläche der CdSe/CdS QDs werden abgesättigt. In nasschemischen Synthesen konnte Talapin *et al.* einheitliche, sphärische *core/shell/shell* CdSe/CdS/ZnS Quantum Dots mit einer Fluoreszenzquantenausbeute (QY) von 70-85% darstellen.<sup>[116]</sup>

Die hohen QY werden durch die Stabilisierung und Lokalisierung des Exzitons im Kern durch das Schalenmaterial aus Zinksulfid erzielt, das eine größere Bandlücke als CdSe und CdS aufweist (s. Abb. 13). Ein weiterer Vorteil ist, dass Zinksulfid als toxisch unbedenklich gilt und somit die giftigen Cadmiumionen umhüllt werden.<sup>[117]</sup>

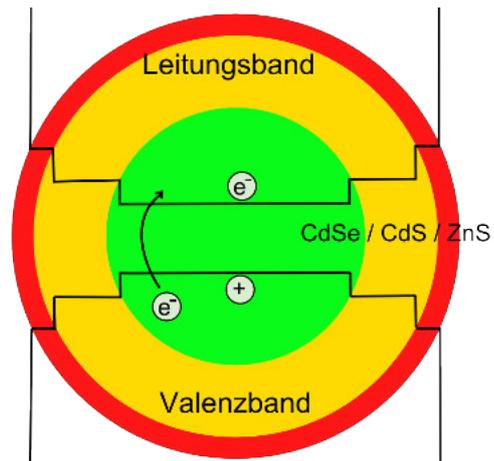


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines *core/shell/shell* Quantum Dots sowie die Bandlagen der unterschiedlichen Halbleitermaterialien (CdSe/CdS/ZnS) im Verhältnis zu einander.

## 4. Motivation

Fluoreszierende Quantum Dots kennzeichnen sich durch ihre hohe Photostabilität, ihr breites Absorptionsspektrum, ihre schmalen Emissionsbanden sowie eine große modifizierbare Oberfläche aus und ermöglichen dadurch eine immer genauere Bildgebung, die beispielsweise in medizinischen Grundlagenforschung zum Einsatz kommt.

Durch eine Kombination aus physikalischen Bestimmungen und *in vivo* Experimenten werden wichtige Informationen gesammelt. Sowohl Zellversuche als auch *in vivo* Studien sind notwendig, um den Einfluss verschiedener Faktoren, wie Blutflussgeschwindigkeiten, Proteincoronabildung, Zirkulationszeiten, Anreicherung in Gewebe und Organen etc. abschätzen zu können.

Anschließend lassen sich einzelne Faktoren genauer betrachten und physikalische Grundlagen erforschen, die als Basis für eine individuellen Anwendung in der Diagnostik und Therapie beim Menschen dienen. Der Weg dahin erfordert eine interdisziplinäre Arbeitsweise.

Diese Arbeit zeigt erste Resultate, um eine Eingrenzung von Faktoren zu ermöglichen. Des Weiteren werden Anwendung und Analyse von biologischen Substanzen in Verbindung mit anorganischen fluoreszierenden Quantum Dots über eine Modifikation der Polymeraussenhülle gezeigt.

Dabei sind sowohl das Erhalten der Fluoreszenz der Quantum Dots als auch deren Stabilität im wässrigen System eines der wesentlichen Ziele. Des Weiteren ist es notwendig, die Kopplungsmethode dem Wirkstoff (Glycosid, DNA, Protein) anzupassen und zu ermitteln, ob die Strukturen ihre Zielstrukturen anschließend noch erkennen.

In dieser Arbeit werden Systeme mit einander kombiniert, die jedes für sich mit einer langen Entwicklung und Optimierung vorangegangen sind. Ziel ist es, weitere Grundlagen für eine spätere medizinische Anwendung und Forschung durch Nanopartikel zu schaffen und besonders die Anforderungen an funktionalisierte Nanocontainer näher zu beleuchten.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Funktionalisierung der Diblockcopolymeren, die für die Verkapselung der Nanopartikel verwendet werden.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnis- und Diskussionsteil gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt wird zunächst auf die Anforderungen der Kopplung von Polymeren mit kleinen Affinitätsmolekülen eingegangen. Im zweiten Abschnitt folgt die Betrachtung der Kopplung von großen Affinitätsmolekülen wie Aptameren und Proteinen an fertig verkapselte Quantum Dot (QD) bzw. Quantum Dot Quantum Rod (QDQR) Nanocontainer. Im dritten Abschnitt wird die Bindungsfähigkeit der gekoppelten AM auf ihre jeweilige Zielstruktur untersucht.

Es werden alternative Lösungswege basierend auf etablierten Methoden vorgestellt und dabei auf die Besonderheiten beim Umgang mit Nanopartikeln eingegangen. Außerdem werden Schwierigkeiten aufgezeigt, die in Zukunft zu beachten sind, um eine erfolgreiche Forschung im medizinischen Bereich durch Nanopartikel zu gewährleisten.

### Abschnitt I - Strategie und Planung der organischen Synthese von kleinen Affinitätsmolekül (AM) mit PI-*b*-PEO sowie Verkapselung von Nanopartikeln

#### 5.1. Diblockcopolymer Poly(isopren-*block*-ethylenoxid)

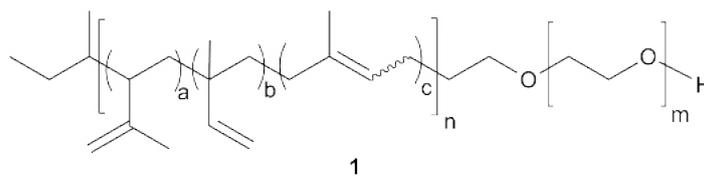


Abbildung 14: Struktur des Diblockcopolymer PI-*b*-PEO **1** .

Organische Synthesen mit Polymeren weisen aufgrund des hohen Molekulargewichts einige Besonderheiten auf. Zum einen ist auf die Löslichkeit der Polymere zu achten. Dabei ist zu bedenken, dass sich Polymere knäueln und funktionelle Gruppen dadurch schwerer zugänglich sein können. Auch die Temperatur kann einen Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten haben. Zum anderen ist allgemein die Viskosität der Lösung, z.B. bei mechanischen Rührvorgängen, erhöht.

Bei der Syntheseplanung mit amphiphilen Diblockcopolymeren (DBC) muss beachtet

werden, dass es zur Bildung von Überstrukturen, wie Mizellen (s. Abschnitt 2.4) kommen kann.

### 5.1.1. Löslichkeit der Diblockcopolymeren

In sehr einfachen Vorversuchen wurde unter anderem das Löslichkeitsverhalten des Diblockcopolymeren in gängigen Lösungsmitteln untersucht. Diese Ergebnisse sind in allen folgenden Synthesen, Reinigungen und Charakterisierungsmethoden berücksichtigt.

Dazu wurde 20 mg DBC in 0.5 mL des jeweiligen Lösungsmittels bei RT gegeben und in 0.5 mL-Schritten bis zu einem Volumen von 3 mL die Löslichkeit getestet (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Löslichkeit des Diblockcopolymeren in gängigen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	H <sub>2</sub> O	DMSO	CHCl <sub>3</sub>	THF	Aceton	Ethanol	Et <sub>2</sub> O
Volumen [mL]	0.5	1.5*	0.5	0.5*	1.5*	0.5	unlöslich

\* Polymere fallen in der Kälte aus.

Anschließend wurden die gelösten Polymere bei -18 °C bzw. Wasser und DMSO bei 5 °C für 12 h gelagert.

Mit diesem kurzen Lösungsmittelversuch lässt sich zeigen, dass Chloroform, THF, Ethanol und Wasser geeignete Lösungsmittel für das verwendete DBC mit einem Molekulargewicht von 6300 g/mol sind. In DMSO weist das Diblockcopolymer (DBC) eine geringere Löslichkeit auf. Für die Reinigung der Polymere durch Fällung ist besonders Aceton geeignet, da die Polymere bei RT vollständig gelöst sind und erst in der Kälte präzipitieren. Der langsame Fällungsvorgang begünstigt die Reinigung, da freie Edukte sonst bei einer schnellen Präzipitation vom Polymer erfasst bzw. in Polymerknäulen eingeschlossen werden könnten. Um eine vollständige Fällung mit geringen Ausbeuteverlusten zu erzielen, wurde häufig eine Mischung von Diethylether und Aceton gewählt. Bei der Wahl des Fällungsmittels ist zusätzlich die Löslichkeit der Edukte zu beachten, um eine Reinigung zu erzielen.

### 5.1.2. Mizellenbildung des Diblockcopolymers in Acetonitril

Bei Synthesen mit Acetonitril als Lösungsmittel ist zu beachten, dass das amphiphile DBC Mizellen ausbildet. Dieses polare Lösungsmittel kommt sehr häufig bei Festphasensynthesen von DNA und Peptiden zum Einsatz. Acetonitril weist eine geringe Dichte auf, hat einen niedrigen Schmelzpunkt bei  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  und lässt sich gut mit Wasser mischen. So kann beispielsweise eine Reinigung über Extraktion, Dialyse oder auch Spinfilterkonzentratoren durchgeführt werden. Zu Bedenken ist die Toxizität, die einen bedachten Umgang erfordert. Als ungiftige Alternative eignet sich häufig DMSO, in dem das Diblockcopolymer jedoch eine geringe Löslichkeit aufweist (s. Tab. 1).

Um die Mizellenbildung zu verringern, kann durch eine Zugabe von Dichlormethan (DCM) die Löslichkeit der Polymere erhöht werden. Am Beispiel von 0.5%igen Diblockcopolymer-Lösungen in Acetonitril sowie mit unterschiedlichen Abmischungen mit DCM wurde eine Untersuchung der Mizellen anhand ihres hydrodynamischen Radius über Dynamische Lichtstreuung (DLS) vorgenommen. In Abbildung 15 sind die relativen Intensitäten der DLS Daten zu sehen. Dabei wurde der höchste Wert zur Normierung genutzt und jeweils durch die Gesamtanzahl der vorhandenen Peaks der Messreihe geteilt. Es ist davon auszugehen, dass DCM die Diblockcopolymere vollständig löst und keine Mizellenbildung stattfindet. Alle Lösungen waren optisch farblos, klar und vollständig gelöst. Im Acetonitril werden kleine Mizellen von 26 nm Durchmesser gebildet, da der Polyisoprenteil in Acetonitril unlöslich ist. Bereits bei einer Zugabe von 25% DCM sind die Mizellen stark vergrößert auf 343 nm. Das DCM löst dabei vermutlich das PI, aber verbleibt in der mizellaren Struktur und weitet diese. Bei weiterer Erhöhung des DCM Anteils sind in den gezeigten Intensitäten neben den Peaks unter 5 nm, die auf die gelösten ungeordneten Diblockcopolymere schließen lassen, auch Peaks bei 400 und 615 nm zusehen. Diese lassen sich durch Verunreinigung der Lösung oder ungelöste Polymere erklären. Auch bei der Polymerlösung mit 100% Dichlormethan wurde, neben dem Peak bei 4 nm, ein Peak bei 190 nm gemessen, der aber ebenfalls auf wenige ungelöste Polymere oder Fremdstoffe zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse dienen zur Vorbereitung der Syntheseplanung am DNA-Synthesizer (s. Kapitel 5.7). Dabei ist drauf zu achten, dass die dünnen Schläuche und Ventile des Synthesizers nicht verstopfen oder einem zu hohen Druck durch hohe Viskosität ausgesetzt werden. Deshalb müssen alle Edukte vollständig gelöst sein und dürfen zu keinem

Zeitpunkt des Syntheszyklus ausfallen. Ein Gemisch aus 1:1 DCM und Acetonitril wurde deshalb für die Synthesen als ausreichend geeignet erachtet.

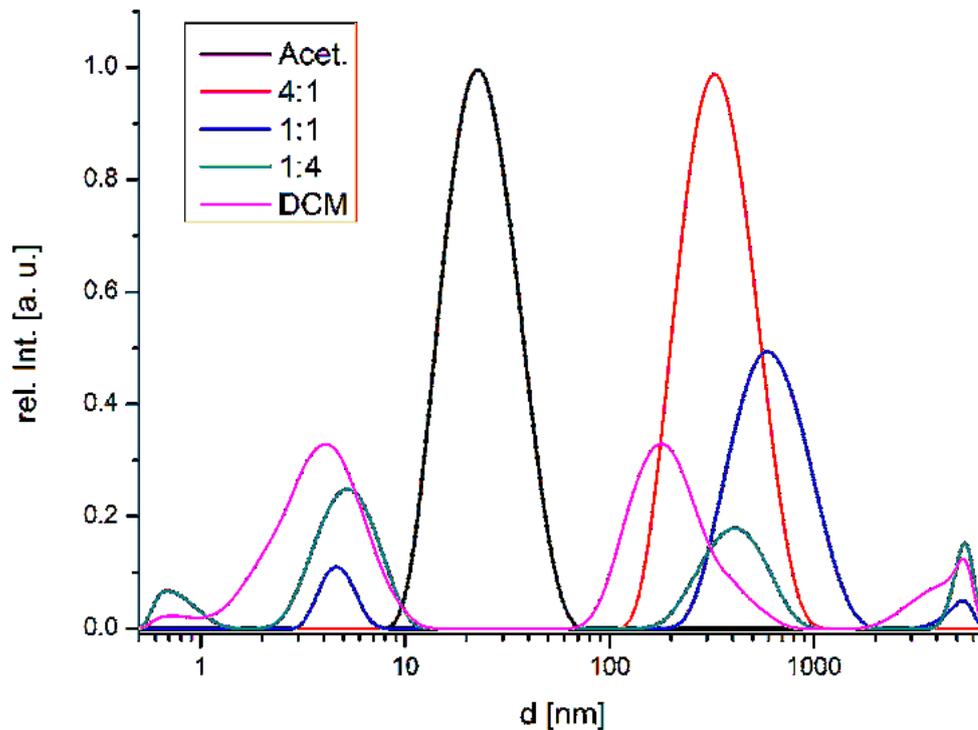


Abbildung 15: Hydrodynamische Durchmesser bestimmt durch DLS. Auflösung der mi- zellaren Struktur des DBCs in Acetonitril durch Abmischung mit DCM ab einem Verhältnis von 1:1.

### 5.1.3. Charakterisierung der Diblockcopolymere

Zur Charakterisierung wurden in erster Linie die  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie genutzt. An- hand der in Abbildung 16 gezeigten NMR Spektren werden die Unterschiede bei der Wahl des Lösungsmittels deutlich.

In deuteriertem THF sowie  $\text{CDCl}_3$  ist das DBC sehr gut löslich wie bereits in Abschnitt 5.1.1 gezeigt. Das Polyisopren lässt sich anhand der Multipletts zwischen 6.0 - 5.6 ppm und 5.1 - 4.6 ppm, die durch den olefinischen Bereich entstehen, sowie den Multipletts zwischen 2.4 - 0.8 ppm der Methylenwasserstoffe identifizieren. Sehr markant ist das Si- gnal der Polyethylenoxid Einheit zwischen 3.7 - 3.5 ppm mit einer hohen Intensität. Das PEO Signal weist sogenannte Satellitensignale auf, diese entstehen durch die Kopplung mit natürlich vorkommenden  $^{13}\text{C}$  Kernen deren Intensität allerdings nur 0.55% von dem Protonensignal betragen.<sup>[118]</sup> Die breiten Multipletts des DBC überlagern häufig die Si-

gnale von gekoppelten kleinen Affinitätsmolekülen. Besonders Spektren in deuteriertem Methanol zeigen sehr breite Signale des Polyisoprens. Ganz deutlich sticht das NMR-Spektrum in D<sub>2</sub>O heraus, in dem der gesamte Bereich des Polyisoprens nicht zu erkennen ist. Durch die Mizellenbildung ist die Beweglichkeit des DBCs stark eingeschränkt und die Signale sind extrem verbreitert, sodass lediglich das Signal des hydrophilen Polyethylenoxids zu sehen ist.

Zur Umsatzbestimmung wurde bevorzugt das Integral des PEO-Signals genutzt, um es mit den Signalen des gekoppelten AMs zu vergleichen, da eine Abtrennung des un-funktionalisierten Polymers nicht möglich ist. Das THF Signal befindet sich ebenfalls bei 3.6 ppm und verfälscht dadurch die Anzahl der Protonen im Integral, wenn das Polymer mit THF verunreinigt ist oder als NMR-Lösungsmittel verwendet wird. Der Lösungsmittelpeak von CDCl<sub>3</sub> bei 7.26 ppm liegt außerhalb der Signale des DBC und eignet sich deshalb besonders gut für die Berechnung des Umsatzes anhand des PEO Peaks.<sup>[119,120]</sup> Verunreinigungen und Umsätze lassen sich somit in den <sup>1</sup>H-NMR Spektren gut verfolgen.

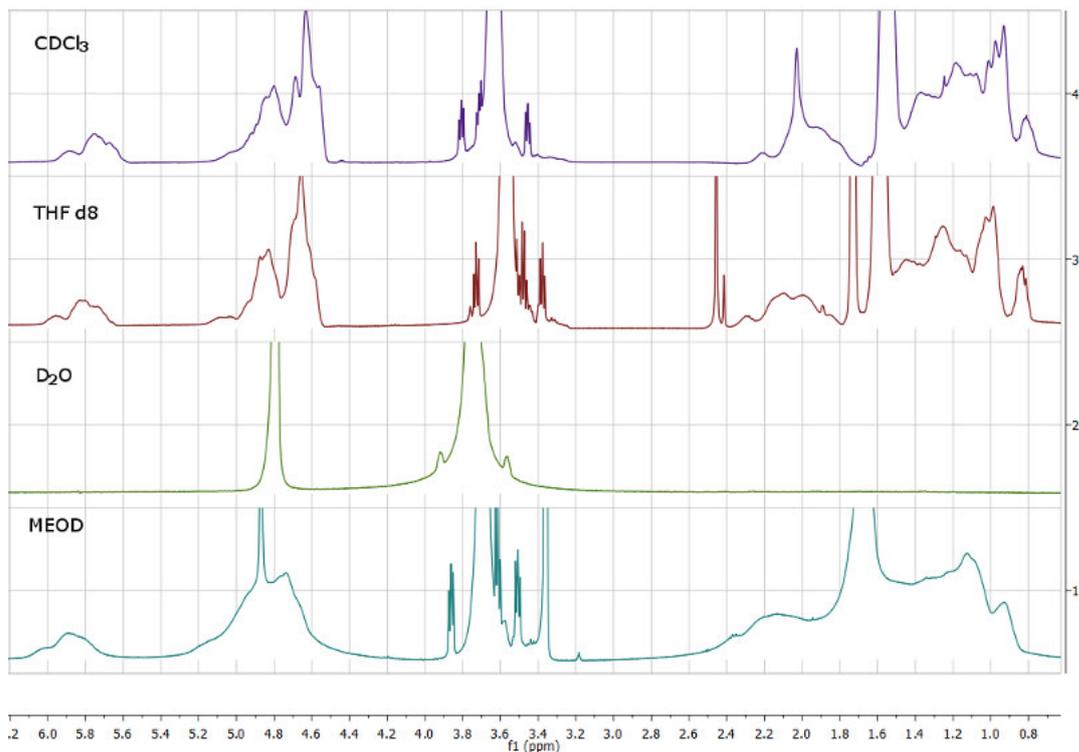
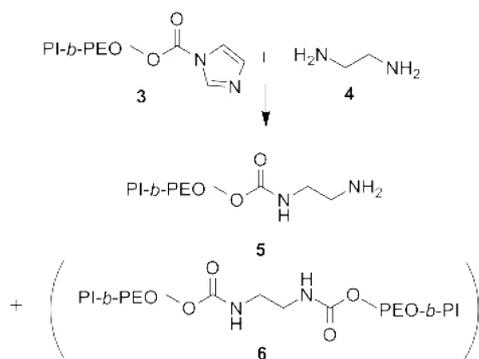
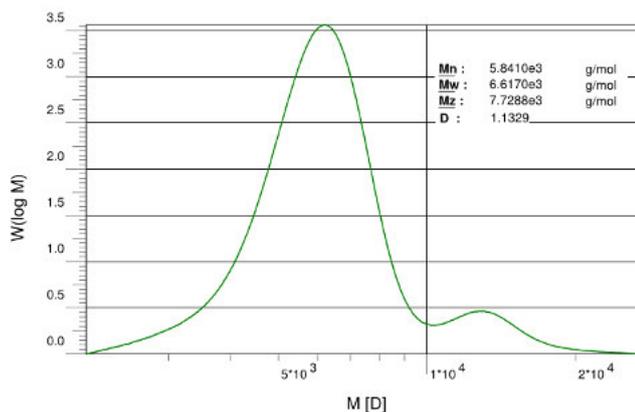


Abbildung 16:  $^1\text{H}$ -NMR von PI-*b*-PEO in unterschiedlichen deuterierten Lösungsmitteln.  $\text{CDCl}_3$ : Alle Signale des DBC sind deutlich zu sehen und eine Umsatzbestimmung ist gut möglich. Das Lösungsmittelsignal (7.26 ppm) liegt außerhalb der Signale des DBCs. THF- $\text{d}_8$ : Signal von THF und PEO fallen bei 3.6 ppm zusammen.  $\text{D}_2\text{O}$ : Polyisopren Signale werden durch Mizellenbildung abgeschirmt. MeOD: Sehr breite Signale, die eine genaue Charakterisierung von PI-*b*-PEO erschweren.

Als weitere Charakterisierungsmethode kam die Gelpermeationschromatographie (GPC) zum Einsatz. In der GPC ist es nicht möglich, die Zunahme des Molekulargewichts durch ein gekoppeltes kleines AM am DBC zu erkennen, da die Polymere eine Größenverteilung aufweisen und der Unterschied zu gering ausfällt. Es lässt sich aber feststellen, ob beispielsweise eine Doppelkopplung stattgefunden hat, wie im Beispiel des GPC-Elugramms (s. Abb. 17) nach der Funktionalisierung mit Ethylendiamin **4** zu Verbindung **5**. Im Fall der Doppelkopplung reagiert ein Molekül Ethylendiamin mit zwei Molekülen Polymer. Neben dem Hauptpeak ist in diesem Fall ein Peak mit dem doppelten Molekulargewicht zu finden der Verbindung **6**, entspricht. Solche Doppelkopplungen treten beispielsweise bei Reaktionen mit zu geringen Mengen des Eduktes und zwei nucleophilen Gruppen auf. (Erläuterung im Kapitel 5.4.3).



(a) Doppelkopplung des DBCs über Ethylendiamin



(b) GPC-Nachweis der Doppelkopplung

Abbildung 17: GPC-Charakterisierung von Verbindung **5** Kopplungsreaktion von DBC mit Ethylendiamin **4** sowie dem Produkt der Doppelkopplung. Im Eluogramm ist neben dem Hauptpeak bei ca. 6600 g/mol ein weiterer Peak bei 10 000 g/mol zu sehen, der eine Doppelkopplung belegt (Verbindung **6**). In diesem Fall müssen die Reaktionsbedingungen geändert werden.

#### 5.1.4. Abmischung größerer und kleinerer Polymere

Für die spätere medizinische Anwendung kann es von Vorteil sein, ein Polymer mit einem größerem PEO-Teil mit einem Affinitätsmolekül zu funktionalisieren und dieses mit einem DBC, das einen kürzen PEO-Teil hat, abzumischen. Das Erkennungsmolekül kann dann aus dem Nanocontainer an der Oberfläche herausragen. In der Arbeit von Dai et al. von 2014 ist beschrieben, dass bei der Bildung einer Proteinkorona *in vivo* bzw. *in vitro* die Zugänglichkeit für den angesteuerten Rezeptor durch die Verwendung unterschiedlich großer Polymere bzw. das Ausfüllen von Lücken durch kleinere Polyethylenoxide verbessert werden kann.<sup>[121]</sup>

Um sicherzustellen, dass eine Mischung von unterschiedlichen Polymeren eine homogene Mizellenbildung nicht stört, wurde der hydrodynamische Radius der Mizellen mit der DLS untersucht. Dazu wurden verschiedene Abmischungen von zwei Polymeren, die sich nur in der Größe der PEO-Einheit unterschieden, verwendet. Der Prozess der Selbstorganisation als Phasentransfer von THF in Wasser mit thermischer Behandlung simuliert die Bedingung, die auch bei der Verkapselung der Nanopartikel (NP) zum Einsatz kommen (s. Abschnitt 5.2 sowie Theorie Abschnitt 2.5).

Die DLS Ergebnisse (s. Abb. 18) zeigen, dass sich die Mizellen in ihrem hydrodynamischen Durchmesser wenig unterscheiden. Dabei ist eine deutliche Tendenz des Größenverhältnisses zu erkennen, welches sich im Bereich zwischen 29 - 38 nm bewegt. Die Ab-

mischung zweier unterschiedlich großer Diblockcopolymerer verändert die Mizellenstruktur nur geringfügig und die Größenverteilung bleibt schmal. Es ist zu erkennen, dass die Mizellen des großen Polymers ( $M_n = 10000 \text{ g/mol}$ ) einen etwas breiteren Peak aufweist, der durch die Abmischung mit dem kleineren Polymer ( $M_n = 9000 \text{ g/mol}$ ) schmaler wird. Eine Abmischung von Polymeren mit unterschiedlichen PEO-Kettenlängen ist möglich und für die spätere mizellare Verkapselung geeignet. Allerdings lässt sich mit dieser Methode nicht feststellen, ob sich die Mizellen aus beiden Polymeren homogen gebildet haben oder ob zwei unterschiedlich große Mizellarten nebeneinander vorliegen. Die Polyisoprenketten der Polymere sind identisch und begünstigen die Bildung der Mizellen aus dem Gemisch. Auch für die spätere Verkapselung der Nanopartikel durch Abmischung von funktionalisiertem und unfunktionalisiertem Polymer wird davon ausgegangen, dass es zu einer homogenen Verteilung in der Mizelle aus beiden Polymeren kommt.

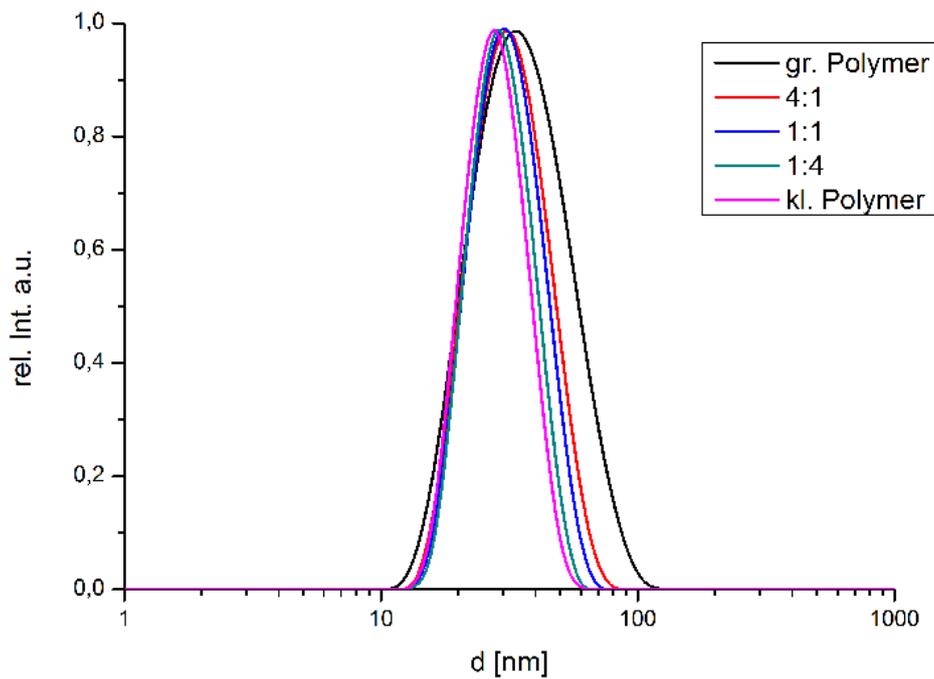


Abbildung 18: Hydrodynamische Durchmesser ( $d$ ) bestimmt mittels DLS nach den Intensitäten. Abmischung mit unterschiedlich großen Polymeren mit geringen Auswirkungen auf den Durchmesser der Mizellen sowie einer homogenen Verteilung.

## 5.2. Nanocontainer - Nanopartikel mit Polymer verkapseln

Nach der Funktionalisierung der Polymere mit einem AM sollen diese zur Verkapselung der Nanopartikel dienen. Für den Einsatz in biologischen Systemen ist die Überführung der NP von organischen Lösungsmitteln in Wasser notwendig. Die DBC zeichnen sich durch ihre amphiphilen Eigenschaften aus und sind auch bei starker Verdünnung mit einer niedrigen cmc stabil. Die Bildung der Mizellen erfolgt beim Kontakt mit Wasser, dabei zeigt der hydrophile PEO-Teil nach außen und der hydrophobe PI-Teil umschließt den QD. Dieser wurde zuvor mit PI-Liganden stabilisiert, sodass die hydrophoben Polyisoprene mit denen des Diblockcopolymer in Wechselwirkung treten. Zur Stabilisierung der Mizellen erfolgt eine radikalische Quervernetzung der PI-Ketten im hydrophoben Kern durch Zugabe von AIBN sowie thermischer Behandlung für 3 h bei 70 °C, sodass die Oberfläche der QDs bzw. QDQRs ideal gegenüber äußeren Einfluss wie z.B. Ionen, die eine Löschung der Fluoreszenz verursachen können, geschützt sind. Auf der anderen Seite sind biologische Systeme vor den zelltoxischen Cadmium-Ionen der QDs bzw. QDQRs abgeschirmt.

Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten zur Verkapselung bzw. zur Bildung von Mizellen. Um die Fluoreszenzquantenausbeute (QY) zu erhalten, muss der Kontakt der Oberfläche der QDs zum Wasser möglichst gering gehalten werden. Im Folgenden werden drei Methoden miteinander verglichen. In der schematischen Abbildung 19 ist der apparative Aufbau dieser gezeigt.

1) In der etablierten Verkapselungsmethode über eine computergesteuerte Vermischung durch eine Mischstruktur werden die Nanopartikel zusammen mit dem DBC PI-*b*-PEO und AIBN in THF gelöst und in einer Spritze mit einer kontrollierten Geschwindigkeit durch den Mischchip geleitet, der in einen zweiten Kanal mit einer weiteren Spritze das Wasser einleitet. Die Mizellen bilden sich sofort aus und die Oberfläche der Nanopartikel kommt nur geringfügig in direkten Kontakt mit Wasser. (**Standard 1**)

2) Die wohl einfachste Methode ist die Vermischung mit Wasser durch Injektion der THF-Lösung mit QDs, PI-*b*-PEO und AIBN unter starkem Rühren. Zur Verbesserung der Bildung von kleinen Mizellen wurde hier die Lösung während der Injektion in ein Ultraschallbad getaucht. (**Ultraschall 2**)

3) Durch die Kopplung mit Affinitätsmolekülen kann es vorkommen, dass sich die Lös-

lichkeiten der Diblockcopolymere verändern und sie eine geringere Löslichkeit in THF aufweisen, z.B. bei Peptid- oder DNA-Sequenzen. Zu diesem Zweck wurde hier ein neue Verkapselungsstrategie getestet, um ggf. darauf zurückgreifen zu können. Dazu wurde das DBC in Wasser gelöst und in die Wasserspritze am Mischchip aufgenommen. Die weitere Durchführung erfolgt dann wie unter Standard 1 beschrieben (**Mischchip 3**).

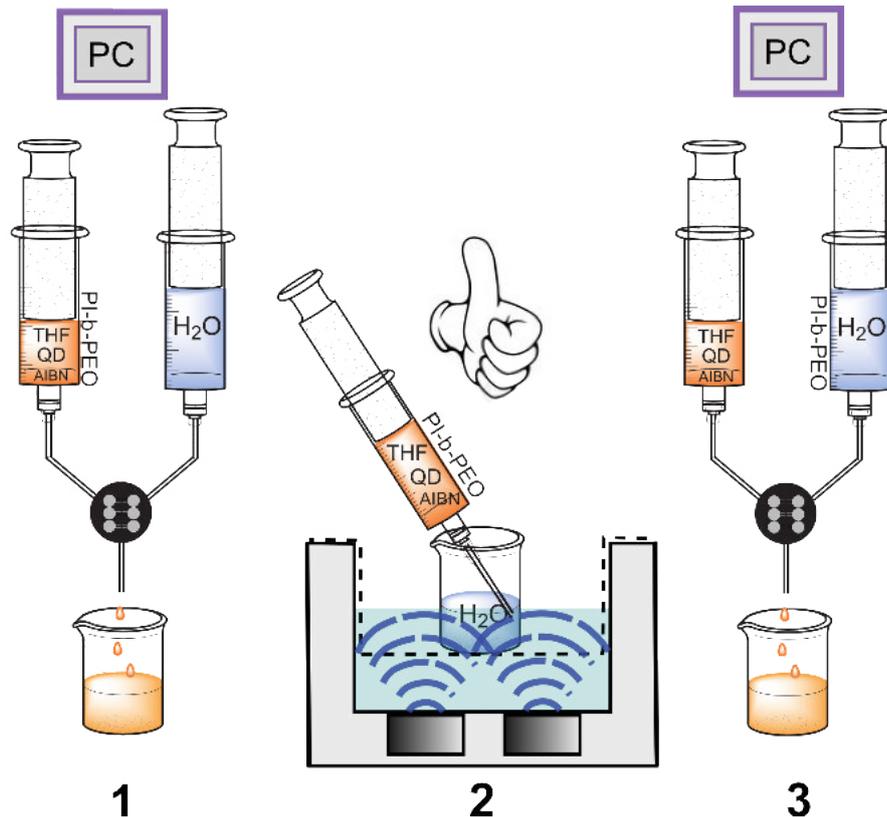


Abbildung 19: Schematische Darstellung der drei Verkapselungsmethoden. Kontrollierte Mizellenbildung durch computergesteuertes Mischverfahren bei Methode 1 und 3. Methode 3 unterscheidet sich wesentlich durch die Zugabe der DBC, die im Wasser gelöst sind und nicht wie die bei 1 und 2 mit QDs und AIBN in THF gelöst sind. Zur Vermischung bei Methode 2 kommt ein Ultraschallgerät zum Einsatz.

Die Absorptions- und Emissionsspektren aller Proben unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. In Abbildung 20 sind die normierten Spektren der Standardverkapselung 1 zusehen. In der Emission wurde für alle Proben eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute nach der Überführung in Wasser gemessen. Zuvor betrug diese in Chloroform 44%. In Tabelle 2 sind die erhaltenen Daten zur Fluoreszenzquantenausbeute sowie die hydrodynamischen Durchmesser zusammengefasst.

Tabelle 2: Fluoreszenzquantenausbeute und hydrodynamische Durchmesser der einzelnen Verkapselungsexperimente.

