

Selbstorganisierende Cellulosemonoschichten auf
Goldoberflächen zur Immobilisierung von Enzymen
und zum Aufbau von polymerunterstützten
Lipidmembranen

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Diplom-Chemikerin
Katrin Ohliger

Saarbrücken
2009

Dekan: Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wenz
Prof. Dr. R. Bernhardt

Tag des Kolloquiums: 13. Februar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis März 2008 am Institut für Organische Makromolekulare Chemie der Universität des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Wenz angefertigt.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung von Monoschichten funktionalisierter Cellulose-Derivate auf Goldoberflächen zum Aufbau von Enzymsensoren bzw. oberflächenverankerten Lipid-Modellmembranen.

Die wasserlöslichen Carboxymethylcellulose-Derivate besitzen neben Thiosulfat-Gruppen für die Anbindung an Goldoberflächen zusätzlich reaktive Gruppen (MCT-, EDC- sowie OSu-Gruppen) für die Anbindung von Biomolekülen. Der Aufbau der Monoschichten aus den verschiedenen Thio-CMC-Derivaten auf Gold wurde in situ mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) verfolgt.

Die Monoschichten der reaktiven HTSHP-CMC-EDC konnten zur kovalenten Immobilisierung von Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) an Goldoberflächen eingesetzt werden. Die immobilisierte HRP wurde bezüglich ihrer Aktivität untersucht und die Ergebnisse mittels Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet. Ein Vergleich der erhaltenen Werte mit der K_M -Konstante des freien Enzyms in Lösung zeigte einen geringen bzw. keinen Verlust der Enzymaktivität durch Immobilisierung. Die Wechselzahl der immobilisierten HRP war in allen Messungen stark herabgesetzt.

Erstmals wurde der Aufbau einer Modellmembran auf einer mit HTSHP-CMC-EDC beschichteten Goldoberfläche beschrieben.

Der Aufbau erfolgte nach hydrophober Modifizierung der reaktiven Thio-CMC-Oberfläche durch 2,3-Didodecyloxy-propylamin. Zur Ausbildung der Lipiddoppelschicht wurden verschiedene lipidhaltige Vesikel auf der modifizierten Thio-CMC-Monoschicht gespreitet. Der Architekturaufbau konnte mittels SPR-Spektroskopie in situ verfolgt werden.

Abstract

The presented thesis discusses the application of self-assembled monolayers (SAM) of functionalized water soluble cellulose derivatives on gold surfaces for the assembly of enzyme sensors and tethered bilayer lipid membranes.

The water soluble carboxymethylcellulose derivatives possess thiosulfate-anchor groups for binding on gold surfaces and additionally reactive groups (MCT, EDC and Osu groups) for binding biomolecules. The self-assembling of all Thio-CMC monolayers on gold surfaces were monitored in situ by surface plasmon resonance spectroscopy (SPR).

The SAMs of the water soluble reactive HTSHP-CMC-EDC could be used for the covalent reagent free immobilization of horse radish peroxidase (HRP) on gold surfaces. The activity of immobilized HRP was assayed and the results were interpreted using Michaelis Menten kinetics. The determined values compared with the K_M of the free solubilized enzyme ($K_M = 0.75 \text{ mM}$) showed a small and/or no loss of activity of the HRP due to immobilization.

The turnover number k_{kat} of the immobilized enzyme was reduced distinctly in all measurements.

For the first time the formation of a bilayer lipid membran on a gold surface coated with a HTSHP-CMC-EDC monolayer was discussed.. The assembly of the membrane took place after hydrophobic modification of the reactive Thio CMC surface by 2,3-Didodecyloxypropylamin. For the formation of the tBLM, different vesicles were fused on the Thio CMC monolayer. The formation was monitored in situ using SPR.

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azido-diammonium-3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonat
AcB	Acetat-Puffer
AFM	Kraftmikroskopie
AGE	Allylglycidylether
AHP	Allylhydroxypropyl-
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
BOC	Di-tert-butyl-dicarbonat
CBS	Carbonatpuffer
CMC	Carboxymethylcellulose
CV	Cyclovoltammetrie
CVD	chemical vapor deposition
d	Schichtdicke
d	Duplett
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCT	2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPC	1,2-Dielaidoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DP	Polymerisationsgrad
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphatidylcholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-thioethanol
DS	Substitutionsgrad
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DTSP	Dithiobis- <i>N</i> -succinimidyl-propionat
ε	Extinktionskoeffizient
EA	Elementaranalyse

EIS	Elektrochemische-Impedanzspektroskopie
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid
F	Funktionalität
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GlcP	D-Glucopyranose
GOD	Glucose-Oxidase
HRP	horse radish peroxidase
His	Histidin
LB	Langmuir-Blodgett
LUV	large unilamellare vesicles
M _w	Molmasse
mbar	millibar
MHz	Megahertz
m	Multipllett
MLV	multilamellare vesicles
MVV	multi vesiculare vesicles
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear magnetic resonance
PSP	Plasmon Surface Polaritons
PB	phosphate buffer
ppm	parts per million
PEG	Polyethylenglycol
POPC	1-Palmitoy-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
QCM	Quarzmicrowaagetchnik
RIFS	Reflektometrische-Interferenzspektroskopie
s	Singulett
SAM	self-assembled monolayer
Ser	Serin
SUV	small unilamellare vesicles
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
tBLM	oberflächenverankerte Lipidmembran

TCEP	Tris-(carboxyethyl)-phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TMB	3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin
TEM	Transmission Electron Microscopy
TOF-SIMS	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektroskopie
T _m	Hauptphasenübergangstemperatur
UV	Ultraviolett
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cellulose.....	1
1.2 Celluloseether: Carboxymethylcellulose.....	4
1.3 Regioselektive Einführung von Substituenten an die Cellulose.....	5
1.4 Ultradünne organische Schichten.....	7
1.5 Biomembranen.....	11
1.6 Lipide.....	12
1.7 Biomimetische Lipidmembransysteme.....	14
1.7.1 Monomolekulare Lipidfilme.....	15
1.7.2 Lipide Vesikel.....	15
1.7.3 Schwarze Lipidmembranen.....	16
1.7.4 Festkörperunterstützte Modellmembranen (sBLMs).....	16
1.7.5 Oberflächenverankerte Modellmembranen (tBLMs).....	17
2. Zielsetzung	19
3. Synthese reaktiver thiofunktionalisierter Cellulosederivate	21
3.1 Einleitung.....	21
3.2 Synthese der 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose (HTSHP-CMC).....	24
3.2.1 Synthesekonzept.....	24
3.2.2 6-O-(3''-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose (AHP-Cellulose).....	26
3.2.3 6-O-(3''-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (AHP-CMC).....	28
3.2.4 6-O-(2''-Hydroxy-3''-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl- cellulose Natriumsalz (HBrPHP-CMC).....	34
3.2.5 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl- cellulose Natriumsalz (HTSHP-CMC).....	36
3.3 Synthese reaktiver Thio-Cellulosederivaten.....	37
3.3.1 Synthesekonzept.....	37

3.3.2	6- <i>O</i> -(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -hydroxysuccinimidyl)-cellulose Natriumsalz (HTSHP-CMC-Osu Na).....	39
3.3.3	6- <i>O</i> -(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl- <i>O</i> -2-(<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kaliumsalz (HTSHP-CMC-EDC K).....	41
3.3.4	Monochlor-triazinyl-6- <i>O</i> -(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (MCT-HTSHP-CMC Na).....	43
3.4	Zusammenfassung.....	45
4.	Aufbau von selbst-organisierenden Monoschichten aus reaktiven Cellulosederivaten auf Goldoberflächen.....	47
4.1	Einleitung.....	47
4.2	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR).....	50
4.3	Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der reaktiven Thio-Carboxymethylcellulosederivaten.....	54
4.4	Zusammenfassung.....	60
5.	Aktivität von Enzymen immobilisiert an reaktiven Cellulosemonoschichten.....	61
5.1	Einleitung.....	61
5.2	Meerrettichperoxidase.....	64
5.3	Aktivität von immobilisierter Meerrettichperoxidase an reaktiven Cellulosemonoschichten auf Gold.....	67
5.3.1	Aufbau des Enzymschichtsystems.....	67
5.3.2	Bestimmung der Enzymaktivität.....	71
5.3.2.1	Michaelis-Menten Kinetik.....	71
5.3.2.2	Enzymaktivität in Lösung.....	73
5.3.2.3	Enzymaktivität nach Immobilisierung.....	74
5.4	Zusammenfassung.....	77
6.	Oberflächenverankerte Modellmembranen (tBLMs).....	79
6.1	Einleitung.....	79
6.2	Vesikel.....	81
6.2.1	Grundlagen.....	81

6.2.2	Präparation von Vesikeln.....	84
6.2.2.1	Lipide für den Aufbau des beschriebenen Membranmodells.....	85
6.2.3	Spreiten von Vesikeln.....	86
6.3	Synthese von 2,3-Didodecyloxypropylamin.....	87
6.3.1	Synthesekonzept.....	87
6.3.2	<i>N</i> -(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid.....	89
6.3.3	<i>N</i> -(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid.....	90
6.3.4	<i>N</i> -(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid.....	91
6.3.5	2,3-Didodecyloxypropylamin.....	92
6.3.6	<i>N</i> -tert-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-carbammat.....	93
6.3.7	<i>N</i> -tert-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbammat.....	94
6.3.8	2,3-Didodecyloxypropylamin Hydrochlorid.....	95
6.3.9	Zusammenfassung.....	96
6.4	Membranaufbau auf reaktiven Thio-CMC-Monoschichten auf Gold.....	97
6.4.1	Unspezifische Bindung von DMPC an eine reaktive HTSHP-CMC-EDC-Monoschicht.....	97
6.4.2	Aufbau der Lipidmembran auf einer hydrophob modifizierten HTSHP-CMC-EDC-Monoschicht.....	99
6.4.3	Diskussion und Ausblick.....	105
6.5	Zusammenfassung.....	106
7.	Experimenteller Teil.....	108
7.1	Chemikalien.....	108
7.2	Methoden und Geräte.....	108
7.3	Präparativer Teil.....	113
7.3.1	Synthesen der Carboxymethylcellulosederivaten.....	113
7.3.2	Synthesen der reaktiven Thio-Carboxymethylcellulosederivaten.....	120
7.3.3	Synthese des Lipidanalogen.....	124
8.	Literaturverzeichnis.....	131

1. Einleitung

1.1 Cellulose

Cellulose, einer der wichtigsten Naturstoffe überhaupt, ist das weltweit am reichlichsten vorhandene organische Polymer und macht über $1.5 \cdot 10^{12}$ t der gesamten jährlichen Biomasseproduktion aus.^[1] Sie ist einer der ältesten und bis heute einer der wichtigsten erneuerbaren und biologisch abbaubaren Rohstoffe der chemischen Industrie. Mehrere hundert Milliarden Tonnen Cellulose werden im Jahr auf natürlichem Wege durch Photosynthese erzeugt.^[2] Damit gilt sie als nahezu unerschöpfliche Rohstoffquelle für die Herstellung von umweltfreundlichen und biokompatiblen Produkten.^[3]

In Pflanzenfasern wie Baumwolle, Jute, Hanf und Flachs ist die Cellulose nahezu in reiner Form enthalten. Cellulose ist der Hauptbestandteil der Zellwand von holzigen Pflanzen (Pflanzenstängel, Blätter etc.). Dort bildet sie einen natürlichen Verbund mit weiteren Gerüstsubstanzen wie Lignin und anderen Polysacchariden (Hemicellulosen)^[4], aus dem sie großtechnisch durch chemische Aufschlussverfahren isoliert wird. Dabei wird die reine Cellulose in fester Form mit einem Polymerisationsgrad von über 12000 erhalten.

Neben Pflanzen produzieren auch bestimmte Algen, Pilze und Bakterien (*Acetobacter xylinum*, *Acanthamoeba castellanii*) Cellulose, die jedoch ausschließlich von wissenschaftlichem Interesse ist.^[5,6] Aufgrund ihrer speziellen supramolekularen Strukturen werden diese Celluloseformen häufig als Modellsubstanzen für weitere Forschungen zur Struktur, Kristallinität und Reaktivität der Cellulose sowie für die Entwicklung von neuen Materialien und Biomaterialien eingesetzt.^[7]

Die Faszination des Biopolymers Cellulose beruht auf ihrer einzigartigen Struktur in Kombination mit charakteristischen Eigenschaften wie Hydrophilie, Polyfunktionalität, Biokompatibilität und Chiralität. Cellulose liegt als polydisperses, lineares und stereoreguläres Homopolymer vor, welches aus regio- und enantioselektiv β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut ist (Abb. 1.1). Jede dieser Einheiten enthält drei reaktive Hydroxylgruppen am C-2-, C-3- und C-6-Kohlenstoffatom. Durch Röntgendiffraktometrie und NMR-Messungen konnte für das Polysaccharid die thermisch bevorzugte 4C_1 -Sesselkonformation nachgewiesen werden, wonach sich die freien

Hydroxylgruppen sowie die glykosidischen Bindungen in der Ringebene (äquatoriale Position) befinden, während die zugehörigen Wasserstoffatome axial dazu positioniert sind.

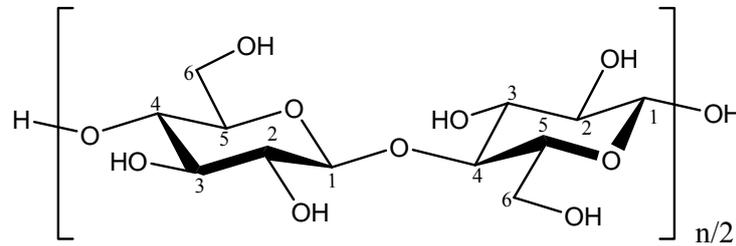


Abb. 1.1: Molekülstruktur von Cellulose

Cellulose besitzt aufgrund starker inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen eine äußerst komplexe, supramolekulare Struktur (Abb. 1.2), deren definierte hierarchische Ordnung und Organisation verschiedene Typen von semikristallinen Faserstrukturen und Morphologien ausbildet.^[8] Signifikant ist die Ausbildung von Mikrofibrillen, deren Dicke je nach Herkunft 2-10 nm beträgt.^[9,10] Darin liegen die Makromoleküle über lange Strecken ungefaltet vor und können zudem parallel oder antiparallel gepackt sein.^[11]

Native Cellulose (Cellulose I) bietet zwei verschiedene kristalline Modifikationen: Cellulose I_α und Cellulose I_β , die nebeneinander vorliegen. Elektronenbeugungsexperimente zeigten kürzlich, dass die korrespondierenden Kristallstrukturen aus triklinen (I_α) und monoklinen (I_β) Elementarzellen aufgebaut sind.^[12] Das Verhältnis von I_α zu I_β ist abhängig von der Herkunft der Cellulose.^[13] In der Regel macht jedoch die I_α -Modifikation mit einer parallelen Anordnung der Celluloseketten den größten Anteil der Struktur aus.^[12,14]

Daneben kann Cellulose noch in weiteren Kristallstrukturen auftreten. Von sehr großer technischer Relevanz ist dabei die Regeneratcellulose (Cellulose II), die aus nativer Cellulose durch Behandlung mit wässriger NaOH und nachfolgender Fällung/Regeneration erhalten wird. Im Gegensatz zur nativen Cellulose besitzt die regenerierte Cellulose ausschließlich eine monokline Kristallstruktur.^[15] Die Elementarzelle enthält zwei antiparallele Polymerketten, die beim Verspinnen der Celluloselösungen ausgerichtet werden. Dadurch entstehen die hochfesten, stabilen Celluloseregeneratfasern.

Sowohl die Kristallinität als auch das ausgedehnte Netzwerk aus geordneten Wasserstoffbrückenbindungen nehmen starken Einfluss auf das gesamte chemische Verhalten der Cellulose.^[16] In erster Linie lässt sich damit die schlechte Löslichkeit der Cellulose in wässrigen sowie in vielen bekannten organischen Lösungsmitteln erklären.

Trotz dieser schlechten Voraussetzungen können mit Cellulose auch Umsetzungen unter homogenen Bedingungen durchgeführt werden. Durch eine entsprechende Vorbehandlung der Cellulose lassen sich die supramolekularen und morphologischen Einflüsse unterbinden. Werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen und innerhalb der Polymerketten aufgebrochen, geht die geordnete Überstruktur verloren. Die Reaktivität der damit freigelegten Hydroxylgruppen erlaubt die für „normale“ primäre und sekundäre Alkohole typischen Umsetzungen. Durch Aktivierung des Polymers mittels Mercerisierung (Behandlung mit wässriger Natronlauge)^[4,17], durch Einwirkung energiereicher Strahlung^[18], oder durch Behandlung mit flüssigem oder gasförmigen Ammoniak^[18-22] kann die supramolekulare Struktur der Cellulose unter heterogenen Bedingungen so stark aufgeweitet werden, dass eine Umsetzung ermöglicht wird. Die Reaktionsfähigkeit der aktivierten Cellulose ist dabei stark abhängig von der Celluloseprobe, der Basenkonzentration und der Quellungsdauer.^[23-25]

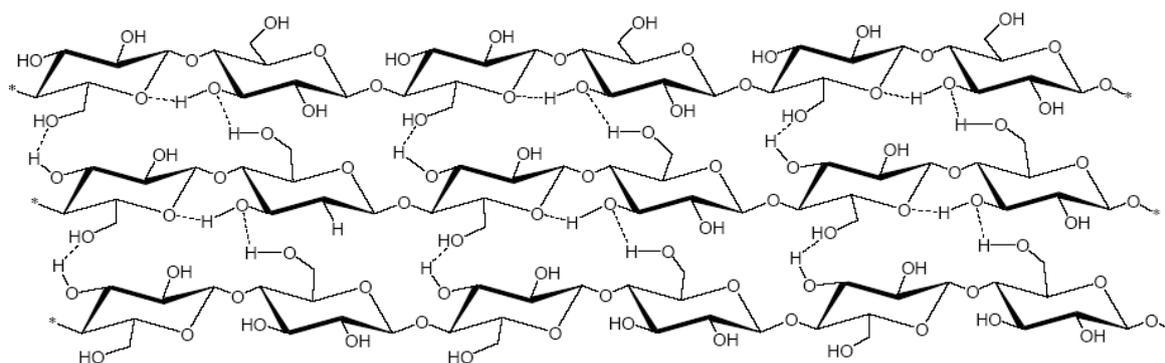


Abb.1.2: Überstruktur der Cellulose durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken

In homogener Lösung kann das Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen durch Einsatz spezifischer Lösungsmittel für Cellulose aufgebrochen werden. Beim Gebrauch von konzentrierten Säuren (Trifluoressigsäure^[26]) oder starken wässrigen Basen (z. B. 10%-ige Natriumhydroxidlösung) kommt es zur Bildung von instabilen Addukten, die in nachfolgenden Reaktionen umgesetzt werden.

Im Gegensatz dazu lösen nicht-derivatisierende Lösungsmittel die Cellulose ausschließlich durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Polymer und Solvens. Dabei unterscheidet man zwischen organischen Lösungsmitteln und metallhaltigen Lösungsmittelkomplexen. Eine Lösung von LiCl in *N,N*-Dimethylacetamid ist beispielsweise eines der wichtigsten Lösungsmittelsysteme für Cellulose in organischen Synthesen^[27], sowie für analytische Zwecke.^[28] Lösungsmittelkomplexe wie Cuam (Kupferoxid-Ammoniak) oder

Cuen (Kupfer-Ethylendiamin) ermöglichen den Lösungsvorgang durch Koordination ihrer Metallkationen an die Hydroxylgruppen.

Tabelle 1.1: Überblick über die spezifischen Lösungsmittelsysteme bzw. –komplexe für Cellulose

		Lösungsmittelsystem
derivatisierend		Xanthogenat ^[29] Trifluoressigsäure Ameisensäure/z. B. SnCl ₂ Trimethylsilylchlorid/Pyridin ^[30]
nicht-derivatisierend:	organisch	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -Oxid ^[31-34] DMAc/LiCl ^[13,19,35-37] DMSO/TBAF ^[38,39] Ionische Flüssigkeiten, Imidazolium-Salze ^[40,41,42]
	Metallkomplexe	Cuam [Cu(NH ₃) ₄](OH) ₂ ^[20] Cuen [Cu(NH ₂ -(CH ₂)-NH ₂) ₂](OH) ₂ ^[43,44] Nioxam [Ni(NH ₃) ₆](OH) ₂ ^[45]

1.2 Celluloseether: Carboxymethylcellulose

Cellulose wurde als Ausgangsmaterial für chemische Modifizierungen eingesetzt, lange bevor ihre polymere Struktur erkannt und verstanden wurde. Wichtige technische Derivate sind vor allem die organischen und anorganischen Celluloseester und –ether.^[46]

Durch Überführung der Cellulose in Ether-Derivate wird ihre Wasserlöslichkeit enorm verbessert.^[47]

Der bis heute wichtigste wasserlösliche Celluloseether ist die Carboxymethylcellulose, CMC. Sie wird großtechnisch in einem sog. Slurry-Prozess hergestellt. Dabei wird die Cellulose unter heterogenen Bedingungen in einem Gemisch aus Ethanol/Isopropanol und wässriger Natronlauge mit Monochloressigsäure bzw. deren Natriumsalz umgesetzt. Man erhält

Carboxymethylcellulosen mit Substitutionsgraden an Carboxymethylgruppen von $DS_{CM} = 0.4-1.2$.^[17,48]

Technische CMC enthält sehr viele Neben- bzw. Abbauprodukte wie beispielsweise Natriumglykolat oder Kohlenhydratverbindungen und kommt daher nur als 50-70%-ige Ware in den Handel. Wasser, welches für den Aufschluss des Zellstoffes benötigt wird, führt häufig zu Hydrolysereaktionen, wodurch die Ausbeute an gewünschtem Produkt stark verringert wird. Rein-CMC erhält man durch Extraktion der Nebenprodukte mit Wasser/Alkohol-Gemischen. Die physikalischen Eigenschaften der carboxymethylierten Cellulose (Viskosität, Wechselwirkung mit multivalenten Kationen oder Polykationen, die Bildung von supramolekularen Aggregaten) werden hauptsächlich durch den Polymerisationsgrad, der durchschnittlichen Zahl von Carboxymethylgruppen pro Anhydroglucose-Einheit bzw. entlang der Cellulosekette^[49] sowie dem Substitutionsgrad an freien Hydroxylgruppen bestimmt.

Die Carboxymethylcellulose (rein und auch technisch) bietet ein sehr breit gefächertes Anwendungsspektrum. Als Zusatz in Baumaterialien, Arzneimitteln, Nahrungsmitteln und Kosmetika bestimmt sie deren Eigenschaften. In den letzten Jahren hat sich die CMC aufgrund ihrer filmbildenden Eigenschaften auch als wichtige Ausgangsverbindung für die Synthese funktioneller CMC-Derivate erwiesen, welche sich als Beschichtungsmaterial für diverse Oberflächen eignen.^[50,51]

1.3 Regioselektive Einführung von Substituenten an die Cellulose

Die Reaktivität von Cellulose wird stark durch die laterale Ordnung und die fibrillare Architektur der Celluloseprobe kontrolliert. Sie ist abhängig vom Reaktionstyp, vom Reagenz sowie dem umgebenden Reaktionsmedium. Die meisten chemischen Eigenschaften der Cellulose basieren auf den primären und sekundären Hydroxylgruppen innerhalb der Anhydroglucoseeinheit sowie den glykosidischen Bindungen. Bei modifizierter Cellulose kommt noch die Verteilung der eingeführten funktionellen Gruppen sowie der verbleibenden Hydroxylgruppen innerhalb der Anhydroglucoseeinheiten und entlang der Polymerkette hinzu. Glykosidische Bindungen sind nicht leicht zu brechen, wodurch die Cellulose gegenüber vielen Reaktionsbedingungen, mit Ausnahme der sauren Hydrolyse und Alkoholyse^[4], recht stabil ist. Das Konzept der polymeranalogen Umsetzungen^[52] besagt, dass funktionelle Gruppen von Makromolekülen in gleicher Weise reagieren wie die

entsprechenden monomeren Verbindungen. Durch passende Wahl der Reaktionsbedingungen kann dabei ein Abbau des Polymerrückgrats vermieden werden. Demnach können Umsetzungen an der Cellulose analog zu denen an D-Glucose, ihrer Monomereinheit, durchgeführt werden, z. B. unter Spaltung von O-H-, C-O-, C-H oder C-C-Bindungen.

Regioselektive Umsetzungen der Cellulose können auf verschiedenen Wegen realisiert werden. Vor allem die selektive Einführung von Schutzgruppen bzw. die selektive Aktivierung der verschiedenen Hydroxylgruppen ermöglicht eine kontrollierte Funktionalisierung von Cellulose und deren Derivaten.

Die primären Hydroxylgruppen an C-6 des Glucoserings sollten gegenüber den sekundären OH-Gruppen an C-2 und C-3 sterisch begünstigt sein. Da jedoch gerade die primären OH-Gruppen sehr leicht Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, liegt bei nativer Cellulose eine erhöhte Reaktivität der sekundären OH-Gruppen vor. Durch Einführung sterisch anspruchsvoller Reagenzien ist dennoch eine regioselektive Umsetzung der Hydroxylgruppen am Kohlenstoffatom C-6 möglich. Infolgedessen wird diese Position für weitere Reaktionen geschützt und somit regioselektive Derivatisierungen an den Positionen C-2 und C-3 ermöglicht.^[53]

Tritylierung ist eine bekannte und häufig angewendete Methode zum Schutz der *O*-6-Position der D-Glucose-Einheit. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität und Regioselektivität werden vor allem 4-Methoxy-substituierte Tritylchloride als effektive Reagenzien in der Schutzgruppen-Technik eingesetzt.^[54-56] Durch Einführung von Triphenylmethyl (Trityl)-Gruppen erhält man Celluloseether, die sich sehr gut in *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N,N*-Dimethylacetamid (DMAc) sowie Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen und dabei eine hohe *O*-6-Selektivität aufweisen. Nach der selektiven Funktionalisierung der verbleibenden sekundären Hydroxylgruppen kann die Schutzgruppe leicht entfernt werden. Tritylierungsrate, also Reaktionsgeschwindigkeit und Regioselektivität bezüglich Position C-6, sowie Detritylierungsrate, steigen mit wachsender Zahl an Methoxysubstituenten.^[55-58] Unter heterogenen Reaktionsbedingungen kann ein Substitutionsgrad an Tritylgruppen von 0.81 bis 1.21 erreicht werden. Die Tritylierung an den primären Hydroxylgruppen läuft 13.8-mal schneller ab, als an den sekundären.^[21,59-62]

Die Umsetzung von Cellulose mit Trialkylchlorsilanen, wie beispielsweise Trimethylsilylchlorid in aprotischen Lösungsmitteln in Anwesenheit von Basen führt zu einer Umwandlung der Hydroxylgruppen in Silylethergruppen. Die Regioselektivität der Umsetzung, *O*-6 > *O*-2 > *O*-3, kann durch sterisch anspruchsvolle Alkyl-Reste wie ^tButyl- oder Thexyl-Gruppen gesteigert werden.^[55] Dabei kann die Thexyldimethylsilyl-Gruppe

sowohl unter homogenen als auch unter heterogenen Reaktionsbedingungen eingesetzt werden. In homogener Lösung (DMAc/LiCl) werden die Positionen *O*-6 und *O*-2 sehr effektiv durch die Thexyldimethylsilyl-Gruppen geschützt.^[63,64]

Bei der heterogenen Silylierung mit Thexyldimethylsilyl-Gruppen in einem mit Ammoniak gesättigten polar-aprotischen Lösemittel, wie z. B. *N*-Methylpyrrolidin, wird dagegen ausschließlich die *O*-6 Position umgesetzt. Aufgrund ihrer hohen Regioselektivität stellen die Trialkylsilylcellulosen wertvolle und vielseitige reaktive Intermediate für anschließende regioselektive Umsetzungen dar^[58,65] Dabei kann die Silylfunktion sowohl als Schutzgruppe, als auch als Aktivierungsmittel (z. B. bei der Synthese von organischen Celluloseestern^[66]) dienen. Die Abspaltung der Silylgruppen erfolgt mit HCl in THF in Gegenwart geringer Wassermengen. Aufgrund der sauren Bedingungen kommt es sowohl bei der Abspaltung der Silylgruppen, als auch bei der Detritylierung, zu einem teilweisen Kettenabbau und damit zu einer Verringerung des Polymerisationsgrades.^[67-69]

Mittels Sulfonylchloriden wie Methansulfonylchlorid (Mesylchlorid), Benzol- oder *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (Tosylchlorid) in Gegenwart von NaOH oder tertiären Aminen gelingt eine Veretherung von Cellulose bzw. deren Derivaten am C-6.^[70] Als Lösungsmittel werden Pyridin, DMAc/LiCl aber auch ein Gemisch aus Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und Dimethylsulfoxid^[39] eingesetzt. Die Reaktivität der OH-Gruppen nimmt dabei gegenüber dem Tosylierungsreagenz in der Reihenfolge *O*-6 > *O*-2 > *O*-3 ab.^[71,73]

1.4 Ultradünne organische Schichten

Das Interesse an den Eigenschaften von ultradünnen Filmen aus organischem Material, vor allem an den selbst-organisierten Mono- und Multischichtsystemen, ist in den letzten Jahren stetig gewachsen. Grund dafür ist die enorme Relevanz dieser Strukturen und Materialien für biologische Membranen und Grenzflächen: als Modellsubstanzen erlauben sie die Studie der physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser komplexen Oberflächen. Des Weiteren werden sie als Beschichtungsmaterial für Metalloberflächen zum Schutz vor Korrosion, in der Elektrochemie und in der Sensortechnik^[74,75] eingesetzt. Die Herstellung der ultradünnen organischen Filme kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Lange bekannt sind die chemische Gasphasenabscheidung (CVD: Chemical Vapor Deposition), die Plasmabeschichtung sowie die Langmuir-Blodgett-Methode und die Adsorption aus Lösungen. Durch Selbstorganisation von Makromolekülen aus einer Lösung können dünne,

homogene Filme hergestellt werden, deren Dicke leicht zu kontrollieren ist. Die dünnen Schichten können wenige Nanometer (Monoschichten) bis zu einigen zehn Nanometern (Multischichten) dick sein.