	Probe	QY [%]	Int. d [nm]	PDI
1	Standard	16	110.7	0.243
2	Ultraschall	13	102.5	0.162
3	Mischchip	17	73.42	0.178

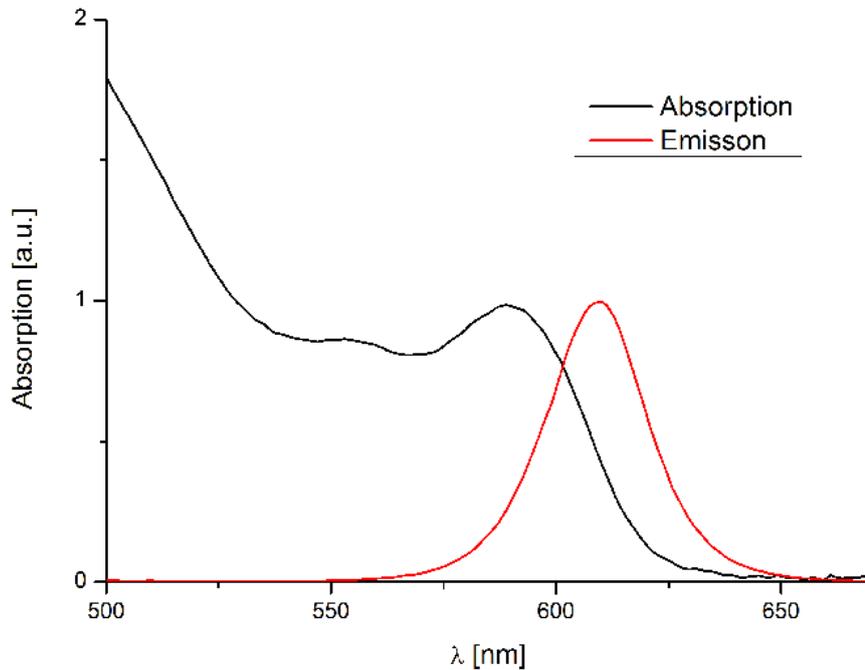


Abbildung 20: Normierte Spektren der Absorption und Emission der Probe der Standardverkapselung 1.

Die Mizellen mit 73 nm aus Versuchsteil 3 sind kleiner als über die Handinjektion (2) und die Standardmethode (1). Im Vergleich der drei Methoden weist die Standardmethode den schlechtesten Polydispersitätsindex (PDI) auf, der aber noch im moderaten Bereich (PDI 0.1-0.4) liegt. Die QY der Proben liegen in einem Bereich zwischen 13-17%. Der beste Wert wird für die Methode 3 erhalten und steht somit als Option für die Verkapselung mit THF und unlöslichen funktionalisierten Polymeren als geeignete Methode zur Verfügung. Allerdings sollte bedacht werden, dass diese Methode eine sehr gründliche Reinigung der Wasserspritze erfordert, die mit dem Polymer verunreinigt wird.

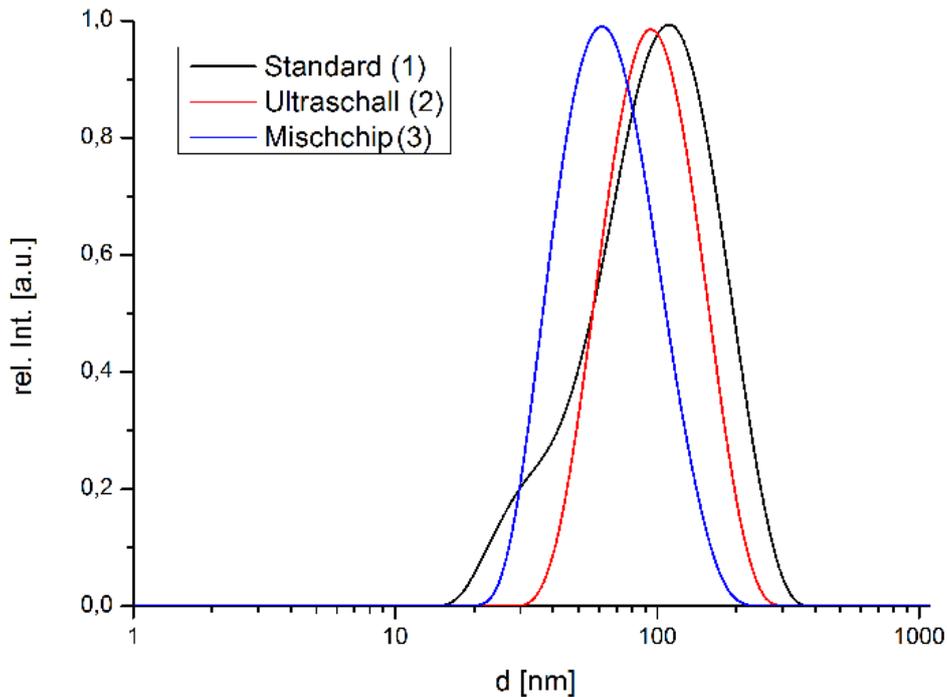


Abbildung 21: Vergleich der drei Verkapselungsmethoden aus DLS-Messungen nach den Intensitäten.

### 5.2.1. Laufverhalten von Nanocontainern in Agarosegelen

Für die spätere Charakterisierung der mit größeren Biomolekülen, wie Aptameren, funktionalisierten Nanocontainer (NC), sind Agarosegele eine geeignete Methode. Auch Aussagen über Wechselwirkungen mit Proteinen in Form einer Proteinkorona sowie Koppelung mit Antikörpern können schnell und einfach untersucht werden.<sup>[122]</sup> Dabei kann eine große Anzahl an Proben unter gleichen Bedingungen kostengünstig mit geringem Aufwand getestet werden.

Nanocontainer bewegen sich aufgrund ihrer Polymerhülle in Agarosegelen langsam. In dem Agarosegel in Abbildung 22 ist zu sehen, dass NC ihr Laufverhalten mit der jeweiligen Ladung der Endgruppen am Polymer verändern. Durch die Stabilisierung mit Polyisopren-Diethylentriamin (PI-DETA) Liganden, die bei der Verkapselung der Nanopartikel zum Einsatz kommen, sind die NC allgemein positiv geladen und bewegen sich dementsprechend zum negativen Pol, der hier im Agarosegel oben liegt. Die jeweiligen Endgruppen der PI-*b*-PEO Diblockcopolymeren verstärken oder vermindern die positive Ladung des NCs. Besonders deutlich wird dies im Vergleich von Bahn 1 mit Nanocontainern, die mit einem DBC mit einer Aminoendgruppe verkapselt wurden, zu Bahn 3 mit NC, die eine Carboxyendgruppe tragen und sich dadurch ihre Laufrichtung nach unten

zur Anode verändert hat. Bei den NC mit neutralen Endgruppen wie Hydroxy- und Methoxygruppen wird die positive Gesamtladung nicht verändert und die NC laufen in Richtung der Kathode. Zu dem wurde überprüft, wie sich eine Proteinlösung (Plasma Pool) auf die Nanocontainer auswirkt. Es ist deutlich, dass nur sehr leichte Wechselwirkungen zu erkennen sind, aber die Nanopartikel ihre Laufrichtung beibehalten. Diese Untersuchung bildet eine wichtige Grundvoraussetzung, um unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen und die Gelelektrophorese als zuverlässige Nachweismethode zu nutzen. Agarosegele eignen sich besonders gut als Nachweismethode im Zusammenhang mit medizinischen und biochemischen Untersuchungen.

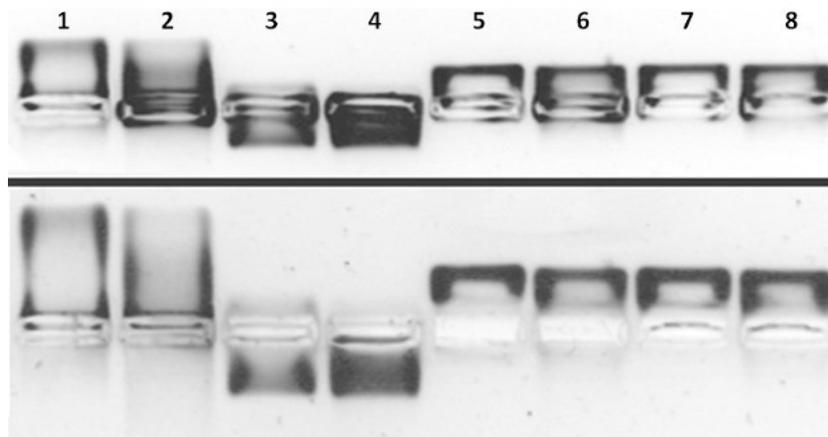


Abbildung 22: NC,QDs mit unterschiedlichen Endgruppen am Polymer im Agarosegel. [0.75%, 80 V, (oben) 1 h, (unten) 2 h, ohne EtBr]: **1**: -NH<sub>2</sub>, **2**: -NH<sub>2</sub> mit Plasma Pool, **3**: -COOH, **4**: -COOH mit Plasma Pool, **5**: -O-CH<sub>3</sub>, **6**: -O-CH<sub>3</sub> mit Plasma Pool **7**: -OH **8**: -OH mit Plasma Pool. Die Laufrichtung bleibt erhalten, geringe Wechselwirkung mit dem Plasma Pool.

### 5.2.2. Stabilität in Fixierungsmitteln

In der Präparation von Gewebeschnitten sowie Zellen ist es häufig notwendig, Fixierungsmittel zu verwenden. In Abbildung 23 sind QDs und QDQRs auf ihre Stabilität in den gängigen Fixierungsmitteln Methanol, Aceton sowie 4%iger Formalinlösung getestet worden. Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Fluoreszenz verringert wird, aber noch gut zu erkennen ist. Wie erwartet agglomerieren die NC in Methanol und Aceton aufgrund der geringen Löslichkeit der Polymerligandenhülle in diesen Medien. Da jedoch die Fluoreszenz weiterhin in ausreichendem Maße erhalten bleibt, stellt dies kein Problem dar.

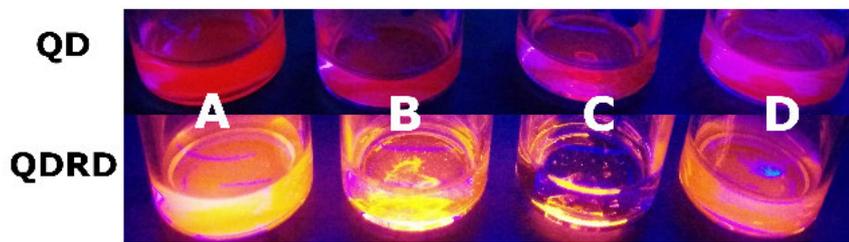


Abbildung 23: Veränderung der Fluoreszenzen von NC in gängigen Fixierungsmitteln: (oben) QD - QU1 (unten) QDQR -RU1, A: ohne Behandlung, B: Methanol C: Aceton D: Formalinlösung 4%. Fluoreszenz der Nanopartikel bei Anregung unter UV-Lampe ist in jeder Probe ausreichend für biomedizinische Anwendungen.

### 5.3. Organische Kopplungsmethoden an Polymere

Die jeweilige Kopplungsreaktion wird nach der entsprechenden Größe, Löslichkeit sowie Stabilität des AMs ausgewählt. Kleine Moleküle können vor der Verkapselung der NP, nach dem sogenannten *pre-assembly* mit dem Polymer gekoppelt werden (s. Kapitel 2.6.2). Die Charakterisierung mittels NMR ist aufgrund der geringen Anzahl an Protonen im Vergleich zu großen Proteinstrukturen gut möglich, und einzelne Verschiebungen durch die Kopplung an das Polymer werden deutlich. Dennoch kann es zu einer Überlagerung durch die breiten Signale der Polymere kommen und die Charakterisierung mittels NMR erschweren.

Größere AM, wie beispielsweise kurze Peptid- und DNA-Sequenzen, stellen eine größere Herausforderung dar. Zum einen sind diese in vielen Lösungsmitteln unlöslich, zum anderen wird eine selektive Kopplung durch die Anwesenheit von mehreren Aminogruppen bzw. nucleophilen Gruppen erschwert.

In Abschnitt II wird dazu für die Funktionalisierung der NC mit größeren AM durch die bioorthogonale Kopplung vorgestellt.

### 5.4. CDI-Aktivierung

Die Grundlage für viele weitere Reaktionen stellt die Aktivierung mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) dar, welche mit quantitativen Umsätzen gelingt. Die darauffolgende Reaktion mit einem AM variiert hingegen stark. Bei der Herstellung des Polyethylenoxid wird nach Abbruch am Ende der Kette eine Hydroxylgruppe erhalten, diese kann durch Umsetzung mit einem hohen Überschuss an CDI aktiviert werden (s. Abb.24) und im nächsten Schritt nucleophil mit einem primären Amin unter Abspaltung eines Imidazols substituiert werden.

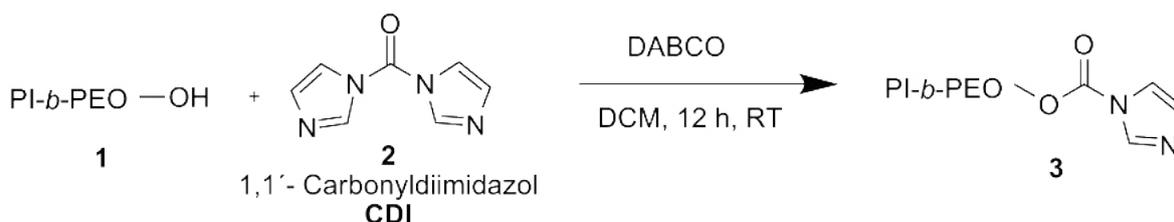


Abbildung 24: Darstellung der CDI-Aktivierung am Diblockcopolymer PI-*b*-PEO.

Nach einer schnellen Reinigung durch Zersetzung von überschüssigem CDI durch kalte wässrige Extraktion erfolgt die Trocknung der organischen Phase mit Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck. Unter wasserfreien Reaktionsbedingungen wird dann im nächsten Schritt die Kopplung der Affinitätsmoleküle durchgeführt.

Das zu koppelnde AM wird in einem organischen wasserfreien Lösungsmittel gelöst. Die Umsetzung erfolgt über das primäre Amin wie in Abbildung 25 zu sehen ist. Diese

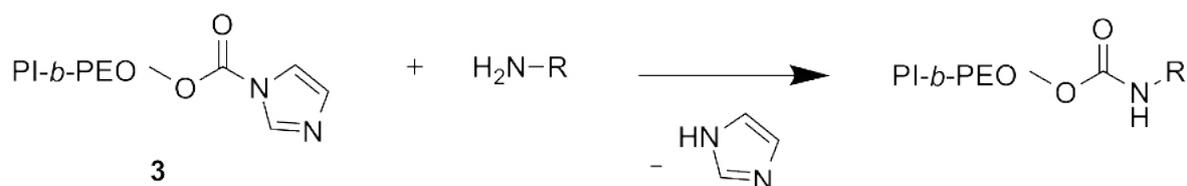


Abbildung 25: Darstellung der Kopplung von primären Aminen an CDI-aktiviertes Diblockcopolymer unter Bildung einer Carbamatgruppe.

Kopplungsmethode eignet sich beispielsweise gut für Glycoside, die mit einem Aminolinker versehen wurden. Es ist dabei zu beachten, dass diese während der Reaktion ihre Acetylschutzgruppen aufgrund der Löslichkeit behalten und diese erst in einem Folgeschritt entfernt werden.

#### 5.4.1. Umsetzung des CDI aktivierten DBC mit Ethylendiamin

Als ein sehr häufig genutztes Produkt und zur Überprüfung der Qualität der CDI-Aktivierung wurde Ethylendiamin an das Polymer gekoppelt. Die Umsätze waren nahe zu quantitativ und reproduzierbar.

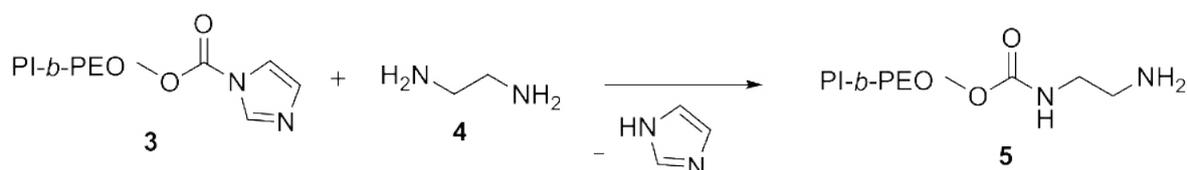


Abbildung 26: Darstellung der Kopplung von Ethylendiamin an CDI-aktiviertes Diblockcopolymer unter Bildung einer Carbamatgruppe zur Verbindung **5**.

Des Weiteren dient die Aminogruppe am Polymer für weitere Kopplungsreaktionen.

#### 5.4.2. Stabilität der Carbamatbindung gegenüber Entschützungsreaktionen

Um sicher zu stellen, dass die Carbamatbindung in Entschützungsreaktionen stabil ist, wurde Benzylisocyanat **7** mit der Hydroxylgruppe am PI-*b*-PEO quantitativ umgesetzt, sodass eine gute Verfolgung der NMR Signale bei 4.26 und 4.37 ppm möglich war. Durch die sterische Hinderung des aromatischen Rests ist die Zugänglichkeit zur Carbamatgruppe verringert und die Bindung zusätzlich stabilisiert.

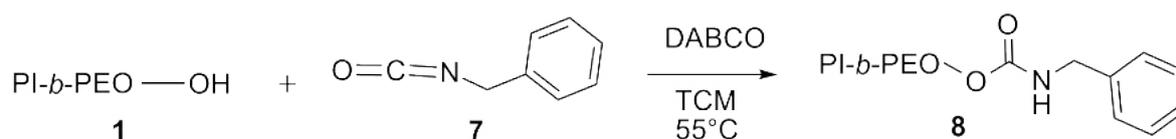


Abbildung 27: Darstellung von PI-*b*-PEO-Benzylcarbamate **8** über Isocyanat.

Typische Entschützungsbedingungen für die Deacetylierung von Glycosiden ist die Verwendung von Natriummethanolat (0.1 M) oder 30%iger Ammoniaklösung zur Entschützung bei Festphasensynthesen von DNA. Hierzu wurde das erhaltene Produkt **8** für sieben Tage den jeweiligen Entschützungsbedingungen sowie Erwärmen (55 °C), ausgesetzt und über Dialyse gereinigt. In den NMR-Spektren (s. Abb. 28) zeigt sich, dass die Kopplung durch die Carbamatgruppe gegen diese Bedingungen sehr stabil ist. Der Peak der  $\alpha$ -Methylengruppe bei 4.26 ppm bleibt in allen Spektren unverändert in der Intensität. Für die Kopplung von Glycosiden sowie bei der DNA-Festphasensynthese steht die Carbamatbindung somit als Option zur Synthesepaltung zur Verfügung.

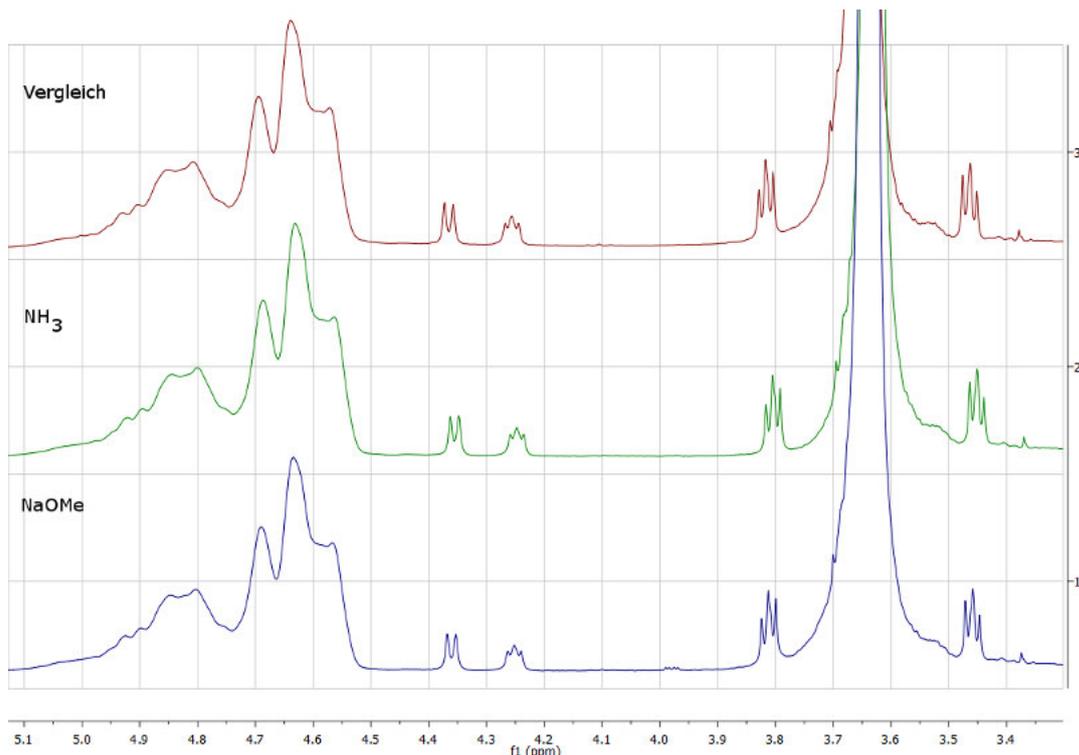


Abbildung 28:  $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{CDCl}_3$ : Stabilitätstest der Carbamatbindung von Verbindung **8** nach sieben Tagen in Natriummethanolat (0.1 M), Ammoniak (30%ig) und unter Erwärmen auf  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . Keinerlei Veränderung der Integrale weisen auf hohe Stabilität hin.

#### 5.4.3. Darstellung von PI-*b*-PEO-Benzylguanin

Eine interessante Verbindungsklasse stellen Moleküle dar, die von Reparaturproteinen erkannt werden können. Das in der Theorie bereits beschriebene SNAP-Protein (s. Kapitel 2.7.1) ist in der Lage Benzylguanin (BG) zu erkennen und unter Abspaltung von Guanin eine kovalente Bindung herzustellen. In *in vivo* Studien bei Mäusen konnten SNAP-Fusionsproteine (z.B. Antikörper) mit hoher Genauigkeit und Stabilität an BG-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe gebunden werden und so Zielstrukturen markiert werden.<sup>[71]</sup>

Dieses Prinzip lässt sich als bioorthogonale Kopplungsmethode auf den Nanocontainer übertragen. Dabei wird das gewünschte Protein zuvor im biochemischen Verfahren als ein zusammenhängendes Protein mit dem SNAP hergestellt und an die Oberfläche der NC, die mit BG funktionalisiert sind, gekoppelt.

Zur Herstellung der funktionalisierten NC wird zunächst das DBC mit  $O^6$ -(4-Aminobenzyl)guanin **9** gekoppelt, um es später in der Verkapselung der NP einsetzen zu können.

Die Synthese verläuft über eine nucleophile Substitution am primären Amin des Benzylringes (s. Abb. 29).

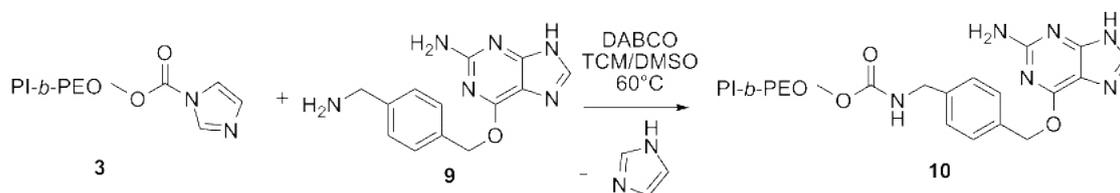


Abbildung 29: Nucleophile Substitution von  $O^6$ -(4-Aminomethylbenzyl)guanin **9** mit einem CDI-aktivierten PI-*b*-PEO **3**.

Allerdings ist zu beachten, dass durch eine langsam ablaufende Reaktionskinetik durch die Knäuelung der Polymere auch die Aminogruppe am Purin als nucleophile Gruppe der Reaktion zur Verfügung steht. Anhand der Elugramme der GPC (s. Abb. 30) lassen sich Doppelkopplungen gut nachverfolgen, besonders wenn die Edukte sich unter den Reaktionsbedingung nur unvollständig gelöst hatten. Daher zeigte sich der Einsatz von DMSO in Abmischung mit TCM als besonders geeignet, um sowohl das Polymer als auch das BG vollständig zu lösen. Das Elugramm (Abb. 30 (II)) zeigt, dass dadurch nur eine geringe Doppelkopplung stattgefunden hat. Des Weiteren weisen die Produkte in der GPC kein Signal für freies Benzylguanin auf, sodass von einer sehr guten Reinigung ausgegangen werden kann.

Die besten Resultate wurden mit einem Lösungsmittelgemisch von DCM und DMSO erzielt, sodass Polymer und Benzylguanin ausreichend gelöst sind. Die Bestimmung der Umsätze erfolgte anhand der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und lag bei 65%. Die Darstellung des SNAP-Proteins über einen molekularbiologischen Prozess, sowohl mit einem *green fluorescent protein* (GFP) als auch mit CLEC 10a, einem Lektin in der Erkennung von veränderten Glykoproteinen, konnten durch die Kooperationspartner bisher leider nicht erfolgreich hergestellt werden. Daher liegen bisher noch keine weiterführenden experimentellen Daten mit Benzylguanin-funktionalisierten Nanocontainern vor.

Zukünftig stellt die bioorthogonale kovalente Kopplungsmethode eine vielversprechende Möglichkeit zur Funktionalisierung der NC mit beispielsweise Antikörpern dar. Diese können gezielt an einer Stelle gekoppelt werden und dadurch der Einfluss der Kopplung

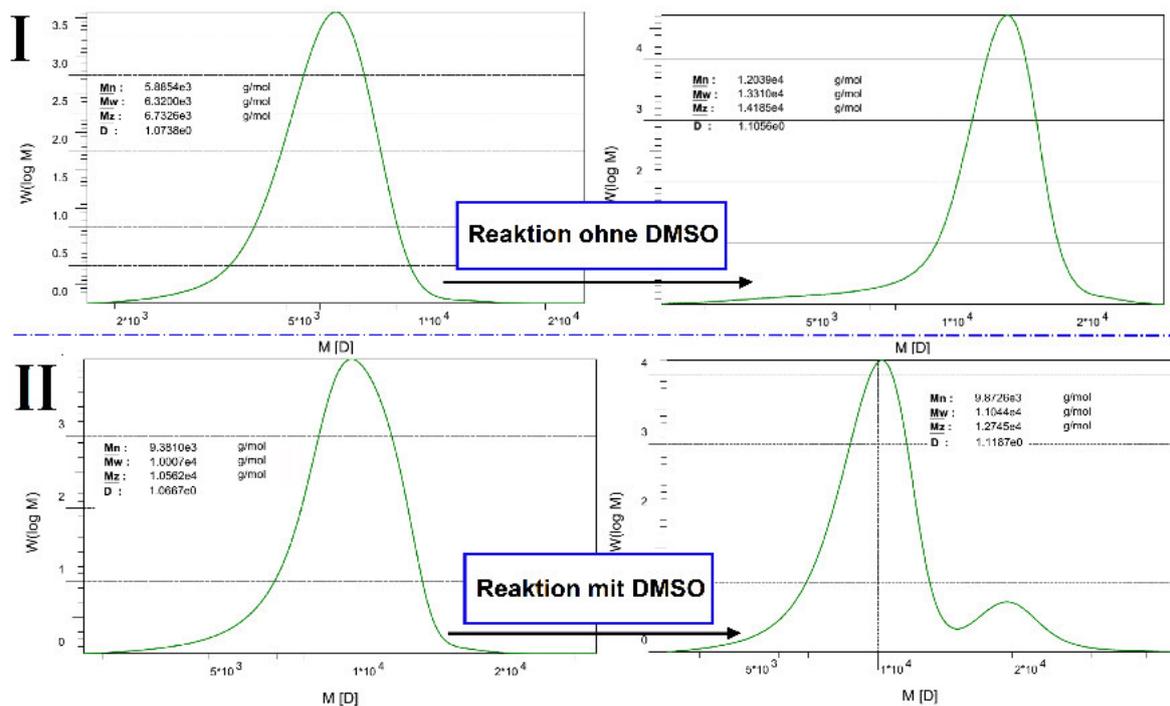


Abbildung 30: GPC-Elugramme: (links) Ausgangspolymere; (rechts) Produkt mit Benzylguanin gekoppelt; Reaktion I) Polymer **P6**; Produkt zeigt doppeltes Mw. Reaktion ohne DMSO das Polymer hat über die beiden Aminogruppen am Benzylguanin gekoppelt. II) Polymer **P4**; Produkt zeigt nur eine geringe Dimerisierung. Diese Reaktion wurde mit 1:1 TCM:DMSO durchgeführt.

auf die Faltung und Bindungsfähigkeit verringert und gesteuert werden. Dies bietet einen großen Vorteil gegenüber üblichen Konjugationen bei denen mehrere Stellen im Protein reagieren, z.B. über NHS- oder EDC-Kopplung.

Es bleibt an dieser Stelle offen, ob das BG am NC für das SNAP-Fusionsprotein zugänglich ist, wie die Stabilität in der Lösung ist und schlussendlich die Bindungsfähigkeit des Proteins nach der Kopplung.

## 5.5. Darstellung von PI-*b*-PEO-Glycosiden über CDI-Aktivierung

Als Beispiele für die Kopplung von Glycosiden über die CDI-Aktivierung werden hier zwei spezielle Zucker gezeigt, die wegen ihrer Eigenschaften von großem Interesse in der medizinischen Forschung sind.

### 5.5.1. PI-*b*-PEO-Streptozotocin Analogon

Streptozotocin (STZ) ist ein Glycosamin, das in der Krebstherapie unter dem Namen Zanosar<sup>®</sup> vertrieben und in der Chemotherapie eingesetzt wird.<sup>[123]</sup> Durch die starke Affinität zum GLUT2 Rezeptor in  $\beta$ -Zellen wird STZ auch zur Induktion von Diabetes mellitus bei Versuchstieren genutzt.<sup>[124]</sup>

Allgemein ist bei der Kopplung aller Moleküle an das DBC immer die Gefahr, dass es zu einer Veränderung der Eigenschaften, insbesondere der Bindungsfähigkeit zum Rezeptor, kommen kann. Für die Kopplung ist ein Linker wichtig, der zum einen die Flexibilität der Struktur zulässt und zum anderen bei einer biochemischen Anwendung wenig Einfluss auf die Bindung zum Rezeptor hat. Dies kann durch einen *n*-Butylaminolinker gewährleistet werden. Das STZ-Analogon **11** wird mit dem CDI-aktivierten DBC **3** zu Verbindung **12** umgesetzt und im letzten Schritt durch NaOMe entschützt um Verbindung **13** zu erhalten.

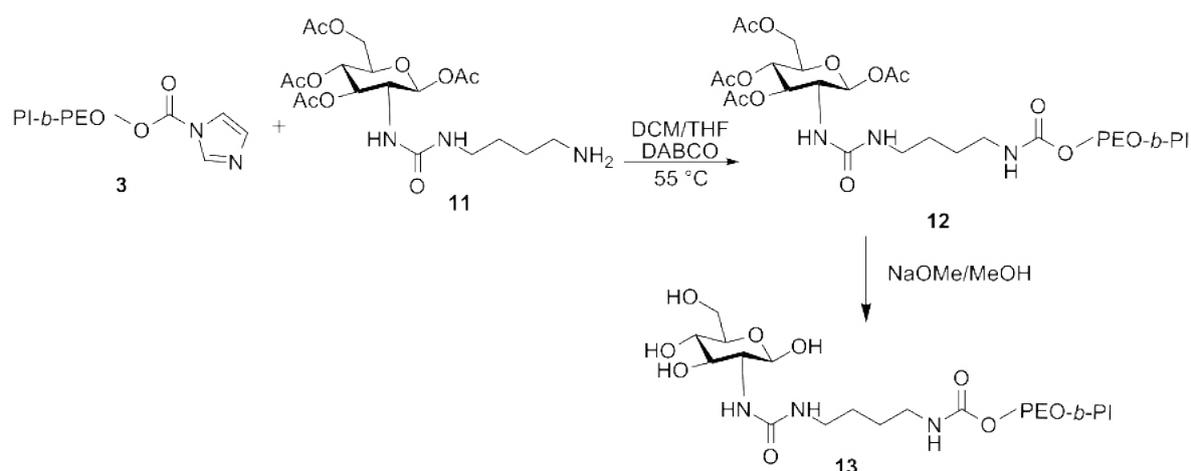


Abbildung 31: Darstellung des PI-*b*-PEO-STZ über CDI-Aktivierung des DBC und nucleophile Substitution am primären Amin.

Nach vollständiger Reinigung wurde ein Umsatz von 10% mittels NMR über das Signal

bei 4.26 ppm des  $\alpha$ -Methylens bestimmt.

### 5.5.2. Darstellung von PI-*b*-PEO-GalNAc-Serin

Die Kopplung des GalNAc-Serins **14** erfolgte nach der Entschützung der Aminogruppe am Serin mittels Piperidin. Nach der anschließenden Deacetylierung konnte ein Umsatz von 25% mittels NMR bestimmt werden.

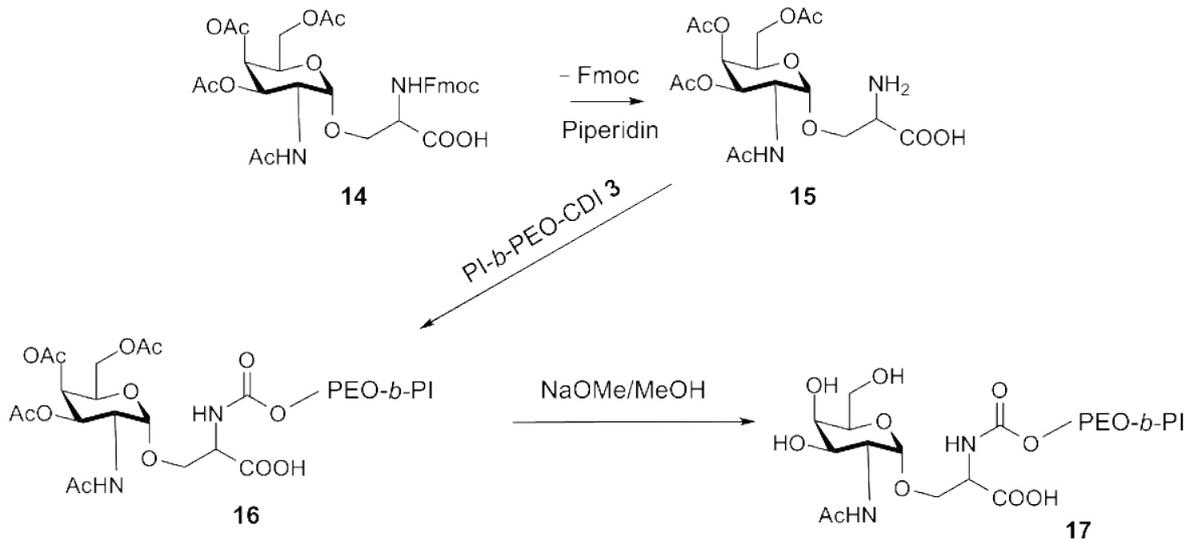


Abbildung 32: Darstellung der Synthese von GalNAc-Serin an CDI-aktiviertes Diblock-copolymer unter Bildung einer Carbamatgruppe.