Die Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Technik) ist eines der wichtigsten Verfahren zur Herstellung von dünnen Monomer- und Polymerfilmen. Bei diesem Tauchverfahren werden zunächst amphiphile Moleküle in einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel auf einer Wasseroberfläche gespreitet. Durch Abdampfen des Lösungsmittels kommt es zu einer spontanen Orientierung der Moleküle, wobei sich die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser und die hydrophoben Schwanzgruppen zur Luft hin ausrichten. Mittels einer Barriere wird der Film komprimiert. Durch den anschließenden Tauchvorgang werden die Moleküle dann auf das Substrat übertragen. Aufgrund von van der Waals- und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Schichten entstehen dabei hochgeordnete Strukturen.^[76,77]

Zum Aufbau von gleichmäßigen ultradünnen Filmen auf verschiedenen Oberflächen eignen sich Cellulosederivate sehr gut, aufgrund der hohen strukturellen Perfektion der Celluloseketten^[14], sowie ihrer gewissen Kettensteifigkeit, infolge derer die Persistenzlängen normalerweise hoch sind (z. B. CMC: 5 nm^[78]). Darüber hinaus ist Cellulose biokompatibel und kann relativ leicht funktionalisiert werden.^[55] Diverse Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der Entwicklung von Langmuir-Blodgett-Filmen auf Basis von hydrophoben Cellulose-Derivaten beschäftigt. Dabei wurden hydrophobe, planare Träger in entsprechende Monoschichten von Trialkanoyl-^[79-81], Trialkyl-^[82,83] oder Trialkylsilylcellulose^[84,85] eingetaucht. Während des Transferprozesses richten sich die Polymerketten vorzugsweise parallel zur Tauchrichtung aus, so dass geordnete Multischichten entstehen.^[86,87]

Multischichtsysteme lassen sich auch nach einer von *Decher et al.* entwickelten layer-by-layer Methode aufbauen, welche auf der Wechselwirkung von Polyelektrolyten basiert. Aufgrund der Entropiezunahme, die beim Ionenaustausch Mono-Ion / Poly-Ion auftritt, wird eine sequentielle Adsorption erreicht.^[88-90] Auch hier handelt es sich also um eine „molecular self-assembly“-Technik. Es konnten bereits Multischichtsysteme mit synthetischen Polyelektrolyten wie beispielsweise Polystyrolsulfonaten (PSS) oder Polyammoniumderivaten (Poly-DADMAC), aber auch mit natürlichen Polymeren wie Proteinen oder DNA^[91] hergestellt werden.

Die ersten auf Cellulose basierenden Polyelektrolytmultischichten wurden aus regioselektiv substituierten ionischen Cellulose-Derivaten, 6-Pyridinium-6-desoxy-2,3-di-O-methylcellulose (kationisch) und 6-Sulfonato-2,3-methylcellulose (anionisch) auf geladenen Oberflächen erzeugt.^[92]

Daneben kann auch die molekulare Selbstorganisation (self-assembly) zum Aufbau von supramolekularen Strukturen genutzt werden. Nach Chemisorption geeigneter organischer Moleküle auf ein Substrat (Träger) kommt es aufgrund starker spezifischer Wechselwirkungen zwischen Adsorbat und Träger zur spontanen Ausbildung einer Monoschicht (self-assembled monolayer). Ursache dafür ist die durch die Wechselwirkungen gewonnene Enthalpie, womit der durch den höheren Ordnungsgrad verursachte Entropieverlust kompensiert wird. Die für den Aufbau von selbst-organisierten Monoschichten (self-assembled monolayer, SAMs) verwendeten Moleküle enthalten spezielle Kopfgruppen zur Anbindung an den Träger sowie lange Alkylketten. Tabelle 1.2 fasst einige Beispiele für selbstorganisierende Monoschichten zusammen.

Tabelle 1.2: Ausgewählte Beispiele zur Oberflächenmodifizierung durch Bildung von SAMs

Adsorbat	Trägermaterial	Literatur
Organosilane	Siliziumdioxid	[93-96]
Silane	Siliziumdioxid	[97,98]
Fettsäuren	Aluminiumdioxid	[99,100]
Amine	Platin	[101]
Phosphorylierte Cellulose	Aluminiumoxid, Titanoxid, Stahl	[102,103]

Die Ausbildung molekularer Schichten auf Metalloberflächen lässt sich auch bei Verbindungen mit schwefelhaltigen Kopfgruppen beobachten. Vor allem Thiol- und Thiosulfatverbindungen, die sogenannten Bunte-Salze, $R\text{-SSO}_3\text{M}$ (R: aliphatischer oder aromatischer Rest, monovalentes Kation) eignen sich hervorragend für die Bildung von ultradünnen organischen Filmen auf Gold- oder Silberoberflächen. Es kommt ebenfalls zur spontanen Ausbildung von stabilen Monolagen.^[104-107] Daneben werden aber auch Sulfide, Thiophene, und vor allem Dialkylsulfide zur koordinativen Bindung an Metalloberflächen und damit zur Bildung von SAMs eingesetzt.^[108-111]

Die Herstellung und die Charakterisierung von langkettigen Alkanthiolen vom Typ $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, mit $2 \leq n \leq 21$, $\text{X} = \text{CH}_3, \text{CH}=\text{CH}_2, \text{Br}, \text{Cl}, \text{OCH}_3, \text{COOCH}_3, \text{OH}, \text{COOH}$, usw. auf polykristallinem Gold wurde bereits 1989 von *Whitesides et al.* beschrieben.^[112] Mittels Ellipsometrie, Kontaktwinkelmessungen und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) wurde die Adsorption der Alkanthiole nachgewiesen. Die strukturelle Aufklärung der Monoschichten erfolgte anschließend mithilfe von TEM-Beugungsmustern (TEM: Transmission Electron Microscopy) und Infrarotspektroskopie. Die zur Grenzfläche Monoschicht/Luft bzw. Monoschicht/Flüssigkeit gerichtete Gruppe X hat einen großen Einfluss auf die Benetzungseigenschaften der adsorbierten Monoschichten: beispielsweise bilden Alkanthiole mit OH- bzw. COOH-Endgruppen hydrophile Oberflächen, die durch Wasser gut benetzt werden.^[112,113] Zudem sind Filme, die von langkettigen Alkanthiolen gebildet werden, wesentlich homogener und thermisch stabiler als jene von kurzkettigen Thiolen.^[114] Langkettige Thiole formen eine voll ausgestreckte trans-Zick-Zack-Struktur auf Gold, in der die Kohlenwasserstoffe in einem Winkel von 20-30° zur Oberflächennormalen gekippt sind. Dagegen ist bei kurzkettigen Thiolen die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Ketten geringer, sodass Aggregate mit einem niedrigeren Ordnungsgrad gebildet werden.

Seit einigen Jahren werden auch Dialkylsulfide auf Goldoberflächen adsorbiert.^[108,115] Die Bildung der Monoschichten erfolgt dabei ohne vorherige Spaltung der C-S-Bindung. Diese zerstörungsfreie Adsorption wurde unter anderem von *Reinhoudt et al.* mittels Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektroskopie (TOF-SIMS) nachgewiesen.^[109]

Auch die Bildung von selbst-organisierenden Monoschichten aus thiofunktionalisierten Cyclodextrinderivaten^[116-118] bzw. Cyclodextrinsulfiden^[110] auf Goldoberflächen ist in der Literatur bekannt. Mittels AFM-Messungen (Atomic Force Microscopy) von β -Cyclodextrindialkylsulfiden auf Gold konnte eine Anordnung dieser Derivate in einem pseudo-hexagonalen Gitter nachgewiesen werden.^[119]

Im Gegensatz zu Alkanthioderivaten bilden polymere Thioderivate, wie z. B. Disulfid-funktionalisierte amphiphile Copolymere^[120] oder Thiosulfatderivate der Cellulose^[104] bzw. Carboxymethylcellulose^[75,121] amorphe SAMs auf Goldoberflächen aus.^[122] *Bordeanu* berichtete erstmals von selbstorganisierenden Monoschichten von reaktiven Thiosulfat-Carboxymethylcellulosen auf Gold- und Silberoberflächen.^[123] Die Bildung der Cellulose-Monoschichten konnte durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und AFM-Messungen nachgewiesen werden. Mithilfe weiterer oberflächenanalytischer Methoden wie Infrarotspektroskopie (FTIR), Kontaktwinkelmessungen und Cyclovoltammetrie (CV)/

Impedanzspektroskopie (EIS) konnten Aussagen über die chemische Zusammensetzung, die Hydrophilie und die Belegungsdichte der adsorbierten Monoschichten getroffen werden.

1.5 Biomembranen

Biomembrane oder Zellmembrane sind der Hauptbestandteil jeder Zelle und daher für das Leben in einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Als Plasmamembran umhüllen sie die Zelle und grenzen dadurch das innere Cytosol von der extrazellulären Umgebung ab. Zudem dienen sie als Trennschicht innerhalb der Zelle, welche die einzelnen Kompartimente mit ihren charakteristischen Eigenschaften voneinander abtrennt. Die Biomembran ist allerdings keine statische Barriere, sie spielt eine aktive Rolle beim Transport von Molekülen und Informationen von einer Seite zur Anderen und hält das Konzentrationsgefälle zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten aufrecht. Den Stofftransport über diese Barriere hinweg bewerkstelligen in die Membran eingebettete Kanäle und Pumpen.

Membranen sind von ungleicher Dicke und Struktur, in ihrem Inneren können die unterschiedlichsten Prozesse ablaufen. Trotz dieser Vielseitigkeit haben alle biologischen Membranen ein wesentliches Strukturmerkmal. Die Hauptbestandteile der meisten biologischen Membranen sind Lipide, Proteine und Kohlenhydrate, wobei die Zusammensetzung je nach Einsatzort und Funktion der Membran variiert. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell (fluid mosaic model) von Singer und Nicholson^[124] (Abb. 1.3) bilden die amphiphilen Lipide als Grundbausteine der Membran eine etwa 5 bis 10 nm dicke fluide Doppelschicht^[125-127] aus, in der ein Mosaik von Proteinen eingebettet ist. Diese Membranproteine werden nicht durch Bindungen zusammengehalten, sondern können frei diffundieren und sich innerhalb der Ebene unabhängig voneinander bewegen, sofern sie nicht mit anderen Zellstrukturen assoziiert sind. Sowohl Lipidmoleküle, als auch Proteine sind fähig für laterale Bewegungen. Dies führt zur Ausbildung von Carriern, Kanälen und aktiven Transportern.

Die Lipiddoppelschicht als Grundgerüst der biologischen Membran bestimmt die physikalischen Eigenschaften wie Elastizität und thermische Stabilität. Reine Lipiddoppelschichten dienen daher als Modell für natürliche Membranen oder können zur direkten Anwendung als Beschichtung auf Festkörpern, z. B. in Biosensoren, eingesetzt werden.

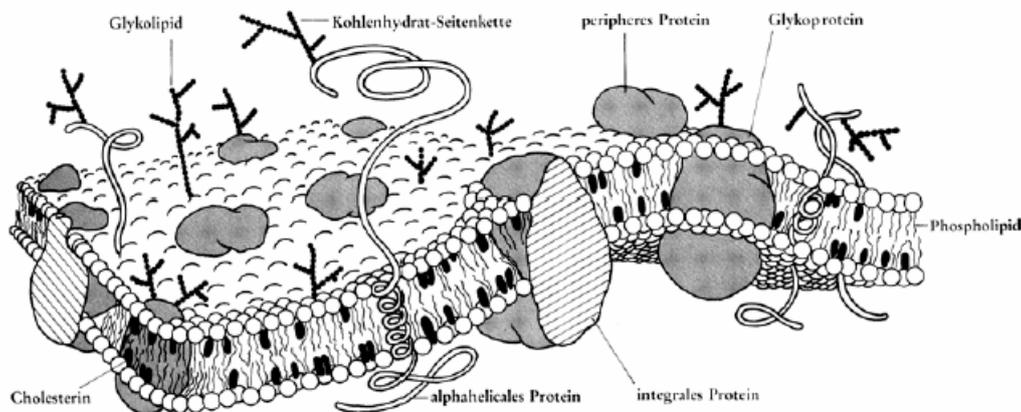


Abb.1.3: Schematisches Modell einer Zellmembran^[128]

1.6 Lipide

Lipide sind amphiphile Moleküle, die aus hydrophoben Ketten und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen. Sie sind in Wasser unlöslich, in organischen Lösungsmitteln dagegen sehr gut löslich. Der Dipolcharakter und die amphiphilen Eigenschaften der Lipidmoleküle sind verantwortlich für die spontane Ausbildung einer Doppelschicht in wässrigem Medium. Phospholipide, vor allem Phosphoglyceride, stellen den Hauptbestandteil biologischer Membranen dar. Ihr Aufbau ist in Abbildung 1.4 skizziert. Der Grundbaustein Glycerin ist darin an seinen Hydroxylgruppen am C-1 und C-2-Kohlenstoffatom mit zwei Fettsäureresten verknüpft. Dabei treten am häufigsten gesättigte Fettsäuren mit 14, 16 oder 18 C-Atomen, oder auch deren einfach ungesättigte Derivate auf. Die physikalischen Eigenschaften der Lipide wie Schmelzpunkt, Löslichkeit, Biegesteifigkeit, usw., werden stark von der Natur dieser hydrophoben Ketten beeinflusst. Die Hydroxygruppe am C-3 Kohlenstoffatom des Glycerins ist mit einem Phosphorsäurerest verestert, welcher zusammen mit der polaren Kopfgruppe R, einem Alkohol wie Ethanolamin, Cholin, Glycerin, Inositol oder Serin, den hydrophilen Teil des Lipids bildet. Gemäß ihrem amphiphilen Charakter lassen sich die Phospholipide also in zwei, in ihrer Polarität unterschiedliche Strukturen unterteilen.

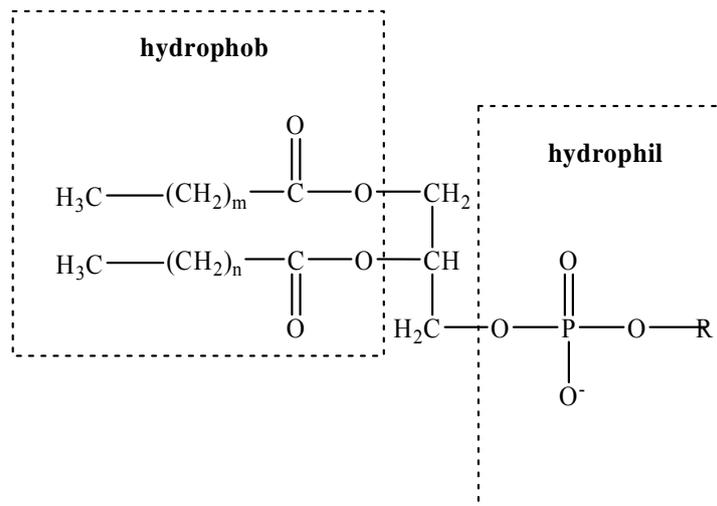


Abb. 1.4: Allgemeine Struktur von Phosphoglyceriden, R = Cholin, Serin, Ethanolamin, Inositol oder Glycerin

Phospholipide unterscheiden sich in den veresterten Fettsäuren und in den Eigenschaften ihrer Kopfgruppe, also Ladung bzw. Fähigkeit zur Wasserstoff-Brückenbindung.

Amphiphile ordnen sich nach Möglichkeit immer so an, dass sich die jeweiligen hydrophoben und hydrophilen Enden nahe kommen. Darauf beruht die Fähigkeit der Lipide zur Selbstorganisation (self-assembly). Werden die amphiphilen Phospholipide in einer wässrigen Phase dispergiert, ordnen sie sich spontan zu geordneten Strukturen zusammen, in denen sich die polaren Kopfgruppen mit den ebenfalls polaren Wassermolekülen umgeben. Der Kontakt der unpolaren Fettsäureketten mit Wasser ist dagegen mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Diese hydrophobe Energie ist direkt proportional zur Fläche des Kohlenstoff-Wasser-Kontaktes und beträgt ca. 10.5 kJ/mol nm^2 .^[129] Durch die spontane Selbstorganisation der Lipide wird eine Minimierung der Kontaktzone zwischen wässriger Phase und hydrophobem Teil des Amphiphils angestrebt. Ab einer bestimmten Konzentration, der sogenannten kritischen Micellenkonzentration (critical micelle concentration), bilden sich daher Aggregate. Neben der Aggregation zu planaren Doppelschichten kommt es dabei auch zur Bildung sphärisch geschlossener Doppelschichtstrukturen. Darüber hinaus können aber auch röhrenförmige Aggregate, die sich in einem hexagonalen Muster aneinanderlagern, oder multilamellare Vesikel mit vielen konzentrisch angeordneten Lipiddoppelschichten entstehen. Das Auftreten der verschiedenen Strukturen ist von der Geometrie der Lipide abhängig.

Bei einem ausgedehnten lipophilen Bereich wird die Aggregation zu lamellaren Phasen bzw. vesikulären Strukturen bevorzugt. Darin sind die lipophilen Fettsäureketten der

Phospholipidmoleküle in das Innere der Vesikelmembran gerichtet, während die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase in Innen- und Außenraum der Liposomen zeigen.

Die lamellaren Phasen können abhängig von Wassergehalt und Temperatur verschiedene Zustände annehmen. Dabei kann man grob zwischen der Subgel-Phase L_c , der gelartigen Phase $L_{\beta'}$ und der fluiden oder flüssig-kristallinen Phase L_{α} , die aus biologischer Sicht die relevanteste Phase ist, unterscheiden. In Abbildung 1.5 sind die wichtigsten Subphasen schematisch dargestellt. Der Übergang von der gelartigen in die flüssig-kristalline Phase wird auch als Hauptphasenübergang bezeichnet, wobei die Beweglichkeit der lipophilen Reste stark zunimmt.

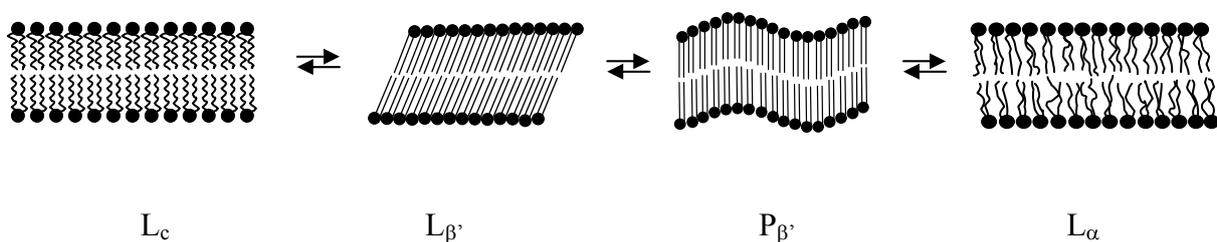


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der wichtigsten, in Phosphocholinen vorkommenden Phasen und ihre Umwandlung ineinander, entsprechend steigender Temperatur: Subgel L_c , gelartig-verkippt $L_{\beta'}$, Ripple-Phase $P_{\beta'}$, Fluid L_{α} .

Die Lipidmoleküle können sich nun innerhalb der Schicht frei bewegen (Flüssigcharakter), die Schicht aber nicht verlassen (kristallin). Die entsprechende Phasenübergangstemperatur T_m ist abhängig von der Kopfgruppe der Lipide, der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäureketten und kann je nach Lipid Werte zwischen -20°C und 60°C annehmen.^[130]

1.7 Biomimetische Lipidmembransysteme

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung biologischer Membranen, sowie der damit verbundenen vielfältigen membranassoziierten biochemischen Prozesse wird die Erforschung biochemischer und biophysikalischer Membraneigenschaften sehr erschwert. Daher wurden künstliche Lipidmembranen entwickelt, die Biomembranen nachahmen sollen und auf diesem Wege zu einem besseren Verständnis der Struktur, der Eigenschaften und der Funktionen von Biomembranen und deren Teilaspekten führen sollen. Abbildung 1.6 zeigt eine Übersicht der gängigsten Modelle.

Durch die Reduzierung des biologischen Systems auf Modellcharakter wird die Komplexität echter Zellmembranen verringert und auf wenige definierte Bestandteile beschränkt.^[131] Die Modellmembransysteme sind darauf ausgerichtet, partiell diese Eigenschaften nachzuahmen. Modellentwicklungen jüngster Zeit sind aber auch von technologischem Interesse, z. B. für die Anwendung als Biosensoren.^[132,133,134,135] Nachfolgend soll kurz auf die wichtigsten Modellsysteme eingegangen werden.

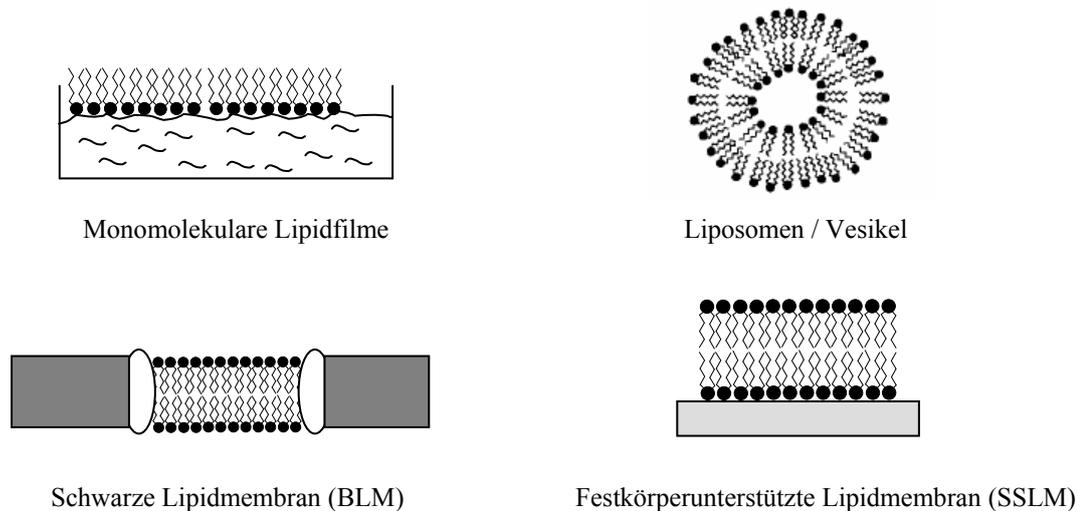


Abb. 1.6: Einfache Modellsysteme für biologische Membranen

1.7.1 Monomolekulare Lipidfilme

Durch Spreiten von amphiphilen Lipiden an der Wasser/Luft-Grenzfläche orientieren sich diese zu einer Monoschicht, die formal die Hälfte der Lipiddoppelschicht einer Zellmembran darstellt^[136]. Dabei richten sich die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Phase, die hydrophoben Acylketten zur Luft hin aus. Diese sehr reduzierten Modellsysteme sind am weitesten vom Vorbild Biomembran entfernt. Sie liefern jedoch präzise Informationen über die molekulare Packung von Amphiphilen, die über andere Modellmembranen nicht zugänglich sind sowie die thermodynamischen Eigenschaften von Lipidmonolagen, z. B. das Phasenverhalten der betrachteten Monolage und deren Bestandteile.^[137,138]

1.7.2 Lipide Vesikel

Kolloidale sphärische Gebilde wie Vesikel oder Liposomen kommen als Modellsysteme dem Aufbau einer biologischen Membran am nächsten. Die kugelförmigen Vesikel bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Doppelschichten aus Phospholipiden, die analog zur

Zellmembran ein wässriges Kompartiment umschließen.^[139] Sie werden meist aus Phosphodiester-Derivaten von 1,2-Diacyl-syn-glycero-3-phosphat hergestellt.