Dabei ist zu beachten, dass es durch die CDI-Kopplung an die Aminosäure zu einer anderen Verschiebung der  $\alpha$ -Methylenprotonen am Polyethylenoxid in der NMR Analytik in Chloroform- $d_1$  kommt, sodass diese von dem Polyisoprensignal überlagert werden. Erst durch die Verwendung von THF- $d_8$  als NMR-Lösungsmittel und nach der Entschützung sind die Protonen von GalNAc zu identifizieren und konnten zur Umsatzbestimmung genutzt werden.

Im Abschnitt III wird auf Zellaufnahme-Experimente an HEPG2-Zellen unter Verwendung der Nanocontainer mit einem funktionalisierten Polymer **17** näher eingegangen.

## 5.6. Darstellung von PI-*b*-PEO-Glycosiden über Click-Chemie

Die Cu-katalysierte Huisgen Reaktion (Click-Chemie) bietet den Vorteil, dass eine Vielzahl chemischer Gruppen toleriert werden und die Reaktion selektiv zwischen der Azid- und Alkingruppe stattfindet. Durch die Kopplung eines Linkers an das anomere Zentrum des Zuckerderivats kann eine vollständig anomerenreine Substanz erhalten werden. Die Zuckerderivate mit entsprechender Linkerchemie wurden in Kooperation mit Dr. Anna Jacobsen und Dr. Yevgeniy Leshch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Thiem zur Verfügung gestellt.<sup>[125]</sup>

Die Click-Reaktion nach Huisgen verläuft sowohl in organischem als auch wässrigem Milieu unter milden Bedingungen mit einer stereospezifischen Bildung des 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols.<sup>[126]</sup> Das Proton am Triazolring liegt im <sup>1</sup>H-NMR bei 7.80-8.09 ppm außerhalb der Signale des Diblockcopolymers und ist somit gut geeignet zur Charakterisierung.

Die Umsätze werden maßgeblich durch die Löslichkeit des Katalysators beeinflusst. Die Reaktionsbedingungen sind daher genau untersucht und optimiert worden. Bei der Reaktion entstehen keine Nebenprodukte, sodass die Reinigung erleichtert wird.<sup>[64,127]</sup> Allerdings ist sowohl für die Anwendung in Zellversuchen also auch besonders bei der Verkapselung der Nanopartikel entscheidend, dass der Kupferkatalysator vollständig entfernt wird. Kupferionen können zum Auslösen der Fluoreszenz (*quenching*) der QDs führen. Des Weiteren können biologische Prozesse durch die Anwesenheit von Kupferionen gestört werden.

### 5.6.1. Darstellung von PI-*b*-PEO- $\alpha$ -D-Mannoheptulose

Es wurde unter bereits erprobten kupferkatalysierten Click-Reaktionsbedingungen mit Kupferiodid gearbeitet. Ziel war es, Nanocontainer mit  $\alpha$ -D-Mannoheptulose (MH) und anderen Zuckerderivaten miteinander zu vergleichen.

Die Synthese erfolgte unter Zugabe von Kupferiodid als Katalysator. Nach der Reinigung und Deacetylierung wurde ein Umsatz von 20% anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums ermittelt. Für die weitere Umhüllung der Nanopartikel und spätere SPR-Messung (s. Kapitel 5.16) ist der Umsatz ausreichend und das funktionalisierte Diblockcopolymer

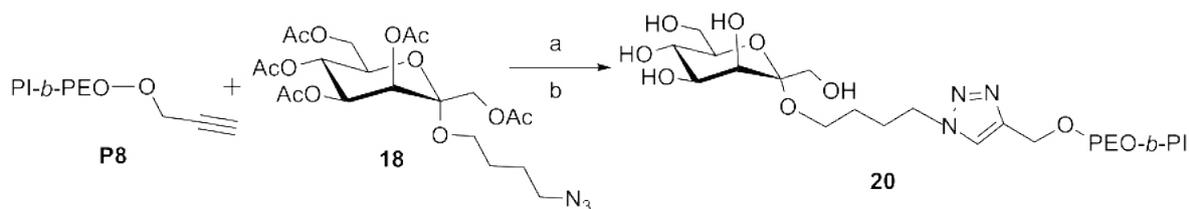


Abbildung 33: Kopplung von PI-*b*-PEO **P8** mit der  $\alpha$ -D-Mannoheptulose **18** über einen Azidlinker zu Verbindung **19** und Entschützung zu PI-*b*-PEO-MH **20**. a) CuI, DABCO, TCM b) NaOMe (0.1 M) in MeOH.

konnte erfolgreich zur Verkapselung von QDs genutzt werden.

### 5.6.2. Darstellung von PI-*b*-PEO-Glucose und PI-*b*-PEO-Mannose

Es zeigten sich in darauf folgenden Reaktionen aber immer häufiger sehr geringe Umsätze in CuI-katalysierten Click-Reaktionen. Aus diesem Grund wurden systematisch unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet und deren Erfolg anhand der Umsätze im  $^1\text{H-NMR}$  miteinander verglichen.

Für eine Anwendung der Click-Reaktion am Nanocontainer im wässrigen Medium (*post-assembly*) ist es notwendig die Click-Reaktion zu optimieren und die Umsätze zu steigern. Dazu wurden Glucose und Mannose mit einem Butylazid-Linker verwendet. Es wurde jeweils ein Überschuss (5 Äq) des Zuckerderivats (**21** - **24**) eingesetzt.

In Hinblick auf eine Kopplung mit Azid-DNA wurde Kupferiodid-Triethylphosphit als Katalysator gewählt, der in der Literatur sehr gute Umsätze mit Polymeren und DNA zeigte.<sup>[91]</sup>

In den organischen Synthesen wurde wie üblich unter Schlenkbedingungen gearbeitet, für Reaktionen im wässrigen Medium wurde zuvor das Wasser entgast. Die Glycoside **21** und **22** wurden vor der Reaktion in Wasser zu den Verbindungen **23** und **24** deacetyliert, um die Löslichkeit zu gewährleisten. Mit  $\text{CuIP}(\text{OEt})_3$  konnten sehr gute Umsätze von 85%, sowohl in organischen als auch in wässrigen Synthesen, erzielt werden. Ebenso wie mit  $\text{CuSO}_4$  und Ascorbinsäure Umsätze von bis zu 87% erreicht wurden.

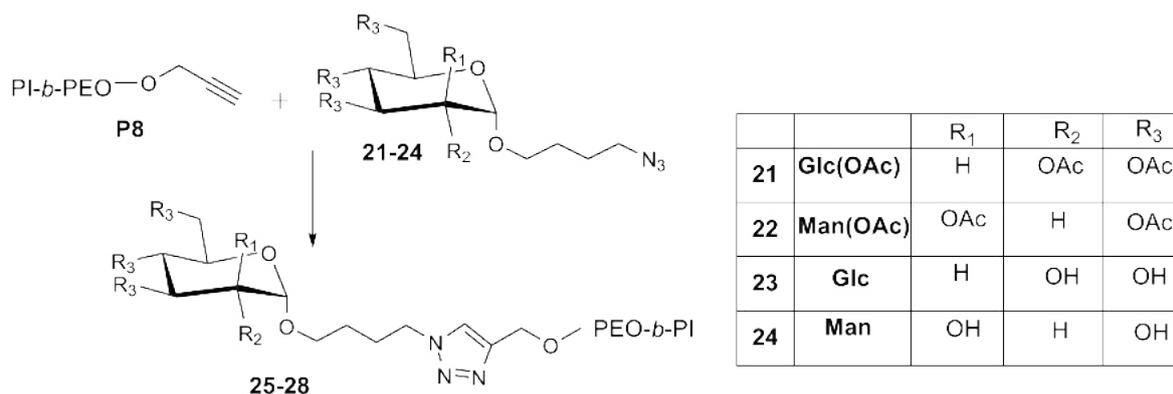


Abbildung 34: Überblick zu Click-Reaktionen mit  $\alpha$ -D-Glucose-Aziden **21** und **23** und  $\alpha$ -D-Mannose-Aziden **22** und **24** zur Kopplung mit PI-*b*-PEO-Alkin **P8**.

Die hohen Umsätze dieser Reaktion im wässrigen Medium sind besonders für *post-assembly* Kopplungen und kostenintensive, empfindliche Substanzen interessant. Aus diesem Grund wurden diese Reaktionsbedingungen zuvor an Nanocontainern getestet, um im nächsten Schnitt eine Kopplung mit z.B. Azid-DNA durchführen zu können.

### 5.6.3. Vorarbeit zur Kopplung von DNA-Aziden an Nanocontainer

Ein großer Nachteil der Click-Reaktionen ist die Anwesenheit von Kupferionen, die eine *quenching* der Fluoreszenz bei QDs bzw. QDQRs hervorrufen könnten. In umfangreichen *quenching* Experimenten mit CuI konnte in der Arbeitsgruppe Weller durch Merkl et. al eine erfolgreiche Verkapselungen von QDs gezeigt werden, die erst nach mehreren Tagen bei hohen Konzentrationen eine Abnahme der Fluoreszenz zeigten.<sup>[63]</sup> Die Konzentrationen des Kupferkatalysators wurden entsprechend unterhalb dieser Werte gewählt, die zum *quenching* führen könnten. In Abbildung 35 wird deutlich, dass die Fluoreszenz der QDQRs bei der Verwendung des CuIP(OEt)<sub>3</sub> Katalysators bereits nach 5 Min. stark abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutlich bessere Abschirmung gegenüber Kupferionen die aus CuSO<sub>4</sub> hervorgehen, diese QDs sind nach 24 h noch immer stabil.

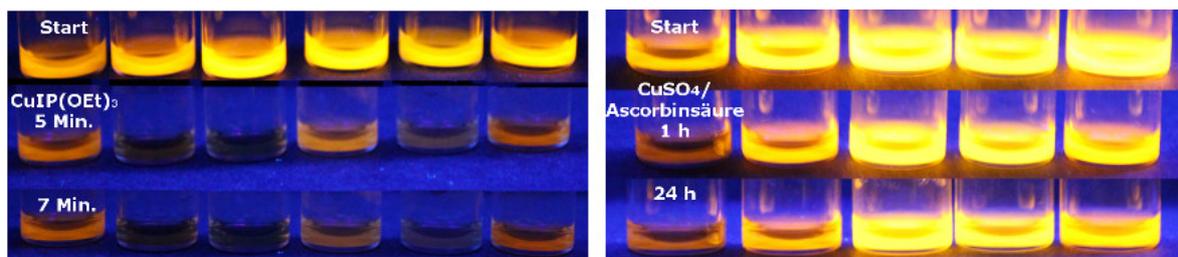


Abbildung 35: QDQRs bei UV-Licht-Anregung unter Click-Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Kupferkatalysatoren. Jeweils vor der Zugabe, oben links  $\text{CuIP(OEt)}_3$ , nach 5 Min. u. 7 Min., rechts  $\text{CuSO}_4$  u. Ascorbinsäure, nach 1 h u. 24 h.

Die organische Kupferverbindung  $\text{CuIP(OEt)}_3$  stellt sich somit als ungeeignet dar. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften ist dieser Katalysator schlecht in Wasser löslich und der lipophile Anteil begünstigt die Zugänglichkeit der Kupferionen zur Oberfläche des Nanopartikels. Dadurch wird in wenigen Minuten die Fluoreszenz der QDs bzw. der QDQRs vollständig gelöscht. Für zukünftige Click-Reaktionen am NC (*post-assembly*) ist daher bevorzugt mit anorganischen Kupferverbindungen zu arbeiten. In organischen Synthesen für die *pre-assembly* Funktionalisierung der Diblockcopolymeren ist  $\text{CuIP(OEt)}_3$  durch eine gute Löslichkeit und gute Umsätze von 86% mit Azidzuckern optimal geeignet.

## 5.7. Vorarbeiten zur Festphasensynthese

Neben biochemischen Verfahren lassen sich Proteine und DNA-Sequenzen in organischen Festphasensynthesen herstellen. Dazu werden die einzelnen Monomere (Aminosäuren oder Nucleotide) in aufeinander folgenden Zyklen aneinander gekoppelt. Die Reinigung von Edukten ist schnell und sehr effektiv indem mit Lösungsmittel gespült wird ohne dadurch einen Ausbeuteverlusten des Produkts befürchten zu müssen, da dieses mit dem Trägermaterial fest verbunden ist. In Abbildung 37 ist ein Zyklus gezeigt, der nicht wie gewöhnlich ein weiteres Nucleotid an das Ende der DNA-Kette gekoppelt sondern ein zuvor aktiviertes DBC (PI-*b*-PEO-Phosphoramidit **30**). Die Festphasensynthese bietet den Vorteil das alle Polymere, die nicht an die DNA binden, über einen Waschschrift entfernt werden. Zum Schluss werden nur Polymere mit einer DNA Funktionalisierung erhalten. Die Kopplung erfolgt dabei nur an der letzten Base und es werden keine mehrfach Kopplungen erhalten (s. Abb. 37). Um die optimalen Bedingungen für die Synthese mit dem Diblockcopolymer zu schaffen, wurden zur Vorbereitung die bereits präsentierten Vorversuche zu Acetonitril als Lösungsmitteln in Kapitel 5.1 vorgestellt. Diese Synthesen sind in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Willem de Vries in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hermann der Universität Groningen entstanden.

Bei der Synthese des PI-*b*-PEO-Phosphoramidits **30** (s. Abb. 36) ist besonders sorgfältig unter Schlenkbedingungen gearbeitet worden. Dazu wurde PI-*b*-PEO-OH unter basischen Bedingungen mit 2-Cyanoethyl-N,N-Diisopropylchlorphosphoramidit **29** umgesetzt. Nach der Entfernung überschüssigen Eduktes **29** wurde ein Umsatz von 80% für Verbindung **30** anhand eines  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums bestimmt. Die Bildung des Oxidationsprodukts **31** ließ sich im NMR-Spektrum ebenfalls nachweisen. Das Gemisch aus Verbindung **30** und **31** konnte ohne weitere Reinigung zur Synthese am DNA-Synthesizer genutzt werden.

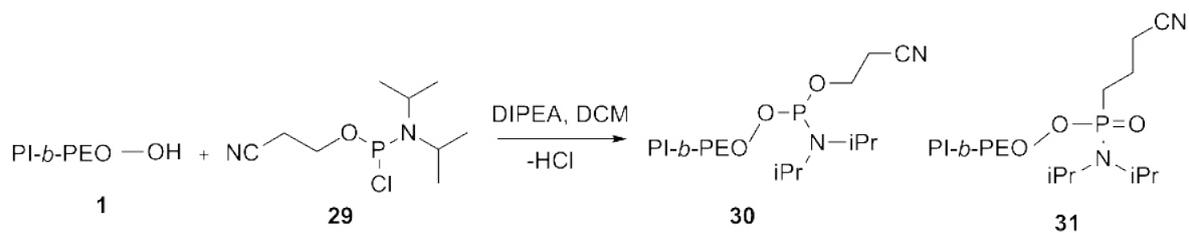


Abbildung 36: Darstellung des DBC-Phosphoramidit **30** sowie oxidierte Form **31** als Nebenprodukt.

Die hier gezeigte Festphasensynthese (s. Abb. 37) wurde an einem basenlabilen Träger aus Polystyrol (PS) durchgeführt. Nach der Synthese der gewünschten DNA-Sequenz kann anstelle einer weiteren Nucleobase das aktivierte PI-*b*-PEO **30** mit der entschützten OH-Gruppe an der Ribose reagieren. Unter schwachsauren Bedingungen reagiert die Hydroxylgruppe nucleophil am Phosphoramidit unter Abspaltung von Diisopropylamin (s. Abb. 37). Das entstandene Phosphit **32** wird anschließend zum Phosphat **33** oxidiert. Der Zyklus wird durch das DBC als letztes Nucleotid beendet und alle Schutzgruppen der DNA-Basen, Phosphatreste sowie Trägermaterial können durch eine wässrige Ammoniaklösung abgespalten werden. Das Produkt **34** wurde erhalten.

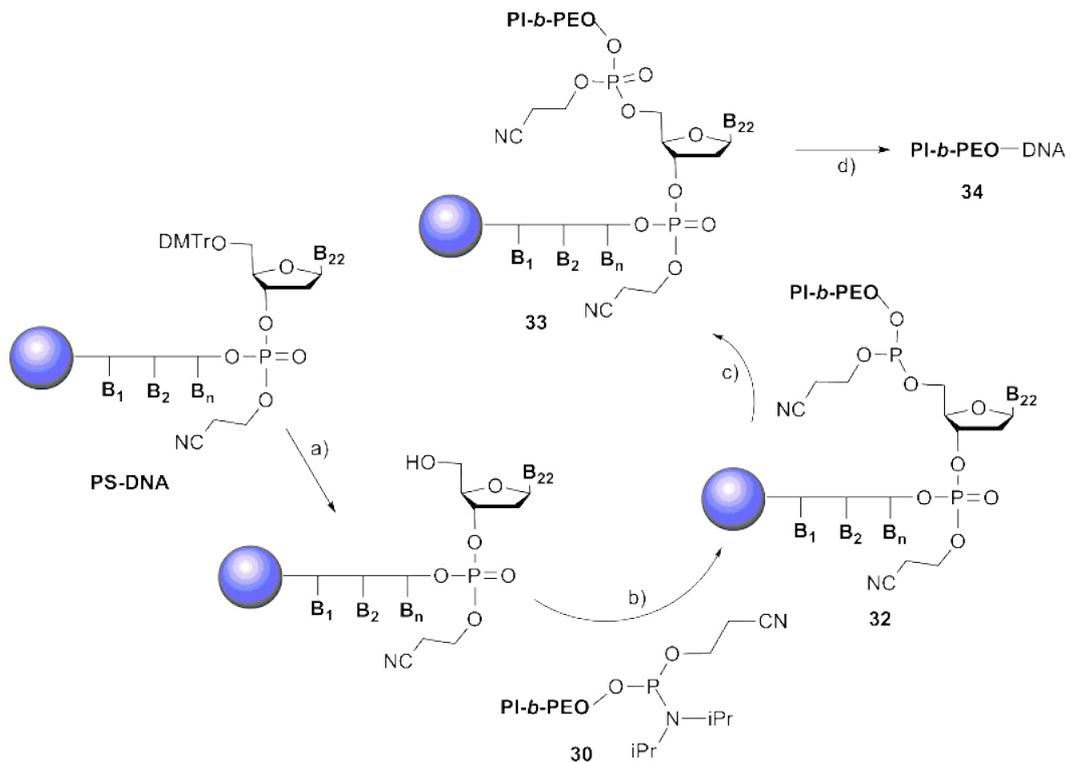


Abbildung 37: Darstellung der Kopplung von PI-*b*-PEO-Phosphoramidit an Desoxyribose innerhalb eines DNA-Syntheseprozesses als letzte Base. a) Entfernung der para-Dimethyltrityl-Schutzgruppe (DMTr-) an der OH-Gruppe der Ribose. b) Nucleophile Substitution von **30**. c) Oxidation der Phosphitgruppe. d) Abspaltung und Entschützung durch Ammoniak.

Die Charakterisierungen gaben erste Hinweise auf die erfolgreiche Kopplung des Diblockcopolymer an die DNA-Sequenz. Das Produkt **34** kann anhand der zusätzlichen negativen Phosphatgruppe über eine HPLC gereinigt werden. Im Polyacrylgel (s. Abb. 38) ist sehr gut der Unterschied zwischen den einzelnen getrennten Produkten zu sehen. In Bahn 3 ist die Fraktion mit freier 22nt einzelsträngiger DNA auf gleicher Höhe zur Referenz in Bahn 2. Das Produkt der DBC gekoppelten DNA ist in Bahn 4 zu finden. Zum Vergleich ist eine Probe der Gruppe aus Groningen mit DNA an einem Polymer in Bahn 12 gezeigt, die ein ähnliches Verhalten aufweist, wie das Produkt aus Bahn 4.

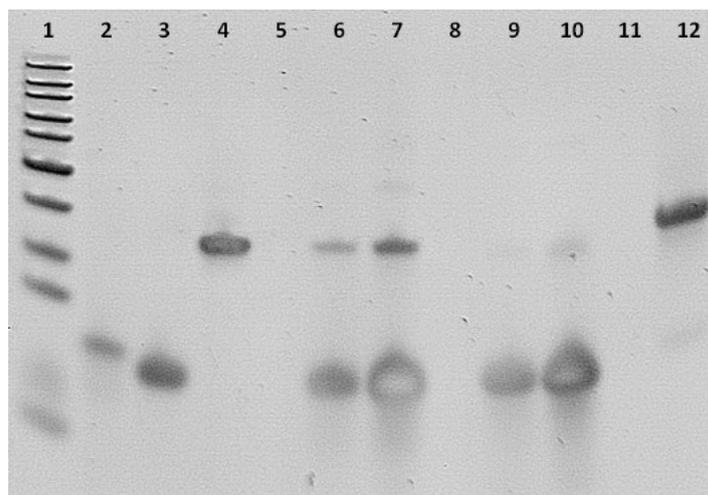


Abbildung 38: Denaturierendes Polyacrylamid-Gel: 1: Ladder 2: ssDNA 22nt, 3: Reinigungsfraktion 3 (kein DBC), 4: DBC (10 kDa) Fraktion 5 mit ssDNA 22nt, 5: -, 6: Syntheseprodukt 1 ungereinigt (100fach verdünnt), 7: Syntheseprodukt 1 ungereinigt (100fach verdünnt) (3x), 8: -, 9: Syntheseprodukt 2 ungereinigt (100fach verdünnt), 10: Syntheseprodukt 2 ungereinigt (100fach verdünnt) (3x), 11: -, 12: Vergleichspolymer mit DNA aus Groningen.

Nachfolgend wurde ein Massenspektrum aufgenommen, hier ließ sich mit Sicherheit feststellen, dass es sich nicht um zwei DNA-Stränge handelte, dennoch konnte die Masse für das Produkt **34** aus PI-*b*-PEO mit gekoppelter DNA nicht ermittelt werden. Im  $^1\text{H}$ -NMR konnten nur Signale von der DNA gefunden werden. Der Grund dafür könnte sein, dass die Signale des PI-*b*-PEOs ggf. durch eine Mizellenbildung abgeschirmt sind, da sich das Produkt nur in  $\text{D}_2\text{O}$  lösen ließ. Wie bereits im Kapitel 5.1 zur Charakterisierung von PI-*b*-PEO in  $\text{D}_2\text{O}$  beschrieben wurde, sind dann keine PI-Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und nur noch das PEO-Signal bei 3.65 ppm zu sehen.

Im DLS wurden für das Produkt PI-*b*-PEO-ssDNA aus Fraktion 5 polydisperse Mizellen (PDI 0.6) mit einem Hauptpeak bei 144-196 nm gemessen. Dieser Wert ist größer als für die zuvor vermessenen DBC aus den Vorversuchen (s. Kapitel 5.1.4). Die Mizellen der Polymere ohne DNA weisen dabei eine Größe zwischen 29-38 nm auf. Die deutliche Vergrößerung der Mizellen spricht dafür, dass eine Kopplung von DNA und PI-*b*-PEO stattgefunden hat und das Produkt **34** erhalten wurde.

Die erhaltenen Mengen sind im Bereich von 2 - 3 mg und für eine Verkapselung der Nanopartikel nicht ausreichend. Für zukünftige Verkapselungen wurde bereits in Kapitel 5.1 die Abmischung mit kleinen DBC getestet sowie eine neue Methode zur Verkapsel-

lung mit DBC, die sich nach der Funktionalisierung nicht mehr in THF lösen lassen (s. Kapitel 5.2) und auf die hier zurück gegriffen werden könnte. Bei ausreichenden Mengen wäre dann die Verkapselung der NP mit DNA funktionalisierten Diblockcopolymeren möglich.

Die Charakterisierung mittels Gelen und über die zusätzliche negative Ladung durch die weitere erhaltene Phosphatgruppe, die in der HPLC zur Trennung von ungekoppelter DNA genutzt wurde, bestätigen die erfolgreiche Kopplung.

Um die Ausbeute zu steigern, sind Optimierungen der Einstellungen am DNA-Synthesizer sowie der Reinigungsschritte erforderlich. Die eingesetzte Menge an DBC von 3 g pro Synthese am DNA-Synthesizer überschreitet allerdings die sonst üblichen verwendeten Mengen (20-200 mg) für unerprobte Reaktionen, sodass diese Syntheseroute nach einigen Versuchen nicht weiter verfolgt wurde.

## 5.8. Darstellung von PI-*b*-PEO-Biotin

Die biotinylierten DBC können genutzt werden um im nächsten Schritt Streptavidin (Strep.) bzw. NeutrAvidin (NAvi) zur bioorthogonalen Kopplung von ebenfalls biotinylierten Affinitätsmolekülen zu nutzen. In der Theorie in Kapitel 2.7.2 wurde bereits detailliert auf die Wechselwirkung von Biotin mit der Klasse der Avidine eingegangen, sowie die Vorteile der bioorthogonalen Kopplung an Nanocontainer. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt II vorgestellt.

Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte eine erfolgreiche Kopplung von Biotin an das DBC durch Dr. Christian Schmidtke gezeigt werden.<sup>[46]</sup> Der Biotin-NHS-Ester ist dabei als kommerziell erhältliches Produkt kostenintensiv und muss trocken gelagert werden. Mit der nachfolgenden Synthesestrategie über eine basisch katalysierte Veresterung am Biotin **35** mit Pentafluorophenyltrifluoroacetat **36** (s. Abb. 39) konnte erfolgreich die Darstellung des PI-*b*-PEO-Biotins **38** (s. Abb. 40) gezeigt werden. Die Umsätze liegen in einem ähnlichen Bereich wie bei der NHS-Kopplung.

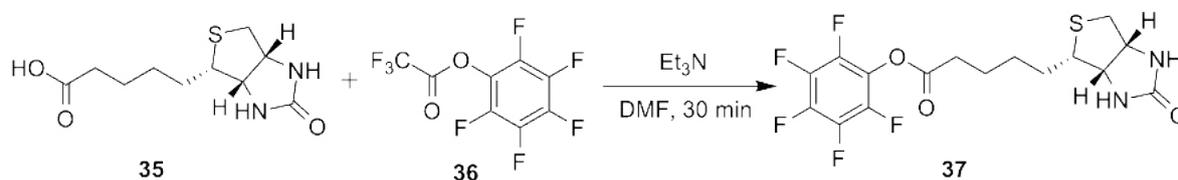


Abbildung 39: Aktivierung des Biotins zum Pentafluorophenyl (pFp)-Aktivester.

Durch die Zugabe der Base 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) wird das nucleophile Amin am Polymer aktiviert und mit dem Carbonyl des Aktivesters umgesetzt. Es konnte ein Umsatz von 30% erzielt werden, somit war diese Reaktion ebenso erfolgreich wie die Umsetzung mit dem NHS-Ester. In den beiden Spektren der Abbildung 41 sind sehr gut die Signale des Biotins im direkten Vergleich mit dem gekoppeltem Polymer wiederzufinden.

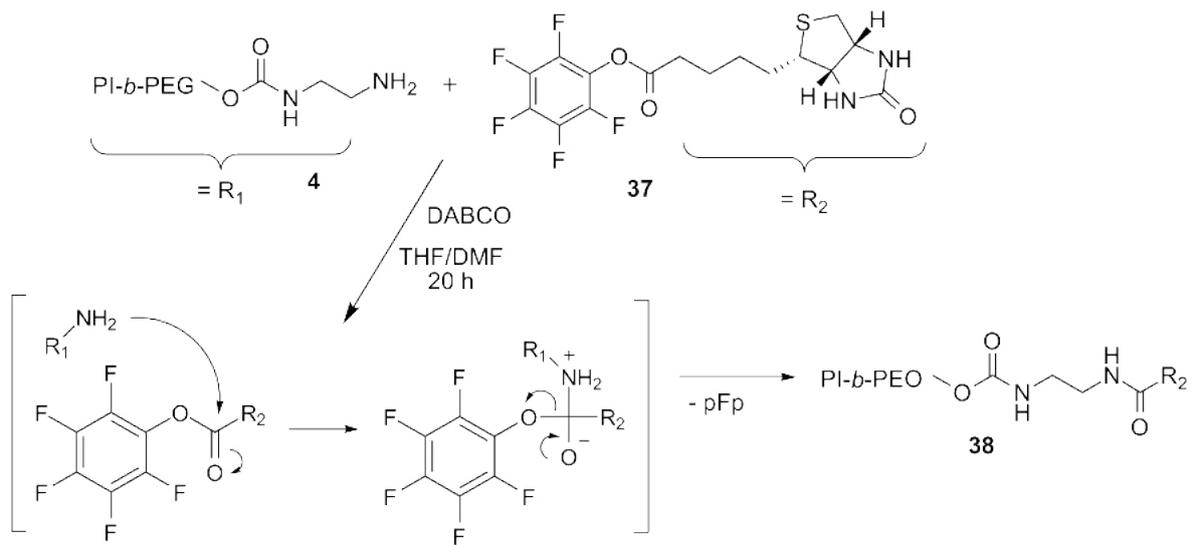


Abbildung 40: Umsetzung des DBC-Amin **5** mit aktiviertem Biotin **38**.

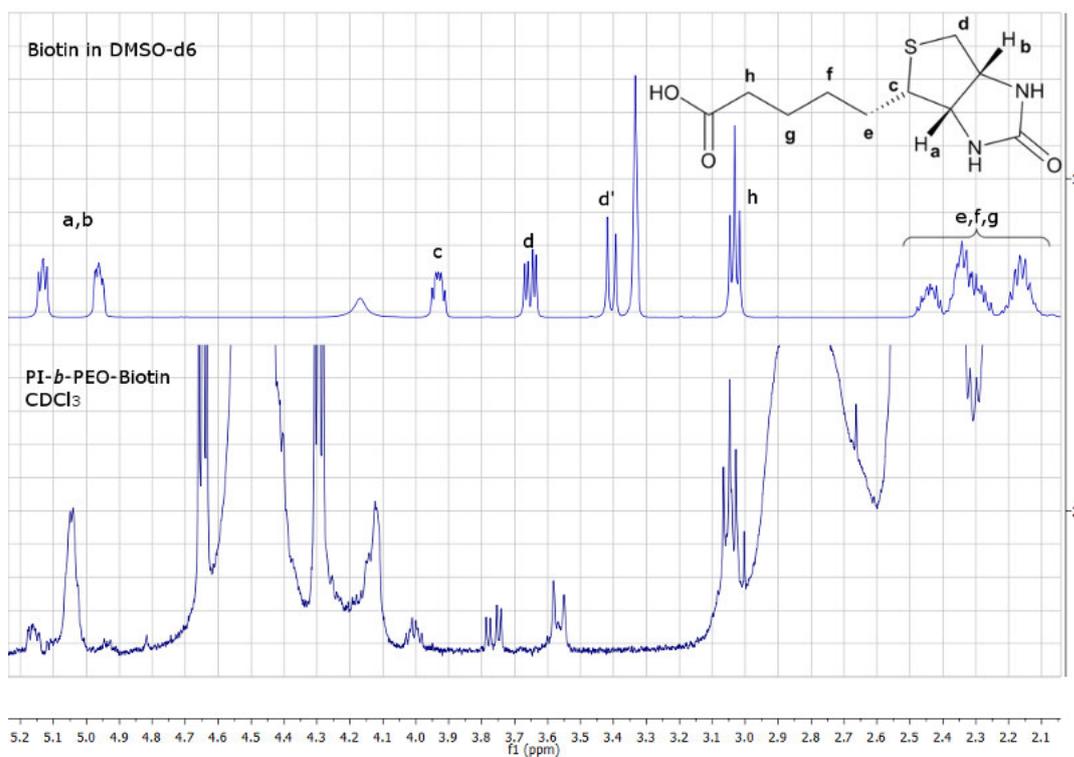


Abbildung 41:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Biotin **35** in DMSO-d<sub>6</sub> (oben) im Vergleich mit PI-*b*-PEO-Biotin **38** (unten).

## Abschnitt II - Bioorthogonale Kopplung an Nanocontainern

Die bioorthogonale Kopplung ist eine schonende Methode, bei der die einzelnen Bestandteile keinen Kontakt zu aggressiven Reagenzien haben und empfindliche biologische Konstrukte gezielt an nur einer Stelle mit einer kopplungsfähigen Gruppe biochemisch reagieren. Es werden Verfahren genutzt, die bei *in vivo* und *in vitro* Anwendungen bereits erprobt sind.

Im folgenden Abschnitt wird näher darauf eingegangen wie DNA-Aptamere (91 Nukleotide (nt)) über NeutrAvidin an die Nanocontainer gekoppelt werden.

### 5.9. Biochemische Kopplung - NeutrAvidin als Bindeglied zwischen Nanocontainer und Aptamer

Die Bindung von Biotin zu Streptavidin und Avidin bzw. NeutrAvidin (NAvi) wurde bereits in den 1970ern erforscht. Es ist die stärkste bekannte nicht kovalente Bindung mit einem  $K_D$ -Wert von  $10^{-15}$  M und findet vielfältigen Einsatz in der biochemischen Forschung.<sup>[128]</sup> Bei den folgenden Kopplungen wird diese starke Bindungsfähigkeit ausgenutzt, um biochemische Materialien mit einander zu verknüpfen.

Die zuvor biotinylierten Polymere wurden zur Verkapselung der Nanopartikel genutzt und tragen etwa 10 Biotin-Einheiten pro Nanocontainer.

Im nächsten Schritt wurde gezielt NeutrAvidin (60 kDa) als Protein gewählt. Es handelt sich dabei um die deglycosylierte Form von Avidin, wodurch Wechselwirkungen mit Lektinen vermindert werden und durch einen neutralen pI von 6.3 die Adsorption zu Zelloberflächen gering gehalten wird.<sup>[129]</sup> Dieses Protein liegt als Tetramer vor und verfügt über vier Bindungsmöglichkeiten für Biotine.

In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Ulrich Hahn aus dem biochemischen Institut wurde als Erkennungsmolekül ein 2014 patentiertes DNA-Aptamer (Selektin-DNA-Aptamer (SDA)), das Faryammanesch *et. al.* in einem Selektionsverfahren ermittelt haben und einen  $K_D$ -Wert von 100 nM zu recombinantem humanem E-Selektin (rh. ES) aufweist, gewählt.<sup>[88]</sup>

Im ersten Schritt wird die Oberfläche der Nanocontainer mit Biotinen durch einen ho-

hen Überschuss von NeutrAvidin vollständig abgedeckt. Nach der Reinigung von freiem Navi kann das gewünschte biotinylierte Erkennungsmolekül an eine der freien Bindungsstellen des Proteins andocken. Der Erfolg der Kopplung wurde mittels Gelelektrophorese bestätigt.

## 5.10. Nanocontainer mit Biotin

Mit den biotinylierten Polymeren **38** wurden Quantum Dots verkapselt. Dazu wurde das jeweilige Ausgangspolymer zur Abmischung genutzt, um statistisch pro Nanocontainer je 10 Biotine an der Oberfläche zu erhalten. Über die Standardverkapselungsmethode wurden QDs und QDQRs, die durch Polyisopren-Diethylentriamin (PI-DETA)-Liganden stabilisiert sind, mit den Diblockcopolymeren in Wasser überführt und anschließend die radikalische Quervernetzung durch den Radikalstarter Azobis(isobutyronitril) (AIBN) bei 70 °C initiiert (s. Kapitel 5.2).

Bei diesem Verfahren werden die Polymere in einem hohen Überschuss eingesetzt, um möglichst einzelne NP in einer Mizelle verkapseln zu können. Dabei werden gleichzeitig viele leere Mizellen ohne NP erhalten, diese können über eine Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt werden. Teilweise werden auch mehrere NP in einer Mizelle eingeschlossen, wie in den TEM-Aufnahmen (s. Abb. 42) zu sehen ist.

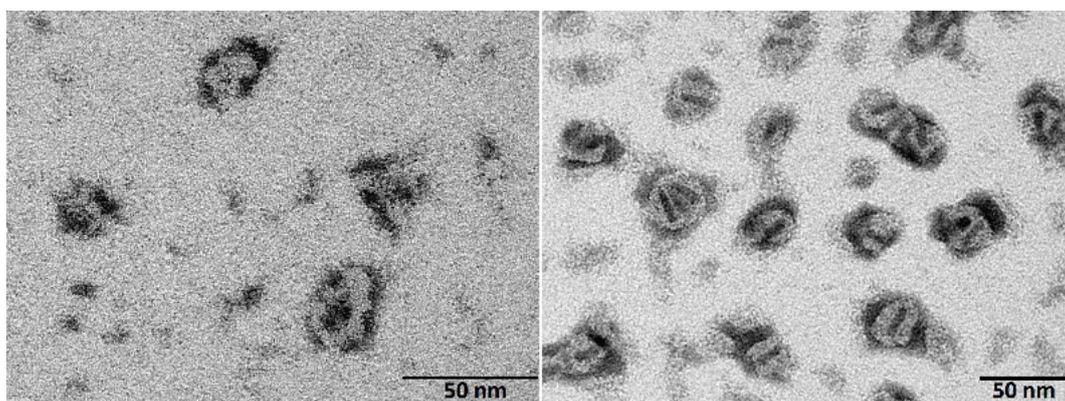


Abbildung 42: TEM-Bilder von Nanocontainern: (links) QDs (rechts) QDQRs, die jeweils mit Phosphorwolframsäure behandelt wurden, um die Polymeraußenhülle sichtbar zu machen.

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind alle verwendeten Nanocontainer zu finden, die als Grundlage für alle weiteren Experimente dienen und sich nur durch die Funktionalisierung ihrer Polymere voneinander unterscheiden (s. Abb. 43). Die Kenngrößen von

Absorption und DLS liegen alle in einem ähnlichen Bereich, sodass die Nanocontainer mit einander vergleichbar sind. Die Halbwertsbreite (*half width at halfmaximum*) HWHM) bezieht sich auf das erste Maximum im Absorptionsspektrum und ist ein Maß für die Größenverteilung der Nanopartikel. Je kleiner die HWHM desto schmaler ist die Größenverteilung.

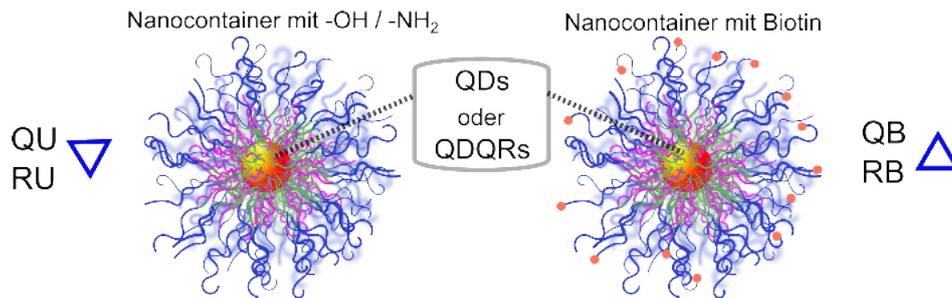


Abbildung 43: Bezeichnung der Nanocontainer mit unterschiedlichen Endgruppen. QU: NC aus QDs mit DBC-OH oder -NH<sub>2</sub>, RU: NC aus QDQRs mit DBC-OH oder -NH<sub>2</sub>, QB: NC mit QDs mit biotinylierten DBC, RB: NC mit QDQRs mit biotinylierten DBC.

Tabelle 3: Übersicht zu allen Ausgangsnanocontainern mit biotinfunktionalisierten Polymeren und zugehörigen NC mit unfunktionalisierten Polymeren.

Symbol	Proben	Polymere	Abs. [nm]	HWHM [nm]	DLS, D Int./V./Num. [nm]
▽	QU1	-OH	600	18	67/40/29
▽	RU1	-OH	588	15	58/44/35
▽	QU2	-NH <sub>2</sub>	587	20	98/46/23
△	QB1	Biotin/OH	600	16	67/42/31
△	RB1	Biotin/OH	588	15	66/46/36
△	QB2	Biotin/NH <sub>2</sub>	587	20	53/37/29
△	QB3	Biotin/NH <sub>2</sub>	587	20	53/35/27

Die QDs mit einer Ausgangs-QY von 35% wurden mit den oben beschriebenen funktionalisierten Polymeren erfolgreich in Wasser transferiert. Dabei wurde, um kostbares Probenmaterial zu sparen, stichprobenartig von den Proben QU1 und QB1 die QY bestimmt. Es wurde festgestellt, dass von der ursprünglichen QY noch 53-38% vorhanden waren. Für eine Detektion mittels Konfokalmikroskopie ist dies allemal ausreichend und könnte unter Verwendung stärker fluoreszierender Ausgangs-QDs, wie beispielsweise von E. Pösel et al. gezeigt, deutlich verbessert werden.<sup>[47]</sup> Für Einzelexperimente mit sehr geringen Volumina (5-20  $\mu$ L) wurden Verdünnungen aus höher konzentrier-

ten Proben, ausgehend von den Konzentrationsberechnungen der Absorptionsspektren, hergestellt. Dabei muss besonders darauf geachtet werden, dass eine höhere Ungenauigkeit der Pipetten bei sehr kleinen Volumina auftritt und es zu Schwankungen in den Endkonzentration kommen kann. Es daher wichtig möglichst alle Ausgangslösungen mit einer ähnlichen Verdünnung herzustellen.

Die Bindungsfähigkeit der Biotine am fertigen Nanocontainer konnte mehrfach erfolgreich mittels Dot Blots bestätigt werden. Wie im Dot Blot in Abbildung 44 zu sehen ist, zeigen die funktionalisierten NC mit Biotin (QB2 u. QB3) eine starke Affinität zu NeutrAvidin. NC mit einfachen Endgruppen (-OH, -NH<sub>2</sub>, QU2) zeigten nur eine sehr geringe unspezifische Wechselwirkung, die kaum wahrnehmbar ist. Zur Überprüfung auf eine unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen und NC auf Dot Blots wurde Albumin aufgetragen und keine Bindung festgestellt. Die Zugänglichkeit und spezifische Wechselwirkung von NC aus biotinyliertem PI-*b*-PEO **38** mit NAvi ist somit für das weitere Vorgehen sichergestellt.

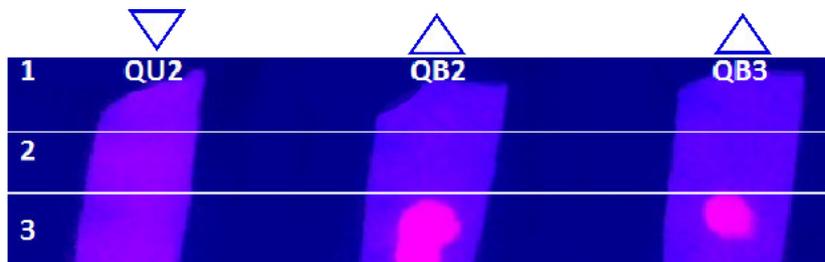


Abbildung 44: Dot Blots unter UV-Bestrahlung. Jeder Streifen wurde in einer verdünnten Lösung aus NC (QU2, QB2 u. QB3) für 40 Min inkubiert. Dabei wurden die Abschnitte zuvor mit Proteinen versehen. 1): Referenz ohne Proteine. 2): Albumin (BSA), 3): NeutrAvidin.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Dot Blots konnte mehrfach bestätigt werden. Weitere Abbildungen zu durchgeführten Dot Blots sind im Anhang zu finden. Dabei sind auch Variationen in der Versuchsdurchführung mit unterschiedlichen Nanocontainern getestet worden, alle weisen die gleichen Resultate auf.

## 5.11. Darstellung der Nanocontainer mit NAvi sowie Kopplung der Aptamere

Zur Herstellung der Nanocontainer mit NAvi  wird ein hoher Überschuss (200 Äq pro biotinyliertem NC) verwendet, um eine Agglomeration von mehreren Nanocontainern über die vier möglichen Bindungsstellen des NeutrAvidins zu unterbinden (s. Abb. 45). Die langsame Zugabe, richtige Verdünnung sowie die Wahl eines geeigneten Puffersystems sind dabei die wichtigsten Faktoren für eine stabile kolloidale Lösung der NAvi-Nanocontainer. Phosphathaltige Puffer mit Calcium und Magnesium sind nur bedingt geeignet, da es nach kurzer Zeit zum Ausfallen von Salzen kommen kann, ohne Calcium und Magnesium sind diese für eine Lagerung der NAvi-NC gut geeignet. Ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen über einen längeren Zeitraum erforderlich, empfiehlt es sich einen TRIS-Puffer zu verwenden.

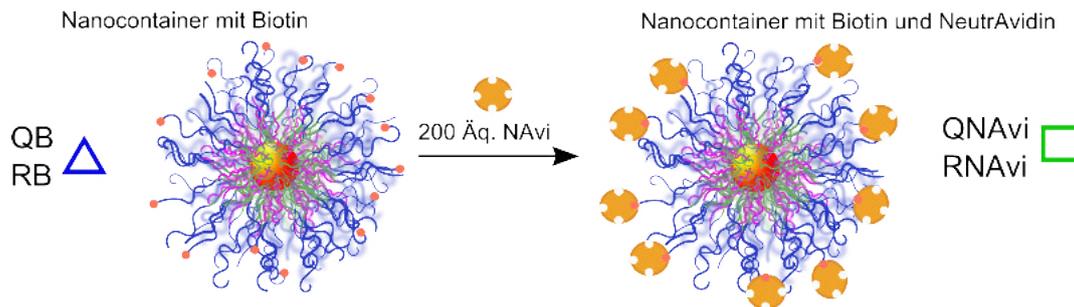


Abbildung 45: Kopplung der Nanocontainer mit Biotin (QB, RB) mit NeutrAvidin.

Nach diesem ersten Schritt sind viele ungebundene Proteine in der Lösung, die mit biotinylierten Aptameren (SDA-Biotin) binden könnten und einen starken Einfluss auf die Resultate in der späteren Anwendung hätten. Daher wurden mehrere Methoden zur möglichst vollständigen Abtrennung des freien NAvi getestet. Die Ausbeuten wurden anhand der verbliebenen QDs bzw. QDQRs über deren Absorption ermittelt (s. Tab. 4). Die Qualität der Reinigung wurde anhand von DLS-Messungen und Agarosegelen überprüft.

Bei der Reinigung über eine Dialyse (QNAvi2, RNAvi2) zeigte sich eine starke Wechselwirkung der NC mit dem Material der Dialyseschläuche, dies führte zu hohen Ausbeuteverlusten. Zudem war die erhoffte Diffusion des NAvi aus der Probenlösung un-

Tabelle 4: Auffistung der Nanocontainer, die mit NeutrAvidin versehen wurden und als Grundkonstrukte für die Kopplung mit biotinylierten Aptameren dienten.

Probe □	Abs. [nm]	HWHM [nm]	c [ $\mu$ M]	n [nmol]	Ausbeute [%]	DLS Int. D [nm]
QNAvi1	598	19	0.12	0.07	12	32
RNAvi1	586	15	0.11	0.06	10	41
QNAvi2	geringe Konzentration,				0	(120)
RNAvi2	unvollständige Reinigung				0	(120)
QNAvi3	590	17	0.06	0.29	48	72
RNAvi3	572	18	0.03	0.03	5	81
QNAvi4	599	18	0.14	0.53	88	142
RNAvi4	587	17	0.07	0.42	70	208

vollständig. Im DLS waren neben dem Peak bei ca. 120 nm auch sehr große Konstrukte vorhanden, die auf eine Agglomeration mehrerer NC hindeuten. Die Proben konnten nicht weiter verwendet werden.

Bei der Reinigung über eine Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) (QNAvi1, RNAvi1, QNAvi3, RNAvi3) variierten die Ausbeuten zwischen 5 und 48%.

Als schonende, erprobte Methode wurde daher im letzten Versuch (QNAvi4, RNAvi4) die Reinigung über eine Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) gewählt. Die Ausbeuten von 88% und 70% übertrafen alle vorherigen Reinigungsmethoden und zeigten ebenfalls hochwertige und reproduzierbare Ergebnisse bei der nachfolgenden Kopplung mit den Aptameren.

Jede Reinigung hatte Vor- und Nachteile, entscheidend ist letztendlich, dass das freie Navi möglichst gut abgetrennt werden kann. Dies ist sowohl mit der GPC als auch mit der DGZ gelungen. Die DLS-Daten zeigen, dass die Nanocontainer nach der DGZ allgemein größer sind als nach der GPC. Die Homogenität von Proben ist in der medizinischen Forschung besonders für eine ähnliche Biodistribution von Vorteil. Für das weitere Vorgehen im experimentellen Bereich liegt der Fokus zunächst auf der Darstellung des NC mit Aptameren, sowie dem Nachweis der Bindungsfähigkeit der Aptamere nach der Kopplung an den NC. Daher sind die Ausbeuten hier der entscheidende Faktor um ausreichende Mengen für *in vitro* und *in vivo* Experimente zur Verfügung stellen zu können. Aufgrund dessen ist für die weitere Forschung die Reinigung über die DGZ zu bevorzugen. Alle Nanocontainer mit Navi wurden in Agarosegelen überprüft und deren Kopplung mit biotinylierten Aptameren ist bei allen NC in Agarosegelen reproduzierbar nachgewiesen worden.

## 5.12. Nachweis der bioorthogonalen Kopplung über Agarosegele

Anhand der ersten Versuchsreihe (QNAvi1 und RNAvi1) ist die Reinigung und Überprüfung der Kopplung mit biotinylierten Aptameren in allen Teilabschnitten sowie Kontrollen auf unspezifische Wechselwirkungen in Agarosegelen dokumentiert. Im Folgenden werden diese Ergebnisse, stellvertretend für alle anderen Versuche, detailliert geschildert. Die Kopplung der biotinylierten Aptamere erfolgt durch Zugabe zu den Nanocontainern, die mit NeutrAvidin versehen sind (s. Abb.46).

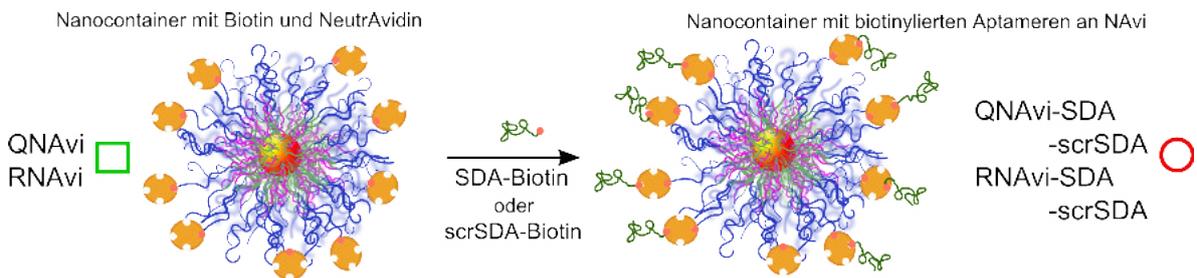


Abbildung 46: Nanocontainer mit NeutrAvidin die mit biotinylierten Aptameren (SDA-Biotin und scrSDA-Biotin) gekoppelt werden.

Zur Untersuchung von Proteinen und DNA eignen sich sowohl Agarose- als auch Polyacrylamidgele (PAA-Gele). Agarosegele können schnell und ohne giftige Substanzen hergestellt werden, im Gegensatz dazu wird bei PAA-Gelen das giftige Monomer Acrylamid verwendet. Es werden stabile Agarosegele mit großen Poren von 150-500 nm erhalten, die eine Trennung von hochmolekularen Proteinen ( $> 500$  kDa) ermöglichen. Die Nachteile bei Agarosegelen sind, dass die Molekülbanden breiter sind als bei PAA-Gelen und bei einer Anfärbung mit Coomassieblau oder Silber eine starke Hintergrundfärbung des Geles eintritt. PAA-Gele besitzen einen geringen Porendurchmesser von wenigen Nanometern (3-5 nm), sodass große Makromoleküle bzw. NC über 800 kDa nicht in das Gel einwandern können.<sup>[130]</sup> Zudem befinden sich die Probenaschen in einem PAA-Gel üblicherweise direkt am oberen Rand, sodass NC mit einer positiven Ladung zur Kathode aus den Taschen herauswandern würden (siehe dazu im Vergleich das Agarosegel der Abb. 47 in Bahn 8, 9, 11 und 12 mit Nanocontainern ohne Navi oder Aptamere). Der Vorteil von Agarosegelen zur Untersuchung von Nanocontainern ist, dass die Taschen in die Mitte des Gels gesetzt werden und so beide Laufrichtungen untersucht werden können. Da das Anfärben mit Silber zu einem *quenching* der QDs geführt hätte und

auch das Einfärben der Proteine über Coomassieblau in einem Agarosegel nicht möglich war, wurde der Nachweis indirekt über das veränderte Laufverhalten der fluoreszierenden NC und zusätzlich die Anfärbung der DNA-Aptamere über Ethidiumbromid (EtBr) erbracht.

Im direkten Vergleich zwischen zwei Reinigungsmethoden zeigten die Agarosegele welche Auswirkungen eine starke Verunreinigung mit freiem NAvi auf das Laufverhalten haben kann. In Abbildung 47 sind die NAvi-NC gezeigt, die über eine Filtration durch einen Spinfilter mit einem Größenausschluss von 100 kDa gereinigt wurden und so das freie NAvi (60 kDa) entfernt werden sollte. In der Abbildung 47 ist nach Zugabe von SDA-Biotin allerdings zu sehen, dass sich die Laufgeschwindigkeiten der Proben kaum verändern. Es ist daraus zu schließen, dass viel freies NAvi in der Lösung vorhanden ist. Dadurch hat die Kopplung der Aptamere an den Nanocontainer nur im geringem Maße stattgefunden.

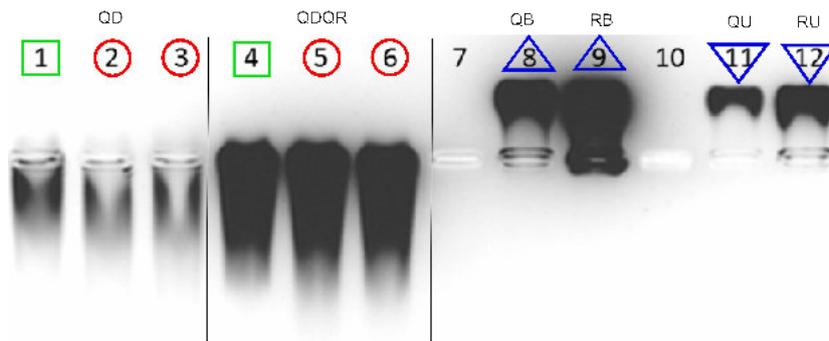


Abbildung 47: NC vor der GPC im Agarosegel [1%, 100 V, 20 Min., ohne EtBr]: 1: QNAvi1, 2: QNAvi1-SDA, 3: QNAvi1-scrSDA, 4: RNAvi1, 5: RNAvi1-SDA, 6: RNAvi1-scrSDA, 7: - , 8: QB1, 9: RB1, 10: - , 11: QU1, 12: RU1. 1-6: NC mit NeutrAvidin und Aptameren sind negativ geladen und wandern ins Gel zum Pluspol. 8-12: NC sind leicht positiv geladen und laufen in Richtung des Minuspols.

Ganz deutlich ist der Unterschied nach der gelungenen Reinigung von freiem NAvi durch die GPC zu sehen. Im Agarosegel in Abbildung 48 wandern die Nanocontainer mit gekoppelten Biotin-Aptameren in Bahn 2, 3, 6 und 7 durch die negative Ladung weiter als die NC ohne Aptamere in Bahn 1 und 5.

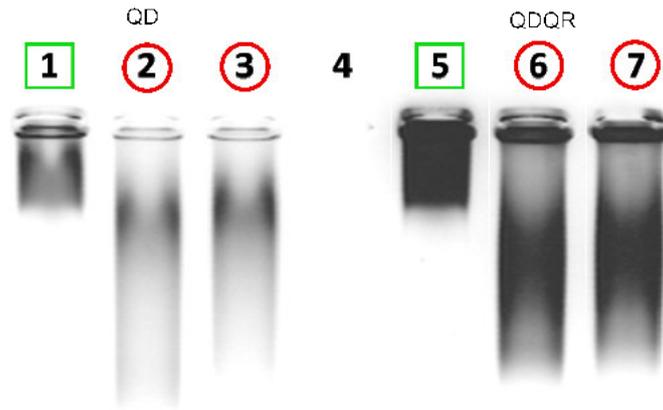


Abbildung 48: Agarosegel [1%, 100 V, 40 Min., ohne EtBr]: 1: QNAvi1, 2: QNAvi1-SDA, 3: QNAvi1-scrSDA, 4: -, 5: RNAvi1, 6: RNAvi1-SDA, 7: RNAvi1-scrSDA. Die NC, die an die biotinylierte DNA gekoppelt wurden laufen schneller als NC die nur Navi auf der Oberfläche tragen.

Ebenso wichtig wie die Entfernung von freiem Navi, ist die Abtrennung ungebundener Aptamere von den NC nach der Kopplung an die Nanocontainer mit NeutrAvidin. Die Abtrennung überschüssiger Aptamere über einen Spinfilter (0.5 mL, MWCO 100 kDa) stellte dabei kein Problem dar und konnte im Agarosegel (s. Abb. 49) mit einzelnen Waschvorgängen dokumentiert werden. Die Abbildung 49 zeigt den gesamten Verlauf einer Kopplung vom Nanocontainer mit Biotin, NC mit Navi und Aptameren sowie Überprüfung der Waschlösung.

In den letzten Bahnen (15, 16) der Abbildung 49 sind zum Vergleich das SDA-Biotin mit Navi, sowie das SDA-Biotin ohne Navi zu sehen. Die NC mit QDs (QNAvi1) im ersten Abschnitt (1-7) zeigen einen deutlichen Unterschied im Laufverhalten durch die Kopplung mit den Aptameren. Es ist aber auch zu erkennen, dass noch ein Rest Navi in der Probe QNAvi1 zurückgeblieben ist und sich auch im letzten Reinigungsschritt nicht vollständig entfernen ließ (s. Abb. 49 Bahn 5 und 7). Im zweiten Abschnitt der Abbildung 49 (8-14) sind die NC mit QDQRs (RNAvi1) in den einzelnen Kopplungsabschnitten nebeneinander gezeigt. Die Reinigung von freiem Navi mittels GPC ist besser gelungen als bei den QDs und kein ungebundenes Navi ist mehr im Agarosegel zu sehen, welches sonst mit den biotinylierten Aptameren gekoppelt hätte (s. Abb. 49 Bahn 9). Das Abtrennen der ungekoppelten Aptamere ist ebenfalls vollständig gelungen (s. Abb. 49 Bahn 12 und 14).

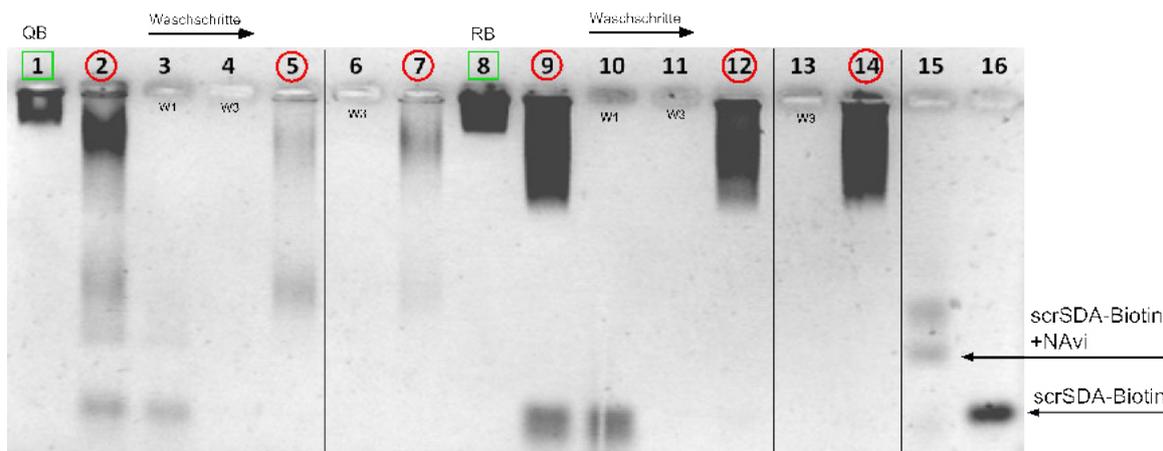


Abbildung 49: Agarosegel [1%, 130 V, 30 Min., mit EtBr] NC nach GPC, Waschlösungen (W) nach Koppeln mit Biotin-Aptameren (SDA und scrSDA): 1: QNAvi1, 2: QNAvi1-SDA (vor den Waschschritten), 3: W1 - 2, 4: W3 - 2, 5: QNAvi1-SDA (nach dem Waschen), 6: W3 - QNAvi1-scrSDA, 7: QNAvi1-scrSDA (nach dem Waschen), 8: RNAvi1, 9: RNAvi1-SDA (vor den Waschschritten), 10: W1 - 9, 11: W3 - 9, 12: RNAvi1-SDA (nach dem Waschen), 13: W3 - 14, 14: RNAvi1-scrSDA (nach dem Waschen), 15: scrSDA-Biotin + NAvi, 16: scrSDA-Biotin. Darstellung aller Teilschritte der Kopplung von Aptameren an NC über NeutrAvidin und Biotin mit Teilschritten sowie Reinigungsabschnitten. 1-7: QDs, 8-14: QDQRs, 15-16: Kontrollen mit Aptameren und NeutrAvidin. Produkte in Bahn 5,7,12 und 14 sind vollständig gereinigt und zeigen keine Reste von Aptameren.

Bei der Überprüfung in den Agarosegelen ist die sehr intensive Fluoreszenz der QDQRs im Vergleich zu den QDs auch in den schwarz-weißen Abbildungen noch deutlich zu erkennen. Es würden auch deutlich geringere Mengen an NC ausreichen, um einen Nachweis im Agarosegel zu sehen. Wichtig bei der Überprüfung auf einen Kopplungserfolg ist dabei, dass die Nachweisgrenzen des DNA-Farbstoffs nicht unterschritten werden.

### 5.13. Kontrollen auf unspezifische Wechselwirkungen von NAvi-NC mit DNA-Aptameren ohne Biotin

Um eine unspezifische Bindung der Aptamere an die Nanocontainer auszuschließen, wurden Kontrollen unter den gleichen Kopplungsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden Aptamere ohne Biotin mit Nanocontainern, die mit NeutrAvidin versehen sind und auch NC mit einer einfachen Polymerhülle aus PI-*b*-PEO-OH (QU1 und RU1) getestet.

In der Abbildung 50 oben ist bereits ohne EtBr-Anfärbung zu erkennen, dass die Na-

nocontainer in Bahn 2 und 3 sowie 6 und 7 ihre Laufgeschwindigkeiten unverändert beibehalten. Dabei handelt es sich um die Kontrollen von NC mit NAvi (2, 6) und Zugabe von Aptameren ohne Biotin (3, 7). Im Vergleich dazu sind in Bahn 4 und 8 die NC mit NAvi unter der Zugabe von biotinyliertem Aptamer (QNAvi-SDA) zu sehen. Diese erhalten durch die gebundenen Aptamere eine stärker negative Ladung und laufen schneller in Richtung der Anode. Im unteren Abschnitt der Abbildung 50 sind durch die Anfärbung mit EtBr dann auch die Aptamere zu sehen.

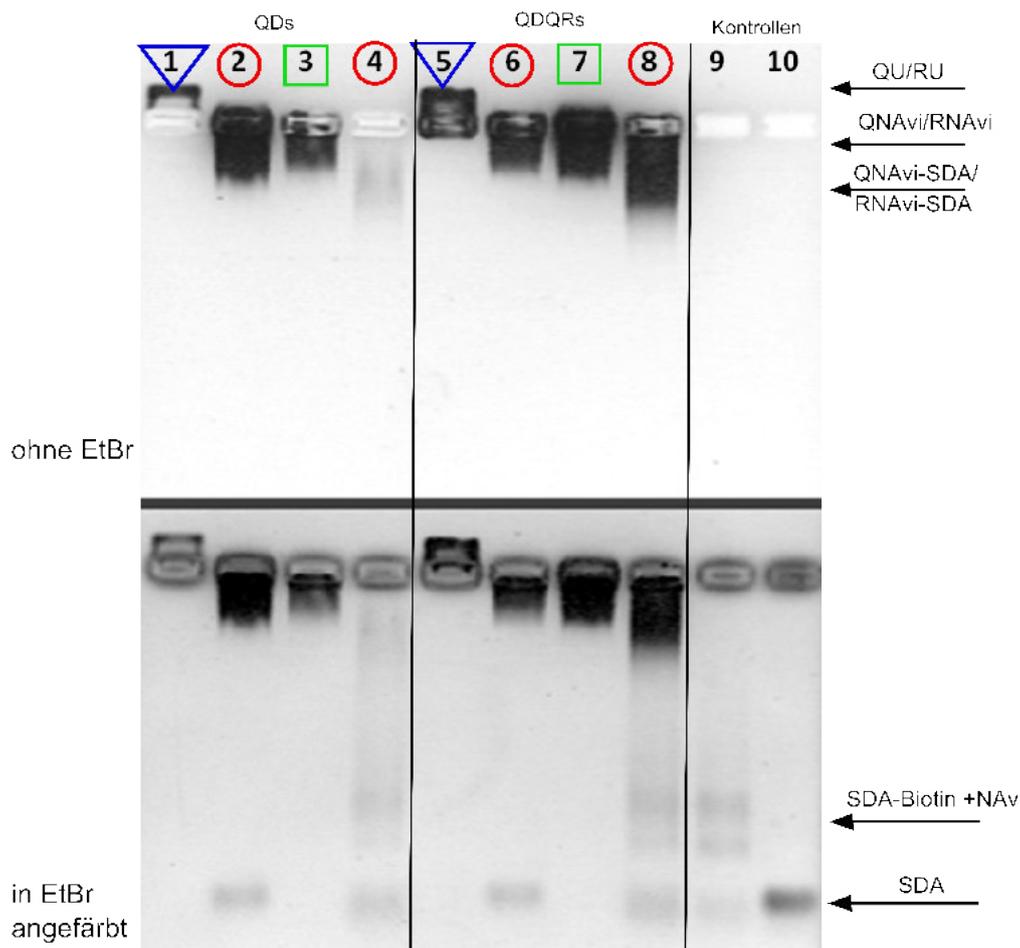


Abbildung 50: Agarosegel [1%, 120 V, 30 Min., (oben) ohne EtBr (unten) mit EtBr]: 1: QU1, 2: QNAvi4 + SDA ohne Biotin, 3: QNAvi4, 4: QNAvi4-SDA, 5: RU1, 6: RNAvi4 + SDA ohne Biotin, 7: RNAvi4, 8: RNAvi4-SDA, 9: SDA-Biotin + NAvi, 10: SDA ohne Biotin. NC mit NAvi und Aptamere mit und ohne Biotin im direkten Vergleich um eine unspezifische Wechselwirkung auszuschließen. Im ersten Abschnitt (1-4) wurden QDs getestet, im zweiten Abschnitt (6-8) QDQRs. Referenzen in Bahn 1 und 5, Aptamer in Bahn 9 und Aptamer-Biotin + NAvi in Bahn 10.

Die ungebundenen Aptamere laufen auf der gleicher Höhe wie die Kontrolle in Bahn

10. In Bahn 4 und 8 sind die NC mit NAvi nach der Reinigung über einen Sucrosegradienten zu sehen (s. Tab. 4 QNAvi4 und RNAvi4), dabei zeigt sich, dass eine geringe Menge freies NAvi in den Proben nicht vollständig entfernt werden konnte, die biotinylierten Aptamere aber ausreichend an die NC binden. In Bahn 9 wird die Qualität der biotinylierten Aptamere deutlich und bestätigt die Annahme, dass nicht alle Aptamere eine Biotingruppe tragen oder diese durch eine sterische Hinderung der Aptamere nicht zugänglich sind, sodass auch bei der Kopplung mit einem Überschuss an NAvi ein kleiner Teil ungebunden bleibt.

Um ein Ausfallen des Proteins zu vermeiden und eine negative Gesamtladung zu erhalten, ist die Wahl des Puffers zu beachten. Im TAE-Puffer bei pH 8 ist das NAvi ( $pI = 6.3$ ) negativ geladen, sodass ein Unterschied im Laufverhalten im Agarosegel im Vergleich zu den nicht an NAvi gebundenen NC zu sehen ist. Wie schon in Abbildung 22 (Kapitel 5.2.1) gezeigt wurde, bewegen sich die Nanocontainer zum negativen Pol, bis auf die NC, die mit Polymer mit Carboxylendgruppe verkapselt wurden.

In Abbildung 51 wurde überprüft wie sich NC mit unterschiedlichen Proteinen verhalten. Diese Überprüfung ist besonders wichtig für das weitere Vorgehen, um eine spezifische Wechselwirkung im nächsten Abschnitt in weiteren Agarosegelen (s. Kapitel 5.14 Abb. 52) und im Dot Blot (Kapitel 5.14.1) überprüfen zu können.

Sehr deutlich ist im Agarosegel der Abbildung 51 zu sehen, dass es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung von NC mit Interleukin 6 (IL6) und Streptavidin (Strep.) kommt, die sich sonst in einem veränderten Laufverhalten zeigen würde. In Bahn 1-3 wurden QDs mit NAvi getestet, sowie in Bahn 4-6 QDQRs. Sowohl NC mit NAvi (14-20) als auch NC mit einer einfachen Polymerhülle mit einer OH-Endgruppe zeigten keine unspezifische Wechselwirkung (7-12) unter der Zugabe von IL6 und Strep.