1.7.3 Schwarze Lipidmembranen (black lipid membranes, BLMs)

Zur Herstellung der schwarzen Lipidmembranen wird ein geeignetes Lipid oder Lipidgemisch in einem organischen Lösungsmittel gelöst und diese Lösung anschließend über ein kleines Loch in einer Teflonfolie gestreift. Durch Verdampfen des Lösungsmittels und spontaner Selbstorganisation der Lipide entsteht eine Lipiddoppelschicht^[140], die aufgrund ihrer Dicke schwarz erscheint. An ihr lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Lipidmembranen und der in ihr inkorporierten Membranproteine untersuchen^[141-143] aus denen man Rückschlüsse auf Membrankapazität, -dicke und -leitfähigkeit ziehen kann. Dadurch erhält man Aussagen über Stoff- und Ladungstransportphänomene durch die Lipidmembran. Von Nachteil ist jedoch die geringe mechanische Stabilität sowie der vom Herstellungsprozess verbleibende Lösungsmittelrest in der Membran.^[144]

1.7.4 Festkörperunterstützte Modellmembranen (solid-supported bilayer lipid membranes, sBLMs)

Für technologische Anwendungen sind die Lebenszeit sowie die mechanische Stabilität einer Membran sehr wichtig. Durch Abscheidung von planaren Lipiddoppelschichten auf festen Oberflächen erhält man die sogenannten sBLMs^[135,145], durch die eine deutliche Verbesserung dieser Eigenschaften erzielt werden kann.^[77,135,146] Im Gegensatz zu Vesikeln, für die aufgrund ihrer kugelförmigen Geometrie kaum Charakterisierungsmethoden und Messverfahren zur Verfügung stehen, können die planaren Systeme durch eine Vielzahl von oberflächenanalytischen und elektrochemischen Messmethoden charakterisiert werden.^[135,147] Dazu gehören Röntgenreflektometrie, Neutronenstreuung, Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR), Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS), Cyclovoltammetrie (CV) sowie Infrarotspektroskopie (FT-IR). Der Aufbau von festkörperunterstützten Modellmembranen (sBLMs) erfolgt mittels Langmuir-Blodgett-Technik. Dabei werden die Doppelschichten durch Physisorption oder Chemisorption auf hydrophile Oberflächen wie Glas, Silizium oder Mica-Substrate sowie auf reine unfunktionalisierte Metalloberflächen übertragen. Die Membran ist dabei durch eine ultradünne Wasserschicht vom Substrat getrennt.^[148] sBLMs werden vorwiegend zur Untersuchung von Einbau und Funktion von

Kanal- und Carrierproteinen eingesetzt. Die Lipidmembran dient hierbei als Matrix für die zu untersuchenden Proteine.^[149]

Ein großer Nachteil dieses Modellsystems ist der direkte Kontakt der Lipiddoppelschicht zum festen Substrat. Die sehr dünne Wasserschicht unter der Lipidmembran schafft nicht ausreichend Raum für die Einlagerung von Membranproteinen, wodurch diese unspezifisch an die Substratoberfläche adsorbieren können. Aufgrund der eingeschränkten bzw. fehlenden Fluidität dieser oberflächenfixierten Systeme werden die eingebauten Proteine in ihrer nativen Konformation beeinflusst, was schließlich zur Denaturierung führen kann.^[126]

1.7.5 Oberflächenverankerte Modellmembranen (tethered bilayer lipid membranes, tBLMs)

Die Reaktionen in Membranen hängen von der lateralen Bewegung und den fluiden Eigenschaften aller Membrankomponenten ab^[150], wobei die Konformation und somit die Funktion der Membranproteine mit einer hydrophilen Umgebung einhergeht. Die bereits erwähnten Einschränkungen bei den rein festkörperunterstützten Membranen führten zur Entwicklung neuer Modellsysteme, den sogenannten oberflächenverankerten bimolekularen Lipidmembranen (tBLMs), bei denen zwischen Substrat und Lipidschicht in Wasser quellbare Hydrogele als sogenannte Abstandhaltermoleküle (spacer-Moleküle)^[135,151] eingesetzt werden.

Sackmann^[135] und *Ringsdorf*^[152] schlugen erstmals vor, eine weiche hydrophile Polymerschicht als Zwischenschicht zwischen der fluiden Membran und dem festen Substrat einzuführen. Seit dem gewinnt die Oberflächenmodifikation mit Polymeren zunehmend an Bedeutung. Für die Entwicklung der unterschiedlichen Systeme spielen vor allem zukünftige Anwendungen in der Biosensorik eine entscheidende Rolle.

Die dünne Polymerschicht ermöglicht die Abkopplung der Lipiddoppelschicht von der Substratoberfläche und stellt eine hydrophile, Wasser-enthaltende Schicht für die Einbettung voluminöser Membranproteine zur Verfügung.^[135] Der Einfluss der Oberfläche auf die Membraneigenschaften wird dadurch minimiert. Gleichzeitig wird die Oberflächenrauigkeit des Substrats ausgeglichen. Die Lipiddoppelschicht kann durch kovalente Anbindung auf der polymermodifizierten Oberfläche verankert werden. Dazu wird die Polymerschicht mit lipophilen Gruppen modifiziert, welche durch Inkorporation in die Membran deutlich stabilere Schichten ermöglichen.

Ein weiterer Faktor ist die stabile Kopplung des Polymersystems an den Untergrund mittels geeigneter Ankergruppen (Abb. 1.7).

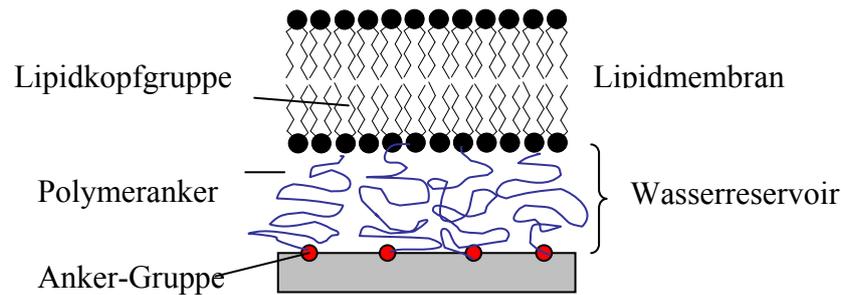


Abb. 1.7: Schematische Darstellung einer polymerunterstützten Lipidmembran

Die zum Aufbau von oberflächenverankerten Lipiddoppelschichtmembranen (tBLMs) eingesetzten Polymere müssen einige Anforderungen erfüllen. Sie sollten sehr hydrophil sein und weder mit Membranlipiden noch mit Membranproteinen wechselwirken. Zur Stabilisierung, die für praktische Anwendungen unumgänglich ist, sollten sie sowohl an das feste Substrat als auch an die Doppelschicht über chemische Bindungen verknüpft sein.^[146]

Eine Vielzahl oberflächengebundener Modellmembranen wurde auf der Basis von hydrophilen, polymeren Abstandshaltern entwickelt. Zu den bekannten Systemen gehören sowohl synthetische als auch biologische Verbindungen:

Synthetische Polymere und Oligomere:

- Polyethylenglykole verschiedener Kettenlänge^[132,146,149,153-158]
- Polyethyloxazoline^[159] bzw. Polymethyloxazoline^[160]
- Polydiallyldimethylammoniumchlorid / Alkylthiol-Spacer^[161]
- Polyacrylamidderivate^[162-164]
- Copolymere verschiedener Acrylsäurederivate^[120]
- Plasmapolymersiertes Maleinsäureanhydrid^[165]
- Dextrane^[151]

Biopolymere:

- Peptide verschiedener Länge und Sequenzen^[166-170]
- Prokaryontische S-Schicht-Proteine^[171]
- Streptavidin^[172-174]

Die Aufgabe solcher Abstandshalter ist es, die Modellmembranen in ihren Eigenschaften den natürlichen Membranen anzugleichen und trotzdem den Modellcharakter dieser Systeme zu wahren.

2. Zielsetzung

In der Einleitung wurden unterschiedliche Membranmodellsysteme vorgestellt, die zur Nachahmung der biologischen Lipidmembran dienen. Vor allem die polymerunterstützten Membranmodelle, die sogenannten tBLMs, sind dabei von großem Interesse, da sie zum einen ein hohes Maß an Stabilität bieten und zum anderen den Einsatz vieler oberflächensensitiver Untersuchungsmethoden ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll erstmals ein polymerunterstütztes Lipidmembran-Modellsystem auf Basis funktioneller Thio-Carboxymethylcellulose Derivaten aufgebaut werden, welches anschließend zur Untersuchung der Aktivität von membrangestützten Proteinen eingesetzt werden soll.

Thiofunktionalisierte Cellulose- bzw. Carboxymethylcellulose-Derivate, die durch Adsorption aus wässriger Lösung selbst-organisierende Monoschichten (SAMs) auf Metalloberflächen wie Gold- und Silberoberflächen ausbilden können, wurden bereits von *Liebold*^[121] und *Bordeanu*^[123] beschrieben und charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun zunächst die bereits entwickelten Synthesewege reproduziert und wenn möglich optimiert werden. Mithilfe der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) soll dann die Kinetik der Adsorption dieser Thio-CMC-Derivate aus wässriger Lösung in situ verfolgt, und die resultierende Filmdicke bestimmt werden. Die erzeugten Monoschichten sollen anschließend zur Immobilisierung von Enzymen genutzt werden.

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Aktivität von immobilisierter Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP). Mittels SPR-Spektroskopie soll die Immobilisierung des Enzyms an den mit reaktiven Thio-Carboxymethylcellulosen beschichteten Goldoberflächen in situ verfolgt werden. Durch Aufnahme von Michaelis-Menten Kinetiken soll die Aktivität des immobilisierten Enzyms für unterschiedliche Belegungsgrade an Enzym bestimmt und anschließend mit den entsprechenden Aktivitätsuntersuchungen von freiem Enzym in Lösung verglichen werden.

Schließlich soll dann eine Lipidmembran auf den adsorbierten reaktiven Thio-Carboxymethylcellulose-Derivaten aufgebaut werden. In diesem Modellsystem sollen die sich selbst-organisierenden Thio-Cellulosemonoschichten die Funktion des Abstandshalters

(spacers) übernehmen, welcher für die Abkopplung der Lipidmembran von der Goldoberfläche sorgen und darüber hinaus als hydrophile Zwischenschicht den Einbau komplexer Membranproteine wie beispielsweise Cytochrom P450 ermöglichen soll. Zur Verankerung der Lipidmembran an der Celluloseoberfläche muss diese jedoch zunächst hydrophob modifiziert werden. Dazu soll ein Lipidanalogen synthetisiert und anschließend in situ an die Thio-CMC-Monoschicht gekuppelt werden. Auf diesen so präparierten, hydrophoben Schichten soll dann durch Fusion von Phospholipidvesikeln eine Lipidmembran aufgebaut werden.

Der schrittweise Aufbau dieses Systems soll ebenfalls in situ durch Einsatz der SPR-Messtechnik verfolgt werden.

3. Synthese reaktiver thiofunktionalisierter Carboxymethylcellulosen

3.1 Einleitung

Für die Bildung von ultradünnen organischen Filmen auf Metalloberflächen wie Gold oder Silber eignen sich auch Thiol- und Thiosulfatderivate von Cellulose.

Wasserlösliche, thiofunktionalisierte Cellulosederivate werden schon seit geraumer Zeit synthetisiert. Zu dieser Gruppe gehören die Thioethercellulosen, die Desoxymercaptocellulosen und die Thiosulfatcellulosen.

6-S-Methylthiocarboxymethylcellulose (MTh-CMC) ist eine bekannte Thioethercellulose, welche von Liepold durch Umsetzung von Tosylcellulose mit Natriumthiomethylat in DMF und anschließender Carboxymethylierung hergestellt wurde.^[50,121] Im Gegensatz zu Thiolen bzw. Bunte-Salzen bildet dieses Derivat koordinative Bindungen zur Goldoberfläche aus, wobei stabile Monolayer mit einer Schichtdicke von 1-3 nm entstehen.^[50]

Desoxymercaptocellulosen können sowohl aus Tosylcellulosen, als auch aus Halogendesoxycellulosen durch Reaktion mit Thioharnstoff hergestellt werden. Basische Hydrolyse des primär entstehenden Thiuroniumsalzes führt dann zum entsprechenden Thiol.^[175,176] Nachteil dieser Verbindungen ist ihre Tendenz unter Lichteinfluss Disulfidbrücken auszubilden. Aufgrund dieser Vernetzung nimmt die Löslichkeit des Polymers in wässrigem Medium stark ab.

Die Darstellung von Thiosulfatcellulosen ist mittlerweile ausführlich untersucht worden. *Rahn* stellte erstmals Thiosulfatcellulosen her, indem sie Tosylcellulose mit Natriumtetrathionat (Natriumthiosulfat) in DMSO umsetzte.^[177,178]

Die Darstellung eines einheitlicheren Bunte-Salzes gelang durch eine vollständige Substitution der Tresyl-Gruppe (Trifluoethansulfonyl-Gruppe) von 6-O-Tresyl-2,3-di-O-methylcellulose durch Thiosulfat.^[92]

Die von *Wenz et al.* entwickelten Bisthiosulfatcellulosen (TSHP), eignen sich ebenfalls zur Bildung von stabilen Monoschichten auf Gold-^[75,104] und Silberoberflächen^[104,179] Unter Lichteinfluss neigen sie aber wie die Desoxymercaptocellulosen zur Bildung von Disulfidbrücken. Die resultierende Quervernetzung führt auch hier zu einer schlechteren Löslichkeit in wässrigem Medium. Durch Synthese der monosubstituierten Thiosulfatcellulose (HTSHP-CMC) wurde dieses Problem gelöst.^[50,121,123] Der höhere

Substitutionsgrad an Thiosulfat-Gruppen, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.08-0.38$ führte außerdem zu stabileren Monoschichten.^[121]

Durch Einführung zusätzlicher reaktiver funktioneller Gruppen lassen sich Derivate herstellen, die als Trägermaterialien für die kovalente Fixierung von biologisch aktiven Wirkstoffen, wie Enzymen oder Pharmaka verwendet werden können.

Es existieren bereits zahlreiche Methoden zur Einführung solcher reaktiver funktioneller Gruppen in die Cellulose. Von sehr großem Interesse ist dabei vor allem die Modifizierung von Cellulose zur Proteinimmobilisierung. Aufgrund der chemischen Diversität der Proteine, die an die reaktiven Cellulosederivate gebunden werden sollen, kann dies durch mehrere reaktive Gruppen ermöglicht werden. Es wurden bereits Amino-^[180-183], Hydroxyl-^[182,184], Carbonyl-^[183] und Thiol-Gruppen^[183,185] eingesetzt. Die Kupplung der Proteine an die reaktiven Cellulosederivate erfolgt in der Regel über ihre Aminofunktionalitäten.^[186]

Carboxylgruppenhaltige Celluloseether wie die Carboxymethylcellulose (CMC) spielen dabei eine sehr große Rolle. CMC ist ein polyfunktionelles, hydrophiles biologisch abbaubares Polymer, welches aufgrund seiner physiologischen Unbedenklichkeit sehr gut als Trägermaterial für die Fixierung von Wirkstoffen genutzt werden kann.^[180,187] Reaktive Derivate der CMC wie beispielsweise das Säurechlorid^[188] oder das Hydrazid^[180,189], welches im Anschluss unter Einwirkung von Natriumnitrit zu dem sehr reaktiven Azid^[180] umgesetzt werden kann, eignen sich als Trägermaterial für aminogruppenhaltige Wirkstoffe.

Daneben kann zur Wirkstoffanbindung an CMC die aus der Peptidchemie bekannte Carbodiimid-Methode angewendet werden^[182,184,190], wobei die Fixierung des Polymers sowohl durch direkte Kopplung an den Träger, als auch unter Verwendung unterschiedlicher Spacer wie beispielsweise p-Aminobenzoesäure, Alkandiole oder Aminoethanol erfolgen kann.^[183-193]

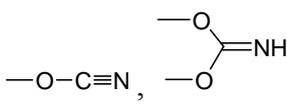
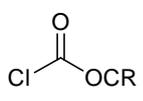
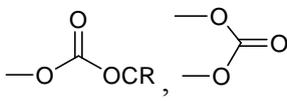
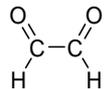
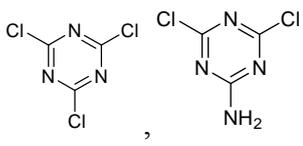
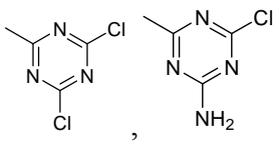
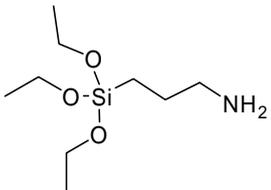
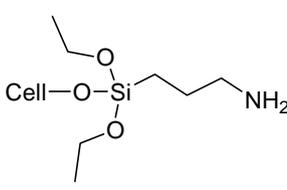
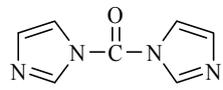
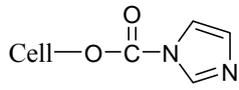
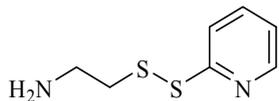
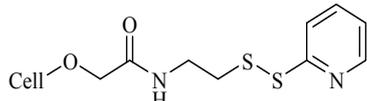
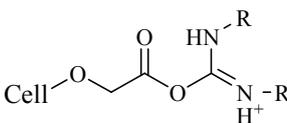
Auch carbonylgruppenhaltige Cellulosederivate können als aktivierte Träger für Enzymimmobilisierungen eingesetzt werden, z. B. die durch Oxidation der Cellulose mit Natriumperiodat erzeugte 2,3-Dialdehydcellulose.^[194,195]

Eine dritte große Gruppe von funktionellen Cellulosederivaten sind die Cellulosecarbamate, die durch Umsetzung von Cellulosematerialien mit Diisocyanaten hergestellt werden. Dabei entstehen je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich stark vernetzte Cellulosecarbamate mit freien Isocyanat-Gruppen^[196,197], die zur Anbindung von Aminosäuren^[190] und Wirkstoffen eingesetzt werden können.

Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht weiterer wichtiger Aktivierungsmethoden für Cellulosederivate.

Neben der kovalenten Bindung von Enzymen an auf Cellulose basierenden Trägermaterialien, können die vorgestellten Aktivierungsmethoden auch dazu genutzt werden, intakte Zellen^[198] und Mikroorganismen^[199] zu immobilisieren.

Tab. 3.1: Modifizierungsmethoden für Cellulose zur Proteinimmobilisierung

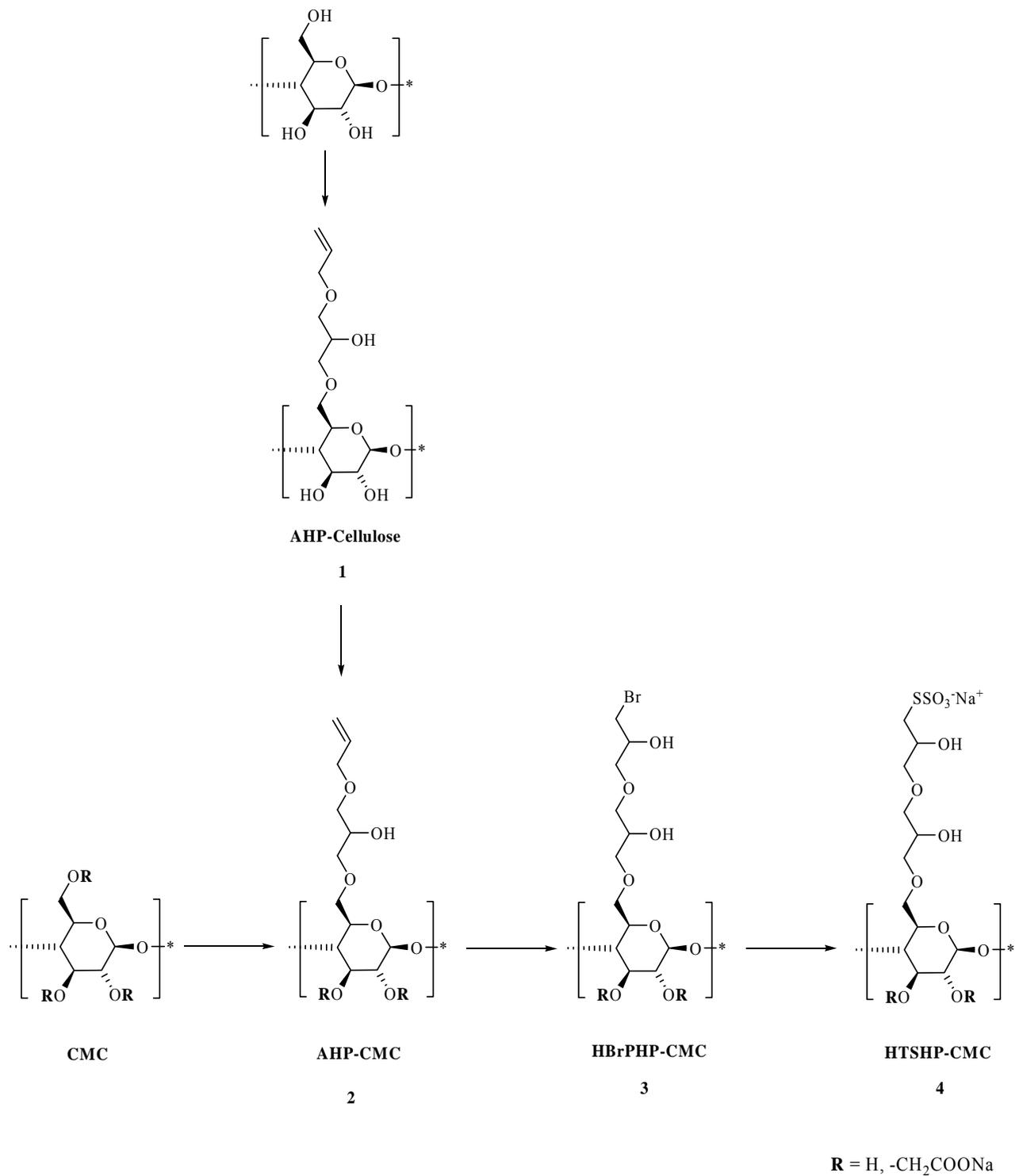
Reagenz	eingeführte reaktive Funktionalität	Funktionalität Enzym
BrCN		NH ₂ ^[200-202]
		NH ₂ ^[203,204]
		NH ₂ ^[205-208]
		NH ₂ ^[209-211]
		NH ₂ , CHO ^[212]
Cell + 		NH ₂ ^[213-215]
CMC + 		SH ^[183]
CMC + R-N=C=N-R		NH ₂ , OH ^[182]

3.2 Synthese der 6-O-(2“-Hydroxy-3“-thiosulfatopropoxy-2’-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose (HTSHP-CMC)

3.2.1 Synthesekonzept

In der vorliegenden Arbeit sollte ausgehend von kommerzieller Carboxymethylcellulose (CMC: $DS_{\text{CMC}} \approx 0.7$, $MW = 250000 \text{ g/mol}$) ein Syntheseweg zur Herstellung der 6-O-(2“-Hydroxy-3“-thiosulfatopropoxy-2’-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose **4** im Hinblick auf Reproduzierbarkeit bzw. Erhöhung des Substitutionsgrades (DS) an Thiosulfat-Gruppen untersucht werden. Dieses Bunte-Salz wurde bereits von *Liepold*^[121] und *Bordeanu*^[123] ausgehend von der 6-O-(3’-Allyloxy-2’-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose (AHP-CMC) **2** synthetisiert (Schema 3.1). *Liepold* setzte **2** mit einem Substitutionsgrad an Allylgruppen von $DS_{\text{Allyl}} = 0.23$ ein und erhielt daraus die HTSHP-CMC **4** mit einem $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Synthese von **2** gelang es *Bordeanu* den Substitutionsgrad an Allylgruppen und schließlich auch an Thiosulfatgruppen zu erhöhen. Er erzielte dabei Werte bis zu einem $DS_{\text{Allyl}} = 0.69$, was einer vollständigen Substitution der freien Hydroxylgruppen am Kohlenstoffatom C-6 durch die Allyloxyhydroxypropyl-Gruppe (AHP-Gruppe) entspricht. Für das Bunte-Salz **4** erhielt er Werte von $DS_{\text{Thiosulfat}}$ zwischen 0.15 und 0.38.

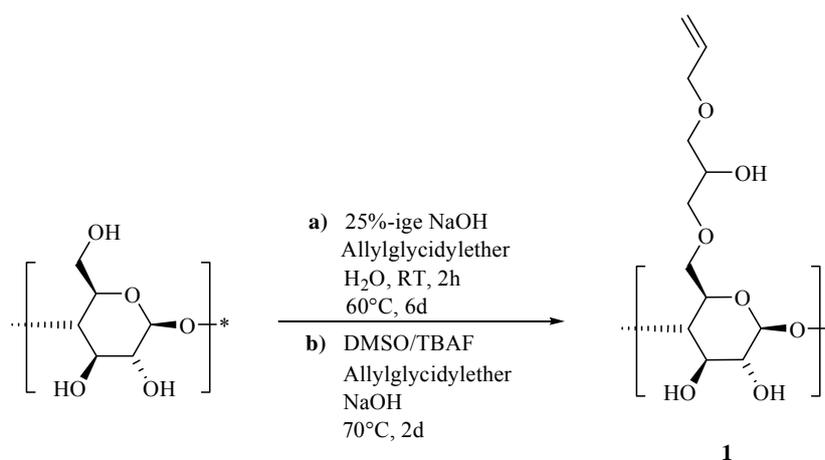
Des Weiteren soll die AHP-CMC **2**, ausgehend von nativer Cellulose, mit einem höheren Substitutionsgrad an Allyl- bzw. Carboxymethylgruppen hergestellt werden. Durch Angriff von Allylglycidylether hauptsächlich in Position C-6 der Cellulose soll zunächst die AHP-Cellulose **1** synthetisiert werden. Partielle Carboxymethylierung der Hydroxylgruppen von **1** mittels Chloressigsäure-Natriumsalz soll dann zum gewünschten Derivat **2** führen.



Schema 3.1: Synthesewege zu 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-cellulose Natriumsalz **4**

3.2.2 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose (AHP-Cellulose) **1**

Zur Darstellung des 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose Natriumsalzes **1** wurde native Cellulose unter heterogenen Reaktionsbedingungen mit Allylglycidylether umgesetzt (Schema 3.2). Dabei kamen zwei verschiedene Lösungsmittelsysteme zum Einsatz: starke wässrige Base (25%-ige Natriumhydroxidlösung) sowie Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) / Dimethylsulfoxid (DMSO).^[39]



Schema 3.2: Synthese von 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose **1**

Um das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen, und damit die übermolekulare Struktur zu zerstören, wurde die Cellulose zunächst in 25%-iger Natriumhydroxidlösung mercerisiert, und anschließend mit Allylglycidylether bei 60°C umgesetzt (Schema 3.2 a)). Das Rohprodukt wurde nach 6d neutralisiert und durch kontinuierliche Ultrafiltration gereinigt. Anschließende Gefriertrocknung ergab eine Ausbeute von 64%. Die erfolgreiche Synthese der AHP-Cellulose **1** konnte mittels ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie, FT-IR Spektroskopie sowie Elementaranalysen bewiesen werden.

Obwohl das entstandene Produkt nicht vollständig in Wasser löslich ist, erkennt man in beiden NMR-Spektren von **1** in D₂O, neben den Signalen für die Glucopyranoseeinheit (Glcp-Einheit) in einem Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 4.53 - 3.36$ ppm bzw. $\delta = 134.69 - 119.09$ ppm, deutlich die charakteristischen Signale der Doppelbindung der eingeführten AHP-Gruppe. Im ¹H-NMR-Spektrum von **1** in D₂O (Abb. 3.1) erscheinen die Signale der Protonen H-2'' und H-3'' bei $\delta = 5.96$ und $\delta = 5.37 - 5.30$ ppm.

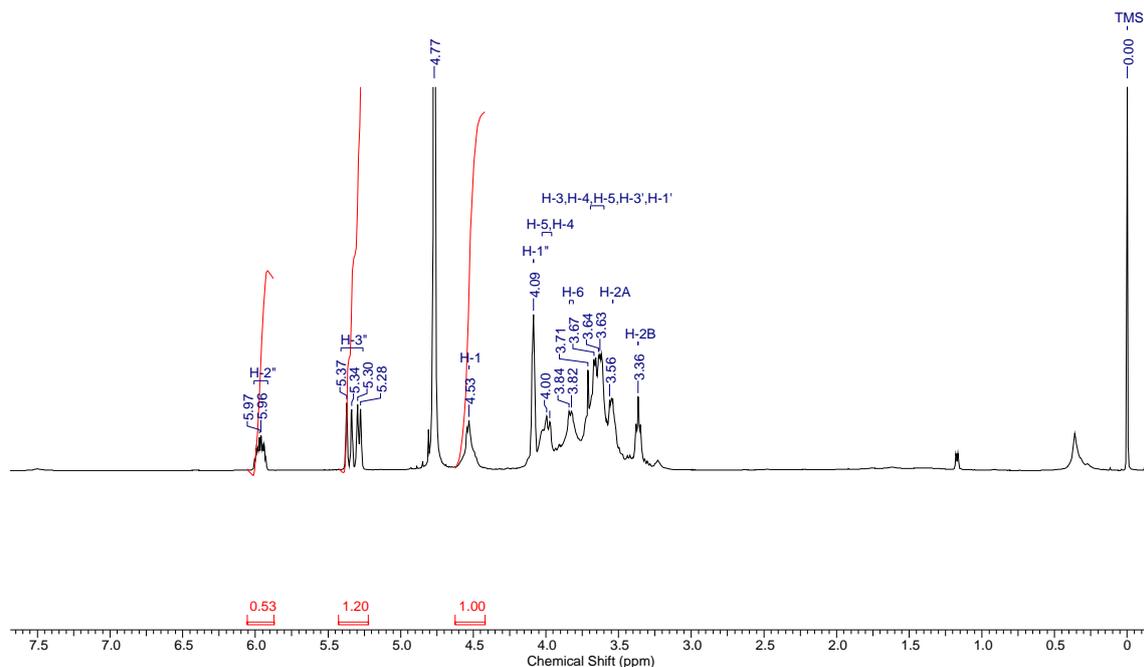


Abb. 3.1: ^1H -NMR Spektrum von 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose **1** in D_2O

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt die Signale der Kohlenstoffatome der Doppelbindung bei $\delta = 134.69$ ppm für $\text{CH}=\text{CH}_2$, und $\delta = 119.09$ ppm für $\text{CH}=\text{CH}_2$. Die weiteren Signale der (3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)gruppe sind von den Signalen des Cellulosegrundgerüsts weitgehend überlagert. Die statistische Verteilung der AHP-Gruppe entlang der Cellulosekette führt zu einer Aufspaltung des Signals des Kohlenstoffatoms C-6. Dabei erfährt das Signal des substituierten C-6, im Folgenden durch den Index A gekennzeichnet, eine Tieffeldverschiebung nach $\delta = 63.52$ ppm, wohingegen das Signal des unsubstituierten Kohlenstoffatom C-6^B (B = unsubstituiert) bei $\delta = 61.62$ ppm erscheint.

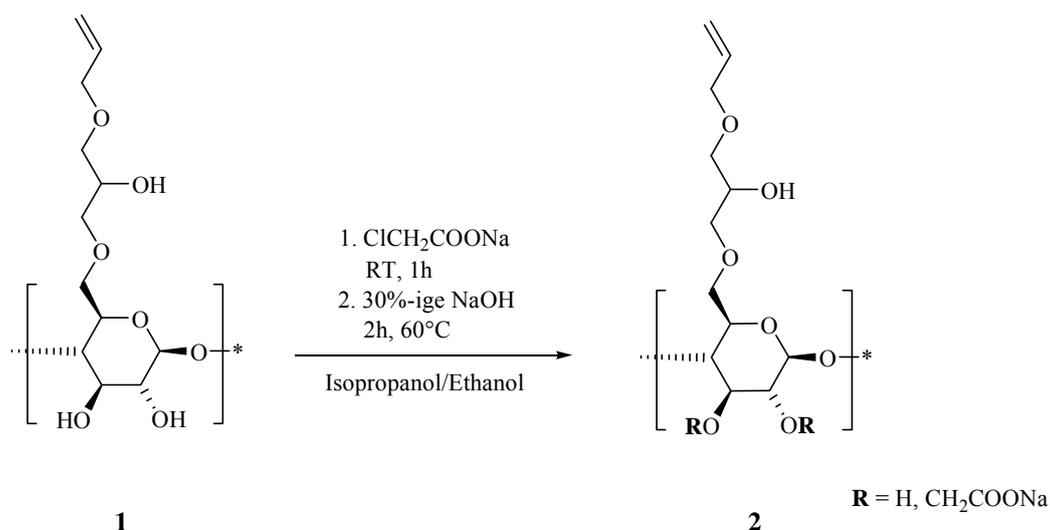
Die Substitutionsgrade an Allylgruppen wurden sowohl mittels ^1H -NMR Spektroskopie als auch aus der Elementaranalyse bestimmt. Aus dem Integrationsverhältnis des Signals des H-2'' Protons und dem Signal des H-1 Protons der Glcp-Einheit ergab sich ein Substitutionsgrad von $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.53$; aus der Elementaranalyse wurde dagegen ein $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.78$ berechnet.

Die Synthese der AHP-Cellulose **1** im Lösungsmittelsystem TBAF/DMSO^[39] wurde mit NaOH als Base und Allylglycidylether durchgeführt. (Schema 3.2 b)). Aufgrund der hohen Viskosität der Reaktionsmischung musste dazu ein KPG-Rührer verwendet werden. Nach einer Reaktionszeit von 2d bei 70°C wurde das Produkt isoliert. Sowohl das ^1H -NMR Spektrum, als auch das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen, dass die Umsetzung zu **1** erfolgreich war.

Allerdings gelang es nicht, das Produkt von überschüssigem TBAF zu befreien. Aufgrund der guten Löslichkeit des TBAF im Organischen sowie im Wässrigen, war es nicht möglich dieses durch Flüssig/Flüssig-Extraktion abzutrennen. Ebenso konnte weder durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen Wasser, noch durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex eine Abtrennung der ionischen Verunreinigung erzielt werden. Auch repetitives Lösen des Rohprodukts in Wasser und anschließendes Fällen in 2-Propanol führte zu keiner merklichen Aufreinigung, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit auf diese Art der Darstellung verzichtet wurde.

3.2.3 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (AHP-CMC-Na) **2**

Durch Carboxymethylierung von **1** in den freien Positionen 2 und 3 der Glcp-Einheit wurde die 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose **2** hergestellt. Diese Umsetzung erfolgte unter heterogenen Reaktionsbedingungen in einem Isopropanol/Ethanol-Gemisch innerhalb von 3h. Als Carboxymethylierungsmittel diente Chloressigsäure Natriumsalz, als Base eine 30%-ige Natriumhydroxidlösung. (Schema 3.3). Nach Neutralisation und Aufreinigung durch kontinuierliche Ultrafiltration erhielt man das Produkt in einer Ausbeute von 25%.



Schema 3.3: Synthese von 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **2**

Die Elementaranalyse ergab für den Substitutionsgrad an Carboxymethyl-Gruppen Werte zwischen $DS_{CM} = 0.97$ und 1.37 . Der Substitutionsgrad an Allylhydroxypropyl-Gruppen betrug $DS_{Allyl} = 0.57$, welcher sehr gut mit dem durch 1H -NMR-Spektroskopie bestimmten Wert von $DS_{Allyl} = 0.59$ übereinstimmte.

Aufgrund der schlechten Ausbeute der Carboxymethylierung wurde für die Herstellung der AHP-CMC **2** auf eine käuflich zu erwerbende Carboxymethylcellulose (CMC) ($M = 250000$ g/mol, $DS_{CM} = 0.7$) zurückgegriffen.

Zur Überprüfung der Herstellerangaben im Hinblick auf den Substitutionsgrad an Carboxymethylgruppen wurde zunächst die Substituentenverteilung in der CMC mittels 1H -NMR-Spektroskopie bestimmt.^[123]

Dazu muss die CMC ($DS_{CMC} \approx 0.7$) zunächst zu ihren carboxymethylierten Monomereinheiten abgebaut werden. Durch Umsetzung mit 2M Trifluoressigsäure (TFA) wird ein säurehydrolytischer Abbau der CMC ohne Verlust der Information des Substitutionsortes erzielt.^[216] Nach einer Reaktionszeit von 50h bei $100^\circ C$ wird die TFA am Rotationsverdampfer abgezogen, die Abbauprodukte anschließend durch Gefriertrocknung isoliert. Die Zuordnung der Signale im 1H -NMR-Spektrum der CMC-Abbauprodukte (Abb. 3.2) erfolgte unter Zuhilfenahme der HC-COSY-NMR-Spektroskopie.

Das 1H -NMR Spektrum ist Beleg für den nahezu vollständigen Abbau der CMC in die entsprechenden monomeren Einheiten. Die Signale der H-1-Protonen der Glcp-Einheiten sind scharf und spalten aufgrund der Kopplung mit dem Proton an C-2 in zwei Sätze von Dubletts bei einer chemischen Verschiebung im Bereich von $\delta = 4.5$ - 5.3 ppm auf. Dabei lässt sich dem Proton am C-1 des α -Anomers der Satz an Dubletts von $\delta = 5.3$ - 5.1 ppm, dem Proton des β -Anomers den bei höherem Feld bei $\delta = 4.6$ - 4.4 ppm zuordnen.^[217] Die Kennzeichnung der Dubletts mit den Indizes „S“ und „U“ bezieht sich auf die mit Carboxymethylgruppen substituierten und unsubstituierten Hydroxylgruppen am C-2 Kohlenstoffatom („S“= substituiert, „U“= unsubstituiert). Die Carboxymethylierung der Hydroxylgruppe an Position C-2 führt unter anderem zu der starken Tieffeldverschiebung des H-1(alpha)-Protons in Position C-1 (Abb. 3.2).^[49]

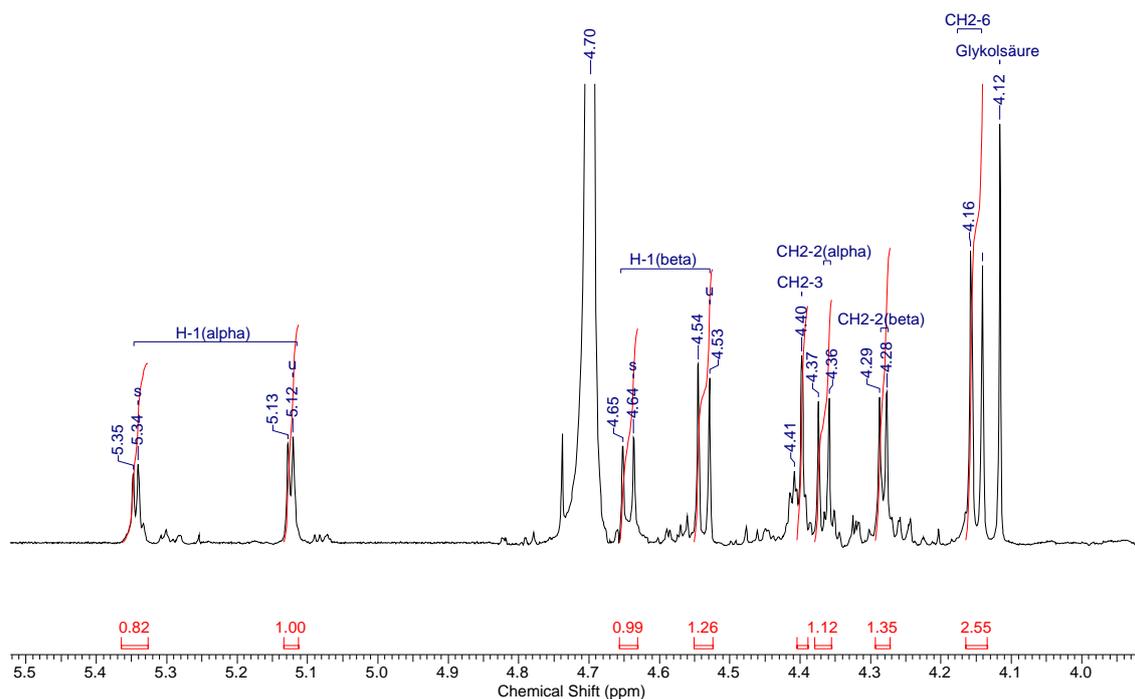


Abb. 3.2: ^1H -NMR-Spektrum der abgebauten CMC und Integration der Signale für die Berechnung der Substitutionsgrade

Die Substituentenverteilung der Carboxymethylgruppen entlang der Cellulosekette lässt sich unter der Voraussetzung das eine vollständige Hydrolyse stattgefunden hat, aus dem ^1H -NMR-Spektrum über das Verhältnis der Integrale zweier Signale A/B ermitteln.^[123] A steht dabei für $\frac{1}{2}$ der Integrale der CH_2 -Gruppe der Carboxymethyl-Signale in der Region zwischen $\delta = 4.10\text{-}4.40$ ppm; B dagegen für die Integration der Signale des H-1 Protons bei $\delta = 4.53\text{-}4.65$ und $\delta = 5.12\text{-}5.35$ ppm (Abb. 3.2).

Der totale Substitutionsgrad an Carboxymethylgruppen (DS_{CM}), sowie die partiellen DS-Grade (x) an CM-Gruppen in den Positionen 2, 3 und 6 wurden mit folgenden Formeln berechnet:

Totaler Substitutionsgrad an CM-Gruppen:

$$\text{DS}_{\text{CMC}} = \text{A/B} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\int_{4.16}^{4.40} H_{\text{CH}_2 - 2,3,6}}{\int_{5.12}^{5.35} H_{\text{C-1}\alpha} + \int_{4.53}^{4.65} H_{\text{C-1}\beta}} = \frac{1}{2} \cdot \frac{(1.12 + 1.36 + 1.09 + 2.55)}{(0.82 + 1.00) + (0.99 + 1.26)} = 0.75$$

Partielle Substitutionsgrade (x) an CM-Gruppen:

$$x_2 = \frac{1}{2} \cdot \frac{\int_{4.36}^{4.37} H_{(CH_2-2)\alpha} + \int_{4.28}^{4.29} H_{(CH_2-2)\beta}}{\int_{5.12}^{5.35} H_{C-1\alpha} + \int_{4.53}^{4.65} H_{C-1\beta}} = \frac{1}{2} \cdot \frac{(1.12 + 1.36)}{1.82 + 2.25} = 0.31$$

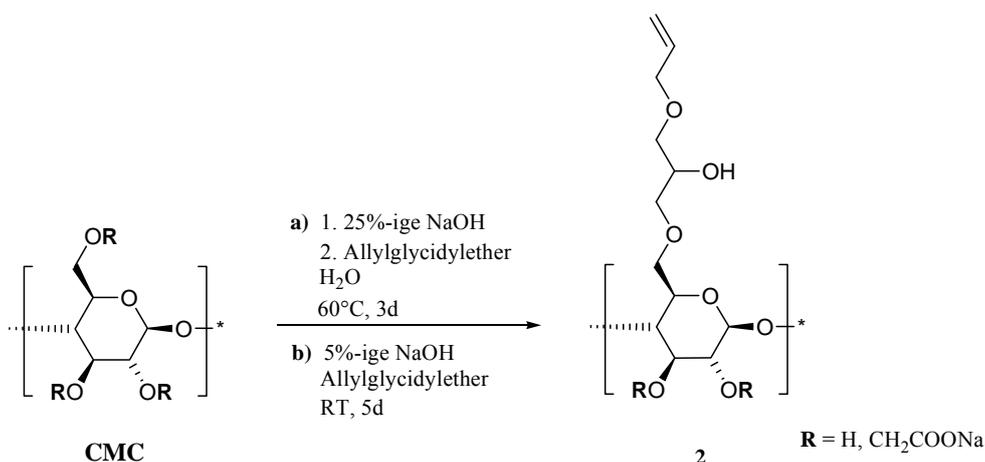
$$x_3 = \frac{1}{2} \cdot \frac{\int_{4.40}^{4.41} H_{CH_2-3}}{\int_{5.12}^{5.35} H_{C-1\alpha} + \int_{4.53}^{4.65} H_{C-1\beta}} = \frac{1}{2} \cdot \frac{1.09}{1.82 + 2.25} = 0.13$$

$$x_6 = \frac{1}{2} \cdot \frac{\int_{4.14}^{4.16} H_{CH_2-6}}{\int_{5.12}^{5.35} H_{C-1\alpha} + \int_{4.53}^{4.65} H_{C-1\beta}} = \frac{1}{2} \cdot \frac{2.55}{1.82 + 2.25} = 0.31$$

Der totale Substitutionsgrad an Carboxymethyl-Funktionalitäten von $DS_{CM} = 0.74$ ähnelt den Herstellerangaben ($DS_{CM} = 0.7$). Die partiellen Substitutionsgrade in den Positionen 2, 3 und 6 betragen $x_2 = 0.3$, $x_3 = 0.13$, $x_6 = 0.31$. Die Werte stimmen mit Werten in der Literatur weitgehend überein.^[218]

In Position C-6 kann ein maximaler Substitutionsgrad von $DS_{C-6} = 1.00$ erreicht werden. Da die CM-Gruppen 0.31 davon einnehmen, können die übrigen 0.69 den freien Hydroxylgruppen zugeordnet werden. Bei regioselektiver Umsetzung in Position C-6 könnte daher ein DS an eingeführter Funktionalität (F) von maximal $DS_F = 0.69$ erreicht werden.

Auf dem zweiten Weg diente 25%-ige Natriumhydroxidlösung als Lösungsmittel für die kommerzielle CMC. Die Umsetzung mit Allylglycidylether war nach 3 d abgeschlossen.^[104] (Schema 3.4 a)). Nach der üblichen Reinigung durch Ultrafiltration und anschließender Gefriertrocknung wurde das Produkt in einer Ausbeute von 86% isoliert.



Schema 3.4: Synthese von 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **2**

Eine andere Variante der Darstellung von **2** beginnt mit einer Aktivierung der CMC in wässriger Natriumhydroxidlösung. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit Allylglycidylether bei RT innerhalb von 5d (Schema 3.4 (b)).

Die ¹³C-NMR-Spektren von AHP-CMC **2** in D₂O belegen die erfolgreichen Umsetzungen. Die charakteristischen Signale der Allylfunktionalität sind deutlich bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 134.76$ ppm (C-2^{''}) und $\delta = 119.15$ ppm (C-3^{''}) zu erkennen. Im Vergleich zum ¹³C-NMR-Spektrum von **1** treten weitere Signale auf. Dabei lassen sich die Signale bei $\delta = 178.63$ ppm und 69.62 ppm eindeutig dem Carbonylkohlenstoff sowie den CH₂-Gruppen der CM-Funktionalität zuordnen. (Abb. 3.3)

Neben der statistischen Verteilung der CM-Gruppen entlang der Cellulosekette führt zusätzlich der Einfluss benachbarter AHP-Gruppen beim Kohlenstoffatom C-2 zu einer Aufspaltung des Signals. Dabei erfährt das Signal des substituierten Atoms (C-2^A) eine Tieffeldverschiebung nach $\delta = 82.93$ ppm, während das unsubstituierte C-2^B dem Signal bei $\delta = 79.05$ ppm zugeordnet werden kann.

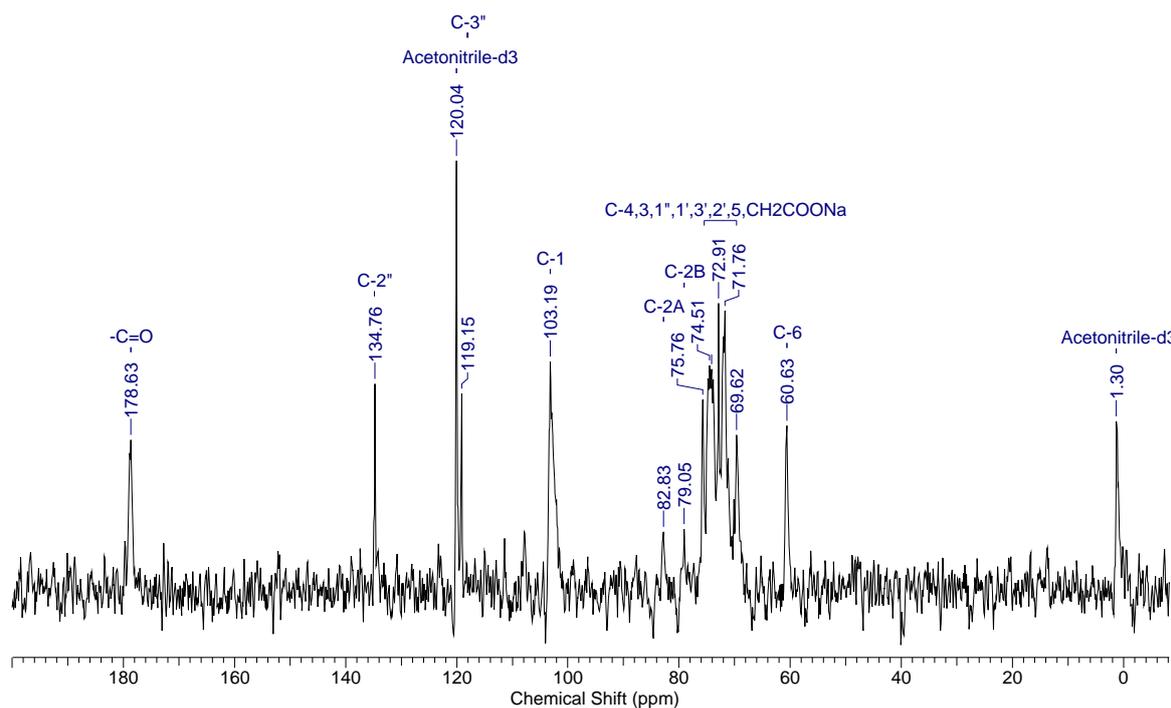


Abb. 3. 3: ^{13}C -NMR Spektrum von 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **2** in D_2O

Die Bestimmung des Substitutionsgrades an Allylgruppen aus dem ^1H -NMR-Spektrum ergab einen DS_{Allyl} von 0.28, der einigermaßen gut mit dem aus der Elementaranalyse ermittelten Wert von $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.24$ übereinstimmt.

In Tabelle 3.2 werden die verschiedenen Synthesewege für die AHP-CMC **2** im Hinblick auf die erzielten Substitutionsgrade (DS) an Allylhydroxypropylgruppen bzw. Carboxymethylgruppen sowie die jeweiligen Produktausbeuten zusammengefasst.

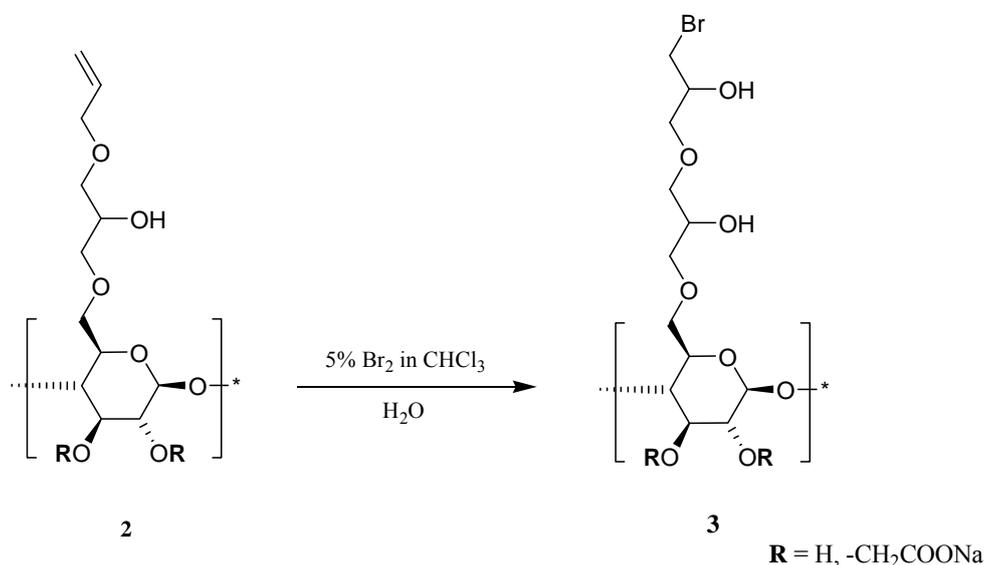
Tabelle 3.2: Substitutionsgrade und Ausbeuten von 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose **2**

Syntheseroute	DS_{Allyl}		DS_{CM}	Ausbeute
	EA	$^1\text{H-NMR}$	EA	
1	0.57	0.59	0.97-1.37	25%
2	0.21	0.38	0.74	86 %
3	0.24	0.28	0.71	86 %

Aus den erhaltenen Ergebnissen lassen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Synthesewegen beobachten. Der maximale Substitutionsgrad von $DS = 0.69$ der für eine Substitution in Position C-6 erreicht werden kann, wird bei keiner der drei Routen erzielt. Durch Umsetzung von nativer Cellulose mit Allylglycidylether und nachfolgender Carboxymethylierung konnte jedoch ein DS_{Allyl} von 0.57 bzw. 0.59 erzielt werden, der dem theoretischen Wert relativ nahe kommt. Ausgehend von kommerzieller Carboxymethylcellulose ($DS \approx 0.7$) wurden dagegen Derivate mit einem wesentlich geringeren Substitutionsgrad an Allylgruppen synthetisiert. Die aus der EA ermittelten Werte stimmten jedoch für beide Derivate gut überein.

3.2.4 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (HBrPHP-CMC Na) **3**

Die Umsetzung der AHP-CMC **2** zum 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **3** erfolgte bei RT. Als Bromierungsmittel diente dabei eine 5%-ige Lösung von Br_2 in CHCl_3 (Schema 3.5).



Schema 3.5: Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **3**

Diese wird über einen längeren Zeitraum zu einer wässrigen Lösung von **2** getropft. Der Reaktionsverlauf lässt sich dabei sehr gut verfolgen. Sind alle Allylgruppen umgesetzt, behält die Reaktionslösung aufgrund eines Brom-Überschusses eine Gelbfärbung. Unter den

verwendeten Reaktionsbedingungen liegen zwei Nukleophile (Bromid, OH⁻) vor, die um die Doppelbindung der Allylfunktion konkurrieren. Diese Konkurrenzsituation führt zur ausschließlichen Bildung des vicinalen Bromhydrins.^[219] Nach Zerstörung des überschüssigen Broms mittels Natriumthiosulfat konnte **3** in einer Ausbeute von 93 % isoliert werden.

Sowohl im ¹H-NMR- als auch im ¹³C-NMR-Spektrum von **3** in D₂O sind die charakteristischen Signale der Doppelbindung der AHP-Gruppe (bei $\delta = 5.85$ ppm, $\delta = 5.26$ - 5.16 ppm, bzw. $\delta = 134.76$ ppm und $\delta = 119.15$ ppm) komplett verschwunden.

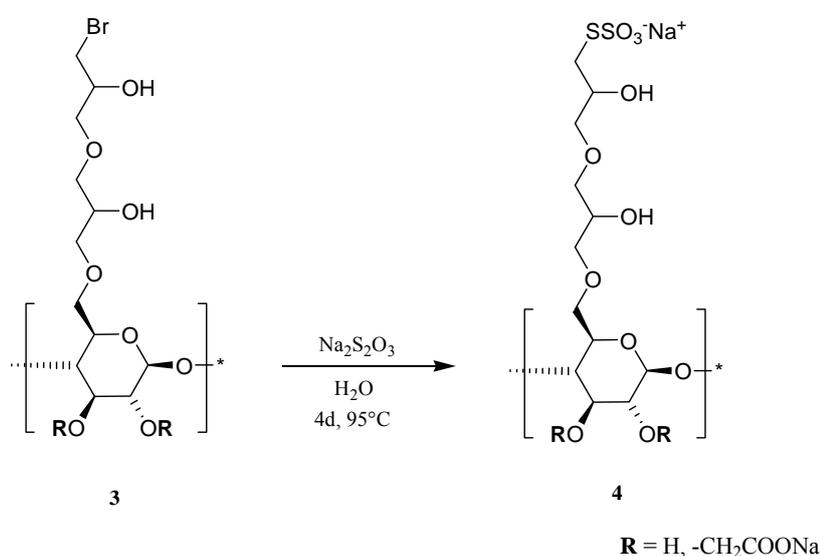
Die Signale der beiden Wasserstoffatome H-2'' und H-3'' lassen sich im ¹H-NMR Spektrum einer chemischen Verschiebung von $\delta = 3.38$ ppm bzw. $\delta = 3.23$ ppm zuordnen. Die übrigen Signale der Glcp-Einheit erfahren keine Veränderung.