Bei Interleukin 6 handelt es sich um ein Protein, dass bei Entzündungsreaktionen im Körper eine Rolle spielt. Eine unspezifische Wechselwirkung mit den NC wäre für die spätere gewünschte Untersuchung dieser Prozesse von Nachteil.

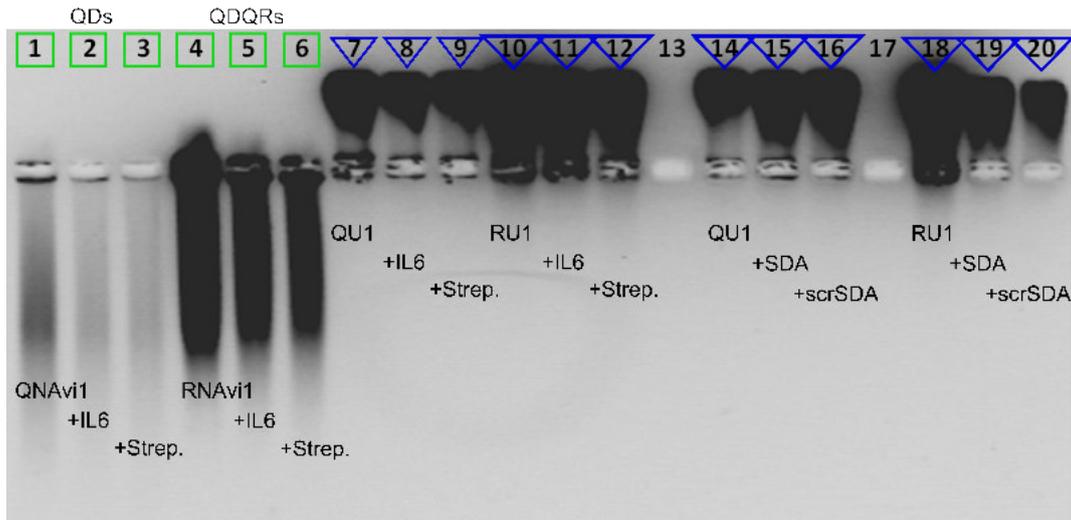


Abbildung 51: Agarosegel [0.75%, 80 V, 3 h, 5 °C, ohne EtBr]: 1: QNAvi1, 2: QNAvi1 + IL6, 3: QNAvi1 + Strep., 4: RNAvi1, 5: RNAvi1 + IL6, 6: RNAvi1 + Strep., 7: QU1, 8: QU1+ IL6, 9: QU1 + Strep., 10: RU1, 11: RU1 + IL6, 12: RU1 + Strep., 13: -, 14: QU1, 15: QU1 + SDA, 16: QU1 + scrSDA, 17: -, 18: RU1, 19: RU1 + SDA, 20: RU1 + scrSDA. Keinerlei unspezifische Wechselwirkungen der NC mit den Proteinen IL6 sowie Strep.

Die Überprüfung auf unspezifische Wechselwirkungen wurde bei einer niedrigen Spannung und einer Temperatur von 5 °C betrieben, um möglichst viele Faktoren auszuschließen, die eine unspezifische Wechselwirkung wieder zerstören könnten. Die Kühlung des Gels ist notwendig, da durch die angelegte Spannung eine Erwärmung der Lösung und des Agarosegels entsteht und dies eine Änderung der Vernetzung des Agarosegels zur Folge hätte. Keiner der hier getesteten NC mit Navi zeigte in diesem Agarosegel eine veränderte Laufgeschwindigkeit, sodass eine unspezifische Wechselwirkung von Strep., IL6 sowie den verwendeten DNA-Aptameren ausgeschlossen wird.

# Abschnitt III - Überprüfung der Bindungsfähigkeit der funktionalisierten Nanocontainer an die Zielstruktur

## 5.14. Bioorthogonal über NAvi gekoppelte Aptamere an Nanocontainern - Überprüfung der Bindungsfähigkeit zu E- und P-Selektin

Durch die vorangegangenen Kontrollen können unspezifische Wechselwirkungen von Aptameren mit Nanocontainern ausgeschlossen werden. Nach der Kopplung der Aptamere an die NC ist nun entscheidend, ob die E- und P-Selektin spezifischen Aptamere noch ihre Bindungsfähigkeit zeigen.

Im Agarosegel der Abbildung 52 sind die NC mit Aptameren mit unterschiedlichen Proteinen auf ihre spezifischen Wechselwirkung mit E- und P-Selektin getestet und verglichen worden. Bei einer geringen Spannung von 80 V und unter Kühlung wurde eine gleichbleibende stabile Umgebung über den Versuchszeitraum von 5 Stunden aufrecht erhalten.

Eine Massenzunahme durch eine Protein-Interaktion mit einem Aptamer führt zu einer Verringerung der Laufgeschwindigkeit und dient als ein erster Nachweis zur spezifischen Bindungsfähigkeit der Aptamere. Durch die vorherige Überprüfung von unspezifischen Wechselwirkungen (s. 22 und 51) kann für die in Abbildung 52 zusehende Wechselwirkung von einer spezifischen Wechselwirkung von rh E- und P-Selektin mit Nanocontainer mit Aptamer (SDA) (Bahn 4, 5 sowie 15, 16) ausgegangen werden. Jedoch zeigte auch das scrSDA (Kontroll-Aptamer) ein ähnliches Verhalten. Dies lässt vermuten, dass auch das scrSDA eine Affinität zu E- und P-Selektin aufweist. Die Suche nach einem geeigneten Kontroll-Aptamer erfordert ein zeitaufwändiges biochemisches Verfahren, um eine erneute unspezifische Bindungsfähigkeit der Aptamere auszuschließen bzw. die  $K_D$ -Werte neu zu bestimmen und lag außerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit. Wie erwartet zeigten die Kontrollproteine IL6 und Strep. nur geringe Wechselwirkungen mit den Nanocontainer-Aptamer Konstrukten (s. Bahn 6 und 7), die ein ähnliches Laufverhalten wie die Ausgangsverbindung ohne Proteine in Bahn 3 zeigen.

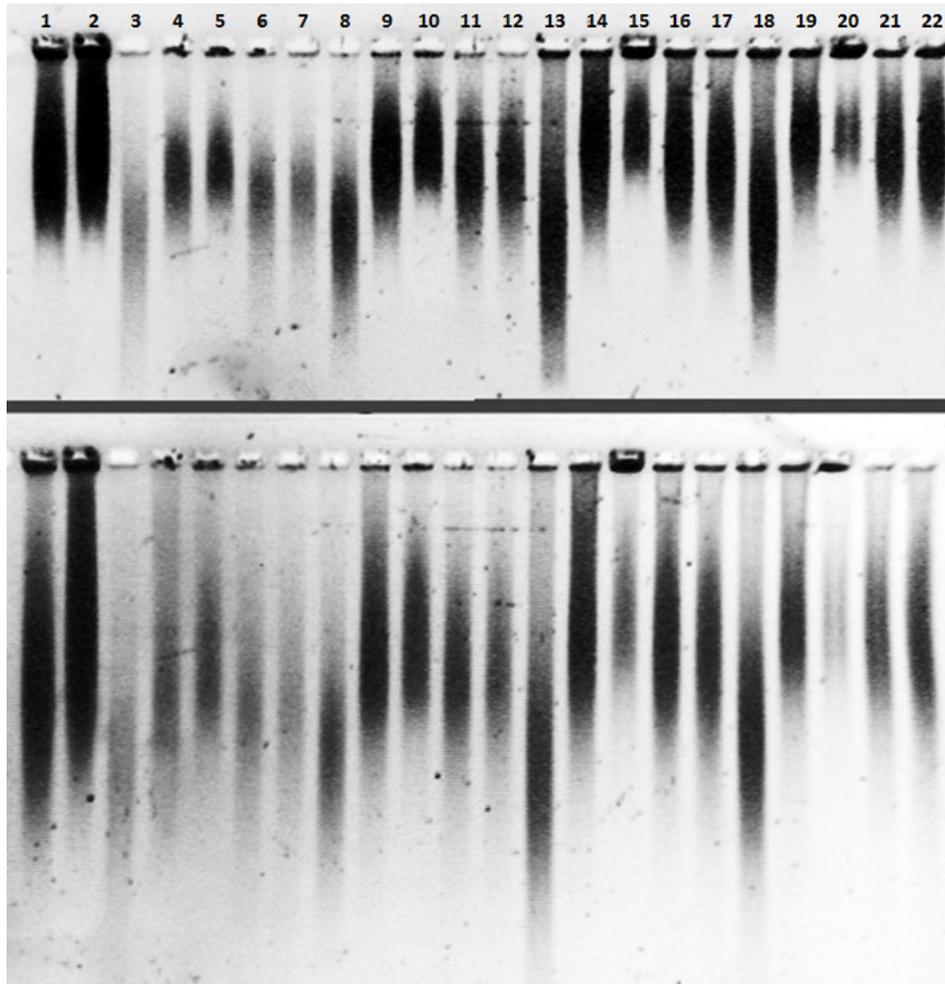


Abbildung 52: Agarosegel [0.5%, 80 V, (oben) 2.5 h, (unten) 5 h, 5°C, ohne EtBr]: 1: QNAvi1, 2: RNAvi1, 3: QNAvi1-SDA, 4: 3 + E-Sel., 5: 3 + P-Sel., 6: 3 + IL6, 7: 3 + Strep., 8: QNAvi1-scrSDA, 9: 8 + E-Sel., 10: 8 + P-Sel., 11: 8 + IL6, 12: 8 + Strep., 13: RNAvi1-SDA, 14: 13 + E-Sel., 15: 13 + P-Sel., 16: 13 + IL-6, 17: 13 + Strep., 18: RNAvi1-scrSDA, 19: 18 + E-Sel., 20: 18 + P-Sel., 21: 18 + IL6, 22: 18 + Strep. 1-2: NC mit NAvi ohne Kopplung mit DNA zeigt eine geringere Laufgeschwindigkeit; 3, 8, 13, 18: Referenzen mit DNA gekoppelt sind negativ geladen und wandern am stärksten; 3-7: QDs mit Aptamer (SDA); 8-12: QDs mit Kontroll-Aptamer (scrSDA); 13-17: QDQRs mit SDA; 18-22: QDQRs mit scrSDA. Sowohl NC mit Aptamer als auch die Kontrolle zeigen ein verlangsamtes Laufverhalten mit E-(4, 9, 14, 19) und P-Selektin (5, 10, 15, 20) im Vergleich zu IL6 (6, 11, 16, 21) und Strep. (7, 12, 17, 22).

#### 5.14.1. Dot Blot mit Aptamer funktionalisierten Nanocontainern

Mit einem Dot Blot Nachweis lässt sich die Bindungsfähigkeit von Proteinen mit einem Affinitätsmolekül, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, überprüfen. Im oberen Abschnitt (1-5) der Abbildung 53 wurden NC mit Aptameren (SDA) getestet, die spezifisch auf E- (1) und P-Selektin (2) binden sollen. Im mittleren Abschnitt (6-

10) wurden NC mit gekoppelten Kontrollaptameren (scrSDA) getestet. Wie schon im Agarosegel (Abb. 52) wurde eine Wechselwirkung von den Selektinen mit beiden DNA gekoppelten NC sowohl mit SDA und scrSDA festgestellt. Die Wechselwirkung mit E- und P-Selektin ist auf dem Dot Blot in Abbildung 53 in den Feldern 1, 2, 6 und 7 durch die anheftenden QDQRs über die Funktionalisierung mit den Aptameren deutlich zu erkennen. In den weiteren Feldern ist durch die weiteren Kontrollen sichergestellt, dass es sich dabei nicht um unspezifische Wechselwirkungen handelt. Dazu wurden unfunktionalisierte NC (-OH) ebenfalls auf E- und P-Selektin getestet (11 und 12), ohne dass eine sichtbare Wechselwirkung stattfand. Auch mit IL6 und Strep. konnte, wie erwartet, keine Wechselwirkung von NC mit gekoppelten Aptameren festgestellt werden. Das Ergebnis bestätigt die Resultate, die im Agarosegel 52 erhalten wurden.

Unabhängig von den hier gezeigten Ergebnissen bestätigte sich in späteren FACS-Untersuchungen die Annahme, dass das verwendete Kontrollaptamer (scrSDA) ebenfalls eine spezifische Bindung zu E- und P-Selektin zeigt.

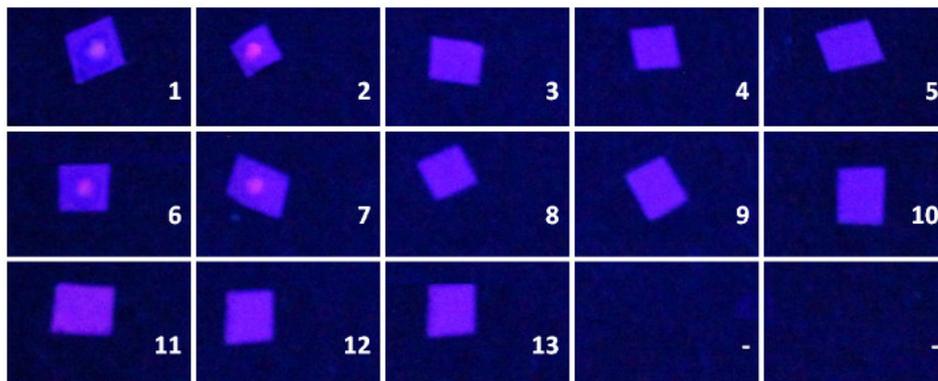


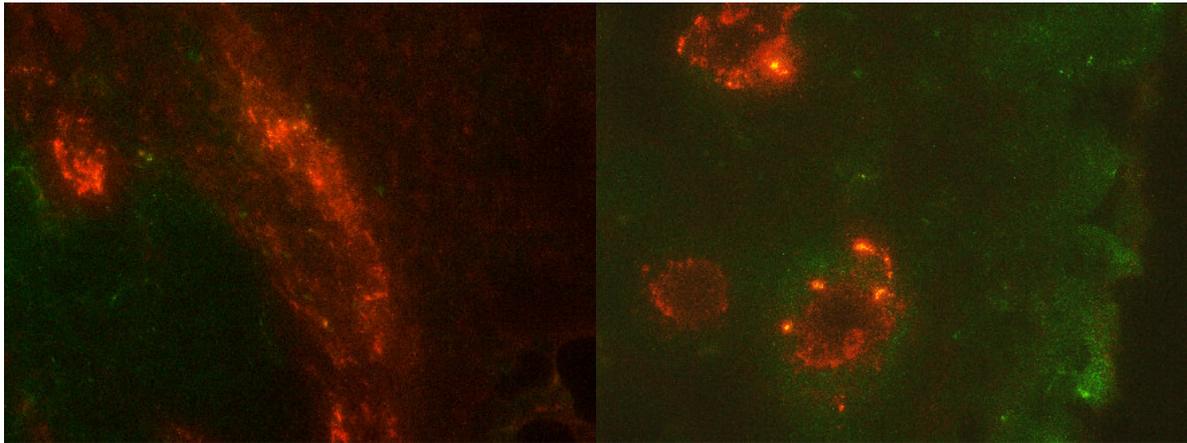
Abbildung 53: Aufnahmen der Dot Blots unter UV-Licht Anregung: 1-5 inkubiert mit RNAvi1-SDA, 6-10 mit RNAvi1-scrSDA, 11-13 RU1; Präparation mit: (1, 6, 11) E-Sel., (2, 7, 12) P-Sel., (3, 8) IL6, (4, 9) Strep., (5, 10, 13) ohne Protein. Bindung zu E- und P-Selektin mit Aptamer (SDA) und Kontroll-Aptamer (scrSDA) die an NC gekoppelt sind. Keine unspezifische Wechselwirkung mit IL6 und Strep.

Bei den in Abbildung 53 gezeigten Bildern weicht die Qualität der Aufnahmen von der realen Darstellung ab. Die im Text beschriebenen Resultate stimmen mit der realen Wahrnehmung überein.

## 5.15. Gewebeschnitte - *in vivo* Experimente

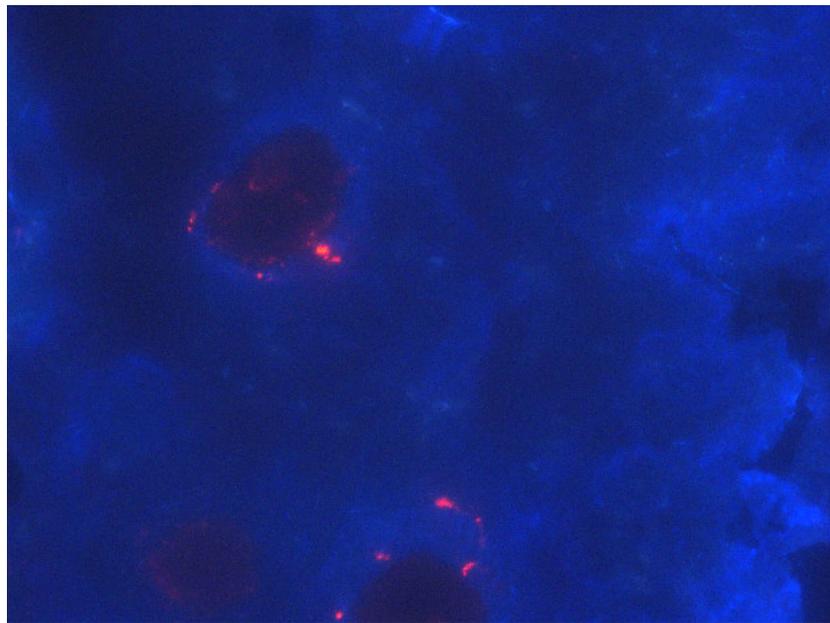
Zur Markierung von entzündlichen Endothelzellen im Tumorgewebe durch Nanocontainer mit gekoppelten Aptameren wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher und seinen Mitarbeitern (UKE - Hamburg) ein erstes Tierexperiment an Mäusen durchgeführt. Dazu wurden die Nanocontainer mit gekoppelten Aptameren QNAvi4-SDA (s. Kapitel 5.9) eingesetzt. Die Bindung findet dabei über die Aptamere (SDA) und die E-Selektine, die von den Endothelzellen überexprimiert werden, statt. Nach den intravenösen Injektionen der Nanocontainer-Lösungen in die Schwanzvene, wurden die Mäuse nach 2 h euthanasiert und die Tumore, Leber, Nieren sowie Milz zur Kryokonservierung vorbereitet. Die Gewebeschnitte wurden umfangreich mit unterschiedlichen Fixierungsmitteln und Kernfarbstoffen behandelt und anschließend jeweils mikroskopisch untersucht. Mehrfache Versuche eine geeignete Methode zur Gegenfärbung der Endothelzellen unter Erhaltung der Fluoreszenz der QDs zu finden, ist bisher nicht gelungen. Wichtig dabei ist, alle Faktoren wie Fixierungsmittel und die Wahl des Farbstoffes mit den optischen Eigenschaften der Nanopartikel abzustimmen. Die erhaltenen konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen Gewebeschnitte unterschiedlicher Organe sowie Tumorgewebe von zwei Versuchstieren (s. Abb. 54). Als Referenz dienten unfunktionalisierte NC mit einer einfachen PI-*b*-PEO-OH Außenhülle (QU1) bei der Maus NK (Negativkontrolle). Die hier dargestellten Kryoschnitte (s. Abb. 54 und 55) wurden ohne jede weitere Behandlung durch Fixierungsmittel in einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Wichtig ist, zu beachten, dass die Nanopartikel erst nach einiger Zeit durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht wieder zu fluoreszieren beginnen, dieser Vorgang kann bis zu 5 Minuten dauern. Das Gewebe wurde dabei teilweise leicht beschädigt. Die Nanopartikel waren dabei sehr gut über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten zu sehen.

Im Tumorgewebe der Maus A (s. Abb. 54 a, b, c) lassen sich deutlich die Nanocontainer mit Aptameren finden, die sich strukturiert in den Blutgefäßen angesammelt haben. Dies deutet auf eine Bindung der Aptamere an die E-Selektine der Endothelzellen hin. Des Weiteren sind in den Abbildungen 54 (d) und (e) Ausschnitte des Tumors der Kontrollmaus NK zu sehen, in der die Referenz mit unfunktionalisierten NC (QD-OH) verwendet wurde. Es sind nur wenige Stellen mit Nanopartikeln zu finden und nur eine geringe Anzahl diffuser Ansammlungen zu sehen, die keine Struktur aufweisen.

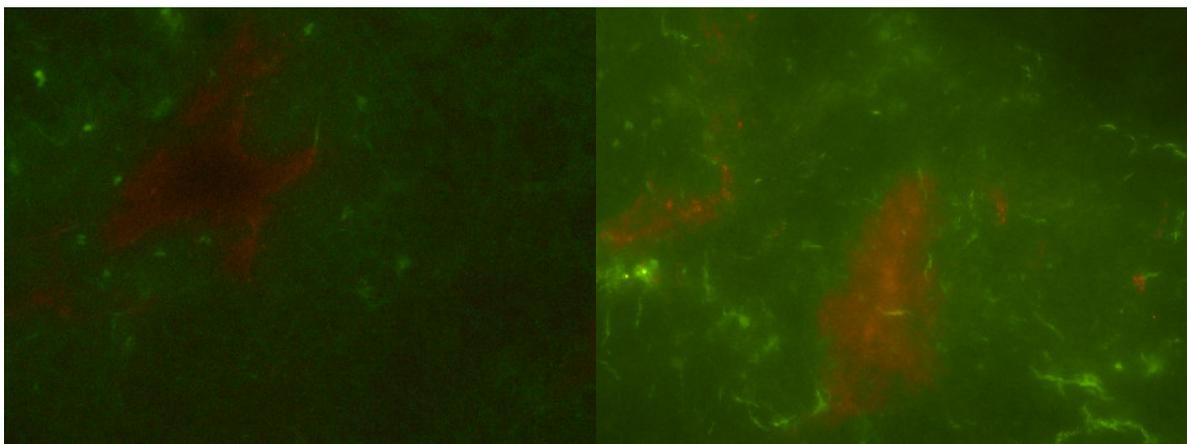


(a) Maus A mit QD-Aptamer

(b) Maus A mit QD-Aptamer



(c) Maus A mit QD-Aptamer mit UV-Langpassfilter



(d) Maus NK mit QD-OH

(e) Maus NK mit QD-OH

Abbildung 54: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten von Maus A (QD-Aptamer) und Maus NK (Negativkontrolle, QD-OH) mit fluoreszierenden QDs unter UV-Licht Anregung. Im Tumor der Maus A (a,b,c) sind die QDs im gesamten Schnitt in definierten Strukturen zu finden. In der Maus NK (d,e) sind vereinzelt diffuse Ansammlungen zu finden.

Ein Teil der inneren Organe wie Leber, Nieren und Milz wurden ebenfalls untersucht. In beiden Versuchstieren konnte eine deutlich vermehrte Ansammlung von QDs gefunden werden. In Abbildung 55 ist die starke Autofluoreszenz des Gewebes in der Milz gezeigt. Durch den Einsatz eines UV-Langpassfilters können jedoch die Nanopartikel eindeutig identifiziert werden.

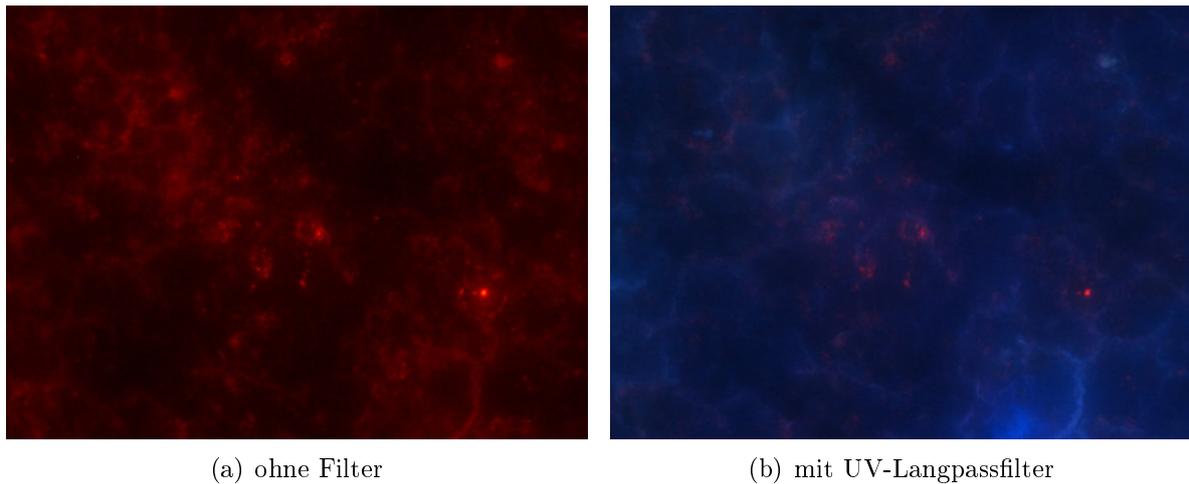
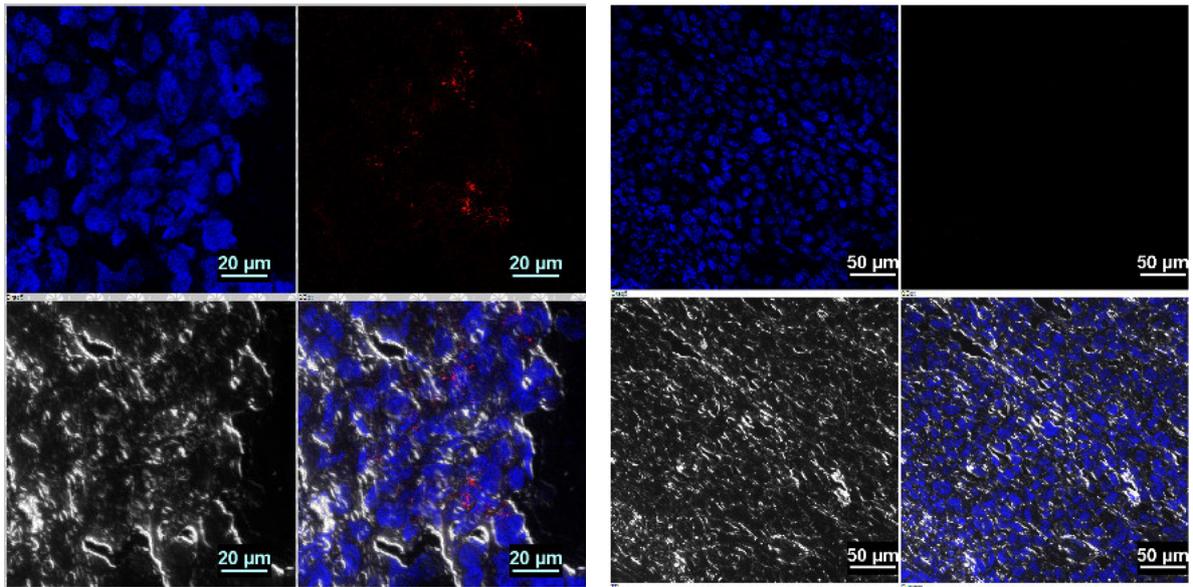


Abbildung 55: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Milz von Maus NK mit QD-OH mit und ohne Filter. Die QDs fluoreszieren auch bei Anregung mit größeren Wellenlängen und können dadurch gut von der Autofluoreszenz des Gewebes unterschieden werden.

Die Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5 erweist sich als besonders geeignet für die Anwendung mit QDs (s. Abb. 56). Insgesamt waren weniger Ansammlungen der QDs in der Maus A wieder zu finden. Zum einen sind die lange Lagerung und das wiederholte Auftauen der Organe und des Tumors für die Herstellung von Kryoschnitten, ungünstig für die Stabilität der QDs. Zum anderen liegen die späteren Schnitte weiter im Inneren der Tumors, sodass die Angiogenese unter Umständen noch nicht bis hier her vorgedrungen ist bzw. sich hier bereits viele abgestorbene Zellen befinden können. Die Ansammlungen der QDs konnten nicht eindeutig als Markierung der Endothelzellen zu geordnet werden. In den Tumorschnitten der Kontrollmaus (Maus NK) wurden keine QDs gefunden.



(a) Maus A QD-Aptamer

(b) Maus NK QD-OH

Abbildung 56: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten der Tumore jeweils nach einzelner Aufnahme der Farbstoffe und Gewebestruktur im Durchlicht. Oben links: Kernfarbstoff DRAQ5 (tiefroter Fluoreszenzfarbstoff), der hier in Blau dargestellt wird. Oben rechts: QDs (Rot). Unten links: Durchlicht - Struktur des Gewebeschnitts. Unten rechts: alle Aufnahmen übereinander gelegt. Im Bild (a) sind QDs im Tumorgewebe zu sehen, die Kerne der Endothelzellen lassen sich aber kaum von den übrigen Zellen unterscheiden. In Bild (b) ist ein Ausschnitt des Tumors der Maus NK zusehen, in dem sich keine QDs befinden.

## 5.16. SPR-Messungen an Nanocontainer-Mannoheptulose

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, *surface plasmon resonance spectroscopy*) ermöglicht die Messung von Bindungsereignissen unter Flussbedingungen. Dabei wird auf einer Goldoberfläche das Lektin (Concanavalin A, Con A, Tetramer bei pH = 7) durch eine NHS-Kopplung gebunden, welches dann in Wechselwirkung mit dem Affinitätsmolekül, z.B. Mannoheptulose oder andere Glycoside treten kann. Wichtig für die Wechselwirkung von Con A und Glycosiden ist ein Puffersystem mit Mangan- und Calciumionen. Die Adsorption und Dissoziation lassen sich in Echtzeit verfolgen und werden in der Auswertung mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  ( $k_a$ ) und  $k_{off}$  ( $k_d$ ) beschrieben. Daraus lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Mannoheptulose und die funktionalisierten Nanocontainer berechnen (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Werte zu den SPR-Sensogrammen der Abbildung 57.

Probe	kon [1/Ms]	SE (kon)	koff [1/s]	SE (koff)	KD [M]
Mannoheptulose (A)	37.28	0.72	6.2E-3	6.2E-5	1.66E-4
NC-MH (B)	3.73 E5	8.1E3	3.19E-3	6.1E-5	8.56E-9
NC-Gal(6) (C)	keine Bindung				

Nach der Synthese und Charakterisierung der funktionalisierten Diblockcopolymeren mit  $\alpha$ -D-Mannoheptulose **20** wurden diese zur Verkapselung von QDs genutzt. Die erhaltenen Nanocontainer mit Mannoheptulose wurden im Folgenden auf den Erhalt ihrer spezifischen Bindungsfähigkeit am *BIACORE*, das auf dem Prinzip der SPR basiert, überprüft. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Anna Jacobsen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Thiem durchgeführt. Des Weiteren wurden Nanocontainer mit Galactose (NC-Gal(6)), und im Vergleich die Bindungsfähigkeit von Con A mit Mannoheptulose gemessen. Die Sensogramme in Abbildung 57 zeigen, dass Mannoheptulose (A) eine sehr gute Bindung an Con A aufweist. In der Messung A werden häufige Bindungsereignisse (RU) für die höher konzentrierten Lösungen erhalten. Der  $K_D$  Wert der freien Mannoheptulose mit  $0.166 \pm 0.086$  mM ist zur gemessenen Referenz von Mannose ( $2.4 \pm 0.7$  mM) um eine Zehnerpotenz niedriger und hat somit eine stärkere Bindungsaffinität.<sup>[131]</sup>

Um Effekte durch eine erhöhte Viskosität auszuschließen, die bei höheren Konzentrationen der Nanocontainer-Lösungen auftreten, wurde für die SPR-Messung mit weitaus

geringeren Konzentrationen gearbeitet als üblich. Für die freie Mannoheptulose wurde mit einer Konzentration von 4.6 mM begonnen und für die NC-MH von 0.45  $\mu$ M. Die Ergebnisse der Messung der Nanocontainer mit Mannoheptulose weisen einen sehr niedrigen  $K_D$ -Wert von 8.56 nM auf und zeigen somit eine sehr starke Bindungsfähigkeit zu Con A. Bei diesem sehr niedrigen  $K_D$ -Wert ist davon auszugehen, dass mehrere Zucker die an einem Nanocontainer gebunden sind, zu einem multivalenten Bindungsereignis mit Con A geführt haben. Dafür spricht eine sehr hohe Adsorptionskonstante der NC-MH ( $k_{on} = 3.73 \text{ E}5 \text{ 1/Ms}$ ) im Vergleich zur freien Mannoheptulose ( $k_{on} = 37.28 \text{ 1/Ms}$ ). Dafür müssen gleichzeitig mehrere Lektine bzw. mehrere Bindungstaschen am Con A in Wechselwirkung mit dem NC-MH getreten sein. An der Dissoziationskonstante  $k_{off}$  ist zu sehen, dass sich der NC-MH ähnlich verhält wie die freie Mannoheptulose. Im Vergleich wird für einen Nanocontainer mit gekoppelter Galactose keine Bindung an Con A erwartet, da Con A spezifisch an Mannose- und Glucose-Derivate bindet.<sup>[132]</sup> Dies wurde erfolgreich im gezeigten SPR-Sensogramm (s. Abb. 57 C) bestätigt. Die spezifische Bindungsfähigkeit der Glycoside auf Nanocontainern hat sich bei dieser SPR-Messung erfolgreich bestätigt.

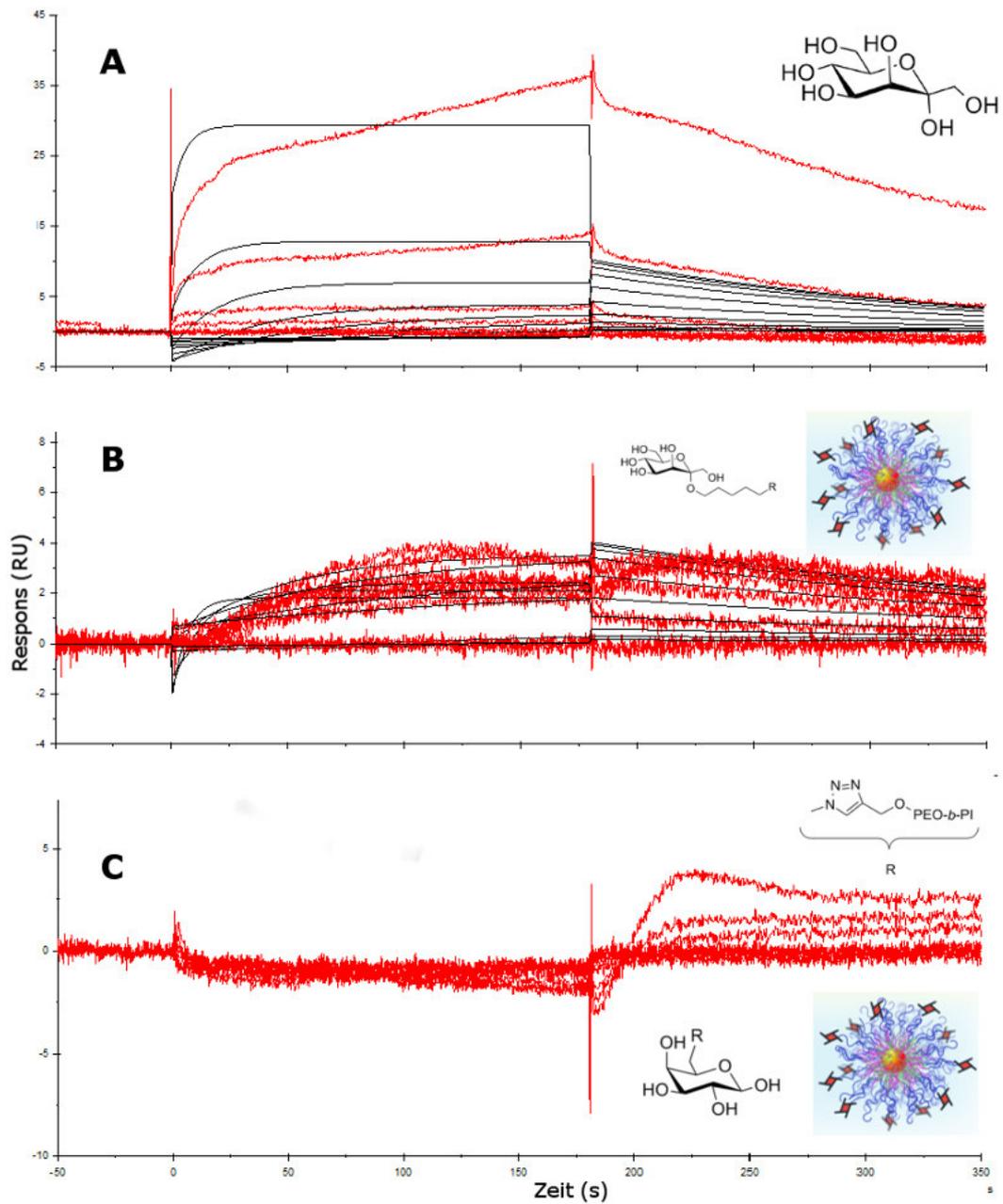


Abbildung 57: Untersuchung der Interaktion mit Concanavalin A via SPR-Messungen.  
 (A) D-Mannoheptulose (B) Nanocontainer mit DBC-Mannoheptulose  
 (C) Nanocontainer mit DBC-Galactose

## 5.17. Zellaufnahmen an HEPG2-Zellen mit Nanocontainern mit GalNAc und Mannoheptulose

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen stellen einen Ausschnitt aus den Arbeiten von Dr. Christopher Wolter und Dr. Christian Schmidtke dar. Die QDs wurden mit GalNAc und Mannoheptulose funktionalisierten Diblockcopolymeren aus Kapitel 5.5.2 und 5.6.1 verkapselt und sind zusammen mit anderen funktionalisierten Nanocontainern auf die Aufnahme in HEPG2-Zellen getestet worden.

Es ist zu sehen, dass bereits Nanocontainer ohne einen Zucker aufgenommen werden (s. Abb. 58(2)). Die geringste Aufnahme erfolgt mit NC mit Methoxygruppen (s. Abb. 58 (5)). Die Bedingungen (ohne fetales Kälberserum (FCS)) in denen die Zellaufnahmen stattgefunden haben, bedeuten für die Zellen einen großen Stress und die Annahme liegt nahe, dass sehr viele Nanocontainer aufgenommen werden, ohne dass es zu einer spezifischen Interaktion mit einem Rezeptor der Zelloberfläche gekommen ist. Die deutlich zu erkennenden Zellaufnahmen von Nanocontainern mit gekoppeltem GalNAc (s. Abb. 58 (3)) und Mannoheptulose (s. Abb. 58 (4)) sind unter diesen Bedingungen nicht aussagekräftig.

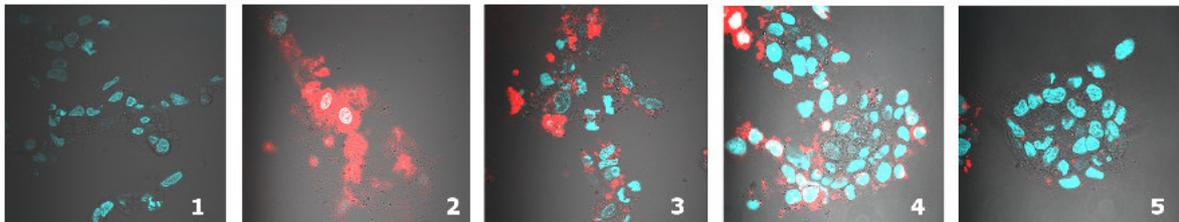


Abbildung 58: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEPG2 Zellen inkubiert mit QDs (unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierung) über Nacht (20 h) in serumfreiem DMEM-Medium (ohne Phenolrot). Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). 1: Kontrolle ohne QDs, 2: QD-OH, 3: QD-GalNAc, 4: QD-Mannoheptulose, 5: QD-OMe.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten zur Funktionalisierung von Nanocontainern mit biologischen Affinitätsmolekülen untersucht und die erhaltenen Strukturen relevant *in vivo* und *in vitro* auf ihre spezifische Bindungsfähigkeit überprüft. Die erfolgreiche Verkapselung von fluoreszierenden Nanopartikeln mit Diblockcopolymeren zum Nanocontainer (NC) ist dabei eine grundlegende Voraussetzung, um in biologischen Systemen arbeiten zu können. Die Funktionalisierung der Diblockcopolymeren (DBC) über organische Synthesen sowie deren Charakterisierung mittels NMR und GPC werden im ersten Abschnitt umfangreich dargestellt. Als Beispiele sind Funktionalisierungen mit Glycosiden wie GalNAc über eine CDI-Aktivierung (Umsatz 25%) sowie  $\alpha$ -D-Mannoheptulose (MH) über einen Linker mit der Click-Chemie (Umsatz 20%) durchgeführt worden. Eine Vertiefung sowie Optimierung der Click-Chemie wurde im Hinblick auf die Funktionalisierung der NC mit größeren Affinitätsmolekülen wie DNA oder Proteinen untersucht. Die Umsätze der Click-Reaktionen konnten für die Kopplung von Glucose und Mannose an die DBC unter Verwendung von unterschiedlichen Click Katalysatoren in organischen sowie in wässrigen Medium auf 85-87% gesteigert werden.

Zu den vielfältigen Möglichkeiten der Funktionalisierung gehört unter anderem die Kopplung von  $O^6$ -(4-Aminomethylbenzyl)guanin, welches zur weiteren bioorthogonalen Kopplung über ein sogenanntes SNAP-Protein in Zukunft eine erfolgsversprechende Anwendung für NC darstellt.

Das zum Phosphoramidit aktivierte DBC (Umsatz 80%) wurde erfolgreich zur direkten Kopplung als Abbruchelement an der letzten Base in einer DNA Festphasensynthese genutzt. Das Produkt aus DNA und DBC konnte erfolgreich in der Gelelektrophorese sowie HPLC nachgewiesen werden.

Der zweite umfangreiche Abschnitt befasst sich mit der bioorthogonalen Kopplung von biotinylierten NC, die mit NeutrAvidin versehen wurden. Diese konnten anschließend erfolgreich mit biotinylierten DNA-Aptameren gekoppelt werden. Der erhaltene NC mit Aptameren konnte in Dot Blots und Gelelektrophoresen auf die Qualität der Kopplung sowie zur Überprüfung von spezifischen als auch unspezifischen Wechselwirkungen systematisch untersucht werden.

Im letzten Abschnitt wurden erste Nachweismethoden mit Nanocontainern in biologi-

schen Systemen und biochemischen Verfahren gezeigt. Die ersten vielversprechenden SPR-Messungen mit MH, die an Nanocontainer gebunden sind, liefern  $K_D$ -Werte im nanomolaren Bereich und lassen den Schluss auf multivalente Bindungsereignisse zu. Zelluntersuchungen (*in vitro*) an HEPG2-Zellen wurden durchgeführt und lieferten neue Anhaltspunkte für die Optimierung der NC im medizinischen Forschungsbereich. In einer ersten *in vivo* Studie an Mäusen konnte die Fluoreszenz der funktionalisierten Nanocontainer mit E-Selektin spezifischen Aptameren in Gewebeschnitten des Tumors in geordneten Strukturen entlang von Blutgefäßen nachgewiesen werden. Im Kontrolltier, das eine Lösung mit unfunktionalisierten Nanocontainern erhalten hat, konnte keine Fluoreszenz im Tumorgewebe beobachtet werden. Dieser Erfolg verdeutlicht das große Potenzial der Nanocontainer für die medizinische Forschung im Bereich der Krebsursachen sowie Früherkennungsdiagnostik.

## 7. Summary

In this work, different ways for the functionalization of nanocontainers with biological affinity molecules were investigated and the ability for specific binding of such structures has been tested by *in vivo* and *in vitro* studies. The profound knowledge of the encapsulation of fluorescent nanoparticles with diblock copolymers for the formation of a nanocontainer (NC) is necessary for their use in biological environments.

Firstly, diblock copolymers (DBC)s were functionalized with different affinity molecules and characterized in depth via NMR and GPC. For example, glycosides like GalNAc and  $\alpha$ -D-Mannoheptulose were coupled via CDI-activation (rate 25%) and with a linker via click chemistry (rate 20%), respectively. Further experiments and optimization of the click chemistry were carried out, which was then applied to the functionalization of NCs with bigger affinity molecules, such as DNA or proteins. The rates of the click reactions with DBCs were raised to 85-87% for glucose and mannose in organic and aqueous syntheses with different catalysts. The successful coupling of  $O^6$ -(4-Aminomethylbenzyl)-guanine (BG) is one of the various possibilities for the functionalization of DBCs. NCs functionalized with BG offer a promising approach for bioorthogonal coupling with the so-called SNAP protein in the future.

DBC)s were successfully activated to phosphoramidites with a rate of 80%. They were used as the terminal part, which was coupled directly to the last base in a DNA solid phase synthesis. The product of DNA and DBC was successfully detected in gel electrophoresis and HPLC.

Secondly, a comprehensive section describes the bioorthogonal coupling of biotinylated NCs. In a first step the NCs were covered with NeutrAvidin. In the following step, biotinylated DNA aptamers were bound to a vacant site of the NeutrAvidin. The synthesis of NCs with aptamers was controlled by dot blots and gel electrophoresis in order to confirm the quality of the coupling and to verify specific and unspecific interactions.

In the third part of this work, NCs were tested in biological systems and in biochemical analysis. The first promising binding studies via SPR with  $\alpha$ -D-Mannoheptulose functionalized NC provided  $K_D$ -values in a nanomolar range, which indicates multivalent bindings. Cellular *in vitro* studies on HEPG2-cells provided new information on the optimization of NCs for medical applications. In a first *in vivo* study on mice, fluorescence of NCs equipped with E-selectin specific aptamers was detected in tissue sections

of the tumor, along the blood vessels. In tumor tissue of the negative control mouse, which has been treated with a nonfunctionalized NC, no fluorescence was found. This success demonstrates the huge potential of nanocontainers in medical applications for early diagnosis in the therapy of cancer.

## 8. Experimentalteil

### 8.1. Verwendete Geräte

#### Absorptionsspektroskopie

Die Proben wurden in Quarzküvetten an einem Absorptionsspektrometer Cary 50 der Firman VARIAN (300 - 800 nm) vermessen.

#### Dynamische Lichtstreuung DLS

Die Messungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgten am Malvern Zetasizer Nano ZS und wurden über die Software Dispersion Technology der Firma Malvern ausgewertet.

#### Emissionsspektroskopie

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurden Emissionsspektren im Bezug zu einer Referenz mit Rhodamin 6G an einem Horiba FluoroMax-4 Spektrometer vermessen.

#### Gelpermeationschromatographie (GPC)

Es wurde mit dem EcoSEC GPC System der Firma Tosoh bei 35 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/Min sowie UV- und IR-Detektor gearbeitet. Dabei kamen vier Trennsäulen der Firma PSS (SDV 5  $\mu\text{m}$ ) mit einem Porendurchmesser von 50 - 1000 Å zum Einsatz. Die Polymerproben wurden in THF gelöst und zuvor über einen 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE Spritzenfilter gegeben. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mittels der PSS Win PPC Unity Software.

Für die Reinigung mit verkapselten Nanopartikeln in wässrigen Lösungen wurde mit einer Säule Superose 6 10/300 GL von GE Healthcare gearbeitet.

#### Gefriertrocknung

Zur Sublimation von Wasser wurden die wässrigen Lösungen zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter vermindertem Druck (0.05 mbar) bei -50 °C das Wasser an

einer Anlage von Christ, 1-4 LD plus entfernt.

## **Konfokalmikroskopie**

Zur Zellaufnahme wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop der Firma Olympus Typs FV 1000 gearbeitet.

## ***Nuclear Magnetic Resonance (NMR)***

Zur  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie wurden 10 - 15 mg des Analyten in 0.7 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in NMR-Röhrchen Economic der Firma Duran an dem Spektrometer AV II 400 der Firma Bruker sowie am Bruker DRX 500 MHz Spektrometer vermessen. Zur Auswertung der Daten wurde die Software MestReNova 9.01 genutzt.

## **Reinstwasseranlage**

Zur Wasseraufbereitung wurde eine Milli-Q Anlage mit destilliertem Wasser betrieben. Abfüllung nach Filtration über einen Millipor Millipak Express Filter mit  $0.22\ \mu\text{m}$  Porendurchmesser.

## **Transmissionselektronenmikroskopie TEM**

Die verdünnten Nanopartikel Proben wurden auf Kupfergrids mit einer amorphen Kohlenstoffbeschichtung gegeben und nach kurzer Inkubation von 20 - 60 s mit einem Filterpapier seitlich abgenommen. Zur Aufnahme wurde an einem Transmissionselektronenmikroskop Jeol JEM-1011 gearbeitet.

## **TEM-Präparation mit Phosphorwolframsäure**

Es wurden  $10\ \mu\text{L}$  der stark verdünnten Probelösung für 120 s auf das TEM-Grid gegeben und überschüssige Lösung nach der Einwirkdauer immer mit einem Filterpapier seitlich abgenommen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit  $15\ \mu\text{L}$  Wasser (20 s), mit  $10\ \mu\text{L}$  10% Phosphorwolframsäure (120 s) und zum Abschluss zwei Waschschriffe mit Wasser.

## 8.2. Methoden

### Agarosegele

Agarosegele wurden je nach Größe der Platte nach Gewichtsprozent in TAE-Puffer gelöst. Dazu wurde die Agarose mit Puffer gemeinsam erhitzt, anschließend in eine Form gegossen und ein Kamm eingelegt. Nach dem Aushärten (20-30 Min.) wurde das Gel mit TAE-Puffer in der Laufkammer überdeckt und kann mit einem Probenvolumen bis zu 20  $\mu\text{L}$  gefüllt werden, je nach Dicke des Gels. In der Regel wurden Proben mit 5  $\mu\text{L}$  mit 1  $\mu\text{L}$  Loading Dye DNA (6x) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeiten müssen an das Experiment angepasst werden. In dieser Arbeit waren 20-40 Minuten bei 120 V üblich.

### Dialyse

Zur Reinigung von niedermolekularen Bestandteilen aus wässrigen Lösungen eignet sich die Dialyse besonders. Die verwendeten Dialyseschläuche der Firma Roth aus Cellulose-Ester-Membran wurden in einem Größenbereich von 500 - 300 000 Da MWCO eingesetzt. Der Schlauch wurde für mindestens 30 Min. im Reinstwasser inkubiert. Alle Gefäße sind mit Ethanol zu reinigen und allgemein eine sterile Arbeitsweise einzuhalten. Die wässrige vollständig gelöste Probe (2-10 mL) wird in den Schlauch gegeben und zugeschraubt. Die Diffusion der niedermolekularen Bestandteile erfolgt nach dem Prinzip der Diffusion bzw. Osmose und kann durch häufigen Wasserwechsel erhöht werden.

### Dichtegradientenzentrifugation

Die Nutzung von Dichtegradienten ist ein bekanntes Verfahren in der Biochemie um größere Proteinkomplexe und Zellbestandteile nach ihrer Größe aufzutrennen. Anhand unterschiedlicher Viskosität erfolgt hier eine Trennung der Substanzen nach ihrer Dichte in wässriger Lösung. Dazu wird ein Gradient aus mehreren Schichten mit unterschiedlichen Voluminaprozenten Sucrose (60%, 5% u. 2.5%) gegossen. In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren genutzt um überschüssiges Diblockcopolymer bzw. daraus gebildete leere Mizellen von Mizellen mit Nanopartikeln zu trennen oder auch von Kopplungsproteinen wie NeutrAvidin. Die kleinen Nanocontainer sammeln sich dabei in der Grenzschicht zwischen 60% und 5%. Die Trennung wurde durch Zentrifugation beschleunigt.

## Dot Blot

Auf eine Nitrocellulose-Membran wurde je zweimal 1  $\mu\text{L}$  einer Proteinlösung ( $c = 2 \text{ mg/mL}$ ) aufgetropft und eingetrocknet. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Tween 20 in PBS-Lösung (0.1%) blockiert. Anschließend folgte die Zugabe der Probelösung aus QDs bzw. QDQRs ( $c = 90 \text{ nM}$ ) in PBS, diese wurden für 30 Min. inkubiert. Das Ergebnis konnte mittels UV-Belichtung sichtbar gemacht werden und wurde fotografisch festgehalten.

Allgemein ist bei Dot Blots ist zu beachten, dass die Proteine bei Wasch- und Trocknungsprozessen ihre Faltung verlieren könnten und die lokale Konzentration durch die Tropfengröße variieren kann.

## Verkapselung am Mischchip

Zur computergesteuerten Vermischung von Polymeren mit Nanopartikeln wurde die Partikellösung mit einer Flussrate von 1.6 mL/Min. zusammen mit Wasser mit einer Flussrate von 14.4 mL/Min. über einen Mischchip geleitet.

Eine übliche Menge von 10-30 nmol QDs, die bereits PI-DETA als Liganden tragen, werden mit hohen Überschüssen von 200 Äq PI-*b*-PEO zusammen gelöst. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom verdampft. Der Rückstand wird in 1 mL THF gelöst und AIBN in 0.5 mL THF zum Schluss hinzugefügt. Die Lösung wird vor dem Phasentransfer über einen 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE Spritzenfilter von Fremdstoffen befreit.

## *Surface Plasmon Resonance (SPR)*

Zur Immobilisierung des Lektins Concanavalin A (Con A) auf einem CM5 Sensorchip wurde das Lektin in 138  $\mu\text{L}$  HEPES-Puffer (0.01 M; pH 6.5) gelöst. Die Oberfläche des Chips wurde mit einer Lösung aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / N-Hydroxysuccinimid (NHS) (0.5 / 0.1 M, 198  $\mu\text{L}$ ) aktiviert und das gelöste Lektin mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  über den Chip geleitet. Zum Blockieren freier reaktiver Oberflächenplätze wurde eine Lösung aus Ethanolamin (1 M, 139  $\mu\text{L}$ ) genutzt. Der Referenzkanal wurde auf gleiche Weise ohne Lektinlösung behandelt.

Zur Kalibrierung der Messung wurde der Chip mit HEPES-Puffer gespült bis eine sta-

bile Baseline erhalten wurde. Die Probelösungen als Konzentrationsreihe wurden mit einem Volumen von je 100 - 250  $\mu\text{L}$  mit einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  über die Kanäle geleitet. Die Kontaktzeit der Probelösung zur Assoziation betrug 180 s und 300 s zur Dissoziation bei einer Temperatur von 25 °C. Zur Auswertung der Daten wurde die Biacore T100 Evaluation Software genutzt.

### 8.3. Materialien

Die verwendeten Nanopartikel wurden durch die CAN GmbH Hamburg zur Verfügung gestellt und wurden mit PI-DETA als stabilisierende Liganden nach der Synthese versehen. Die Daten zu den verwendeten QDs der CAN GmbH sind im Anhang zu finden. Die QDQRs sind von Dr. Christopher Wolter zur Verfügung gestellt worden.

**NMR:** Chloroform  $d_1$  ( $\text{CDCl}_3$ , 99.8%D, stab. mit Ag), Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100%D), Methanol (MeOD, 99.9%D) und Tetrahydrofuran  $d_8$  (99.5% D), NMR-Röhrchen: Economic 300 MHz - Carl Roth.

**Chemikalien:** Chloroform (anhydrous, Amylen stabil.), Kupferiodid (99.5%), 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (99%), Dichlormethan (anhydrous, Amylen stabil.) und Pyridin (anhydrous, 99.8%) - Sigma-Aldrich. Aceton - Grüssing. Chloroform (AnalaR Normapur) - VWR. Tetrahydrofuran (THF, 99.9%) - Carl Roth. Amberlite (R) IR120 (Hydrogen) und  $\text{MgSO}_4$  - 99% - Grüssing. Essigsäureanhydrid, *N,N*-Dimethylformamid (DMF, 99.8%), Ethylendiamin und Natriummethoxid (NaOMe, 97.0%) - Fluka. 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorphosphoramidit (Ampulle), *N*- $\alpha$ -Fmoc-*O*- $\beta$ -(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin (GalNAcSerinFmoc) - Sigma Aldrich. *O*<sup>6</sup>-(4-Aminobenzyl)guanin (95%) - ArkPharm.

**Proteine und DNA:** NeutrAvidin Mw = 60 kDa, trockenes Pulver, Prod. 31055, Lot: LL153552 - ThermoSci.

DNA-Aptamere - Invitrogen.

**SPR:** CM5 Sensorchips, Serie S Sensor Chip - GE Healthcare.

Lektin Concanavalin A (Con A) - Jack Bean, Typ VI.

## 8.4. Liste Polymere

Alle Diblockcopolymer wurden von Dr. Johannes Ostermann und Dr. Steffen Fischer synthetisiert.

Tabelle 6: Liste der Diblockcopolymer mit Nummerierung.

Nummer	Bezeichnung	Mw [g/mol]	Mn [g/mol]	Gew.% PEO
<b>P1</b>	sf9	14300	13700	70
<b>P2</b>	jo2-105	10800	10000	74
<b>P3</b>	sf10	10800	10000	67
<b>P4</b>	jo1-69	10600	9000	65
<b>P5</b>	jo6	8100	6600	73
<b>P6</b>	jo1-185	6300	5900	65
<b>P7</b>	jo 3-43 (NH <sub>2</sub> )	11300	10000	73
<b>P8</b>	jo 3-57 (Alkin)	11300	10000	73

## 8.5. Verhalten der Diblockcopolymere 1

### 8.5.1. Löslichkeit der Diblockcopolymere

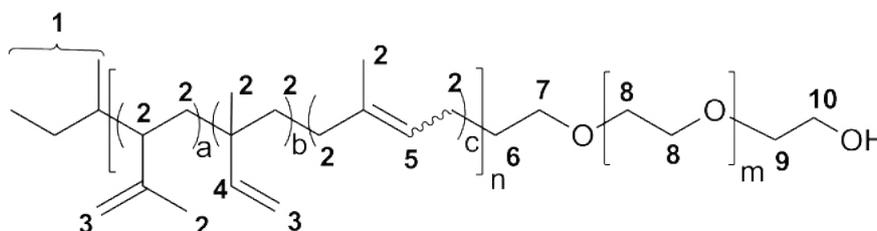
Es wurden je 20 mg des Diblockcopolymers **P1** auf die Löslichkeiten in Wasser, DMSO, Chloroform, THF, Aceton, Ethanol und Diethylether getestet. Dazu wurden zunächst 0.5 mL Lösungsmittel verwendet, wenn sich das Polymer nicht löste wurden weitere 0.5 mL hinzugefügt bis zu einem Maximalvolumen von 2.5 mL. Anschließend wurden die gelösten Polymere bei -18 °C bzw. Wasser und DMSO bei 5 °C für 12 h gelagert.

### 8.5.2. Diblockcopolymer in Acetonitril:DCM

Es wurde je eine 0.5%ige Polymerlösung **P6** hergestellt. Dazu wurden je 10 mg in 2 mL Lösungsmittel bzw. in Lösungsmittelmischungen aus Acetonitril und DCM gelöst. Folgende Lösungsmittelverhältnisse von Acetonitril:DCM wurden gewählt: 1:0, 1:4, 1:1, 4:1, 0:1.

### 8.5.3. NMR Diblockcopolymer PI-*b*-PEO 1 in unterschiedlichen deuterierten Lösungsmitteln

Diese NMR Daten dienen als Grundlage und werden in weiteren NMR-Auswertungen nicht erneut aufgeführt, lediglich  $^1\text{H}$ -NMR-Signale, die sich durch eine Kopplung verschieben.



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 5.95 - 5.64 (m, 1 H je 1,2-PI Einheit, H4), 5.04 - 4.56 (m, 2 H je 1,2-PI sowie 3,4-PI Einheit, H3; 1 H je 1,4-PI Einheit, H5), 3.82 - 3.44 (m, 4 H je PEO-Einheit, H8; 2 H, H7), 2.22 - 0.77 (m, 6 H je 3,4-PI Einheit, H2; 5 H je 1,2-PI Einheit, H2; 7 H je 1,4-PI Einheit H2; 2 H, H6; 9 H, H1).

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{THF-d}_8$ ; TMS) [ppm] = 6.00 - 5.69 (m, 1 H je 1,2-PI Einheit, H4), 5.10 - 4.58 (m, 2 H je 1,2-PI sowie 3,4-PI Einheit, H3; 1 H je 1,4-PI Einheit, H5), 3.76 - 3.36 (m, 4 H je PEO-Einheit, H8; 2 H, H7), 2.30 - 0.81 (m, 6 H je 3,4-PI Einheit, H2; 5 H je 1,2-PI Einheit, H2; 7 H je 1,4-PI Einheit H2; 2 H, H6; 9 H, H1).

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ; TMS) [ppm] = 3.81 - 3.48 (m, 4 H je PEO-Einheit, H8; 2 H, H7).

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{MeOD}$ ; TMS) [ppm] = 6.04 - 5.67 (m, 1 H je 1,2-PI Einheit, H4), 5.18 - 4.64 (m, 2 H je 1,2-PI sowie 3,4-PI Einheit, H3; 1 H je 1,4-PI Einheit, H5), 3.84 - 3.46 (m, 4 H je PEO-Einheit, H8; 2 H, H7), 2.34 - 0.96 (m, 6 H je 3,4-PI Einheit, H2; 5 H je 1,2-PI Einheit, H2; 7 H je 1,4-PI Einheit H2; 2 H, H6; 9 H, H1).

### 8.5.4. Untersuchung der Mizellen mit Abmischungen von zwei unterschiedlich großen Polymeren

Es wurden je 30 mg Polymergemisch eingewogen. Dazu wurde begonnen mit 100% **P2**, 75% zu 25% **P4**, 50% und dann in umgekehrtem Mengenverhältnis, sodass 5 Polymerverhältnisse untersucht werden konnten. Dazu wurden die Polymere jeweils

gelöst in 1 mL THF und per Hand in 9 mL Reinstwasser eingespritzt bei 800 rpm. Die Spritzennadel wird direkt über dem Rührfisch platziert. Anschließend wurde 2 h bei 200 rpm und 80 °C das THF wieder entfernt. Über Nacht wurde die Lösung langsam herunter gekühlt, während die Lösung weiter gerührt wurde. Die Proben wurden aus dem Heizblock entnommen und je 2 mL Probelösung in die Küvetten gegeben, die vor der Messung 2 h geruht haben.

## 8.6. Nanopartikel

### 8.6.1. Verkapselung mit unterschiedlichen Methoden

Es wurden je 90  $\mu\text{L}$  (5 nmol) QDs (56  $\mu\text{M}$ , in TCM) mit 10 mg (0.001 mmol) Diblockcopolymer **P4** und je 5 mg AIBN verkapselt. Alle Proben wurden 20 Min. inkubiert und anschließend 3 h im Heizblock quervernetzt.

**1. Standard:** Das Polymer wurde zur QD-Lösung hinzugegeben und gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft. Es folgte die Zugabe von AIBN in 1 mL THF. Die Verkapselung erfolgte am Mischchip nach Standardprotokoll wie in Kapitel 8.2 mit 8.3 mL ddH<sub>2</sub>O.

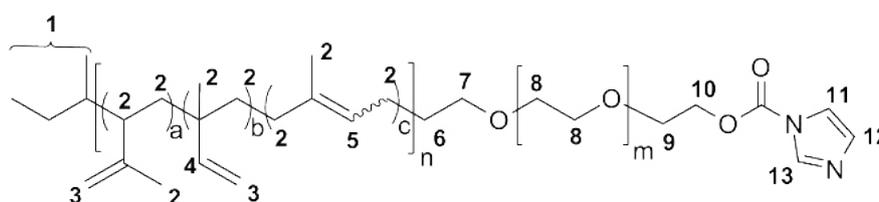
**2. Injektion per Hand unter Ultraschall:** Vorgang zur Präparation wie bei 1. Standard. Injektion der QD, Polymer, AIBN Lösung in 1 mL THF dann in 5 mL ddH<sub>2</sub>O unter Ultraschall schnell injiziert und für weitere 2 Min. im Ultraschall belassen.

**3. Polymer in Wasserspritze am Mischchip:** Die QDs wurden getrocknet und mit AIBN zusammen in 1 mL THF gelöst. Das Polymer wurde zuvor in ddH<sub>2</sub>O gelöst und dann mit der Nanopartikellösung (THF) am Mischchip nach dem Standardprotokoll verkapselt.

## 8.7. Synthesen an Diblockcopolymeren

Allgemeine Vorschriften zu nasschemischen Synthesen an Diblockpolymeren Poly(isopren-*block*-ethylenoxid) (PI-*b*-PEO).

### 8.7.1. CDI-Aktivierung an PI-*b*-PEO Verbindung 3



Die CDI-Aktivierung wurde am Diblockcopolymer zwischen 6-13 kDa durchgeführt. Im Folgenden wird die allgemeine Vorgehensweise der CDI-Aktivierung am Polymer beschrieben.

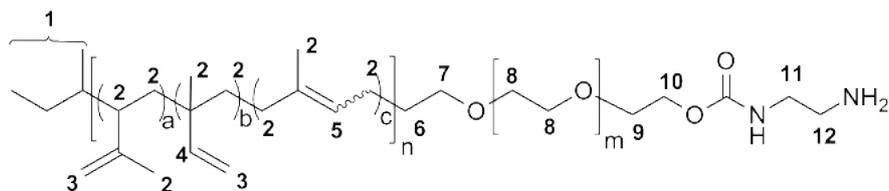
Zur Kopplung eines Äquivalents (Äq) des Polymers wurden je 20 Äq 1,1'-Carbonyldiimidazol in separaten Kolben 60 - 90 Min. im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan in katalytischen Mengen im N<sub>2</sub>-Gegenstrom zum CDI gegeben. Das CDI-DABCO Gemisch und das Polymer wurden in Dichlormethan gelöst. Das gelöste Polymer wurde unter Rühren bei RT in die CDI-DABCO-Lösung langsam hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wurde die Reaktionslösung dreimal durch Reinstwasser gereinigt und mit Chloroform extrahiert. Die Phasentrennung wurde durch kurzes Zentrifugieren beschleunigt. Die vereinten organische Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Im Anschluss wurde das Gemisch filtriert und der Filterkuchen mit Chloroform (wasserfrei) gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und ein farbloser viskoser Feststoff erhalten.

$\delta_H$  (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; TMS) [ppm] = 8.13 (s, 1 H, H13), 7.44 (s, 1 H, H12) , 7.10 (s, 1 H, H11).

### 8.7.2. Kopplung von Liganden mit primären Amingruppen- Allgemeine Vorschriften

### 8.7.3. PI-*b*-PEO-Ethyldiamin 5

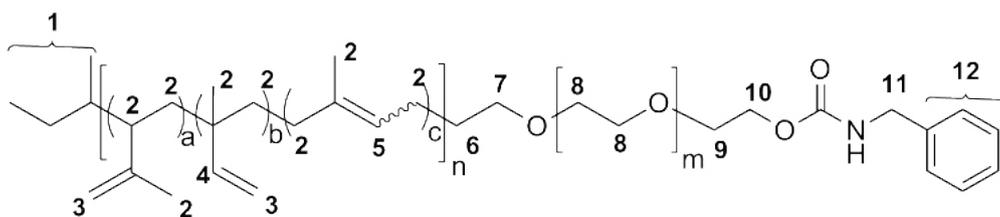
Es wurden 50 mg (5 mmol) CDI-aktiviertes DBC **3** in 1.5 mL TCM gelöst und langsam zu einer Lösung aus 9  $\mu$ L (166 mmol) Ethyldiamin in 1 mL TCM getropft. Die Reak-



tion wurde auf 60 °C erwärmt und für 64 h gerührt. Anschließend wurde das Produkt in der Kälte in Diethylether dreimal präzipitiert, anschließend bis zur Trockene eingengt, um es in Wasser wieder aufzunehmen und zu lyophilisiert. Der Umsatz anhand der NMR Daten betrug 98%.

$\delta_H$  (400 MHz;  $CDCl_3$ ; TMS) [ppm] = 4.22 (m, 2 H, H11), 3.10 (m, 2 H, H12).

#### 8.7.4. PI-*b*-PEO-Benzylcarbamat **8** sowie Stabilitätstest der Carbamatgruppe



Zur Darstellung des Benzylcarbamats wurden 101 mg (0.0074 mmol) **P1** im Vakuum getrocknet. Es folgte die Zugabe von 2.5 mg (0.022 mmol) DABCO und 10 mL Chloroform. Die Reaktionslösung wurde auf 55 °C erwärmt. Darauf folgte die Zugabe von 11 mg (0.081 mmol) Benzylisocyanat. Die Reaktion wurde für 20 Stunden unter Rühren bei 55 °C fortgesetzt. Die farblose Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, in 2 mL Chloroform gelöst und mit Diethylether gefällt. Es wurden 90 mg (0.0065 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 88%. Der Umsatz war quantitativ.

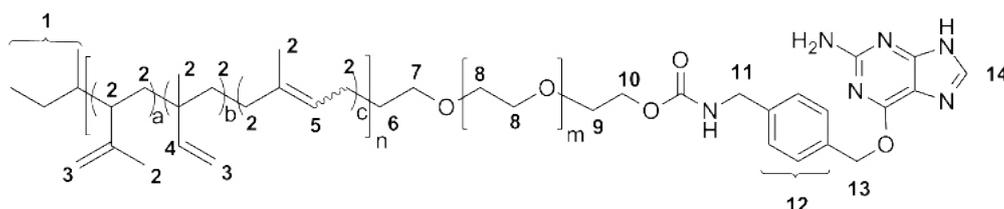
#### Stabilität der Carbamatbindung

Es wurden je 30 mg der Probe für 7 Tage mit je 2 ml Ammoniaklösung (30%) oder 2 mL eine Natriumethanolatlösung (0.1 M in Methanol) bei einer Temperatur von 55 °C geschüttelt. Anschließend wurden beide Proben mittels Dialyse gereinigt und an der Lyophile getrocknet.