Auch das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt eine Hochfeldverschiebung der Signale der Kohlenstoffatome C-2'' und C-3''. Dabei wird das Signal des Kohlenstoffatom C-3'' aufgrund der Substitution mit dem elektronegativen Brom sehr stark nach $\delta = 36.26$ ppm verschoben. Dem Signal von C-2'' kann man dagegen eine chemische Verschiebung von $\delta = 69.59$ ppm zuordnen. Die übrigen Signale der AHP-Gruppe bzw. der Cellulose-Grundgerüstatome erfahren keine Verschiebung, sie liegen im Bereich von $\delta = 103.19$ – 60.55 ppm. Dem Carbonylkohlenstoffatom lässt sich eindeutig das Signal bei $\delta = 178.88$ ppm zuordnen.

Die Elementaranalyse ergab einen Gehalt an Brom von 5.96 %. Daraus ließ sich ein DS_{Bromid} = 0.22 berechnen. Dieser Wert stimmt mit dem theoretisch zu erwartenden Wert von 0.23 überein.

3.2.5 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (HTSHP-CMC Na) **4**

Die Synthese des 6-O-(2''-Hydroxypropyl-3''-thiosulfato-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalzes **4** erfolgte durch Umsetzung von **3** mit Natriumthiosulfat. (Schema 3.6) Nach einer Reaktionszeit von 4d und einer Temperatur von 95°C wurde das Produkt durch Ultrafiltration gereinigt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 76 %.



Schema 3.6: Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-Thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **4**.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 3.4) bzw. im ^{13}C -Dept-NMR-Spektrum der HTSHP-CMC erfährt das Signal des Kohlenstoffatoms C-3'' eine leichte Verschiebung zu tieferem Feld. Es tritt jetzt bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 38.44$ ppm auf. Aufgrund der statistischen Verteilung der AHP-Gruppe wird auch hier das Signal des C-6 Atoms aufgespalten. Die Substitution bewirkt eine Tieffeldverschiebung des Signals von C-6^A nach $\delta = 63.44$ ppm; das Signal des unsubstituierten Kohlenstoffatoms C-6^B tritt dagegen wie erwartet bei $\delta = 60.69$ ppm auf.

Durch Bestimmung des Schwefel- und Bromgehaltes mittels Elementaranalyse wird die vollständige Umsetzung bestätigt. Aus dem Gehalt an Schwefel wurde ein Substitutionsgrad an Thiosulfatgruppen von $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.22$ berechnet.

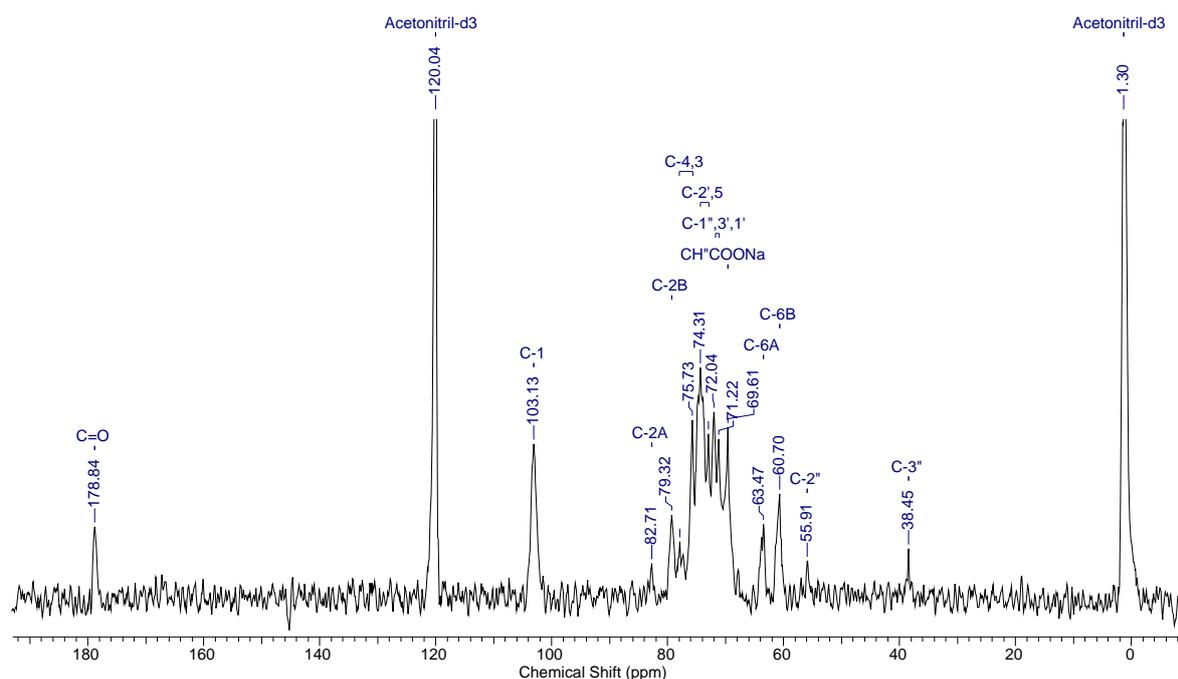


Abb. 3. 4: ^{13}C -NMR Spektrum von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-Thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **4** in D_2O

3.3 Synthese reaktiver Thiocellulosederivate

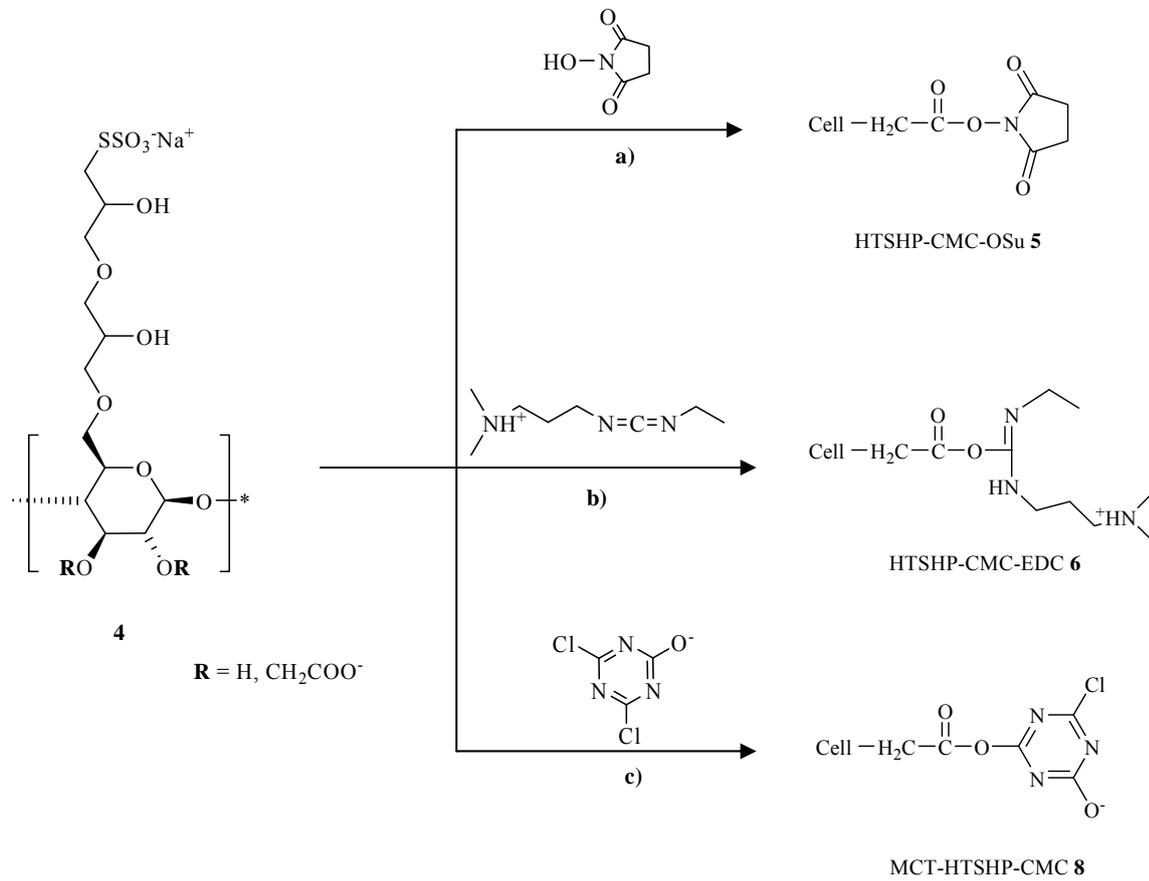
3.3.1. Synthesekonzept

Ausgehend von der Thiosulfatcellulose **4** sollten wasserlösliche reaktive Cellulosederivate hergestellt werden, die zum einen der Immobilisierung von Wirkstoffen wie beispielsweise Enzymen, aber auch als Grundlage zum Aufbau von sog. tethered lipid bilayer membranes (tLBM) auf einer Metalloberfläche dienen. Die Charakterisierung dieser Derivate erfolgte mittels NMR- bzw. IR-Spektroskopie. Mithilfe der Elementaranalyse wurden die Substitutionsgrade an reaktiven Gruppen bestimmt.

Die reaktiven Derivate entstehen aus **4** durch Aktivierung der Carbonsäuregruppen. Durch die Reaktion von **4** mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) soll der entsprechende neutrale Aktivester hergestellt werden. (Schema 3.7 b)).

Bei der Synthese des kationischen Derivats **6** dient das wasserlösliche *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid (EDC) als Aktivierungsmittel (Schema 3.7 a)). Schließlich soll aus der Umsetzung von **4** mit dem wasserlöslichen 2,4-Dichlor-6-oxidotriazin (DCT) **7** ein Derivat **8** synthetisiert werden, welches seine Reaktivität durch Einführung

anionischer funktioneller Gruppen erhält (Schema 3.7 c)). Alle Synthesen wurden bereits von *Bordeanu*^[123] beschrieben.



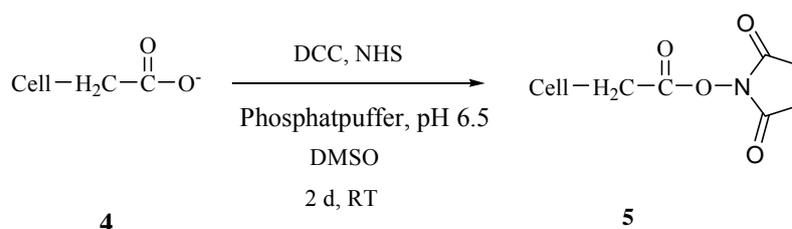
Schema 3.7: Synthesekonzept der reaktiven Thiosulfatcellulosen **5**, **6**, **8**

3.3.2 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-succinimidyl-cellulose Natriumsalz (HTSHP-CMC-OSu Na) **5**

N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester Derivate werden häufig zum Aufbau von Biosensoren eingesetzt, da sich an ihnen aufgrund ihrer Reaktivität leicht Biomoleküle anbinden lassen.^[220-223] Mithilfe verschiedener Kupplungsreagenzien gelingt die Aktivierung als OSu-Ester in der Regel ohne Probleme. Das bekannteste Verfahren zur Einführung der OSu-Gruppe wurde von der Firma Biacore entwickelt.^[224] Dabei wird eine mit Dextran beschichtete Sensoroberfläche durch ein wässriges Gemisch aus EDC/NHS funktionalisiert, wodurch die direkte Immobilisierung von Enzymen, Antigenen und Antikörpern über die Carboxylgruppen des Dextrans erfolgen kann.^[184,224]

Eine alternative Darstellung von OSu-Aktivestern besteht in ihrer Synthese in Lösung. *Bordeanu* stellte auf diese Art erstmals reaktive *O*-Succinimidyl-thiocarboxymethylcellulose-Derivate her.^[123]

Die Synthese von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-succinimidyl)-cellulose Natriumsalz **5** erfolgte nach der aus der Peptidchemie bekannten Carbodiimid-Methode^[183,185,190], wobei Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz eingesetzt wurde (Schema 3.8).



Schema 3.8. Synthese von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-succinimidyl)-cellulose Natriumsalz **5**

Durch Umsetzung von **4** mit einem 6-fachen Überschuss an DCC in DMSO entsteht als reaktive Zwischenstufe ein *O*-Acylisoharnstoff, welcher durch die schwach sauren Bedingungen (Phosphatpuffer, pH 6.5) direkt protoniert wird. Dadurch wird der Angriff des Nucleophils NHS am Carbonyl-C des Carboxylats sehr erleichtert.^[224] Das im Zuge der Acylierungsreaktion freigesetzte Wasser reagiert mit dem eingesetzten DCC zu *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff^[225], der nach beendeter Reaktion leicht abgetrennt werden kann. Das

Produkt wird nach 2d Rühren bei RT durch kontinuierliche Ultrafiltration gereinigt und nach Gefriertrocknung in 95 %-iger Ausbeute isoliert.

Die Charakterisierung dieses OSu-Aktivesters erfolgte durch $^1\text{H-NMR}$ - $^{13}\text{C-NMR}$ -, HC-COSY-NMR Spektroskopie, FT-IR-Spektroskopie, sowie Elementaranalyse.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennt man deutlich die Signale der Protonen der OSu-Gruppe. Sie treten bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2.33$ ppm auf. Das Verhältnis des Integrals dieser beiden Protonen und des Integrals des H-1 Protons der Glcp-Einheit diene neben der Elementaranalyse zur Bestimmung des Substitutionsgrades an OSu-Funktionalitäten. Aus der Elementaranalyse ergaben sich Substitutionsgrade von $\text{DS}_{\text{OSu}} = 0.36$ und $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.13$.

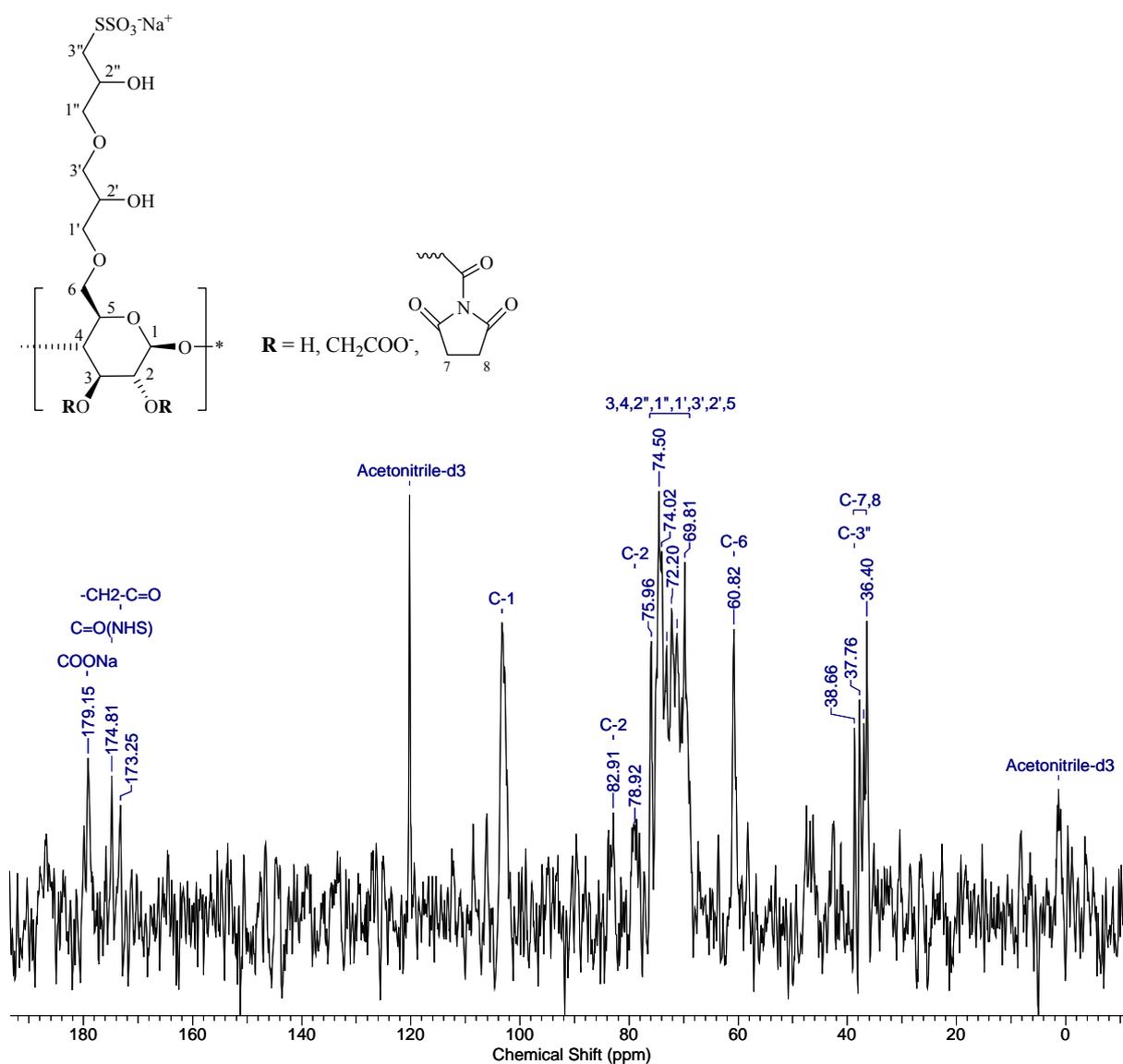
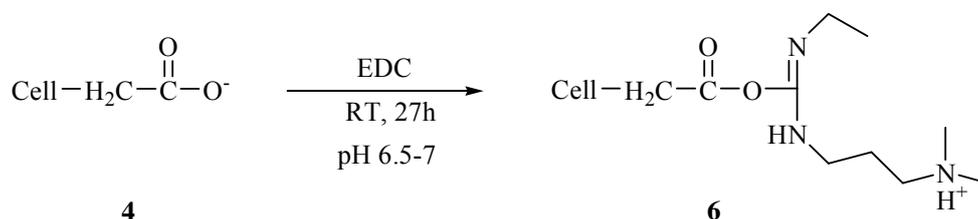


Abb. 3.5: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-(*N*-hydroxysuccinimidyl)-cellulose Natriumsalz **5**

Das ^{13}C -NMR Spektrum von **5** in D_2O zeigt deutliche Anzeichen für eine erfolgreiche Aktivierung mit OSu-Gruppen. Durch die Einführung dieses Substituenten wird das Signal der CH_2 -Gruppe der Carboxymethylgruppe zu höherem Feld hin verschoben. Es erscheint jetzt bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 69.80$ ppm. Die beiden Carbonylkohlenstoffatome der OSu-Gruppe lassen sich dagegen dem Signal bei $\delta = 174.90$ ppm zuordnen. Die übrigen Signale der OSu-Gruppe sind aufgrund der statistischen Verteilung der OSu-Gruppe entlang der Cellulosekette tieffeldverschoben nach $\delta = 39.40$ - 37.13 ppm. (Abb. 3.5)

3.3.3 6-O-(2'-Hydroxy-3'-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-2-(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kaliumsalz (HTSHP-CMC-EDC K) **6**

Durch Umsetzung der Thiosulfatcellulose (HTSHP-CMC) **4** mit dem wasserlöslichen *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) wurde ein kationischer Aktivester hergestellt (Schema 3.9). Auch bei dieser Synthese kam die Carbodiimid-Methode zum Einsatz. Die Carboxylgruppen der Thiosulfatcellulose **4** werden hierbei durch Addition an die $\text{C}=\text{N}$ -Doppelbindung des EDC aktiviert. Die daraus resultierende Zwischenstufe kann selbst als aktiviertes Carbonsäurederivat fungieren und mit Aminen Amidbindungen ausbilden.^[230] Eine Isolierung der Zwischenstufe, des *O*-Acyllactim-Derivats, ist nur möglich, weil Cellulosederivate im Vergleich zu niedermolekularen Stoffen erheblich weniger reaktiv sind.



Schema 3.9: Synthese von 6-O-(2'-Hydroxy-3'-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-2-(*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kaliumsalz **6**

Die Synthese der 6-O-(2'-Hydroxy-3'-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-2-(*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidyl)-cellulose **6** erfolgte nach

Zugabe eines Überschusses an EDC zu einer wässrigen Lösung von **4** innerhalb von 27h bei RT. Für eine erfolgreiche Umsetzung ist jedoch die Einhaltung eines neutralen pH-Wertes erforderlich. In saurer Umgebung würde die entstehende Zwischenstufe, der *O*-Acylisoharnstoff, direkt protoniert werden, wodurch ein Angriff eines weiteren Nucleophils (z. B. Wasser) induziert wäre. Auch ein basisches Reaktionsmedium ist von Nachteil, da es unter diesen Bedingungen sehr leicht zu einer Umlagerung des gebildeten *O*-Acylisoharnstoff zum *N*-Acylisoharnstoff kommen kann.

Zur Reinigung wurde **6** ultrafiltriert, zunächst mit 0.2 M KCl-Lösung, um die Abbauprodukte, lösliche Harnstoffderivate, aber auch über elektrostatische Wechselwirkungen haftende EDC-Moleküle zu entfernen, danach mit destilliertem Wasser. Anschließende Gefriertrocknung brachte eine Produktausbeute von 47 %.

Auch hier erfolgte die Charakterisierung des Produktes mittels $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, CH-COSY-NMR-Spektroskopie, FT-IR-Spektroskopie und Elementaranalyse.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lassen sich die Signale der Methylgruppen der EDC-Funktionalität, H-12 und H-13 eindeutig einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2.92$ ppm zuordnen. Aus dem Integrationsverhältnis dieses Signals und dem Signal des H-1 Protons der Glcp-Einheit bei $\delta = 4.58$ ppm ergab sich ein Substitutionsgrad an EDC-Gruppen von $\text{DS}_{\text{EDC}} = 0.21$. Aus der Elementaranalyse wurde ein $\text{DS}_{\text{EDC}} = 0.27$ bestimmt.

Die übrigen Signale der EDC-Gruppierung werden zum Teil durch die Signale der Protonen der Glcp-Einheit überlagert. Unter Zuhilfenahme der HC-COSY-NMR-Spektroskopie konnten die Signale aber den entsprechenden Protonen zugeordnet werden.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ - (Abb. 3.6) bzw. im $^{13}\text{C-DEPT-NMR}$ -Spektrum ist die erfolgreiche Synthese des Aktivesters ebenfalls deutlich anhand der zusätzlichen Signale zu erkennen. So erscheinen die Signale der beiden Kohlenstoffatome C-7 und C-8 bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 161.48$ ppm und $\delta = 138.37$ ppm. Grund dafür ist die Ausbildung der *O*-Acyllactim-Struktur. Die übrigen charakteristischen Signale der EDC-Funktionalität (C-11, C-12, 13, C-9, 14, C-10, C-15) treten im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 56.24$ ppm bis $\delta = 12.61$ ppm auf.

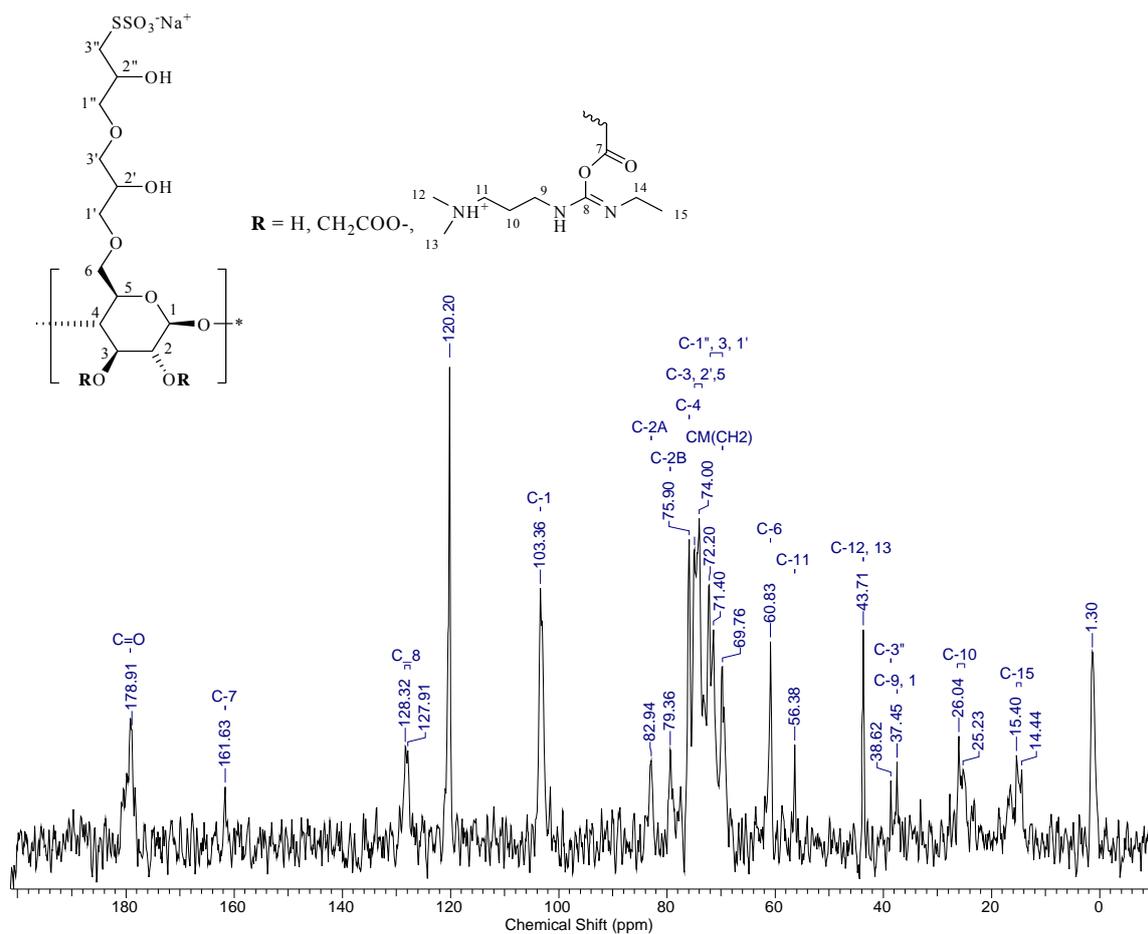
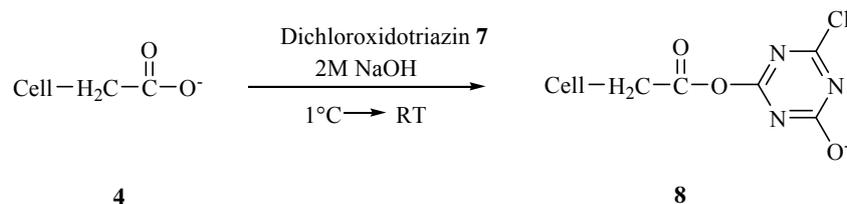


Abb. 3.6: ¹³C-NMR Spektrum von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-2-(*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kaliumsalz **6**

3.3.4 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-*O*-(2-chlor-4-oxido-1, 3, 5-triazinyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz (MCT-HTSHP-CMC) **8**

Durch Umsetzung von 2,4,6-Trichlor-1,3,5-Triazin (Cyanurchlorid) mit 2 M NaOH bei 1°C wurde zunächst das 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin (DCT) **7** hergestellt.^[123] Das ¹³C-NMR-Spektrum des erhaltenen Produktes in D₂O sowie das ESI-MS-Spektrum dienten als Beleg für die ausschließliche Bildung von **7**.

Aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit dieses Triazin-Derivats im Gegensatz zum Cyanurchlorid, konnte die Synthese des 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-*O*-(2-chlor-4-oxido-1, 3, 5-triazinyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalzes unter homogenen Bedingungen durchgeführt werden (Schema 3.10).