$\delta_H$  (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 7.35 – 7.21 (m, 5 H, arom. H, H12), 4.37 (d,  $J = 6$  Hz, 2 H, H11), 4.26 (t,  $J = 4$  Hz, 2 H, H10).

### 8.7.5. PI-*b*-PEO-Benzylguanin 10

Die Synthesen zu Polymer-Benzylguanin sind in Zusammenarbeit mit Andrey Krutilin entstanden und sind in seiner Bachelorarbeit veröffentlicht worden.

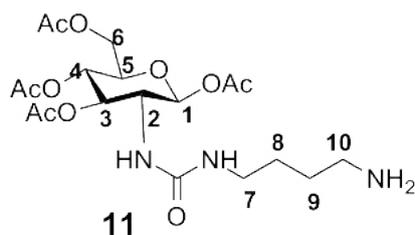


Das CDI-aktivierte PI-*b*-PEO **3** aus **P6** (180 mg / 0.031 mmol) sowie das *O*<sup>6</sup>-(4-Aminomethylbenzyl)guanin (86 mg / 0.32 mmol) wurden für 1 h im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden 63 mg (0.57 mmol) DABCO zu **3** hinzugefügt und in 4.5 mL TCM gelöst. Das BG wurde in 4.5 mL DMSO gelöst, auf 60 °C erwärmt und die Lösung aus aktiviertem Diblockcopolymer und DABCO zum Benzylguanin hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 42 h beendet und zweifach aus kaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurde das Produkt 7 Tage dialysiert und zum Schluss über Gefrierdrying ein farbloses Pulver erhalten.

$\delta_H$  (400 MHz;  $\text{THF-d}_8$ ; TMS) [ppm] = 7.59 (s, 1H, H14), 7.43 (d, 2 H,  $J = 8$  Hz, H12), 7.28 (d, 2 H,  $J = 8$  Hz, H12), 5.38 (s, 2H, H13), 4.16 (d, 2 H,  $J = 6$  Hz, H11), 4.00 (t, 2 H,  $J = 5$  Hz, H10).

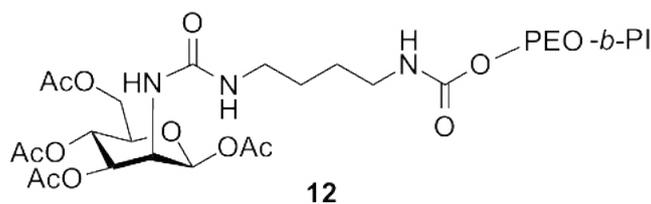
### 8.7.6. Darstellung von PI-*b*-PEO-STZ 13

Zunächst wurde das primäre Amin des Linkers von der Boc-Schutzgruppe befreit, indem 320 mg (0.570 mmol) STZ-Analogen NH-Boc in 5 mL DCM gelöst wurde und mit 5 mL TFA für 3.5 h bei RT gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt für 2 h getrocknet. Das enthaltene STZ-Analogen mit Aminolinker **11** wurde mit <sup>1</sup>H-NMR untersucht.

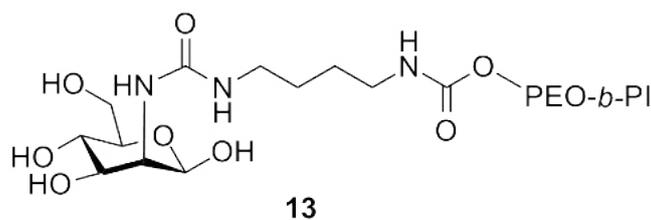


$\delta_H$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 6.40 (d, 1H  $J$  = 7 Hz, H1), 5.13 (t, 1H  $J$  = 4 Hz, H3), 5.07 - 5.05 (m, 1H, H4), 4.33 - 4.28 (m, 3 H, H6 u. H2), 3.99 - 3.96 (m, 1H, H5), 3.50 - 3.39 (m, 2H, H10), 3.10 - 3.09 (m, 2 H, H7), 2.13 - 2.02 (m, 12 H, 4 x OAc), 1.83 - 1.74 (m, 4 H, H8 u. H9).

Es wurden 5 mL des in DMSO gelösten STZ-Analogons **11** (68 mg / 0.15 mmol) in einem Kolben vorgelegt und erwärmt auf 55 °C erwärmt. Das CDI-aktivierte DBC **3** (**P1**, 199 mg, 0.015 mmol) wurde in 5 mL THF zusammen mit 16 mg (0.14 mmol) DABCO gelöst und langsam zu getropft. Unlöslicher Feststoff wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Polymer wurde dreifach in der Kälte aus Aceton gefällt und ein Umsatz von 30% anhand des  $^1\text{H-NMR}$ s bestimmt.



$\delta_H$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 6.34 (d, 1H  $J$  = 7 Hz, STZ-H1), 4.29 - 4.24 (m, 3 H, STZ-H6 u. H2), 3.23 - 3.11 (m, 2 H, H10), 2.17 - 2.01 (m, 12 H, 4 x OAc).

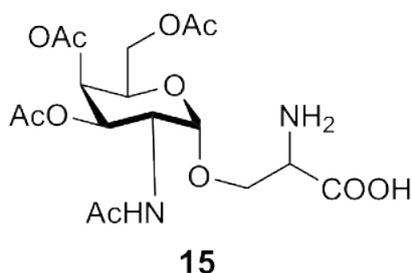


Zur Deacetylierung wurde das Produkt **12** in 10 mL 0.1 M NaOMe/Methanol-Lösung bei RT für 2 h gerührt. Zur Neutralisation wurde Amberlite verwendet. Das Amberli-

te IR120 wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur vollständigen Entfernung aller ungebundenen STZ-Analoga wurde das Produkt **13** 3 Tage dialysiert (MWCO: 1000 g/mol). Umsatz von weniger als 10% anhand der  $^1\text{H-NMR}$  Daten.

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 5.34-5.31 (m, STZ), 4.22 - 4.18 (m, 3 H, H6 u. H2), 3.99 - 3.97 (m, 1H, H5).

### 8.7.7. PI-*b*-PEO-GalNAc **17**



Das Fmoc geschützte GalNAcSerin **14** (48 mg / 0.073 mmol) wurde in 5 mL DMF, das 10% Piperidine erhält, gelöst und für 90 Min. bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt über eine Kieselgelsäule gereinigt. Eine vollständige Separation der Fmoc-Schutzgruppe wurde nicht erreicht, konnte aber für die Folgereaktion vernachlässigt werden.

Das Reaktionsprodukt **15** wurde in 5 mL TCM gelöst und in einen Schlenkkolben überführt. Das Chloroform wurde im Stickstoffstrom verdampft und das Produkt unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Feststoff wieder in 3 mL TCM gelöst und auf 55°C erwärmt. Währenddessen wurde eine zweite Lösung mit CDI-aktiviertem DBC **3** (**P6**, 80 mg; 0.014 mmol) mit 27 mg DABCO (0.24 mmol) in 3 mL TCM hergestellt, die langsam zur erwärmten GalNAc-Lösung hinzuge tropft wurde. Nach einer Reaktionszeit von 40 h wurde die Lösung auf RT gebracht und im Stickstoffstrom das Lösungsmittel reduziert. Im Folgenden wurden zwei Präzipitationsschritte mit Aceton bei  $-18^\circ\text{C}$  durchgeführt und das Produkt zuletzt gefriergetrocknet.

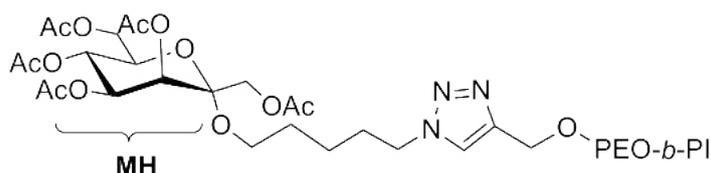
$\delta_H$  (400 MHz;  $CDCl_3$ ; TMS) [ppm] = 3.91 (m, 2H, GalNAc-*H*), 2.23 – 1.79 (m, 12H, OAc).

Das Produkt **16** wurde in 4 mL Methanol/NaOMe (0.1 M) gelöst und für 3.5 h bei RT gerührt. Bei der zweifachen Präzipitation in kaltem Diethylether wurde das gereinigte Produkt **17** erhalten, welches erneut im Vakuum getrocknet und im Anschluss lyophilisiert wurde. Es wurde ein farblores Pulver erhalten. Der Umsatz wurde anhand des  $^1H$ -NMRs auf 25% berechnet.

$\delta_H$  (400 MHz;  $THF-d_8$ ; TMS) [ppm] = 5.33 (t,  $J = 5$  Hz, 1H, GalNAc-*H*), 3.76 (m, 2H, GalNAc-*H*), 1.89 (s, 3H, NAc).

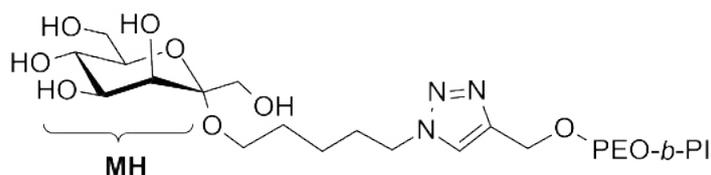
## Click-Chemie

### 8.7.8. PI-*b*-PEO-D-Mannoheptulose **20**



Es wurden 26 mg (0.0503 mmol) 4-Azidobutyl-1,3,4,5,7-penta-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manno-hept-2-ulopyranosid **18** mit 50 mg (0.005 mmol) PI-*b*-PEO-Alkin **P8** sowie 50 mg (0.005 mmol) CuI und 5 mg (0.05 mmol) DABCO in 5 mL TCM gelöst und 24 h bei 60 °C gerührt. Die gelb orange Suspension wurde filtriert (PTFE, 0.2  $\mu$ m) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in der Kälte aus Ether dreimal präzipitiert.

$\delta_H$  (400 MHz;  $CDCl_3$ ; TMS) [ppm] = 8.09 (s, 1 H, 1,4-Triazol), 5.40 – 5.34 (m, 1 H, MH), 5.25 – 5.20 (m, 1 H, MH), 4.46 – 4.44 (m, 1 H, MH) 4.35 (s, 2 H,  $CH_2$ ), , 4.27 – 4.22 (m, 1 H, MH), 4.15-4.10 (m, 1 H, MH) 2.13 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, OAc).

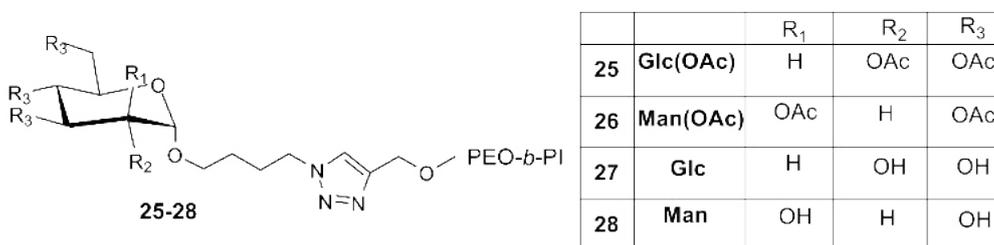


Es folgte die Entschützung mit 4 mL NaOMe/MeOH (0.1 M) bei RT für 3.5 h und Neutralisation mit Ambelite IR 120 H. Nach Filtration wurde das Produkt mit Wasser gewaschen und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das gereinigte Produkt wurde zum Schluss lyophilisiert. Anhand der <sup>1</sup>H-NMR Charakterisierung konnte ein Umsatz von 20% ermittelt werden.

$\delta_H$  (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; TMS) [ppm] = 8.02 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 5.35 – 5.33 (m, 1 H, MH), 5.26 – 5.18 (m, 1 H, MH), 4.35 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.04 – 3.94 (m, 5 H, MH).

### 8.7.9. PI-*b*-PEO-Glycoside 25-28

Die Synthesen der Polymer-Glycoside sind in Zusammenarbeit mit Jenny Spöttel entstanden und wurden in ihrer Bachelorarbeit veröffentlicht.



#### Synthesen mit Kupferiodid-Triethylphosphit in TCM:

Es wurden 1 Äq (87 mg / 0.0087 mmol) des DBC-Alkin **P8** und 5 Äq (18 mg / 0.041 mmol) des acetylgeschützten Glycosidazid-Derivats 1-(4-Azidobutyl)-2,3,4,6-Tetra-*O*-acetylmannopyranosid (Man(OAc)) in TCM gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 Äq Kupferiodid-Triethylphosphit welches zuvor in 1 mL TCM gelöst wurde. Die Reaktion wurde 48 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde über einen PTFE Spritzenfilter 5  $\mu$ m sowie 0.2  $\mu$ m filtriert. Das Polymer wurde in der Kälte aus Aceton dreimal präzipitiert.

$\delta_H$  (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; TMS) [ppm] = 8.01 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 4.22 - 4.09 (m, 3 H, Man-H), 2.18 - 1.90 (m, 12 H, OAc).

Zur Entschützung wurde das glykokonjugierte PI-*b*-PEO in 10 mL NaOMe/MeOH (0.1 M)

gelöst und nach einer Reaktionszeit von 2 h neutralisiert durch Amberlite IR 120 H. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in Reinstwasser aufgenommen und lyophilisiert. Anhand der  $^1\text{H-NMR}$  Charakterisierung konnte ein Umsatz von 86% bestimmt werden.

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 8.01 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 4.22 - 4.13 (m, 3 H, Man-H).

#### Synthesen mit $\text{CuSO}_4$ in $\text{H}_2\text{O}$ :

Es wurde 1 Äq (116 mg / 0.012 mmol) DBC-Alkin **P8** in THF gelöst und zu dem bereits deacetylierten Glycosidazid 1-(4-Azido-2,3,4,6-Tetrahydroxy-glucopyranosid (Glc) (22 mg / 0.079 mmol) in entgastem Reinstwasser gegeben. Dazu wurden 125 Äq Kupfersulfat sowie 10 Äq Ascorbinsäure hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 48 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde über einen Nylon 0.2  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter gegeben und anschließend dreimal mit TCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in Reinstwasser aufgenommen, erneut filtriert und lyophilisiert. Anhand der  $^1\text{H-NMR}$  Charakterisierung konnte ein Umsatz von 87% bestimmt werden.

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; TMS) [ppm] = 8.09 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 5.43 - 5.25 (m, 2 H, Glc-H), 4.35 - 4.25 (m, 3 H, Glc-H), 4.22 - 4.11 (m, 2 H, Glc-H).

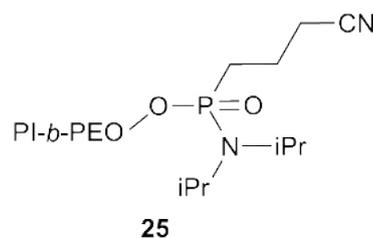
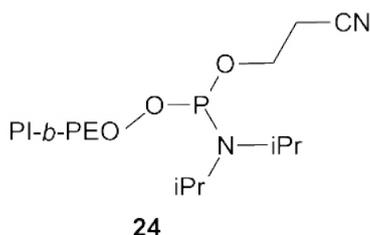
$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ; TMS) [ppm] = 8.22 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 5.23 - 5.16 (m, 1 H, Glc-H), 4.44 - 4.37 (m, 3 H, Glc-H), 4.35 - 4.28 (m, 2 H, Glc-H).

#### Synthesen mit Kupferiodid-Triethylphosphit Analog zu wässrigen Synthesen mit $\text{CuSO}_4$ :

Am Beispiel der Reaktion mit Man-Derivat. Es wurden 7 mg (0.025 mmol) Mannose-Azid in entgastem Reinstwasser gelöst, dazu wurde das in THF gelöste DBC-Alkin **P8** (37 mg / 0.0037 mmol) injiziert und ebenso 2 Äq des Katalysators Kupferiodid-Triethylphosphit in THF gelöst und zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 48 h bei RT und die Reinigung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt durch Extrahieren mit TCM. Anhand der  $^1\text{H-NMR}$  Charakterisierung konnte ein Umsatz von 85% bestimmt werden.

$\delta_H$  (400 MHz;  $CDCl_3$ ; TMS) [ppm] = 8.08 (s, 1 H, 1,4-Triazol-H), 5.46 - 5.27 (m, 2 H, Man-H), 4.34-4.30 (m, 3 H, Man-H), 4.22 - 4.15 (m, 2 H, Man-H).

## 8.8. PI-*b*-PEO-Phosphoramidit 30



Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Hermann in Groningen durchgeführt.

Zunächst wurden Dichloromethan und DIPEA frisch destilliert und unter Argon aufbewahrt. Es wurden 3.079 g (0.3079 mmol) PI-*b*-PEO **P4** für 30 Min. im Vakuum konditioniert und unter Argon aufbewahrt. Das Diblockcopolymer wurde in 13 mL DCM gelöst und 0.5 mL DIPEA wurden hinzugefügt. Nach 5 Min. wurden 0.4 mL (0.45 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N-Diisopropylchlorphosphoramidit tropfenweise unter ständigem Rühren hinzugefügt bei RT. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wurde mit DCM mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

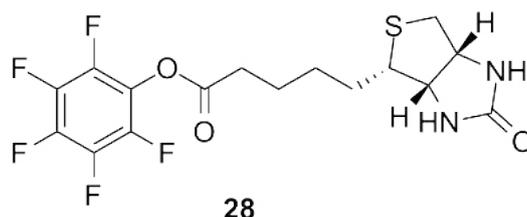
$^{31}P$ -NMR in DCM  $\delta$  [ppm]: 148 (80%, **30**), 18 (20%, **31**).

Zur Synthese der DNA (5-XCG ACG CGA TAC CGC TCG ACG TA-3) wurden 247 mg Adenosin (auf Polystyrol-Festphase) in das Metallreaktionsgefäß gegeben und fest verschlossen. Nach Abschluss der DNA-Synthese wurde als letzte Base X das aktivierte Diblockcopolymer in 13 mL DCM gelöst und der Aktivator (0.3 M) ausgetauscht. Dazu wurden 5.77 g Hyacinthin BMT in DCM:Acetonitril (60:40) gelöst.

Zur Reinigung wurde die Reaktionssäule gespült und vom Lösungsmittel befreit. Das trockene Rohprodukt wurde in eine Schott Flasche (100 mL) überführt. Zum Quellen der Festphase wurden 3 mL Acetonitril hinzugefügt und mit einer 25%iger Ammoniaklösung bei 60 °C für 4 h entschützt. Die Festphase wurde durch Filtration entfernt und mit 50% Ethanol gewaschen. Das Lösungsmittelgemisch wurde unter vermindertem Druck entfernt. Über eine AIEX (Anionic Exchange) Säule Source 15 RPC 5 mL wurde mit einem kontinuierlich ansteigenden

NaCl Gradienten von zwei Puffern basierend auf einem gesättigtem Urea Tris HCL (25 mM, pH= 8) gearbeitet um eine Auftrennung von 21mer, 22mer und 23mer (DNA+X-Polymer) zu erhalten. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die wässrigen Fraktionen wurden unter vermindertem Druck unter Erwärmen reduziert und zum entsalzen über Spinfilter (MWCO 3000) gewaschen mit 20 mL Reinstwasser. Zur Analytik wurde ein 15% PAA TBE-Urea Gel der Firma Thermo Fisher verwendet.

### 8.8.1. Biotin-Pentafluorophenylester **37** zu PI-*b*-PEO-Biotin **38**

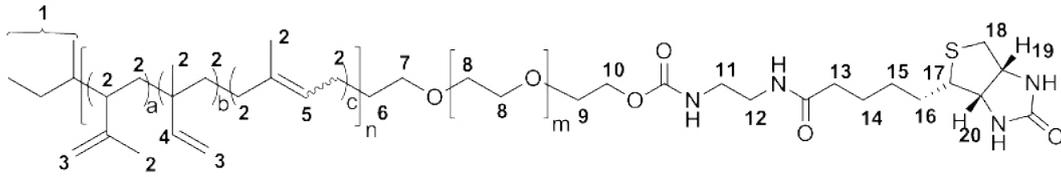


Zur Aktivierung des Biotins im ersten Schritt wurden 106 mg (0.432 mmol) Biotin in 2 mL DMF aufgenommen und auf 70 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf RT herab gekühlt und 0.1 mL (0.7 mmol) Triethylamin sowie 0.1 mL (0.6 mmol) Pentafluorophenyltrifluoroacetat zugesetzt. Die Lösung wurde für 30 Min. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der weiße Feststoff wurde in 2 mL Diethylether gelöst. Es wurden 626 mg (0.0626 mmol) PI-*b*-PEO-NH<sub>2</sub> ?? in 3 mL THF und 3 mL DMF gelöst und zur ersten Lösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Chloroform/Wasser extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Zusätzlich wurden weitere Fällungsschritte mit einem Ethanol/Diethylether-Gemisch durchgeführt. Ein leicht gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 97% (635 mg, 0.0635 mmol) wurde erhalten. Der Umsatz wurde mittels NMR auf 30% bestimmt.

$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; TMS) [ppm] = 4.36 - 4.30 (m, 1 H, H20), 3.23 - 3.14 (m, 1 H, H1), 2.99 - 2.90 (m, 1 H, H18), 2.78 - 2.65 (m, 2 H, H13).

### 8.8.2. PI-*b*-PEO-Biotin **38** mittels (+)-Biotin-N Hydroxysuccinimidester

Es wurden 500 mg (0.05 mmol) PI-*b*-PEO-NH<sub>2</sub> **P7** in 2 mL THF und 3 mL DMF gelöst. Zu dem gelöstem Polymer wurden eine Lösung aus 85 mg (0.25 mmol) (+)-Biotin-N Hydroxysuccinimidester und 5 mg (0.05 mmol) DABCO in 4 mL DMF langsam zugetropft. Das Gemisch



wurde für 20 h bei RT gerührt. Zur Reinigung erfolgte eine Extraktion des Produkts mit Chloroform/Wasser. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Ausbeute des leicht gelblichen Feststoffes betrug 99% (598 mg, 0.05 mmol, 99%).

$\delta_H$  (400 MHz;  $CDCl_3$ ; TMS) [ppm] = 4.35 - 4.30 (m, 1 H, H20), 3.22 - 3.12 (m, 1 H, H1), 2.96 - 2.90 (m, 1 H, H18), 2.79 - 2.68 (m, 2 H, H13).

## Biochemische Kopplungen

### 8.9. NeutrAvidin an biotinylierte Diblockcopolymere verkapselte Nanopartikel

Kopplung von biotinylierten Nanopartikeln QB1 und RB1. Es wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL NeutrAvidin in einem 1:3 Gemisch aus demineralisiertem Wasser und PBS-Puffer (ohne Calcium) hergestellt. Parallel dazu wurden 182  $\mu$ L CS-AMK-QB1 (0,6 nmol) mit 2 mL PBS und 336  $\mu$ L CS-AMK-RB1 (0,6 nmol) mit 2 mL PBS vermischt. Zu je 7 mL NeutrAvidin-Lösung wurden diese Proben sehr langsam zugetropft und bei Raumtemperatur für 15 Minuten gerührt.

#### Reinigung

Der Überschuss an NeutrAvidin wurde über einen Sucrose-Gradienten entfernt. Die Sucrose wurde durch Waschen mit Satorius-Zentrifugationsfilter (MWCO 100 kDa) abgetrennt. Anschließend wurden die Proben spektroskopisch charakterisiert.

### 8.10. Aptamere an Neutravidin Nanocontainer

Die Kopplung der Aptamere an die Nanocontainer mit NeutrAvidin fand in PBS-Puffer statt. Dazu wurden je 10  $\text{\AA}$ q biotinylierte Aptamere zu den Nanocontainern gegeben, deren Kon-

zentration mittels Absorption bestimmt wurde. Nach einer Inkubation von 15 Min. bei RT wurden die eventuelle ungebundenen Aptamere über einen Spinfilter (100 kDa) entfernt. Dazu die Probelösung in den Spinfilter gegeben und bei 6000 G für 1 Min. zentrifugiert. Darauf folgen drei Waschschrte mit je 200  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer, die jeweils durch erneutes zentrifugieren abgetrennt wurden.

## 8.11. Agarosegel

### 8.11.1. Nachweis auf spezifische Wechselwirkung von NC-NAvi-Aptameren mit E- und P-Selektin

Die Laufzeit wurde nach 5 h bei 80 V bei 5 °C beendet. Belegung der Taschen mit je 10  $\mu\text{L}$  sowie 2  $\mu\text{L}$  LD 6x 1) QD-Biotin-NAvi, 2) Rods-Biotin-NAvi 3) QD-Biotin-NAvi-Aptamer 4) +E-Selektin 5) +P-Selektin 6) +IL-6 7) +Streptavidin 8) QD-Biotin-NAvi-neg.Aptamer Kontrolle 9) +E 10) +P 11) +IL-6 12) +Strep 13) Rod-Biotin-NAvi-Aptamer 14) +E 15) +P 16) +IL-6 17) +Strep 18) Rod-Biotin-NAvi-neg.Aptamer Kontrolle 19) +E 20) +P 21) +IL-6 22) +Strep.

Zuvor wurden je 10  $\mu\text{L}$  der NP-Lösung mit gekoppelten Aptamer für 5 Min auf 80 °C erwärmt und langsam auf RT abgekühlt. Anschließend wurden je 5  $\mu\text{L}$  Protein (2  $\mu\text{M}$ ) zu je 5  $\mu\text{L}$  NP-Lösung gegeben und für 30 Min bei RT inkubiert. Das 0.8% Agarosegel wurde bei 80 V im Kühlschrank nach 2,5 h und nach 5 h ohne EtBr Anfärbung unter UV-Bestrahlung photographisch dokumentiert.

## 8.12. Dot Blot

In dem gezeigten Dot Blots (Abb. 53) wurde in einer 96-Well Platte gearbeitet. Dazu wurden je 300  $\mu\text{L}$  Tween20 (0.1% in PBS) in 13 Kammern zum Blockieren der Oberfläche gegeben und für 30 Min. inkubiert. Währenddessen wurden je 3  $\mu\text{L}$  Proteinlösung (1  $\mu\text{M}$ ) in 0.5  $\mu\text{L}$  Schritten auf die Nitrocellulose-Membran gegeben und trocknen gelassen. Mit 300  $\mu\text{L}$  Tween20 0.1% in PBS+ (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) wurden für 2 h freie Bindungstellen auf der Oberfläche blockiert. Es folgte 2 Spülvorgänge mit je 300  $\mu\text{L}$  PBS+. Mit dem Proteinspot nach oben gerichtet wurden in ein Lösung aus 40  $\mu\text{L}$  PBS+ vorlegen und 10  $\mu\text{L}$  der RB1-DNA Lösungen um eine verdünnte Lösung zu erhalten mit deutlich sichtbarer Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung.

### 8.13. *in vivo* Maus - Gewebeschnitte

Es wurde ein Ansatz von 0.1 nmol QDs (4QB1) nach dem oben beschriebenen Verfahren (s. Abschnitt 8.9) mit Aptameren funktionalisiert und mit einem Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  in PBS für die Injektion in die Schwanzvene einer Maus mit Tumorgewebe vorbereitet. Nach einer Zirkulationszeit von 30 Min. erfolgte die Entnahme der Organe und des Tumors unter sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff in einem Einbettungsmedium (Tissue-Tek<sup>®</sup>). Als Kontrolle wurde eine zweite Maus mit QDs mit einer einfachen PI-*b*-PEO-OH Außenhülle verwendet, ebenfalls mit einer Menge von 0.1 nmol in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$ . Die Kryoschnitte wurden bei -20 °C angefertigt und bei -80 °C gelagert.

Schnitte und Tierversuche wurden von Tobias Gossau am UKE in der Gruppe von Prof. Dr. Schumacher angefertigt.

Die Bilder wurden am HPI mit Dr. Dennis Eggerts und Dr. Rudolph Reimer am Konfokal von Nikon, C2+ an gefertigt. Die Auswertung und Bildbearbeitung erfolgt mit dem Programm NIS Elements Viewer.

#### 8.13.1. DRAQ5-Kernanfärbung

Schnitte mit DRAQ5 (1,5-Bis([2-(di-methylamino) ethyl]amino)-4, 8-Dihydroxyanthracene-9,10-dion) angefärbt 1:1000 in PBS (100  $\mu\text{L}$ ), 10-15 Min. inkubiert, 1 x Waschen mit dest. Wasser.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen mit C2+, Nikon – Anregung 640 nm von DRAQ5 ist ein *far-red* fluoreszierender Farbstoff (Emission: 697 nm) wird in den Aufnahmen Blau dargestellt! Alle Aufnahmen wurden mit einer 40fachen Vergrößerung gemacht.

Allgemein gilt für alle Aufnahmen der Schnitte eine systematisch Untersuchung. Die Auswahl der Aufnahmen zeigen charakteristische Merkmale der jeweiligen Probe.

### 8.14. Verdünnungsreihen DBC-Mannoheptulose zur SPR-Messung

Zur Auswertung der Daten wurde die Biacore T100 Evaluation Software genutzt.

In dieser Versuchsreihe wurden mehrere Glycoside getestet.

Als Puffer wurde HEPES (0.01 M), NaCl (0.15 M), Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> (1 mM) verwendet bei einem pH-Wert von 6.5, der filtert und im Ultraschallbad entgast wurde.

Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe nur mit D-*manno*-heptulose (MH) angefertigt,

mit folgenden Konzentrationen: 0.0089, 0.0178, 0.0356, 0.0713, 0.1435, 0.286, 0.57, 1.14, 2.28, 4.56 mM.

Für die verkapselten Nanocontainer-MH wurde folgende Konzentrationsreihe hergestellt: 0.00083, 0.00166, 0.00332, 0.00664, 0.01328, 0.02656, 0.05313, 0.10625, 0.2125, 0.4250  $\mu\text{M}$ . (Die Konzentration wurde anhand der Absorbtionspektren der Nanopartikel kalkuliert.)

## 9. Sicherheit

Die verwendeten Chemikalien mit entsprechenden Hinweisen zu Sicherheit und Entsorgung.

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung
Aceton	GHS 02, 07	225, 319, 336, EUH 066	210, 261, 305+351+338	I
Acetonitril	GHS 02, 07	225, 332, 302, 312, 319	210, 305+351+338, 403+235	I
Ammoniaklsg. (25-38%)	GHS 05, 07, 09	314, 335, 400	261, 273, 280, 305+351+338, 310	IV
Azobis(isobutyronitril)	GHS 02, 07	242, 332, 302, 412	273	VIII
Biotin	-	-	-	V
(+)-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester	-	-	-	V
Benzylisocyanat	GHS 02, 07, 08	226, 315, 317, 319, 334, 335	26, 280, 305+ 351+338, 342+311	V
1,1-Carbonyldiimidazol	GHS 05, 07	302, 314	280, 305+351+338, 310	V
Chloroform	GHS 07, 08	351, 302, 373, 315; Kanzerogen	302+352, 314	II
1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan	GHS 02, 07	228, 302, 315, 319, 335, 412	210, 261, 273, 305+351+338	V
Dichlormethan	GHS 07, 08	315, 319, 335, 336, 351, 373	261, 281, 305+351+338	II
Diethylether	GHS 02, 07	224, 302, 336, EUH 019, 066	210, 240, 403+235	I
2-Cyanoethyl N,N-Diisopropylchlorphosphoramidit	GHS 02, 05	250, 314	222, 231, 280, 305+351+338, 310, 422	V

Dimethylformamid	GHS 02, 06, 07	360d, 226, 332, 314, 319	201, 210, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313	I
Dimethylsulfoxid	-	-	-	I
Diisopropylethylamin	GHS 02, 05, 06	225, 301, 314, 412	210, 273, 280, 301+310, 305+351+338, 310	IV
Ethanol	GHS 02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233	I
Ethylendiamin	GHS 02, 05, 07, 08	226, 302, 312, 314, 317, 334	261, 280, 305+351+338, 310	IV
<i>N</i> - $\alpha$ -Fmoc- <i>O</i> - $\beta$ -(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin	-	-	-	V
D-Glucose	-	-	-	V
Harnstoff	-	-	-	VII
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure	-	-	-	V
Hyacinthin	GHS 07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338	I
Kupfer(I)iodid	GHS 02, 07	302, 315, 319, 335, 400	261, 273, 305+351+338	V
Kupfer(I)iodid-Triethylphosphit	GHS 07	315, 319, 335	261, 305+351+338	I

Kupfersulfat	GHS 07, 09	302, 319, 315, 410	273, 305+351+338, 302+352	VII
Magnesiumsulfat	-	-	-	V
D-Mannose	-	-	-	V
Methanol	GHS 02, 06, 08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352	I
Natriummethanolat	GHS 02, 05, 07	228, 251, 290, 302, 314, EUH 014	210, 380, 310, 370+378, 305+351+338, 402+404, 406	VII
Natriumsulfat	-	-	-	VI
<i>O</i> <sup>6</sup> -(4-Aminomethyl- benzyl)guanin	GHS 07	315, 319, 335	261, 305+351+338	V
Phosphorwolframsäure	GHS 03	314	280, 305+351+338, 310	III
Saccharose	-	-	-	VI
Tetrahydrofuran	GHS 02, 07	225, 319, 335	210, 261, 305+351+338	I

Entsorgungsschlüssel

I : Organische Lösungsmittel

II : Halogenhaltige Organische Lösungsmittel

III : Anorganische Säuren

IV : Anorganische Basen

V : In Chloroform lösen und dann nach II entsorgen.

VI : Feststoffbehälter

VII : Vorsichtig in Wasser lösen und nach I entsorgen.

VIII : Getrennt aufbewahren und gesondert Entsorgung nach entsprechender Arbeitsanweisung.

## Literatur

- [1] S. Hieber, B. Müller, *Nanomedizin - Nanotechnologie für die Chirurgie*, Bd. 4, Springer Verlag, Basel, **2011**, S. 7–15.
- [2] WHO, <http://www.who.int/> **2015**, Date Accessed: 2016–01–05.
- [3] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small* **2008**, *4*(1), 26–49.
- [4] Z. Ge, S. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*(17), 7289–7325.
- [5] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chemie* **2009**, *121*(5), 886–913.
- [6] R. K. Jain, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, *1*(96), 241–263.
- [7] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*(11), 206–212.
- [8] J. A. Barreto, W. O'Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, L. Spiccia, *Adv. Mater.* **2011**, *23*(12), H18–H40.
- [9] G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen, D. D. Lasic, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17*(1), 31–48.
- [10] J. D. Hood, *Sci. Reports* **2002**, *296*(5577), 2404–2407.
- [11] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*(3), 161–171.
- [12] J. Comenge, C. Sotelo, F. Romero, O. Gallego, A. Barnadas, T. G. C. Parada, F. Dominguez, V. F. Puentes, *PLoS One* **2012**, *7*(10), e47562.
- [13] M. R. Longmire, M. Ogawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*(6), 993–1000.
- [14] S. Chen, K. Yang, R. G. Tuguntaev, A. Mozhi, J. Zhang, P. C. Wang, X. J. Liang, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *12*(2), 269–286.
- [15] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Drug Deliv.* **2006**, *13*(6), 399–409.
- [16] Y. C. Barenholz, *J. Control. Release* **2012**, *160*(2), 117–134.
- [17] D. D. Lasic, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*(7), 307–321.
- [18] P. Zrazhevskiy, M. Sena, X. Gao, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*(11), 4326–4354.