Schema 3.10: Synthese von 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-*O*-(2-chlor-4-oxido-1,3,5-triazinyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **8**

Die Schwierigkeit bei der Darstellung liegt darin, dass es bei zu stark basischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) zu einer partiellen Hydrolyse des zweiten Chlor-Atoms kommen kann. Um dies zu verhindern, muss dafür gesorgt werden, dass der pH-Wert der Reaktionsmischung bei Zugabe der NaOH nicht über 12 steigt. Darüber hinaus muss für eine konstante Kühlung auf etwa 1°C gesorgt werden. Diese kann nach Beendigung der NaOH-Zugabe ausgeschaltet werden. Infolge der Alkylierungsreaktion entsteht HCl, die durch NaOH neutralisiert wird. Der pH-Wert der Lösung nimmt daher mit fortschreitender Umsetzung stetig ab, bis er einen konstanten Wert erreicht. An diesem Punkt ist die Reaktion beendet und das Produkt kann nach kontinuierlicher Ultrafiltration und anschließender Gefriertrocknung isoliert werden.

Aus der Elementaranalyse wurden der Stickstoff- sowie der Chlor-Gehalt des MCT-Derivats ermittelt und daraus die Substitutionsgrade an Chlor $\text{DS}_{\text{Chlor}} = 0.08$ und Triazin $\text{DS}_{\text{Triazin}} = 0.46$ bestimmt. Auffällig ist der sehr niedrige Wert für DS_{Chlor} . Durch Einführung der MCT-Gruppe sollte theoretisch ein Gehalt an Chlor von 4.21% bzw. ein $\text{DS}_{\text{Chlorid}} = 4.25$ erzielt werden. Da der Chlor-Gehalt des erhaltenen Produktes mit 0.82 diesem maximalen Wert jedoch in keinster Weise entspricht, muss von einer partiellen Hydrolyse des zweiten Chloratoms aufgrund der basischen Reaktionsbedingungen ausgegangen werden. Der berechnete Substitutionsgrad an den daraus entstandenen *O*-(2,4-dioxido-1,3,5-triazin-6-yl) (DOT) Gruppen liegt bei $\text{DS}_{\text{DOT}} = 0.18$.

Entsprechend der Funktionalisierung mit der Monochlortriazinyl-Gruppe treten im ^{13}C -NMR-Spektrum von **8** in D_2O neue Signale im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 171.01$ - 170.20 ppm auf, die sich den Signalen der Kohlenstoffatome C-O⁻, C-Cl und COCH₂ der eingeführten MCT-Gruppe zuordnen lassen. Zusätzlich dazu tritt jedoch ein weiteres Signal bei $\delta = 161.02$ ppm auf, welches die partielle Hydrolyse des zweiten Chloratoms bestätigt. Die Signale des Cellulosegrundgerüsts erfahren keine Verschiebung.

3.4 Zusammenfassung

Die Synthese der 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose **2** konnte auf verschiedenen Wegen erfolgreich durchgeführt werden.

Durch Umsetzung von nativer Cellulose mit Allylglycidylether wurde die 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose **1** mit einem maximalen Substitutionsgrad an AHP-Gruppen von $DS_{\text{Allyl}} = 0.57$ bzw. 0.59 dargestellt. Durch nachfolgende Carboxymethylierung von **1** konnte dann die 6-*O*-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose, AHP-CMC **2**, synthetisiert werden. Die bei der Synthese von **2** erzielten Substitutionsgrade an Carboxymethylgruppen betragen $DS_{\text{CM}} = 0.97$ und 1.34 .

Bei der Synthese der AHP-CMC **2** aus der kommerziellen Carboxymethylcellulose (250000 g/mol, $DS_{\text{CM}} = 0.74$, $x_2 = 0.3$, $x_3 = 0.13$, $x_6 = 0.31$) wurden Substitutionsgrade an Allyl-Gruppen von $DS_{\text{Allyl}} = 0.18 - 0.24$ erreicht. NMR-spektroskopische Untersuchungen belegten die regioselektive Substitution in Position C-6 der Glcp-Einheit.

Durch Bromierung der AHP-CMC **2** in wässriger Lösung wurde die Doppelbindung der Allylfunktion zu dem vicinalen Bromalkohol **3** umgesetzt. Dabei wurden Substitutionsgrade von $DS_{\text{Bromid}} = 0.11-0.23$ erreicht. Bei der Synthese der HBrPHP-CMC Na **3** mit einem $DS_{\text{Bromid}} = 0.23$ wurden alle Doppelbindungen vollständig umgesetzt.

Die Substitution von **3** mit Natriumthiosulfat führte zur gewünschten Thiosulfatcellulose HTSHP-CMC Na **4** mit einem Substitutionsgrad an Thiosulfatgruppen von $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.22$.

Aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit und der Tatsache, dass die wässrigen Lösungen keine Tendenz zur Quervernetzung durch Disulfidbrücken aufweisen, eignet sich die HTSHP-CMC **4** sehr gut zur Beschichtung von Metalloberflächen wie Gold und Silber.

Ausgehend von der 6-*O*-(2''-Hydroxypropyl-3''-thiosulfatopropoxy)-carboxymethylcellulose **4** konnten durch Einführung der entsprechenden reaktiven Gruppe das jeweilige neutrale, kationische sowie das anionische Aktivester-Derivat erfolgreich hergestellt werden.

Die Darstellung des neutralen HTSHP-CMC-OSu **5** aus **4** erfolgte in wässriger Lösung durch Umsetzung mit *N*-Hydroxysuccinimid unter Verwendung des Kupplungsreagenzes DCC. Dabei wurde ein Substitutionsgrad an OSu-Gruppen von $DS_{\text{OSu}} = 0.36$ erzielt.

Die Aktivierung der Carboxymethylgruppen der HTSHP-CMC **4** mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC führte zur erfolgreichen Synthese des kationischen Aktivesters **6**. Da dieses

Derivat in wässriger Lösung bereits nach kurzer Zeit zum entsprechenden Harnstoff hydrolysiert, müssen die Lösungen immer frisch hergestellt werden. Es wurden Substitutionsgrade an EDC-Gruppen von $DS_{\text{EDC}} = 0.12$ und 0.27 erzielt.

Durch Umsetzung von **4** mit dem wasserlöslichen 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin (DCT) **7** wurde ein reaktives Derivat mit anionischen MCT-Gruppen (*O*-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazinyl)-Gruppen) **8** hergestellt. Der ermittelte Substitutionsgrad an MCT-Gruppen lag bei $DS_{\text{MCT}} = 0.46$. Dieser niedrige Wert lässt sich damit erklären, dass ein Teil der MCT-Gruppen im Reaktionsverlauf wegen zu basischer Bedingungen zu *O*-(2, 4- dioxido-1, 3, 5-triazin-6-yl)-Gruppen hydrolysiert ist. Der Anteil dieser DOT-Gruppen liegt bei 0.18 .

Alle drei reaktiven Thio-Cellulose-Derivate, HTSHP-CMC-OSu **5**, HTSHP-CMC-EDC **6** und MCT-HTSHP-CMC **8** sind sehr gut wasserlöslich und eignen sich für die Beschichtung von Goldoberflächen. Zudem ermöglichen die eingeführten reaktiven Gruppen eine Anbindung von Biomolekülen über deren Amino-Funktionalitäten. Die reaktiven Thio-CMC-Derivate können daher zur Immobilisierung von Wirkstoffen auf Metalloberflächen eingesetzt werden.

4. Aufbau und Charakterisierung von selbst-organisierenden Monoschichten aus funktionellen Cellulosederivaten auf Goldoberflächen

4.1 Einleitung

Seit einigen Jahren erfährt der Einsatz von organischen ultradünnen Filmen als Beschichtungsmaterial für Oberflächen eine immer größere Nachfrage. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf Mono- bzw. Multischichten, die durch spontane Selbstorganisation geeigneter organischer Moleküle (Monomere oder Polymere) an einer Oberfläche erzeugt werden (self-assembly monolayer, SAMs). Diese SAM-Bildung ermöglicht eine Modifizierung der Oberflächeneigenschaften, wodurch sich ein breites Anwendungsspektrum ergibt. So können SAMs beispielsweise eingesetzt werden, um Metalloberflächen vor Korrosion zu schützen.^[226] Neben dem Einsatz in der Sensortechnik besteht ein sehr großes Interesse darin, mithilfe der SAMs Modellsysteme für das Studium von Biomembranen und biokompatiblen Oberflächen zu entwickeln.^[74]

Voraussetzung für die spontane Selbstorganisation (self-assembly) geeigneter Moleküle auf einer festen Oberfläche sind starke kovalente Wechselwirkungen zwischen Adsorbat und Träger.^[227,228] Diese chemisorbierten Monoschichten sind sehr stabil und weisen eine hohe Lebensdauer auf, sodass sie perfekte Filme für Membranen und Oberflächenmodifizierungen darstellen. Viele verschiedene Systeme sind bereits untersucht worden. Dazu gehören SAMs von Organosilanen auf Siliziumoxid^[93-96], Fettsäuren auf Aluminiumoxid^[99,100] und Amine auf Platin^[101].

Von sehr großem Interesse sind SAMs aus organischen Verbindungen, die über eine Schwefelkopfgruppe kovalente Bindungen an Gold ermöglichen. Die einzige Beschränkung, die diesen Systemen auferlegt ist, betrifft die Schwanzgruppen. Sie sollten möglichst wenig mit den Goldsubstraten wechselwirken, und auch nicht mit den Thiolgruppen reagieren. Aufgrund seiner positiven Eigenschaften (inertes Verhalten gegenüber vielen anderen Stoffen, keine Anfälligkeit für Oxidation an der Oberfläche) stellt Gold ein ideales Trägermaterial (Substrat) dar.

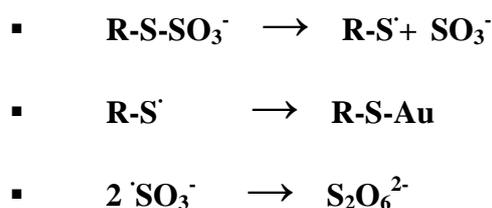
Vor allem Alkanthiole, Alkylsulfide und Dialkylsulfide eignen sich besonders gut für eine solche Oberflächenmodifizierung auf Gold.^[112]

Die Schwefelkopfgruppen der Alkanthiole ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{X}$, mit $1 \leq n \leq 22$, $\text{X} = \text{H}, \text{OH}, \text{COOH}$) bilden mit dem Goldsubstrat Thiolate. Deren starke Bindungsenergie von $184 \text{ kJ/mol}^{[74]}$ ist die treibende Kraft für die Ausbildung der stabilen hochgeordneten Monoschichten. Daneben bilden, nach Spaltung ihrer S-S-Bindung, auch Alkyldisulfide stabile Thiolatbindungen mit der Goldoberfläche aus.^[108,229-232]

Dagegen basiert die Adsorption von Dialkylsulfiden auf koordinativen Bindungen zwischen Schwefel und Gold. Den Nachweis dazu erbrachten *Beulen et al.* mittels XPS und TOF-MS-Messungen.^[233] Für eine Spaltung der C-S-C-Bindung wurden keine Anhaltspunkte gefunden. Auch aus Cyclodextrin-Thiolderivaten^[116,117,234,235], Cyclodextrinsulfiden^[119] und Ferrocensulfiden^[109,236] können selbst-organisierende Monoschichten auf Goldoberflächen erzeugt werden.

Ende der Neunziger Jahre berichteten *Lukkari et al.* über organische monomere Thiosulfatverbindungen, die unter Sauerstoffausschluss stabile Monoschichten auf Gold ausbilden.^[107]

In jüngerer Zeit erfahren vor allem polymere Schwefel-enthaltende Verbindungen ein besonderes wissenschaftliches Interesse. Durch molekulare Selbstorganisation von polymeren Thioderivaten lassen sich Monoschichten wie beispielsweise funktionalisierte Dextranschichten auf Gold (Biacore) erzeugen, die im medizinischen Bereich Verwendung finden.^[221-223] Daneben werden auch Cellulosederivate eingesetzt, die sich aufgrund ihrer Kettensteifigkeit hervorragend zur Erzeugung von Mono- und Multischichten auf planaren Trägern eignen.^[79,82-89] Thiocellulosederivate, wie die von *Wenz et al.* entwickelten wasserlöslichen Bisthiosulfat-^[25,104] und Thiosulfatcellulosen^[25], bilden innerhalb weniger Minuten stabile Monoschichten auf Gold aus. Durch homolytische Spaltung der S-S-Bindung der Thiosulfatgruppen entstehen zunächst Thioradikale, die anschließend oxidativ an die Goldoberfläche addiert werden.^[25,115,228] XPS-Messungen bestätigten die Ausbildung von stabilen kovalenten Au-S-Bindungen.^[104] Neben den Thioradikalen entstehen bei der homolytischen Spaltung auch immer Sulfitradikale, die jedoch gleich zum Dithionat dimerisieren.^[23,112,228,237]



Die sehr gut wasserlöslichen Thiosulfat- und Methylthio-carboxymethylcellulosen^[121] bilden ebenfalls stabile selbst-organisierende Monoschichten auf Goldoberflächen aus. Da deren wässrige Lösungen im Gegensatz zu Bisthiosulfatcellulosen stabil sind gegenüber Quervernetzung durch Disulfidbrücken, erfolgt die Ausbildung dieser Monoschichten um einiges schneller und effektiver.

Eine Vielzahl analytischer Methoden steht zur Verfügung, mittels derer man u. a. Informationen über Dicke, Orientierung, Beschaffenheit und Belegungsdichte der zu untersuchenden Oberfläche erhalten kann. (Tabelle 4.1)

Tab. 4.1: Charakterisierungsmethoden für Oberflächenbeschichtungen

Methode	Eigenschaften	Information
AFM	Wechselwirkungskraft	Molekulare und supramolekulare Struktur
Cyclovoltammetrie	Ladungsstrom	Kapazität / Dicke
Ellipsometrie/ SPR-Spektroskopie	Reflektivitätskurven von polarisiertem Licht	Brechungsindex, Filmdicke
Impedanzspektroskopie	Komplexer Widerstand	Belegungsdichte
Infrarot-/ Ramanspektroskopie	Optische Adsorption	Chemische Struktur, Molekulare Orientierung
Kontaktwinkel	Benetzbarkeit	Oberflächenpolarität
XPS	Bindungsenergie	Element-Zusammensetzung Oxidationsstufe
SIMS	Sek. Elektronenenergie	Chem. Zusammensetzung
STM	Tunnelstrom	Molekulare Struktur

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung der einzelnen Schichten die Oberflächenplasmonenspektroskopie (Surface Plasmon resonance, SPR) eingesetzt. Der

Vorteil dieser Messtechnik liegt darin, dass es sich um eine in situ Methode handelt, mittels derer die Abscheidung direkt verfolgt werden kann.

4.2 Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Die Adsorption von Molekülen an Metalloberflächen wie Gold oder Silber kann in situ mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie verfolgt werden. Dabei erhält man Informationen über die Dicke der adsorbierten Schicht in Abhängigkeit ihres Brechungsindex. Auch lässt sich mit dieser Methode der schrittweise erfolgende Aufbau von Multischichtsystemen beobachten, und somit ein Architekturaufbau kontrollieren. Darüber hinaus kann die in Echtzeit erfolgende zeitaufgelöste Messung von Adsorptionsprozessen an Oberflächen, d. h. die Adsorptionskinetik von Monolagen dargestellt werden.

Oberflächenplasmonen (Plasmon Surface Polaritons, PSP) stellen longitudinale Ladungsdichtewellen des freien Elektronengases eines Metalls dar, die sich entlang der Grenzfläche zwischen dem Metall und einem Dielektrikum ausbreiten.^[238] Durch das Einkoppeln von Licht kommt es an dieser Grenzfläche zur Reflexion und Transmission eines Lichtstrahls, welcher unter bestimmten experimentellen Bedingungen zur resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen führen kann. Voraussetzung dafür ist, dass die Oberflächenplasmonen und die verwendeten Photonen in ihrer Energie ($E = h\nu$) und ihrem Impuls ($p = h/\lambda$) übereinstimmen. Ist dies nicht der Fall, kann es zu keiner Anregung der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Metall/Luft kommen.

Durch Variation des internen Einfallswinkel ϕ des Lichtes lässt sich der Wellenvektor der Photonen jedoch dem Wellenvektor der Oberflächenplasmonen soweit anpassen, bis die Resonanzbedingungen erfüllt sind.^[239-242] Die evaneszente Welle des einfallenden Lichtes ist nun in der Lage mit den Plasmonen (freien oszillierenden Elektronen) im Metallfilm zu wechselwirken. Dadurch wird dem einfallenden Lichtstrahl Energie entzogen und die Intensität des reflektierten Lichtes reduziert, was schließlich detektiert werden kann.

Zur Anregung der Oberflächenplasmonen wird in den meisten SPR-Geräten die Kretschmann-Konfiguration eingesetzt.^[243,244] (Abbildung 4.1)

Dabei wird ein Prisma oder ein Glassubstrat, welches plan auf der Prismenoberseite aufliegt, mit einem etwa 40 – 50 nm dicken Metallfilm (z. B. Au, Ag) beschichtet. Die Anregung der Oberflächenplasmonen erfolgt durch monochromatisches, p-polarisiertes Licht. Nach

Auftreffen auf das Prisma wird ein Teil des Strahls gebrochen, der andere Teil an der Innenseite des Prismas reflektiert.

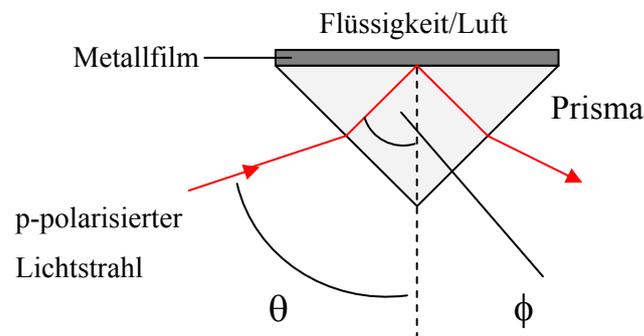


Abb. 4.1: Kretschmann-Konfiguration zur Anregung von Oberflächenplasmonen

Mit zunehmendem Einfallswinkel steigt auch der Brechungswinkel. Bei einem bestimmten Einfallswinkel der Strahlung (Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c) erreicht der Brechungswinkel 90° . Oberhalb dieses Winkels wird der Lichtstrahl nicht mehr gebrochen, sondern komplett reflektiert. In diesem Bereich dringt ein evaneszenter Anteil des elektromagnetischen Feldes durch die dünne Metallschicht ein und regt unter dem Resonanzwinkel ϕ_0 die Plasmonen an. (Totale interne Reflexion = Attenuated total reflection, ATR).

Die Reflexionskurve des zur Anregung verwendeten Lichts weist bei maximaler Resonanz am Winkel θ_0 aufgrund der Energiedissipation durch das Oberflächenplasmon ein Minimum. (Abb. 4.2 a), Kurve ($R(\theta_0)$) auf.

Durch Adsorption einer zusätzlichen dünnen, dielektrischen Schicht, z. B. Cellulose, mit einem Brechungsindex $n_{\text{Schicht}} > n_d$ auf die Metalloberfläche ändert sich die Dielektrizitätskonstante ϵ_D an der Grenzschicht und damit auch die Dispersionsrelation (Beziehung zwischen Energie und Impuls) des Oberflächenplasmons. Durch Zunahme der Schichtdicke d_{Schicht} und des Brechungsindex n_{Schicht} wird der Resonanzwinkel des Plasmons zu größeren Winkeln verschoben ($\theta_0 \rightarrow \theta_1$) (Abb. 4.2, Kurve ($R(\theta_1)$)). Eine Verkleinerung des Brechungsindex würde dementsprechend eine Verschiebung zu kleineren Winkel bewirken. Gleichung 4.1 beschreibt die Proportionalität der Resonanzwinkeldifferenz $\Delta\theta$ zur optischen Dicke dieser zusätzlichen Schicht:

$$\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0 \approx \Delta n * d_{\text{Schicht}} \quad \Delta n = n_{\text{Schicht}} - n_{\text{LM}} \quad (4.1)$$

Der kritische Winkel der Totalreflexion (Abb. 4.3), θ_c , wird nur durch die Brechungsindizes von Prisma und Lösungsmittel (LM) bestimmt. Dabei gilt:

$$\sin \phi_c = \frac{n_{LM}}{n_p} \quad (4.2)$$

Sind die Brechungsindizes von Prisma, Gold, adsorbiertem Material und Lösungsmittel bekannt, lässt sich aus der Winkelverschiebung $\Delta\theta$ die Schichtdicke des Adsorbats bestimmen.^[245,246]

Auch die Änderung des Resonanzwinkels kann mit dieser Methode verfolgt werden. Durch eine zeitabhängige Messung der Resonanzminima erhält man den kinetischen Verlauf der Adsorption (Abb. 4.2 b)).

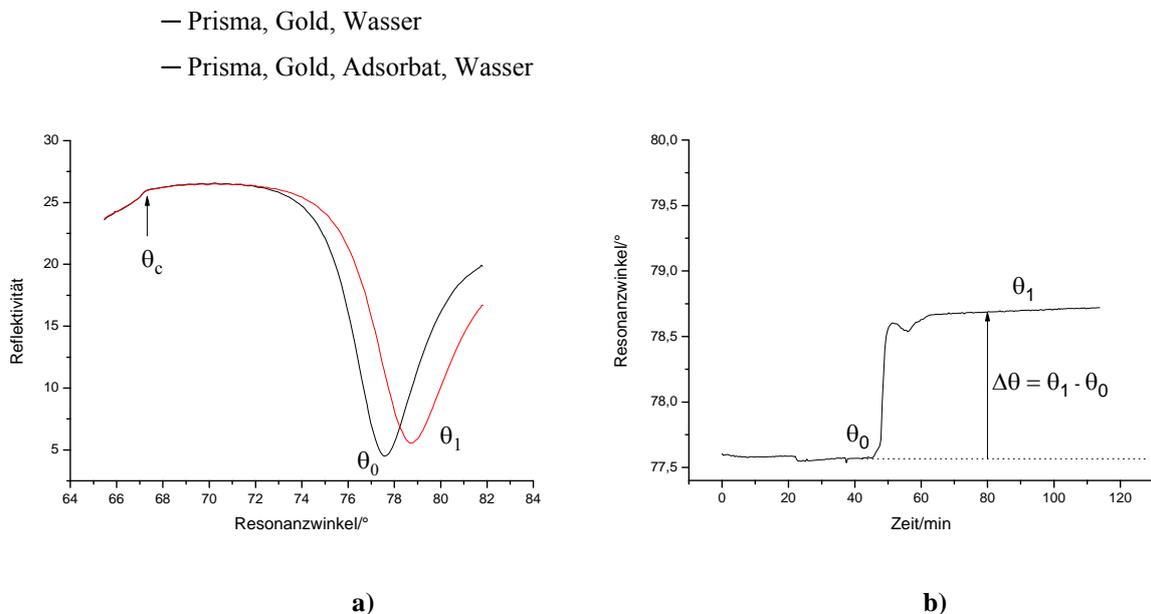


Abb. 4.2: a) Reflektivitätskurven vor ($R(\theta_0)$) und nach ($R(\theta_1)$) Adsorption einer dielektrischen Schicht auf Gold
b) Adsorptionskinetik des Schichtsystems

In der vorliegenden Arbeit wurde die in situ Kontrolle des Schichtaufbaus der Thio-Cellulose-Derivate, sowie die Bestimmung der jeweiligen Schichtdicken mithilfe des Bio-Suplar II Gerätes (Mivitec GmbH, Regensburg) durchgeführt.

Die Auswertung der gemessenen Reflektivitätskurven erfolgte mit der am Max Planck-Institut für Polymerforschung entwickelte Auswertungs-Software Winspall (2.20). Dazu müssen die Wellenlänge des eingesetzten Lasers, der Prismenwinkel und die Brechungsindizes der jeweils gemessenen Schichten eingegeben werden. Die experimentellen Reflexionskurven

werden zunächst mithilfe des Programms Origin auf den äußeren Winkel der Totalreflexion, $\theta_c = 50.2^\circ$; bei einem Prismenwinkel von $2 \times 25^\circ$, kalibriert und anschließend in die Auswertungs-Software eingelesen.^[121,123]

Zur Auswertung der gemessenen Reflexionskurven wird eine theoretische Simulationskurve benötigt. Diese Simulationskurve wird vom Auswerteprogramm für das 3-teilige Schichtsystem Prisma / Metall / Lösungsmittel ermittelt. Durch Variation der Parameter für Gold, Brechungsindex n und Schichtdicke d , wird die für dieses Schichtsystem gemessene Kurve an die entsprechende simulierte Kurve angeglichen.

Nach Adsorption der zusätzlichen Polymerschicht auf die Goldoberfläche wird die zugehörige Reflexionskurve mit der theoretischen Kurve zur Übereinstimmung gebracht, indem die Schichtdicke d des Adsorbats bei bekanntem Brechungsindex n_{Adsorbat} variiert wird.

Sind die beiden Kurven deckungsgleich, lässt sich die gesuchte Schichtdicke einfach ablesen. Als Beispiel wird in Tabelle 4.2 das Schichtsystem für die Bestimmung der Schichtdicke der HTSHP-CMC-EDC **6** auf Gold gezeigt.

Tab. 4.2: Schichtsystem für die Ermittlung der Schichtdicke der auf Gold abgeschiedenen HTSHP-CMC-EDC **6**.

Material	Schichtdicke [nm]	Brechungsindex	
		Realteil	Imaginärteil
Glas	0	1.616	0
Gold	4.16	0.092	3.84
HTSHP-CMC-EDC 6	1.9	1.47	0
Lösungsmittel	0	1.33	0

4.3 Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der Thiocarboxymethylcellulosederivaten 4, 5, 6 und 8 auf Gold

Mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie sollen für ausgewählte Thiocarboxymethylcellulosen die Schichtdicken und die entsprechenden Oberflächenbelegungen nach ihrer Abscheidung auf Gold ermittelt werden. Durch Vergleich der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der HTSHP-CMC **4** mit denen der reaktiven Derivate HTSHP-CMC-OSu **5**, HTSHP-CMC-EDC **6** und MCT-HTSHP-CMC **8** soll der Einfluss der reaktiven Gruppen auf die Adsorption untersucht werden.

Um eine genaue Bestimmung der Schichtdicken der adsorbierten Thiocellulosederivate auf Gold zu gewährleisten, müssen deren genaue Brechungsindizes n bekannt sein, da für den experimentell bestimmten Resonanzwinkel unendlich viele Kombinationen aus Filmdicke und Brechungsindex existieren. Will man aus den bekannten Schichtdicken die Oberflächenbelegung berechnen, so muss man das Brechungsindexinkrement, dn/dc der einzelnen Derivate kennen.^[247]

Bordeanu ermittelte den Brechungsindex der Thio-Carboxymethylcellulose HTSHP-CMC **4** aus einer Kalibriergeraden $H_{\text{TSHP-CMC-OSu}}(H_{\text{TSHP-CMC-OSu}})$, mit n = Brechungsindexäquivalente und w = Massenbruch der Thiosulfatcellulose:

$$H_{\text{TSHP-CMC-OSu}} = 1.47 \pm 0.005$$

Die Brechungsindexäquivalente $H_{\text{TSHP-CMC-OSu}}$ der HTSHP-CMC wurden dazu aus einer Kalibriergeraden $n(\text{RI})$ für KCl und Rohrzucker bestimmt. Das Brechungsindexinkrement von **4** ergab sich aus der Steigung der Geraden $H_{\text{TSHP-CMC-OSu}}(H_{\text{TSHP-CMC-OSu}})$, mit c = Konzentration der HTSHP-CMC-Lösungen.^[123]

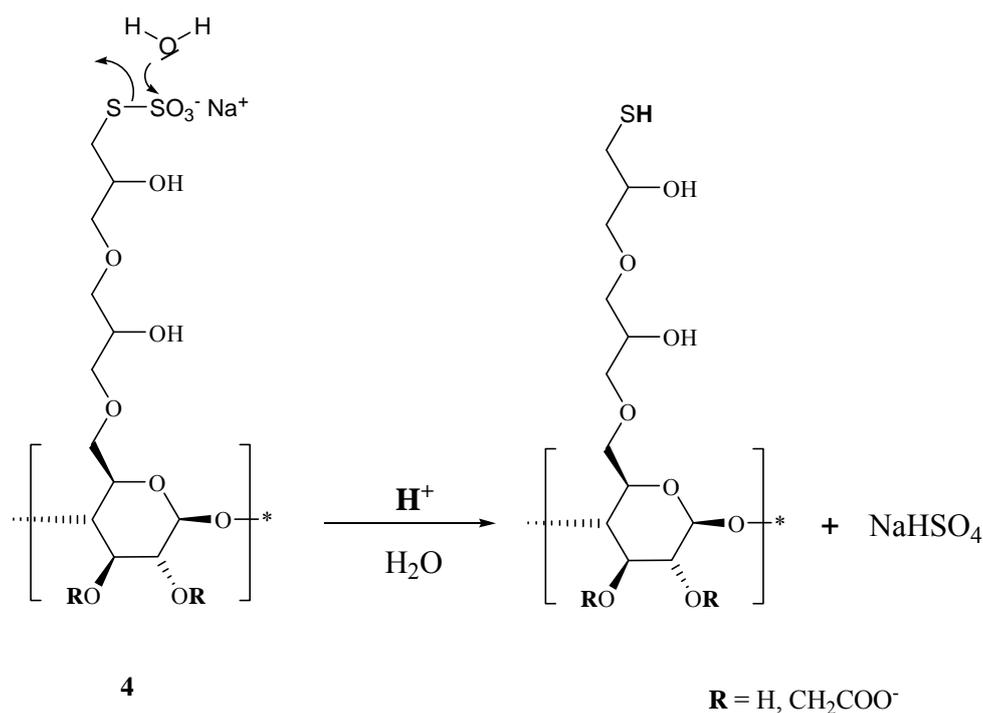
$$\frac{dn}{dc} = 0.14 \text{ ml/g}$$

Für die Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der Thiocellulosederivate werden im Folgenden die Werte für n und dn/dc für alle Cellulosederivate verwendet.