- [19] H. Maeda, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*(5), 797–802.
- [20] K. F. Pirollo, E. H. Chang, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*(10), 552–558.
- [21] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*(8), 969–976.
- [22] R. K. Jain, *Sci. AAAS WebinarSeries* **2015**, <http://webinar.sciencemag.org/>.
- [23] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*(Sep.), 678–689.
- [24] „Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien“ Technischer Bericht 4, **2011**.
- [25] Y. Yin, A. P. Alivisatos, *Nature* **2005**, *437*(9), 664–670.
- [26] J. W. de Vries, F. Zhang, A. Herrmann, *J. Control. release* **2013**, *172*(2), 467–483.
- [27] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*(1), 293–346.
- [28] R. Fries, M. Simkó, *NanoTrust-Dossiers* **2012**, *33*(Sep.), 1–4.
- [29] D. V. Talapin, J.-S. Lee, M. V. Kovalenko, E. V. Shevchenko, *Chem. Rev.* **2010**, *110*(1), 389–458.
- [30] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Sci. Reports* **1998**, *281*(5385), 2013–2016.
- [31] J. K. Jaiswal, S. M. Simon, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*(9), 497–504.
- [32] C. Schmidtke, A.-M. Kreuziger, D. Alpers, A. Jacobsen, Y. Leshch, R. Eggers, H. Kloust, H. Tran, J. Ostermann, T. Schotten, J. Thiem, J. Thimm, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*(40), 12593–600.
- [33] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian, *Biomaterials* **2007**, *28*(31), 4717–4732.
- [34] S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chemie* **2002**, *114*(5), 712–739.
- [35] D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, *JACS Commun.* **2005**, *127*(14), 4990–4991.

- [36] A. Feld, J.-P. Merkl, H. Kloust, S. Flessau, C. Schmidtke, C. Wolter, J. Ostermann, M. Kampferbeck, R. Eggers, A. Mews, T. Schotten, H. Weller, *Angew. Chemie* **2015**, *127*(42), 12645–12648.
- [37] G. F. Fuhrmann, *Toxikologie für Naturwissenschaftler*, 1. Aufl., Teuber Verlag, Wiesbaden, **2006**.
- [38] C. D. Klaassen, J. Liu, S. Choudhuri, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*(1), 267–294.
- [39] A. Giemsa, *Aufnahme, Metabolisierung und Toxizität von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIOs)*, Dissertation, Hamburg, **2013**.
- [40] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Publ. Gr.* **2009**, *8*(7), 543–557.
- [41] B. Gupta, V. P. Torchilin, *Cancer Immunol.* **2007**, *56*(8), 1215–1223.
- [42] A. M. Ponce, B. L. Viglianti, D. Yu, P. S. Yarmolenko, C. R. Michelich, J. Woo, M. B. Bally, M. W. Dewhirst, *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*(1), 53–63.
- [43] E. Pösel, S. Fischer, S. Foerster, H. Weller, *Langmuir* **2009**, *25*(24), 13906–13913.
- [44] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D. E. Discher, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*(4), 249–55.
- [45] J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowski, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld, H. Weller, *ACS Nano* **2013**, *7*(10), 9156–67.
- [46] C. Schmidtke, E. Pösel, J. Ostermann, a. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastús, R. Eggers, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*(16), 743374–44.
- [47] E. Pösel, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller, *ACS Nano* **2012**, *6*(4), 3346–3355.
- [48] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*(37), 8861–8871.
- [49] T. Nann, P. Mulvaney, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*(40), 5393–5396.

- [50] H. Kloust, C. Schmidtke, J.-P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Pösel, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*(44), 23244–23250.
- [51] K. G. E. Nordmeier, M. Lechner, *Makromolekulare Chemie*, 4. Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **2010**.
- [52] J. Ostermann, *Maßgeschneiderte Polymerliganden für die biomedizinische Anwendung von Quantum Dots*, Dissertation, Hamburg, **2014**.
- [53] M. Szwarc, M. Levy, R. Milkovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*(11), 2656–2657.
- [54] A. F. Hussain, H. R. Krüger, F. Kampmeier, T. Weissbach, K. Licha, F. Kratz, R. Haag, M. Calderon, S. Barth, *Biomacromolecules* **2013**, *14*(8), 2510–2520.
- [55] E. Harris, J. M., *Poly(ethylene glycol) Chemistry*, 1. Aufl., Springer US, Boston, MA, **1992**.
- [56] M. Thiry, K. Boldt, M. S. Nikolic, F. Schulz, M. Ijeh, A. Panicker, T. Vossmeier, H. Weller, *ACS Nano* **2011**, *5*(6), 4965–4973.
- [57] S. Jain, F. S. Bates, *Sci. Reports* **2003**, *300*(5618), 460–464.
- [58] W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*(5), 825–858.
- [59] G. T. Hermanson, „Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation“ in *Bioconjugate Tech.*, 3. Aufl., Elsevier Ltd, Oxford, **2013**, S. 229–258.
- [60] H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 11836–11840.
- [61] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*(5), 1821–1826.
- [62] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*(43), 16793–7.
- [63] J.-P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, A.-M. Kreuziger, S. Flessau, H. Mattoussi, H. Weller, *Proc. SPIE* **2014**, *8955*, 89551X.
- [64] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie* **2001**, *113*(11), 2056–2075.

- [65] N. J. Agard, J. a. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(46), 15046–7.
- [66] J. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, „Zusammensetzung und Struktur der Proteine“ in *Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2013**, Kapitel 2, S. 25.
- [67] F. Stagge, G. Y. Mitronova, V. N. Belov, C. A. Wurm, S. Jakobs, *PLoS One* **2013**, *8*(10), 1–9.
- [68] A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*(27), 9955–9.
- [69] F. Kampmeier, M. Ribbert, T. Nachreiner, S. Dembski, F. Beaufils, A. Brecht, S. Barth, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*(5), 1010–1015.
- [70] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*(2), 128–136.
- [71] K. Bojkowska, F. S. D. Sio, I. Barde, S. Offner, S. Verp, C. Heinis, K. Johnsson, D. Trono, *Chem. Biol.* **2011**, *18*(6), 805–815.
- [72] A. Petershans, D. Wedlich, L. Fruk, *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, *47*(38), 10671–3.
- [73] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*(C), 85–133.
- [74] K. S. Roth, *Am. J. Soc. Clin. Nutr.* **1981**, *34*(Sep.), 1967–1974.
- [75] R. E. Eakin, E. E. Snell, R. J. Williams, *J. Biol. Chem.* **1941**, *140*(4), 535–543.
- [76] E. A. Bayer, S. Ehrlich-Rogozinski, M. Wilchek, *Electrophoresis* **1996**, *17*(8), 1319–1324.
- [77] N. M. Green, *Biochem. J.* **1963**, *89*(3), 609–20.
- [78] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*(1), 85–133.
- [79] O. H. Laitinen, V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, M. S. Kulomaa, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*(24), 2992–3017.
- [80] O. H. Laitinen, H. R. Nordlund, V. P. Hytönen, M. S. Kulomaa, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*(6), 269–277.
- [81] R. Alon, E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*(3), 1236–1241.
- [82] Y. Hiller, J. M. Gershoni, E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. J.* **1987**, *248*(1), 167–171.

- [83] P. Vermette, T. Gengenbach, U. Divisekera, P. A. Kambouris, H. J. Griesser, L. Meagher, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *259*(1), 13–26.
- [84] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, „DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information“ in *Stryer Biochem.*, Springer Verlag, Berlin, **2013**, Kapitel 4, S. 110–141.
- [85] M. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*(21), 278–284.
- [86] M. Kwak, A. Herrmann, *Angew. Chemie* **2010**, *122*(46), 8754–8768.
- [87] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- [88] R. Faryammanesh, T. Lange, E. Magbanua, S. Haas, C. Meyer, D. Wicklein, U. Schumacher, U. Hahn, *PLoS One* **2014**, *9*(4), e93173.
- [89] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*(7243), 73–76.
- [90] J. K. Lee, Y. H. Jung, J. B.-H. Tok, Z. Bao, *ACS Nano* **2011**, *5*(3), 2067–74.
- [91] T. R. Wilks, J. Bath, J. W. de Vries, J. E. Raymond, A. Herrmann, A. J. Turberfield, R. K. O’Reilly, *ACS Nano* **2013**, *7*(10), 8561–72.
- [92] S. Modi, M. G. Swetha, D. Goswami, G. D. Gupta, S. Mayor, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*(5), 325–330.
- [93] A. J. Mastroianni, S. A. Claridge, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(24), 8455–8459.
- [94] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*(5709), 538–44.
- [95] A. Alivisatos, *Sci. New Ser.* **1996**, *271* (5251), 933–937.
- [96] D. Vanmaekelbergh, P. Liljeroth, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*(4), 299–312.
- [97] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, **1995**, S. 1313.
- [98] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1905**, *4*(17), 132–148.
- [99] L. de Broglie, *Found. Phys.* **1970**, *1*(1), 5–15.

- [100] G. Wedler, H.-J. Freund, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 6. Aufl., WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2012**, S. 127–128.
- [101] G. Schmid, *Nanoparticles: from theory to application*, 2. Aufl., John Wiley & Sons, Weinheim, **2010**.
- [102] H. Weller, *Angew. Chemie* **1993**, *105*(1), 43–55.
- [103] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*(19), 8706–8715.
- [104] A. L. Rogach, *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots*, Springer-Verlag, Wien, New York, **2008**.
- [105] H. Weller, H. M. Schmidt, U. Koch, A. Fojtik, S. Baral, A. Henglein, W. Kunath, K. Weiss, E. Dieman, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *124*(6), 557–560.
- [106] H. Schmidt, H. Weller, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *129*(6), 615–618.
- [107] L. Brus, T. B. Laboratories, M. Hill, *Appl. Phys. A -Springer Verlage* **1991**, *74*(53), 465–474.
- [108] L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*(9), 4403–4409.
- [109] A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Gao, A. Eychmüller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*(16), 3065–3069.
- [110] D. J. Norris, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. B* **1996**, *53*(24), 16338–16346.
- [111] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 551–553.
- [112] C. A. Leatherdale, W.-K. Woo, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*(31), 7619–7622.
- [113] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag, New York, **2006**, S. 11.
- [114] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*(9), 763–775.
- [115] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2005**, *4*(6), 435–446.

- [116] D. V. Talapin, I. Mekis, S. Go, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J Phys. Chem. B* **2004**, *108*(49), 18826–18831.
- [117] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*(1), 11–18.
- [118] C. Wutz, <https://www.chemie.uni-hamburg.de/tmc/wutz/>, *NMR-Untersuchungen an Polymeren* **2004**, Data Accessed 2015–11–20.
- [119] W. Bauer, <http://www.chemie.uni-erlangen.de/bauer/nmrsolvprop.html>, *Eigenschaften der wichtigsten NMR-Lösungsmittel* **2010**, Data Accessed 2015–11–20.
- [120] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*(3), 7512–7515.
- [121] Q. Dai, C. Walkey, W. C. W. Chan, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*(20), 5093–5096.
- [122] K. Welsher, S. A. McManus, C. H. Hsia, S. Yin, H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*(2), 580–583.
- [123] J. C. M. Carmen Avendano, „DNA Alkylation Agents“ in *Med. Chem. Anticancer Drugs*, 2. Aufl., Elsevier Science Ltd, Amsterdam, **2015**, Kapitel 5, S. 221–225.
- [124] G. F. Weber, „Molecular Therapies of Cancer“ in *Mol. Ther. Cancer*, 1. Aufl., Springer International Publishing Switzerland, Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, **2015**, S. 26.
- [125] Y. Leshch, A. Jacobsen, J. Thimm, J. Thiem, *Org. Lett.* **2013**, *15*(19), 4948–4951.
- [126] J. Sauer, R. Huisgen, H. Sturm, *Tetrahedron* **1960**, *11*(4), 241–251.
- [127] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. Van Maarseveen, *European J. Org. Chem.* **2006**, *2006*(1), 51–68.
- [128] H. Heitzmann, F. M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*(9), 3537–3541.
- [129] *Technical data sheet 779: The Benefits of Neutravidin over Streptavidin and Avidin*, Polyscience, Inc., Eppelheim, **2008**, S. 1.
- [130] F. Lottspeich, *Bioanalytik*, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, München, **2006**, S. 236–268.
- [131] A. Jacobsen, *Selektive Funktionalisierung von Ketoheptosen zur medizinischen Anwendung sowie Neue Methoden zur Darstellung von Glucuronsäure*, Dissertation, Hamburg, **2016**, S. 45–53.

- [132] J. J. Goldstein, R. D. Poretz, *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, Orlando, **1986**.

# Anhang A. HPLC DNA Analytik mit Urea Puffer

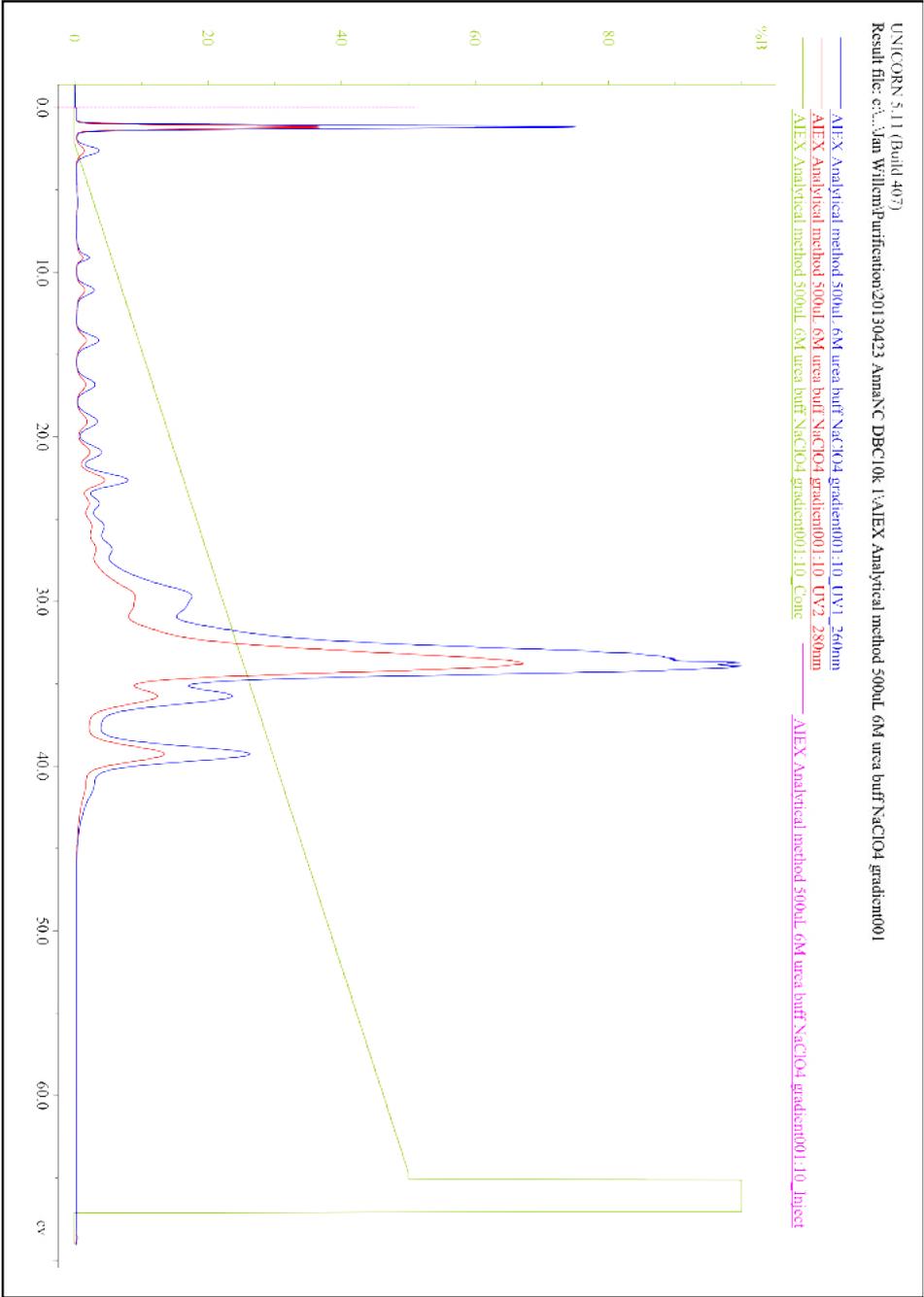
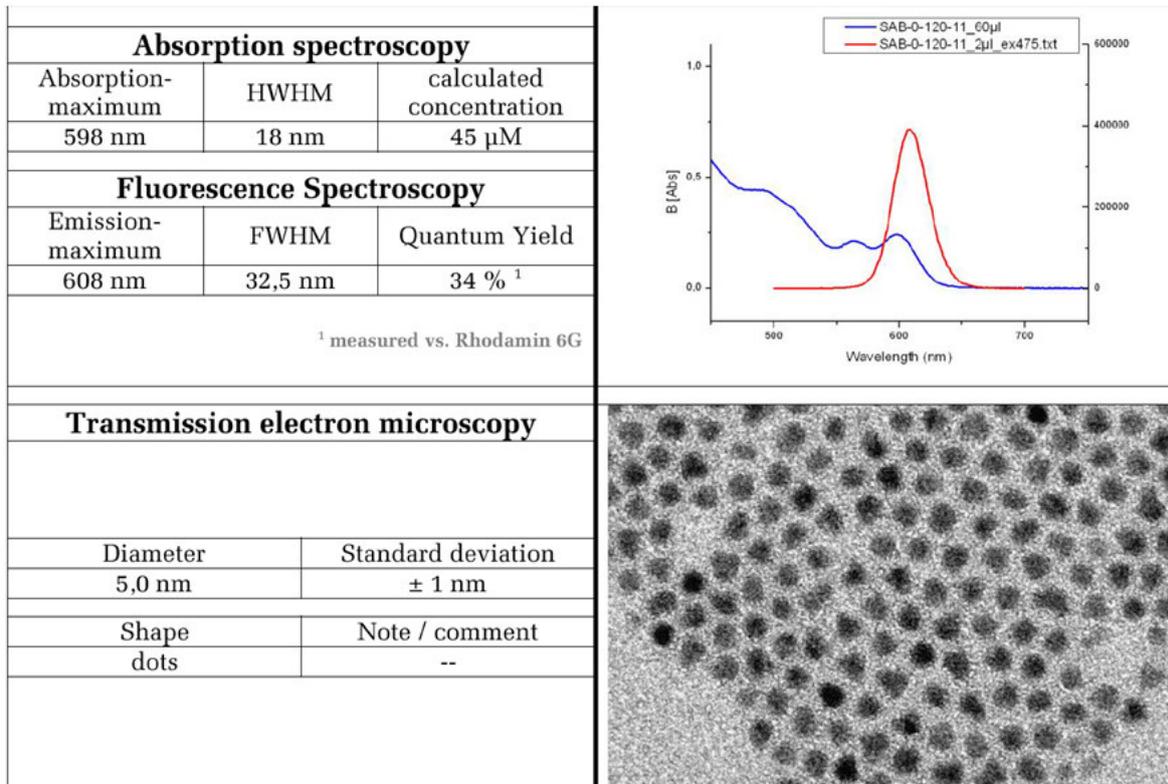


Abbildung 59: Puffer A: 6 M UREA 25 mM TRIS-Puffer B: mit 1 M NaCl

## Anhang B. Datenblätter



## Anhang C. Dot Blot

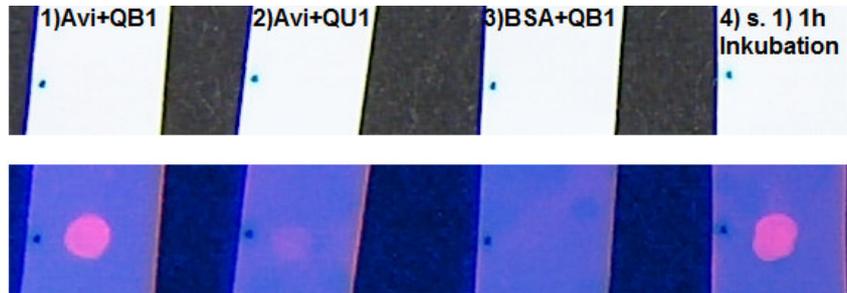


Abbildung 60: Dot Blots bei Tageslicht (oben) und unter UV-Bestrahlung (unten). Dabei zeigen die Blots: 1): Avidin geblottet und mit QD-Biotin inkubiert eine Bindung, die beiden Kontrollen 2): Avidin geblottet und mit QD-OH inkubiert [leichte unspezifische Bindung] und 3): BSA geblottet und mit QD-Biotin inkubiert keine Bindung. 4): wurde wie 1) präpariert, aber länger inkubiert ( 1 h).

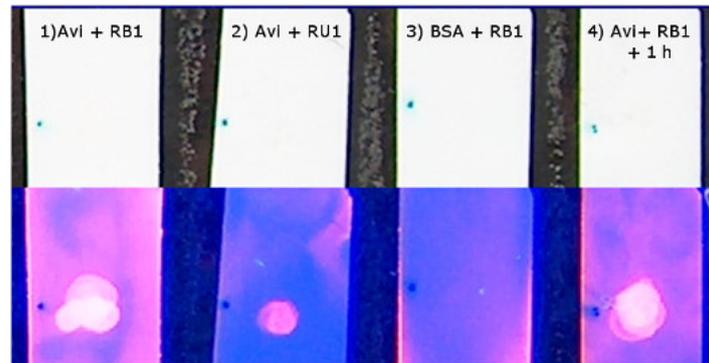


Abbildung 61: Dot Blots bei Tageslicht (oben) und unter UV-Bestrahlung (unten). Dabei zeigen die Blots: 1): Avidin geblottet und mit QDQR-Biotin inkubiert eine Bindung, die beiden Kontrollen 2): Avidin geblottet und mit QDQR-OH inkubiert [leichte unspezifische Bindung] und 3): BSA geblottet und mit QDQR-Biotin inkubiert keine Bindung. 4): wurde wie 1) präpariert, aber länger inkubiert (1 h).

## Anhang D. Agarosegele

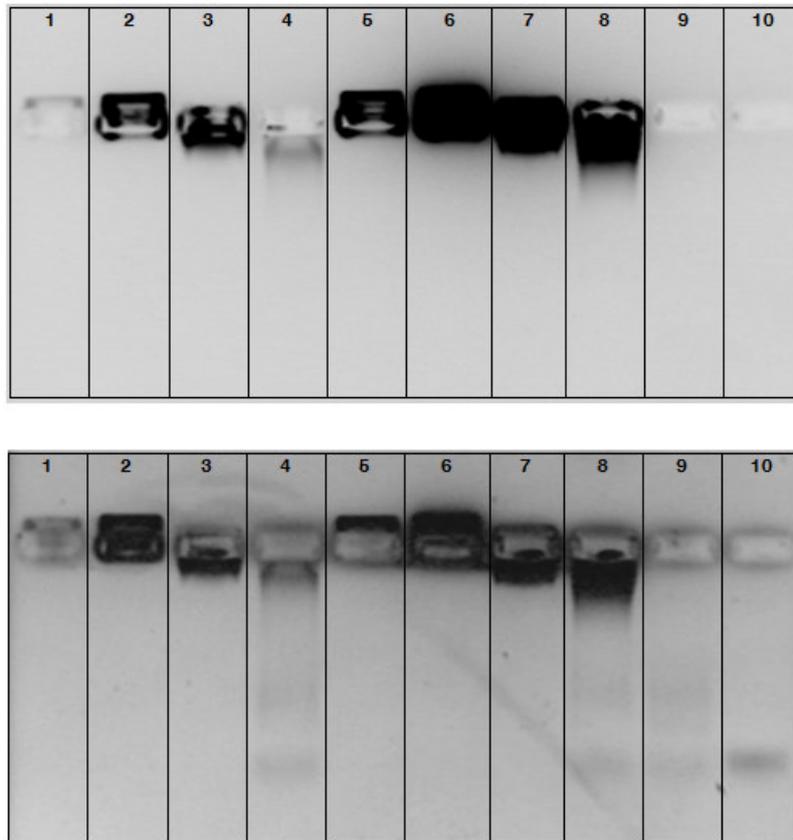


Abbildung 62: 1% Agarosegel, 120 V, 20 Min., **1**: QU1, **2**: QB1, **3**: 4QB1, **4**: 4QB1 + Aptamer-Biotin, **5**: RU1, **6**: RB1, **7**: 4RB1, **8**: 4RB1 + Aptamer-Biotin, **9**: Aptamer-Biotin + NAvi, **10**: Aptamer-Biotin. (**oben**): ohne EtBr, (**unten**) mit EtBr-Einfärbung.

# Anhang E. GHS



- H200-Reihe: Physikalische Gefahren

H200	Instabil, explosiv
H201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
H202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220	Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder Verletzungen verursachen.

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

- H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.

H301 Giftig bei Verschlucken.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.

H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.

H311 Giftig bei Hautkontakt.

H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H318 Verursacht schwere Augenschäden.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H331 Giftig bei Einatmen.

H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335 Kann die Atemwege reizen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Fd	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Df	Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H361fd	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H370	Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H371	Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H372	Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

- H400-Reihe: Umweltgefahren

H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.  
H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.  
H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  
H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  
H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.

- EUH-Sätze: nur in Europa zu nennen

EUH001 In trockenem Zustand explosiv.  
EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.  
EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige / entzündbare Dampf /Luft-Gemische bilden.  
EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.  
EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.  
EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.  
EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.  
EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.  
EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.  
EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.  
EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.  
EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.  
EUH201 Achtung! Enthält Blei.  
EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.  
EUH203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.  
EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.  
EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH206	Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
EUH207	Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
EUH208	Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH209	Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
EUH209A	Kann bei Verwendung entzündbar werden.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
EUH401	Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

- P100-Reihe: Allgemein

P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

- P200-Reihe: Vorsorgemaßnahmen

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P211	Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220	Von Kleidung brennbaren Materialien fernhalten / entfernt aufbewahren.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen unbedingt verhindern.
P222	Kontakt mit Luft nicht zulassen.
P223	Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
P230	Feucht halten mit ...
P231	Unter inertem Gas handhaben.
P232	Vor Feuchtigkeit schützen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.

P234	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
P235	Kühl halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P241	Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.
P242	Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P244	Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
P250	Nicht schleifen / stoßen /... reiben.
P251	Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P263	Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283	Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
P284	Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231+P232	Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235+P410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

- P300-Reihe: Empfehlungen

P301	Bei Verschlucken:
P302	Bei Berührung mit der Haut:
P303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

P304	Bei Einatmen:
P305	Bei Kontakt mit den Augen:
P306	Bei kontaminierter Kleidung:
P307	Bei Exposition:
P308	Bei Exposition oder falls betroffen:
P309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P311	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P315	Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P320	Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P321	Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P322	Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P330	Mund ausspülen.
P331	Kein Erbrechen herbeiführen.
P332	Bei Hautreizung:
P333	Bei Hautreizung oder -ausschlag:
P334	In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
P335	Lose Partikel von der Haut abbürsten.
P336	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
P337	Bei anhaltender Augenreizung:
P338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P350	Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

P352	Mit viel Wasser und Seife waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
P360	Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P370	Bei Brand:
P371	Bei Großbrand und großen Mengen:
P372	Explosionsgefahr bei Brand.
P373	Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
P374	Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
P375	Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P376	Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P377	Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
P378	zum Löschen verwenden.
P380	Umgebung räumen.
P381	Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
P390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P301+P310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+P312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+P330+P331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302+P334	Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
P302+P350	Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P302+P352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen
P303+P361	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen

P353+P304+P340	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhig stellen, die das Atmen erleichtert
P304+P341	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305+P351+P338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
P306+P360	Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P307+P311	Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309 +P311	Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P332+P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder - ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P335+P334	Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen /nassen Verband anlegen.
P334+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+P311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P370+P376	Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P370+P378	Bei Brand: zum Löschen verwenden.
P370+P380	Bei Brand: Umgebung räumen
P370+P380+P375	Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen
P371+P380+P375	Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

- P400-Reihe: Lagerhinweise

P401	... aufbewahren.
P402	An einem trockenen Ort aufbewahren.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P404	In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P406	In korrosionsbeständigem /... Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
P407	Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.
P410	Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P411	Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ... aufbewahren.
P412	Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P413	Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren
P420	Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
P422	Inhalt in / unter ... aufbewahren.
P402+P404	In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
P403+P233	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403+P235	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410+P403	Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410+P412	Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P411+P235	Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

## Anhang F. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Horst Weller für seine großartige Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Herrn Prof. Dr. Alf Mews danke ich für die Übernahme des Zweitgutachten, sowie Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Moritz und Herrn Dr. Thomas Hackl als Mitglieder der Prüfungskommission.

Ein großer Dank geht an meine Kooperationspartner: Die Gruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann aus Groningen, besonders Herrn Dr. Jan Willem de Vries. Für die biochemischen und *in vivo* Studien am UKE - Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, Herrn Prof. Dr. Tobias Lange und ihren Mitarbeitern. Für die Unterstützung bei der Bildgebung am HPI Herrn Dr. Rudolph Reimer und Herrn Dr. Dennis Eggert. Der Can GmbH und allen Mitarbeitern der Bioabteilung. Aus dem Institut der Biochemie danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn und seinen Mitarbeitern, sowie Frau Prof. Dr. Andrea Rentmeister. Aus der Organischen Chemie möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem und seinen Mitarbeitern Frau Dr. Anna Jacobsen und Herrn Dr. Yevgeniy Leshch bedanken, sowie Herrn Dr. Thomas Hackl für die Unterstützung zu Fragen der NMR-Spektroskopie. Vielen Dank an Herrn Dr. Sebastian Meinke für die Hilfestellung und Beratung bei den SPR-Messungen. Für die Unterstützung bei der Konfokal-Mikroskopie danke ich Herrn Dr. Christian Strelow und Frau Dr. Andrea Pietsch.

Für ihre stetige Hilfe in allen Lebenslagen danke ich den Sekretärinnen der Physikalischen Chemie Frau Kreutzer, Frau Krasa und Frau Zeckert.

Ich danke allen Spitzenforschern: Christian, Hauke, Johannes, Artur, Robin, JP, Chris und Flo. Viel Glück und Erfolg wünsche ich den neuen Spitzenforschern: Lasse, Rieke, Agnes, Daniel und Marcus.

Vielen Dank für eine echt tolle Zeit an den gesamten AK Weller für tägliche Kickerrunden, Feste, Kaffeerunden, Grillabende, Mittagessen (So Na Mu), Ausflüge in den Wildpark, Kartfahren, Whiskey-Tasting und Ostseefahrten.

Besonderen Dank an Natalia, Lisa, Svenjo, Tov, Hebert, Rorik, Hamster, Jerrybert, Friederike, der Becker, Niehaus, Alexey, Hauke, Daniel, Maikbert, Carsten, Gregbert, Tobias, Andreas K., Kathrin, Tobias V. und den Grill- und Hobelverein „Freunde des Aals“ ;)

Meinen unzähligen Büronachbarn und besonders Michaela danke ich für die vielen Gespräche und die entstandene Freundschaft. Vielen Dank an Rieke und Michael, dass ich noch solange im Büro bleiben durfte.

Für eine tolle Zusammenarbeit danke ich meinen Praktikanten: Benjamin Noster, Marcel Fassbinder, Konrad Siggelkow, Andrey Krutilin, Jenny Spöttel, Sebastian Ehrlich und Bernhard Biermann.

Einen ganz lieben Dank an Marcel, Christian, Johannes, Jan-Philip, Anna, Svenja, Mazlum, Hendrik und Lisa für das sehr fleißige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke allen meinen Freunden für ihre Unterstützung und Mut machen, besonders Anna, Olli, Mazlum, Christin, Eliah, Salma, Svenja, Hendrik und Noah. Ebenso danke ich meiner Familie für ihr Verständnis und die Unterstützung: Joschka, Lisa, Viktor, Sophia, Julia, Sönke, Mama, Papa und Ella.

## Lebenslauf

Anna-Marlena Kreuziger, geboren in Hamburg 14.07.1986

### Werdegang

- 02/2012-07/2016 Promotion in der Physikalischen Chemie - Universität Hamburg  
12/2011-07/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin - Universität Hamburg  
11/2009-11/2011 Master of Science in Chemie – Universität Hamburg  
09/2010-12/2010 Auslandsaufenthalt School of Chemistry, Bangor (Wales, UK)  
10/2006-11/2009 Bachelor of Science in Chemie – Universität Hamburg  
08/1997-06/2006 Abitur in Hamburg - Gymnasium Grootmoor

### Publikationen

- *Conference Paper*: C. Schmidtke, J. Ostermann, H. Tran, E. Pöselt, H. Kloust, J. Niehaus, S. Becker, **A.-M. Kreuziger**, K. Werner, A. Pietsch, H. Weller, *Encapsulation of nanoparticles with multifunctional, cross-linkable diblock copolymers for biomedicine*. **2012**, Nanotech, *3*, 36-39.
- *Artikel*: C. Schmidtke, **A.-M. Kreuziger**, D. Alpers, A. Jacobsen, Y. Leshch, R. Eggers, H. Kloust, H. Tran, J. Ostermann, T. Schotten, J. Thiem, J. Thimm, H. Weller, *Glycoconjugated amphiphilic polymers via click-chemistry for the encapsulation of quantum dots*. Langmuir, **2013**, *29* (40), 12593–12600.
- *Conference Paper*: J.-P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, **A.-M. Kreuziger**, S. Flessau, H. Mattoussi, H. Weller, *Shielding of quantum dots using diblock copolymers: implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots*. SPIE BiOS, **2014**, 89551X.
- *Conference Paper*: J.-P. Merkl, C. Schmidtke, M. Safi, M. Muroski, D. Alpers, H. Tran, J. Ostermann, **A.-M. Kreuziger**, S. Ehrich, G. Strouse, G. Wolter-Eisfeld, H. Mattoussi, H. Weller, *Cellular uptake behavior of glycoconjugated and micellar-encapsulated quantum dots on HeLa cervical cancer cells*. TechConnect Briefs, **2015**.

### Vorträge

- *Small affinity molecules for large recognitions*. Bunsentagung Karlsruhe, **2013**.
- *Glycoconjugated amphiphilic polymers for the encapsulation of nanoparticles*. READi Workshop-DESY Hamburg, **2014**.
- *Glycoconjugated amphiphilic polymers for the encapsulation of nanoparticles*. 13<sup>th</sup> Bratislava Symposium on Saccharides, **2014**.

## Anhang G. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ferner versichere ich, dass diese Arbeit zu keinem früheren Promotionsversuch an dieser oder einer anderen Hochschule vorgelegt wurde.

Anna-Marlena Kreuziger

Hamburg 25.07.2016