Der Aufbau der Monoschichten mit den thiofunktionalisierten Cellulosen **4**, **5**, **6** und **8** erfolgte durch Chemisorption aus den wässrigen Lösungen der entsprechenden Thiocellulosederivate erst nach Aktivierung ihrer Thiosulfatgruppen durch Umwandlung zum entsprechenden Thiol.

In der organischen Synthese sind dafür verschiedene Methoden bekannt. So kann die Umwandlung zum Thiol entweder durch saure Hydrolyse^[248] oder durch Spaltung der S-S-Bindung der Thiosulfat-Gruppen mit Boranen^[249], Phosphenen^[250] oder H^+/Zn erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reaktion je nach eingesetztem Thiocellulosederivat durch saure Hydrolyse oder mittels Einsatz von Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP) durchgeführt.

Die Aktivierung der Thiosulfatgruppen der HTSHP-CMC **4** und des Monochlor-triazinylderivats **8** erfolgte mittels Zitronensäure in wässriger Lösung, wobei die S-S-Bindungen der Thiosulfatgruppen säurehydrolytisch gespalten werden. (Schema 4.1).



Schema 4.1: Säurehydrolytische Spaltung der Thiosulfatgruppe in HTSHP-CMC **4**

Um eine vollständige Aktivierung der Thiosulfatgruppe der HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.22$) zu gewährleisten, wurde eine 0.1%-ige Lösung von **4** in 0.2 M Zitronensäure 1h bei RT gerührt. Nach Injektion dieser Lösung in das SPR-Gerät wurde die Geschwindigkeit, mit der der Adsorptionsprozess von **4** auf Gold abläuft in situ verfolgt. Abbildung 4.3 zeigt die

entsprechende Kinetikkurve. Bei einem Fluss von 34 $\mu\text{l}/\text{min}$ hat sich bereits nach 30 min eine stabile Monoschicht ausgebildet.

Aus der Aufnahme der Reflexionskurven in Abhängigkeit des Einfallswinkels lässt sich die Änderung der Schichtdicken bestimmen.

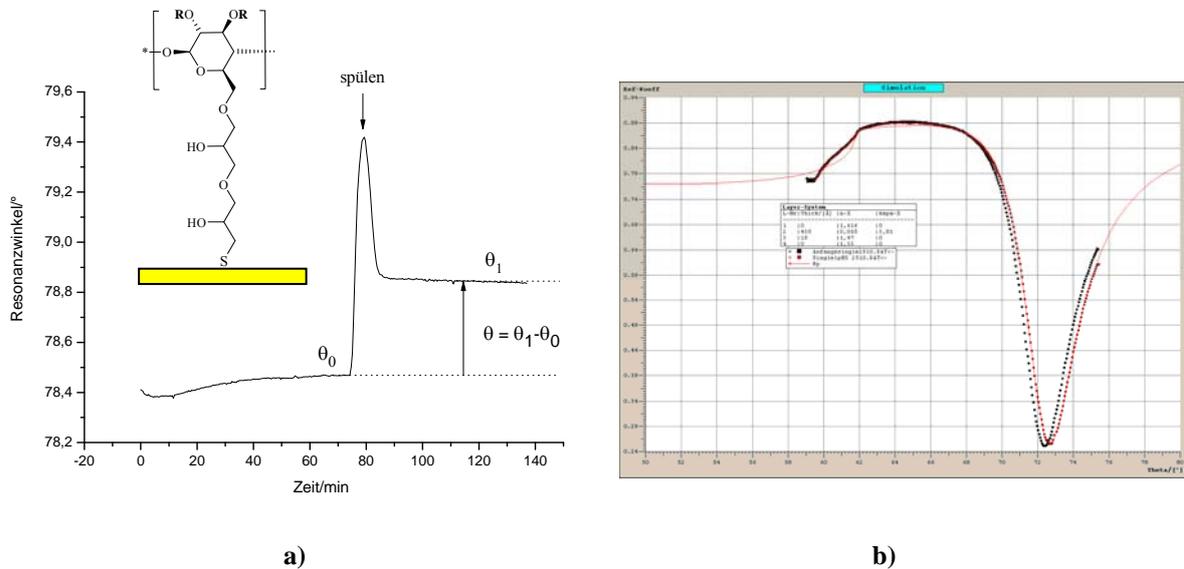


Abb. 4.3 a) Adsorptionskinetik der HTSHP-CMC auf Gold aus einer 0.1%-igen Lösung von **4** in 0.2M Zitronensäure

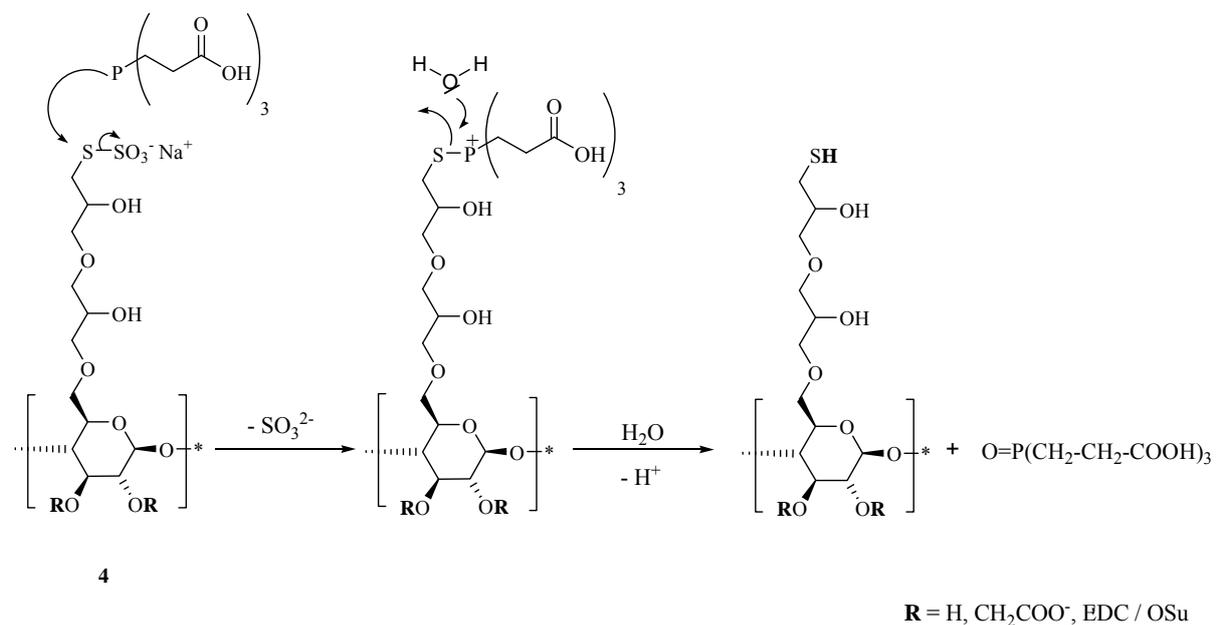
b) Reflexionskurve zur Bestimmung der Schichtdickenänderung nach Adsorption von **4** auf Gold

Im Auswertprogramm (Winspill 2.20) wird dazu die nach der Abscheidung von **4** gemessene Reflexionskurve $R(\theta)$ (Abb. 4.3 b) Kurve (—) an die theoretische Simulationskurve (Abb. 4.3 b) Kurve (---) angepasst, und daraus die Schichtdicke von **4** auf Gold ermittelt. Für die einfache Thiocarboxymethylcellulose **4** wurde dabei eine Schichtdicke von 2.1 ± 0.2 nm bestimmt.

Die Abhängigkeit der Adsorptionskinetik von der Konzentration der eingesetzten Bunte-Salz-Lösungen wurde bereits von *Bordeanu* untersucht.^[123] Er erhielt bei Beschichtungen unter dynamischen Bedingungen (konstanter Fluss) bei niedrigeren Konzentrationen auch einen geringeren Schichtzuwachs. Je geringer die Teilchendichte der Cellulosemoleküle in Lösung ist, desto länger brauchen sie, um an die Metalloberfläche zu gelangen und dort zu adsorbieren. Daher wird unter dynamischen Bedingungen ein großer Teil der Cellulosemoleküle ausgespült, bevor sie an der Goldoberfläche adsorbieren können.

Ein ähnliches Verhalten konnte auch unter statischen Bedingungen beobachtet werden.^[121]

Der Aufbau der Monoschichten aus den reaktiven Thio-Cellulose-Derivaten **5** und **6**, erfolgte analog durch Chemisorption aus den wässrigen Lösungen. Aufgrund der Säure/Base-Labilität der reaktiven Ester kann die Aktivierung der Thiosulfatgruppe jedoch nicht durch saure Hydrolyse erfolgen. Daher wurde das wasserlösliche Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP) zur Spaltung der S-S-Bindungen der Thiosulfatgruppen eingesetzt.^[250] Durch Verwendung von TCEP kann die Reaktion in einem pH-Bereich von 5-8 durchgeführt werden kann. Der Mechanismus der Reduktion ist in Schema 4.2 dargestellt. Auch hier erfolgt eine Umsetzung der Thiosulfatgruppen zum Thiol.



Schema 4.2: Mechanismus der Reduktion eines reaktiven Thio-CMC Derivats mit Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP) in Wasser.

Zur Abscheidung auf Gold wurden von beiden Aktivestern 0.1%-ige Lösungen in 0.4 M Acetapuffer (pH 6.5) hergestellt. Die Lösungen wurden nach Zugabe von TCEP 1h bei RT geschüttelt, um eine vollständige Aktivierung der Thiosulfatgruppen zu erzielen. Abbildung 4.4 zeigt die Adsorptionskinetiken der beiden reaktiven Derivate. Um eine vollständige Beschichtung der Goldoberfläche zu gewährleisten wurde eine niedrigere Flussrate gewählt, sodass sich erst nach etwa 1h stabile Monoschichten ausbildeten.

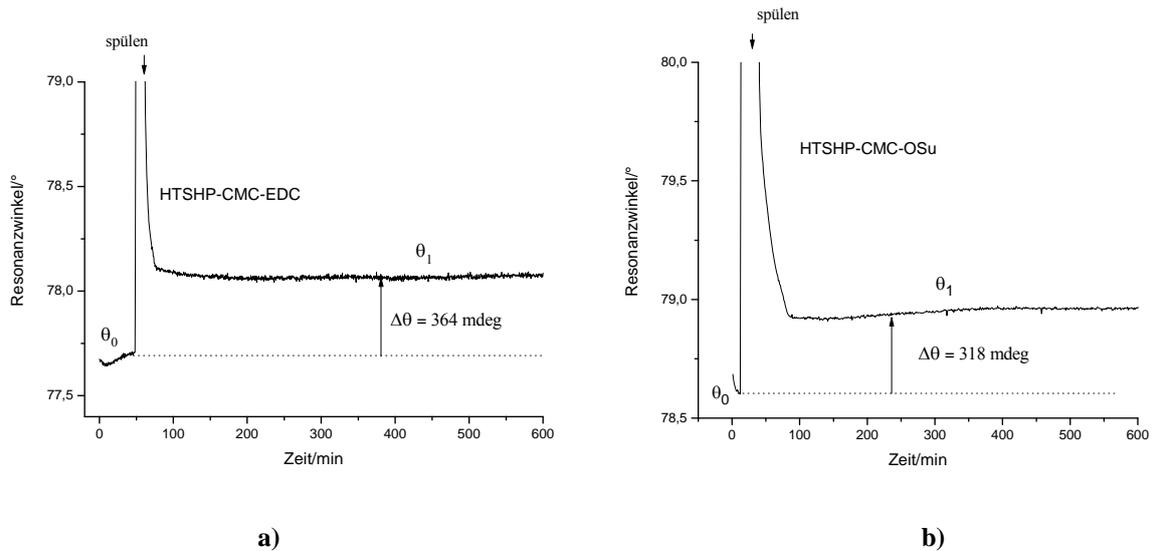


Abb. 4.4: Adsorptionskinetiken von a) HTSHP-CMC-EDC **6** und b) HTSHP-CMC-OSu **5** auf Gold (Flussrate: 11 μ l/min) nach Aktivierung mit TCEP in 0.4 M Acetatpuffer (pH6.5)

Die Abscheidung des dritten reaktiven Derivats, der MCT-HTSHP-CMC **8** konnte dagegen aufgrund der Stabilität der MCT-Gruppen gegenüber Säuren aus einer 0.1%-igen Lösung in 0.2 M Zitronensäure erfolgen.

Die Bestimmung der Schichtdicken der reaktiven Derivate erfolgte ebenfalls durch Auswertung der zugehörigen Reflexionskurven. (Tab. 4.2)

Aus der Schichtdicke der adsorbierten Thio-Cellulose-Derivate lassen sich unter Berücksichtigung der Brechungsindexinkremente die entsprechenden Oberflächenbelegungen Γ berechnen.^[247] Dabei gilt:

$$\Gamma = \frac{dc}{dn} \cdot \Delta n \cdot d \quad (4.5)$$

Γ : Oberflächenbelegung [mg/m^2 oder ng/mm^2]

$\frac{dn}{dc}$: Brechungsindexinkrement [ml/mg oder ml/g]

$\Delta n \cdot d$: optische Dichte [nm],

Δn : Differenz zwischen $n_{\text{HTSHP-CMC}}$ und $n_{\text{Lösungsmittel}}$;

d : Schichtdicke der adsorbierten Thio-CMC auf Gold

Am Beispiel der HTSHP-CMC **4** soll die Umrechnung der Schichtdicke in die entsprechende Oberflächenbelegung verdeutlicht werden:

$$d_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.6 \text{ nm} = 1.6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$$

$$\frac{dn}{dc} = 1.40078 \cdot 10^{-4} \frac{\text{cm}^3}{\text{mg}} \Rightarrow \frac{dc}{dn} = 7.138 \cdot 10^3 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}$$

$$\Delta n = n_{\text{HTSHP-CMC}} - n_{\text{Wasser}} = 1.47 - 1.33 = 0.14$$

$$\Rightarrow \Gamma_{\text{HTSHP-CMC}} = \frac{dc}{dn} \cdot \Delta n \cdot d_{\text{HTSHP-CMC}} = 7.138 \cdot 10^3 \cdot 0.14 \cdot 1.6 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mg}}{\text{cm}^2}$$

$$\Rightarrow \Gamma_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.59 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mg}}{\text{cm}^2} = 1.59 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mg}}{10^{-4} \text{ m}^2}$$

$$\Rightarrow \Gamma_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.59 \frac{\text{mg}}{\text{m}^2}$$

In Tabelle 4.3 sind die ermittelten Schichtdicken sowie die daraus berechneten Oberflächenbelegungen aller Thio-CMC Derivate zusammengestellt.

Tab. 4.3: Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der HTSHP-CMC **4** und ihrer reaktiven Derivaten **5**, **6** und **8** (DS: Substitutionsgrad an funktionellen Gruppen, $\Delta\theta$: Schichtzuwachs, d: Schichtdicke, Γ = Oberflächenbelegung)

Thio-CMC	Funktionalität	DS	$\Delta\theta$ [mdeg]	d [nm]	Γ [mg/m ²]
4	Thiosulfat	0.22	198	1.6 ± 0.1	1.59 ± 0.1
5	Thiosulfat OSu	0.13 0.36	313	1.8 ± 0.2	1.79 ± 0.2
6	Thiosulfat EDC	0.08 0.27	379	2.1 ± 0.2	2.09 ± 0.2
8	Thiosulfat MCT	0.1 0.46	266	1.7 ± 0.2	1.69 ± 0.2

4.4 Zusammenfassung

Der Aufbau von Monoschichten auf Goldoberflächen erfolgte durch Adsorption der synthetisierten thiofunktionalisierten Carboxymethylcellulose-Derivate HTSHP-CMC **4**, HTSHP-CMC-OSu **5**, HTSHP-CMC-EDC **6** und MCT-HTSHP-CMC **8** aus wässriger Lösung.

Der Aufbau selbstorganisierender Monoschichten aus reaktiven Thio-CMC Derivaten wurde am Beispiel der einfachen Thiosulfatcellulose HTSHP-CMC **4** und des kationischen Aktivesters HTSHP-CMC EDC **6** dargestellt.

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) konnte die Abscheidung der verschiedenen Derivate insitu kontrolliert und untersucht werden.

Durch Aufnahme der jeweiligen Reflektivitätskurven konnten die Schichtdicken d der reaktiven Derivate ermittelt werden. Die Auswertung dieser Kurven erfolgte mit dem Programm Winspall 2.0.

Die ermittelte Schichtdicke der HTSHP-CMC **4** ist mit $d = 1.5 \pm 0.1$ nm etwas kleiner als die Schichtdicken ihrer reaktiven Analoga, die in einem Bereich von $d = 1.7-2.3 \pm 0.2$ nm liegen. Nach Gleichung (4.3) ließen sich Oberflächenbelegungen von $\Gamma = 1.69$ bis 2.29 ± 0.2 mg/m² für die reaktiven Derivate **5**, **6** und **8** sowie $\Gamma = 1.59 \pm 0.1$ mg/m² für die einfache Thiosulfatcellulose **4** berechnen.

Aus den in Tabelle 4.3 zusammengefassten Werten lässt sich die größte Schichtdicke resp. Oberflächenbelegung bei Monoschichten des kationischen EDC-Aktivesters, der HTSHP-CMC-EDC **6** beobachten, was auch durch zahlreiche Wiederholungsmessungen bestätigt werden konnte.

5. Aktivität von immobilisierten Enzymen an reaktiven Thio-carboxymethylcellulosemonoschichten

5.1 Einleitung

Die Immobilisierung von Enzymen ist ein biotechnologisches Verfahren, das seit den 60er Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnt. Durch die seitdem erzielten Fortschritte bei der Erforschung der Technik zur Immobilisierung von Enzymen^[251] hat das Basiswissen über die verschiedenen Enzymimmobilisierungsverfahren sehr stark zugenommen.^[252-254]

Die Anwendung von frei suspendierten Enzymen bringt bekanntermaßen einige Nachteile mit sich. Unter normalen Arbeitsbedingungen sind Enzyme nicht besonders stabil und haben daher auch nur eine sehr begrenzte Lebenszeit. Ein weiteres Problem besteht in ihrer guten Wasserlöslichkeit, wodurch die Abtrennung der Enzyme von ihren Substraten bzw. den hergestellten Produkten sehr erschwert wird. Enzyme werden durch die von ihnen katalysierten Reaktionen zwar nicht verbraucht, trotzdem ist durch den Einsatz im gelösten Zustand eine kontinuierliche Verwendbarkeit kaum möglich. Auch eine Wiederverwendung der Enzyme ist schwierig.

Diese Probleme können durch Immobilisierung von Enzymen umgangen werden. Dabei werden die Biokatalysatoren unter Erhalt ihrer katalytischen Aktivität an wasserunlösliche Träger geknüpft, wodurch das Enzym zunächst an Stabilität gegenüber den freien Enzymen gewinnt. Die immobilisierten Enzyme können nach der Reaktion mitsamt ihrer Trägersubstanz durch relativ einfache Methoden von der Reaktionslösung abgetrennt und anschließend wiederverwendet werden.

Trotzdem bringt diese Anwendung auch Nachteile mit sich. Aufgrund der Fixierung an wasserunlösliche Träger wird leider auch eine Verschlechterung der Löslichkeit bzw. der Beweglichkeit der Enzyme beobachtet. Dies führt dazu, dass ihre Zugänglichkeit zu Effektoren sowie bindenden und wechselwirkenden Liganden stark eingeschränkt wird. Darüber hinaus kommt es in der Regel zu Veränderungen der physikochemischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des Enzyms. So kann beispielsweise die Heterogenität dieses Prozesses zur Beschränkung der Diffusion und dadurch zu einem Verlust an Aktivität führen.

Die Immobilisierung der Enzyme kann auf verschiedenen Wegen realisiert werden. Sehr häufig erfolgt sie durch ionische, adsorptive oder kovalente Bindung an ein festes Trägermaterial.

Weitere Möglichkeiten bestehen in dem Einschluss der Enzyme in permeablen Membranen (Membranabtrennung) oder in die Matrix eines Polymers (Matrixeinhüllung). Dazu werden sowohl künstliche Polymere wie Polyacrylamid und Polystyrol als auch natürliche Polymere wie Alginat, Gelatine, Agar-Agar oder Carrageenan verwendet.^[255]

Bekannte Trägermaterialien, die zur Anbindung an Enzymen genutzt werden, sind vor allem Polysaccharide wie Dextran^[256], Cellulose^[257,258], Sephadex^[259,260], Chitin und Chitosan^[261], wobei sich gerade die Cellulosestrukturen aufgrund ihrer biokompatiblen Eigenschaften hervorragend für die Anwendung zur Enzymimmobilisierung eignen.^[262]

Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht über literaturbekannte Anwendungen von Cellulose bzw. von löslichen als auch unlöslichen Cellulosederivaten als Trägermaterialien zur Enzymimmobilisierung.

Tabelle 5.1: Ausgewählte Beispiele für Enzymimmobilisierungen an Cellulosederivaten (AE: Aminoethyl; DEAE: Diethylaminoethyl; TEAE: Triethylaminoethyl; CM: Carboxymethyl)

Cellulosederivat	Art der Immobilisierung	Enzyme
Cellulosebutylacetat	Einbettung im Träger	z. B. Urease ^[263]
DEAE-, TEAE-Cellulose	Ionische Bindung	z. B. Catalase Invertase, Pepsin, Aspartase ^[264]
p-Aminobenzylcellulose	Diazo-Kupplung	z. B. Catalase, Invertase, Pepsin, Aspartase ^[265]
CM-Cellulose, AE-Cellulose	Carbodiimid-Methode	z. B. Peroxidase, Urease ^[182]
Nitrocellulose Membranen	Membran Einbettung	z. B. Glucose-Oxidase, Peroxidase ^[266]
Bromcyan aktivierte Cellulose	Bromcyan-Aktivierung	z. B. Xanthin-Oxidase, Lactase, Dextranase ^[267]

In der Biotechnologie oder in der praktischen Biochemie werden häufig Cellulosederivate als unlösliche Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie und zur Immobilisierung von Enzymen und Immunoproteinen verwendet.^[197,265-269]

Von sehr großem Interesse ist der Einsatz funktioneller Cellulosederivate auf dem Gebiet der (bio)chemischen Sensortechnologie, wo sie vor allem zum Aufbau von Enzym- und Immunosensoren^[270-272] verwendet werden. Die Cellulosederivate sollen darin eine Verringerung der Elektronenübertragungsbarriere zwischen Enzymstruktur und Arbeitselektrode ermöglichen und die Signalübertragung verbessern.^[273-275]

Als Analyt-Erkennungssysteme in diesen Sensoren werden häufig Oxidoreduktaseenzyme wie z. B. die Glucose-Oxidase (GOD), die Lactat-Oxidase und die Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) eingesetzt. Auch hierbei gibt es verschiedene Immobilisierungsansätze:

- ionisch, kovalent^[266,276]
- Vernetzung (cross-linking)^[277]
- auf Bioaffinität basierende Methoden^[277]
- Propfpolymerisation^[278] und Einschluss^[279,280]

Vor allem die Immobilisierung durch kovalente Anbindung ist von großer Bedeutung, da dadurch die aktive Konformation des immobilisierten Enzyms stabilisiert und somit auch die Enzymaktivität deutlich erhöht werden kann.^[281,282]

In der vorliegenden Arbeit sollen die wasserlöslichen reaktiven Thio-CMC Derivate **5**, **6** und **8** als Substrate zur kovalenten Immobilisierung der HRP an Gold eingesetzt werden. Durch Aufnahme von Michaelis-Menten-Kinetiken der immobilisierten Meerrettichperoxidase bei verschiedenen pH-Werten sollen Aussagen über die Aktivität des Enzyms getroffen werden.

5.2 Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase = HRP)

Die Meerrettichperoxidase (HRP) ist ein hämhaltiges Enzym, welches Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dazu benutzt, um eine Vielzahl von organischen und anorganischen Verbindungen zu oxidieren. HRP ist ein sehr weit verbreitetes Enzym und wird kommerziell genutzt, z. B. als Komponente für klinisch diagnostische Kits und für Immunoassays. Obwohl sie bereits seit mehr als hundert Jahren erforscht wird, sind erst in jüngerer Zeit große Fortschritte im strukturellen und funktionellen Verständnis der HRP erzielt worden. Die erfolgreiche Produktion von rekombinanten Enzymen^[283] führte Mitte der neunziger Jahre zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der HRP mittels Röntgenkristallographie^[284] (Abb. 5.1), ihres katalytischen Mechanismus, der Intermediate, die im katalytischen Zyklus des Enzyms entstehen, sowie der Funktion von spezifischen Aminosäureresten.^[284,285]

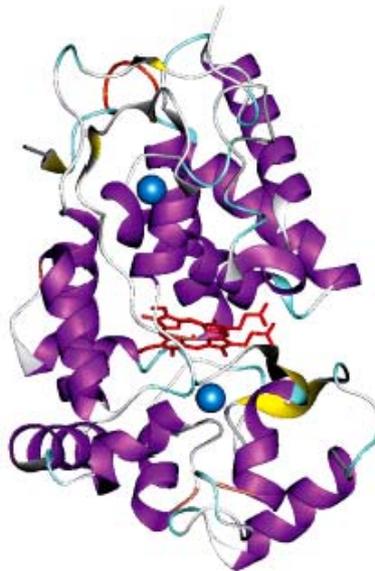


Abb. 5.1: Dreidimensionale Röntgen-Kristallstruktur der HRP. Die Häm-Gruppe (rot) liegt zwischen der distalen und proximalen Domäne, die jeweils ein Calcium Atom (blau) enthalten. Lila: α -Helices; gelb: β -Faltblattstrukturen

Die Meerrettichperoxidase besteht größtenteils aus α -Helices und einer kleinen Region aus β -Faltblattstrukturen (Abb. 5.1). Es gibt zwei Domänen, eine distale und eine proximale, zwischen denen die Häm-Gruppe positioniert ist. Das Enzym kommt in vielen Formen vor, die sich in saure, neutrale und basische Isoenzyme einteilen lassen. Kommerziell erhältliche HRP-Präparationen enthalten hauptsächlich Isoenzym C, eine neutrale bis leicht basische

Form ($\text{pH}_I \approx 8.4$). Die HRP hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa und Dimensionen von $4.03 \times 6.57 \times 11.7 \text{ nm}^3$.^[285] Sie besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 308 Aminosäuren.^[286] Darin liegen zwei verschiedene Typen von Metallzentren vor, welche für die funktionelle und die strukturelle Integrität des Enzyms überaus wichtig sind: Eisen(III)-Protoporphyrin IX (meist als Häm-Gruppe bezeichnet), sowie zwei Calcium (II)-Ionen.

Die Häm-Gruppe ist am His170, dem proximalen Histidin-Rest, an das Enzym gebunden (Abb. 5.2). Dabei liegt eine koordinative Bindung zwischen dem Stickstoff-Atom der Histidin-Seitenkette und dem Eisen-Atom der Häm-Gruppe vor.^[287] Die zweite axiale Koordinationseite, die distale Seite der Häm-Ebene, ist im Ruhezustand des Enzyms unbesetzt, dient aber während des Enzymumsatzes (turnover) dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Angriffspunkt.

Kleine Ligand-Moleküle wie Kohlenstoffmonoxid, Cyanide, Fluoride und Azide binden ebenfalls von der distalen Seite der Häm-Gruppe an das Eisen-Atom. Dadurch entstehen sechsfach koordinierte Komplexe, die die Peroxidase-Reaktion inhibieren. Einige der Liganden binden jedoch nur in der protonierten Form, da diese durch Wasserstoffbrückenbindungen mit der distalen Häm-Tasche der Aminosäure-Seitenketten von Arg38 (distales Arginin) und His42 (distales Histidin) stabilisiert werden.^[285]

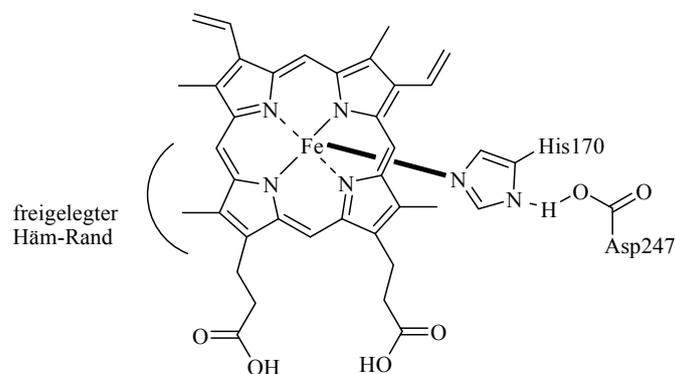


Abb. 5.2: Struktur des Protoporphyrin IX-Eisen-Komplex: His170 bildet koordinative Bindung zum Eisen Atom in Häm-Gruppe aus. Aromatische Substrate werden am freigelegten Häm-Rand oxidiert, binden aber nicht an Eisen.

Die beiden Calcium bindenden Seiten sind distal und proximal zur Häm-Ebene angeordnet und sind mit der Häm-bindenden Region durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken verbunden. Jede Calcium-Stelle ist siebenfach mit verschiedenen Sauerstoff-Donor-Liganden (Aminosäure-Seitenketten mit Carboxyl- (Asp), Hydroxyl-Gruppen (Ser, Thr), Rückgrat-Carbonylen und Wassermolekülen) koordiniert.

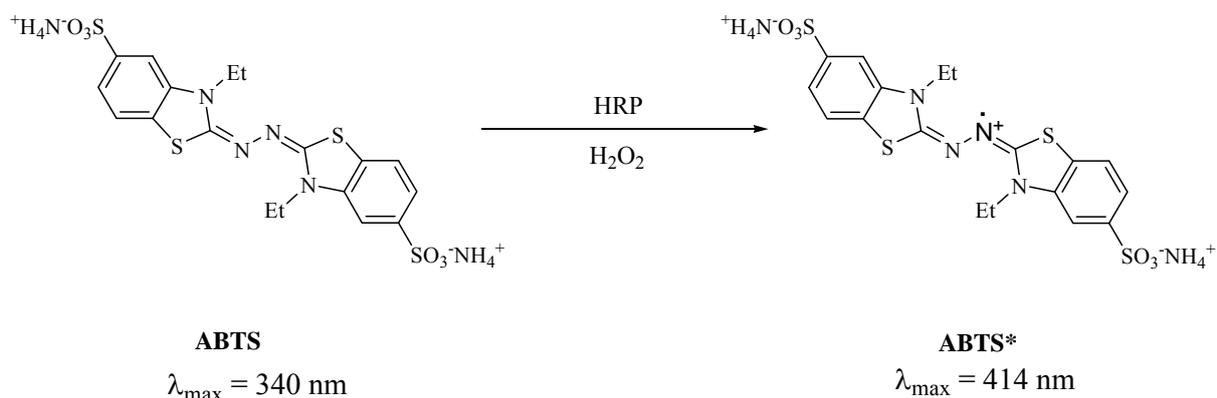
Der Verlust von Calcium kann zu einer Verringerung der Aktivität sowie der thermischen Stabilität der Meerrettichperoxidase führen.^[288]

Die Meerrettichperoxidase bietet ein breit gefächertes Anwendungsfeld. In der organischen Synthese wird sie als Reagenz für verschiedene Reaktionen eingesetzt beispielsweise zur *N*- und *O*- Dealkylierung, bei der oxidativen Kupplung, bei selektiver Hydroxylierung sowie in Sauerstoff-Transferreaktionen. Eine große Rolle spielt sie aber auch bei diversen Biotransformationen^[289] wo sie häufig in gekoppelten Enzym-Assays^[290] und Chemilumineszenz-Assays^[291] eingesetzt wird.

Eine interessante Entwicklung zeigen jüngste Arbeiten von *Wardmann* und Kollegen, die in Meerrettichperoxidase in Kombination mit Indol-3-Essigsäure ein potenzielles Mittel in der Krebstherapie^[292-294] sehen. Ferner bietet diese Kombination einige Vorteile für die Entwicklung zukünftiger Antikörper-, Gen- oder Polymergerichteter Enzyme. Gründe dafür sind ihre Stabilität bei 37°C, die hohe Aktivität bei neutralem pH und die fehlende Toxizität der HRP. Außerdem kann sie relativ leicht an Antikörper oder Polymere gebunden werden.

TMB (3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin)^[295] und ABTS (2,2'-Azido-di-(ammonium-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat))^[296] sind typische Substrate mittels derer die Kinetik der Meerrettichperoxidase untersucht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ABTS als Substrat eingesetzt, da das aus ABTS gebildete Radikal photometrisch leicht detektierbar ist. Schema 5.1 zeigt das entsprechende ABTS/H₂O₂-Assay für Peroxidasen.



Schema 5.1: ABTS/H₂O₂-Assay für Peroxidasen

In Anwesenheit des Cofaktors H_2O_2 wird das ABTS durch die Meerrettichperoxidase in das entsprechende Radikal-Kation ABTS^* überführt, wobei sich das Maximum der Absorption von $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\text{ABTS} = \text{Edukt}$) nach $\lambda = 414 \text{ nm}$ ($\text{ABTS}^* = \text{Produkt}$) verschiebt. Durch die Detektion der Extinktion des entstandenen Produktes ABTS^* kann die Aktivität des Enzyms bestimmt werden. ($\epsilon_{(414 \text{ nm})}(\text{ABTS}^*) = 36000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

5.3 Aktivität von immobilisierter HRP an reaktiven Thio-carboxymethylcellulosemonoschichten auf Gold

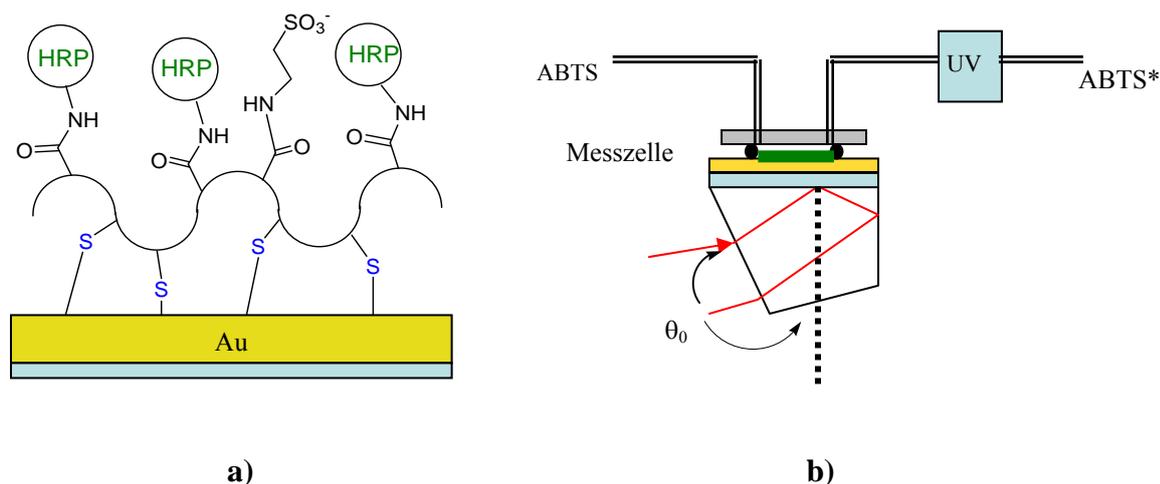
Die HRP eignet sich aufgrund ihres breiten Anwendungsspektrums sehr gut zur Untersuchung des Aufbaus von Enzymschichtsystemen an verschiedenen funktionellen Oberflächen, die von großem Interesse in der biochemischen Sensortechnologie sind.^[272-274,297] Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, wird die Immobilisierung von Enzymen an Goldoberflächen allgemein durch die kovalente Anbindung des Enzyms an Dextran modifizierte Goldsubstrate (Biacore-Verfahren)^[298] oder an Alkanthiole bzw. reaktive Alkandisulfide, z. B. DTSP: Dithiobis-*N*-succinimidyl-propionat^[299] beschrieben. Mit Ausnahme der reaktiven Alkandisulfide benötigt man dazu jedoch immer eine Voraktivierung der Carboxylgruppen mit löslichen Reagenzien wie z. B. EDC oder NHS.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Meerrettichperoxidase an Monoschichten der reaktiven Thio-CMC-Derivate **5**, **6** und **8** auf Gold immobilisiert, und der jeweilige Enzymschichtaufbau in situ mittels SPR-Spektroskopie verfolgt werden. Durch Kopplung eines UV-Detektors an das SPR-Gerät sollte schließlich die Aktivität des immobilisierten Enzyms untersucht werden und mit der des freien Enzyms in Lösung verglichen werden.

5.3.1 Aufbau des Enzymschichtsystems

Der Aufbau eines Enzymschichtsystems auf einer Goldoberfläche erfolgt analog zu der bereits in Kapitel 4 beschriebenen Vorgehensweise. Dabei wird zunächst eine reaktive Thio-CMC aus wässriger Lösung auf der Goldoberfläche abgeschieden. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgt anschließend durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den aktivierten Carboxymethylgruppen des Thio-CMC Derivats und den Aminofunktionalitäten

der Lysin-Reste an der Peripherie des Enzyms. Nach Desaktivierung aller nicht umgesetzten funktionellen Gruppen mit Taurin kann die Aktivität des immobilisierten Enzyms mit einem an das SPR-Gerät gekoppelten UV-Detektor bestimmt werden. In Schema 5.2 werden der Aufbau des Enzymschichtsystems sowie die Messanordnung zur Bestimmung der Enzymaktivität veranschaulicht.



Schema 5.2: a) Schichtaufbau an einer mit HTSHP-CMC-EDC **6** funktionalisierten Goldoberfläche
b) das verwendete SPR-UV Messsystem (Transducer)

Diese allgemeine Vorgehensweise gilt für alle reaktiven Thio-CMC Derivate. Eine Immobilisierung der Meerrettichperoxidase konnte jedoch lediglich an der HTSHP-CMC-EDC **6** beobachtet werden.

Die Abscheidung des Aktivesters erfolgte aus einer 0.1%-igen Lösung von **6** in 0.4 M Acetatpuffer (pH 6.95) nach Aktivierung seiner Thiosulfat-Gruppen durch TCEP. Um eine vollständige Beschichtung der Goldoberfläche zu gewährleisten, wurde eine niedrige Flussrate von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt. Nach etwa 1h hatte sich in der Regel eine stabile Monoschicht ausgebildet. Überschüssige physisorbierte Anteile wurden danach mit MilliQ-Wasser abgespült. Die Immobilisierung der HRP erfolgte in Carbonatpuffer bei pH-Werten im Bereich von 7.5 bis 9. Im Anschluss an die Adsorption des Enzyms wurden nicht umgesetzte EDC-Gruppen durch Zugabe von Taurin (unter statischen Bedingungen: Fluss gestoppt für ca. 30 min) desaktiviert.

Abbildung 5.3 zeigt die Adsorptionskinetik der HRP bei pH 8.01 an einer mit HTSHP-CMC-EDC **6** beschichteten Goldoberfläche (a), sowie die zugehörigen Reflektivitätskurven, mit deren Hilfe die jeweiligen Schichtdicken der einzelnen Monolagen bestimmt wurden (b):

Zur Immobilisierung des Enzyms wurde zunächst das Laufmittel auf 10 mM CBS (carbonat buffer solution: 10 mM Carbonatpuffer pH 8.01 + 0.15 M KCl) bei einem Fluss von 34 $\mu\text{l}/\text{min}$ umgestellt.

Vor Injektion der Meerrettichperoxidase (12.5 μM Lösung von HRP in 10 mM CBS pH 8.01), wurde die Flussrate wieder auf 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ verringert, um dem Enzym genügend Zeit zur Reaktion zu geben. Nach Adsorption der HRP wurde sorgfältig mit Pufferlösung gespült. Die Desaktivierung der nicht umgesetzten EDC-Gruppen erfolgte anschließend durch 0.1 M Taurinlösung

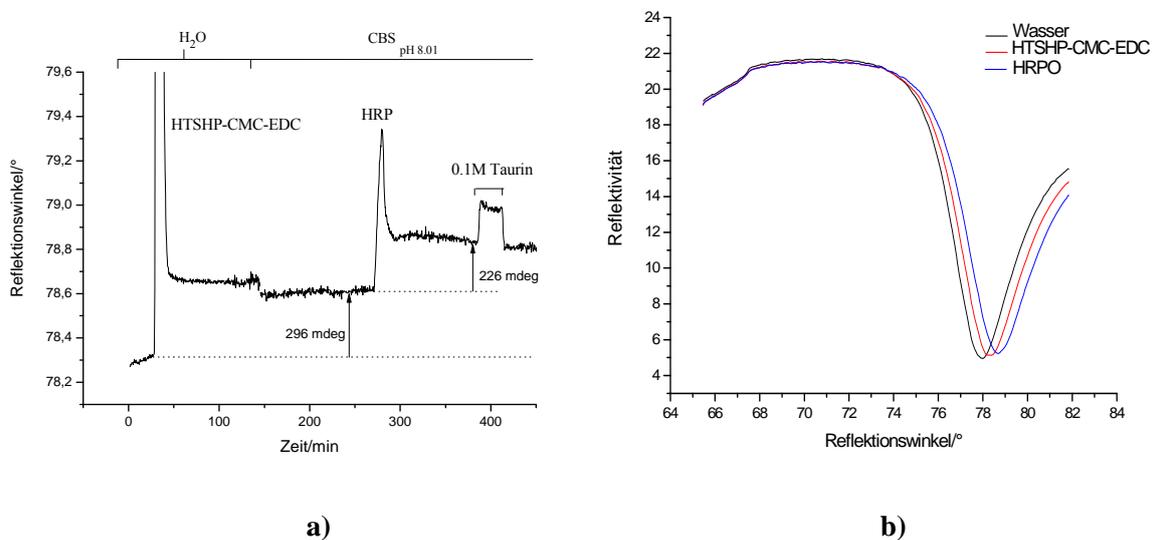


Abb. 5.3: a) Adsorptionskinetik der HRP (12.5 μM in 10 mM CBS, pH 8.01) an einer mit HTSHP-CMC-EDC **6** (0.1%-ig in 0.4 M Acetatpuffers + TCEP) modifizierten Goldoberfläche; Taurin: 0.1 M in Wasser (MilliQ) b) Reflektivitätskurven zur Bestimmung der jeweiligen Schichtdicken

Die erhaltenen Reflektivitätskurven wurden unter Annahme eines Vierschichtmodells ausgewertet, das Prisma, Goldschicht, adsorbierte Cellulosemonoschicht und Enzymschicht berücksichtigt. Mit dem Brechungsindex $n_{\text{HRP}} = 1.50$ wurde eine Schichtdicke von $d_{\text{HRP}} = 1.4$ nm ($\Gamma = 1.4$ mg/m^2) für die immobilisierte HRP bestimmt.

Die ermittelte Schichtdicke des immobilisierten Enzyms weicht stark von den veröffentlichten Daten ab.^[285]

Alle SPR-Messungen wurden nach dieser Vorgehensweise und mit den entsprechenden Konzentrationen an HTSHP-CMC-EDC und HRP durchgeführt. Für jeden pH-Wert wurden

mindestens 3 Messungen durchgeführt und aus den jeweiligen Werten ein Mittelwert gebildet. Tabelle 5.2 fasst die erhaltenen Schichtdicken zusammen.

Tab. 5.2: Schichtdicken der immobilisierten HRP bei unterschiedlichen pH-Werten des verwendeten CBS
($\Delta\theta$ = Schichtdickenzunahme in mdeg, d = Schichtdicke in nm)

pH	$\Delta\theta$ (HRP) [mdeg]	d (HRP) [nm]
7.5	74	0.7 ± 0.2
8	186	1.4 ± 0.2
8.5	113	1.1 ± 0.2
9	96	1.0 ± 0.2

Aus den erhaltenen Ergebnissen ließ sich keine eindeutige Tendenz in der Belegung aufgrund der pH-Wert Erhöhung beobachten. Die größte Dickenzunahme wurde bei einem pH von 8 beobachtet, was sich auch durch zahlreiche Wiederholungen der Messungen bestätigen ließ.

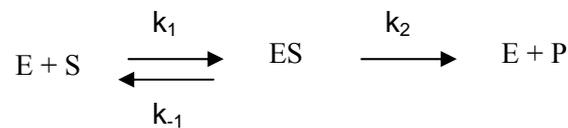
Nach Aufbau des Enzymschichtsystems wurde das Laufmittel auf 10 mM AcB (AcB = acetat buffer: 10 mM Acetatpuffer pH 4.5 + 0.01% H₂O₂) umgestellt und das entsprechende ABTS-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt.^[296]

5.3.2 Bestimmung der Enzymaktivität

5.3.2.1 Michaelis-Menten Kinetik

Die Michaelis-Menten Kinetik beschreibt die Reaktion von Enzymen mit Substraten abhängig von den Konzentrationen mit einem charakteristischen Zeitverlauf. Dabei verbindet sich ein Enzym E zunächst mit einem Substrat S zu einem Enzym-Substrat-Komplex, welcher in einem zweiten Schritt zu einem Produkt P führen, oder wieder in E und S dissoziieren kann.

Das formale Schema dieser enzymkatalysierten Reaktion lautet:



k_1/k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von E und S bzw. der Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes.

k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Produktes

Die Michaelis-Menten-Kinetik setzt dabei voraus, dass die Rückreaktion $E + P \rightarrow ES$ zu Reaktionsbeginn vernachlässigbar und daher unberücksichtigt bleiben kann. Unter diesen Bedingungen ist k_2 ein Maß für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung (v_{\max}).

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung (5.1) beschrieben:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (5.1)$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit [$M \cdot s^{-1}$]

v_{\max} : Reaktionsgeschwindigkeit [M/s oder $\mu\text{mol}/\text{min}$] bei völliger Substratsättigung des Enzyms [$M \cdot s^{-1}$]

[S]: Substratkonzentration [M]

K_M : Michaelis-Menten-Konstante = Substratkonzentration, bei der das Enzym mit genau der halben maximalen Geschwindigkeit arbeitet [M]

Danach steigt die Umsatzgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion mit wachsender Substratkonzentration an. Sind alle Bindungsstellen des aktiven Zentrums des Enzyms mit Substrat gesättigt, hat eine weitere Steigerung der Substratkonzentration keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit des Enzyms. Das Enzym arbeitet mit seiner maximalen Geschwindigkeit v_{\max} .

Die Michaelis-Menten-Konstante, K_M -Konstante, ist eine charakteristische Enzym-Substrat-Konstante, die gleichbedeutend ist mit der Substratkonzentration, bei der das Enzym zur Hälfte gesättigt ist. Darüber hinaus ist die Konstante ein direktes Maß für die Affinität zwischen Substrat und Enzym. Im Allgemeinen besagt ein niedriger K_M -Wert, dass ein Substrat fest an ein Enzym bindet, die Affinität des Enzyms zum Substrat ist dementsprechend hoch. Dagegen entspricht ein hoher Wert der ermittelten K_M -Konstante einer schwachen Bindung, also einer geringeren Affinität des Enzyms zum Substrat. In diesem Fall sind hohe Substratkonzentrationen ($[S]$) zur Sättigung des Enzyms erforderlich. K_M kann Werte von 10^{-6} bis 10^{-2} M annehmen.^[300]

K_M und v_{\max} werden als kinetische Parameter bezeichnet, obwohl nur K_M von der eingesetzten Enzymmenge unabhängig ist. v_{\max} ist dagegen von der Enzymkonzentration abhängig. Es gilt:

$$v_{\max} = k_{\text{kat}} \cdot [E_t] \quad (5.2)$$

Die kinetische Konstante k_{kat} , wird als Wechselzahl bzw. turnover Zahl N , bezeichnet und gibt die Anzahl von Substratmolekülen an, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit von dem aktiven Zentrum in Produkt umgewandelt werden. Da bei enzymatischen Reaktionen die Anzahl der Umsätze pro Zeiteinheit bestimmt wird, entspricht die Wechselzahl in diesem Zusammenhang der Geschwindigkeitskonstanten k_2 , ist also ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von Produkt P. k_{kat} hat daher die Dimension s^{-1} . Die Wechselzahlen der meisten Enzyme liegen zwischen 1 und 10^4 s^{-1} .

Der Quotient aus Wechselzahl k_{kat} und Michaelis-Menten-Konstante K_M beschreibt die katalytische Effizienz eines Enzyms:

Je höher die Wechselzahl und je höher die Affinität (d. h. je kleiner der K_M Wert) eines Enzyms für sein Substrat ist, desto größer ist seine katalytische Effizienz.

5.3.2.2 Enzymaktivität in Lösung

Die Fähigkeit eines Enzyms als biologischer Katalysator chemische Reaktionen zu beschleunigen, wird als Enzymaktivität bezeichnet. Zu ihrer Messung bestimmt man entweder das Verschwinden eines Substrats oder die Zunahme eines Produktes in Abhängigkeit von der Zeit:

$$v = \frac{\partial n}{\partial t} \quad (5.3)$$

Im Allgemeinen wird jedoch die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit angegeben.

$$v = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (5.4)$$

Da bei Reaktionen in Lösung das Volumen unverändert bleibt, laufen für die Enzymkinetik beide Definitionen auf dasselbe hinaus.

Der Reaktionsverlauf wird in den meisten Fällen photometrisch verfolgt. Dabei wird die Extinktionsänderung ΔE pro Zeiteinheit registriert. Nach Lambert-Beer ist die beobachtete Extinktionsänderung proportional zur Konzentrationsänderung entweder des Substrats oder eines Produkts:

$$\Delta E = \Delta c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (5.5)$$

Zur Bestimmung des Substratumsatzes einer Reaktion und deren photometrischen Registrierung müssen die als Messgröße verfügbaren Werte von $\Delta E/\Delta t$ in Konzentrationsänderungen umgerechnet werden. Hierzu muss der Extinktionskoeffizient der optisch gemessenen Substanz bekannt sein. Für den Umsatz pro Zeiteinheit gilt dann:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = v_{\max} = \frac{\Delta E / \Delta t}{\varepsilon \cdot d} \quad (5.6)$$

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt also durch zeitabhängige Messung der Extinktion. Nach Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration $[S]$ werden die Ergebnisse nach Michaelis-Menten angepasst. Man erhält eine charakteristische hyperbolische Kurve, aus der die kinetischen Parameter K_M und v_{\max} eines Enzyms in Lösung bestimmt werden.

5.3.2.3 Enzymaktivität nach Immobilisierung

Zur Bestimmung der K_M -Konstante der immobilisierten Meerrettichperoxidase wurden verschiedene Substratkonzentrationen des ABTS nacheinander injiziert, und die Zunahme des Produkts, ABTS*, pro Zeiteinheit durch UV-Absorption gemessen. Im Gegensatz zu Reaktionen in Lösung bleibt unter diesen Bedingungen das Volumen nicht mehr unverändert. Daher gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{c \cdot \partial V}{dt} \quad (5.7)$$

Unter Einbeziehung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ($E = \varepsilon \cdot c \cdot d$) folgt daraus:

$$v = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{\partial V}{dt} \quad (5.8)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v ist also proportional zur Extinktion E .

Aus der Auftragung der jeweiligen Produktabsorption E gegen die Substratkonzentration $c(\text{ABTS})$ erhält man dann ebenfalls eine charakteristische hyperbolische Kurve (Abb. 5.4). Durch die Methode der mathematischen Hyperbelkurvenannäherung, d. h. nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten Gleichung an die experimentellen Daten, lässt sich die Konstante K_M abschätzen.

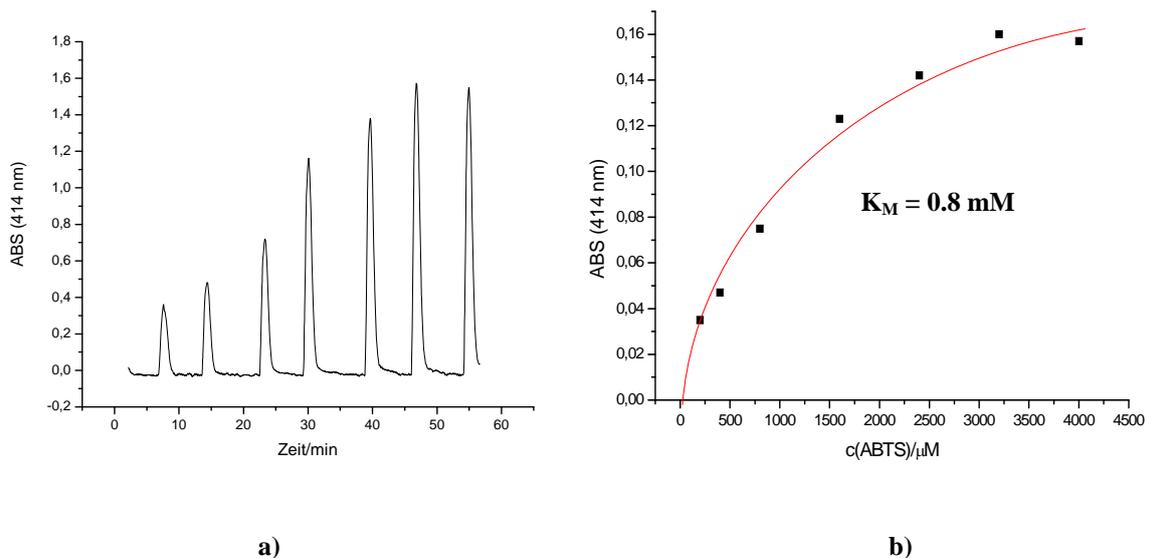


Abb. 5.4: a) UV-Detektion der Produktmengen ABTS* ($\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$) bei verschiedenen ABTS-Substratkonzentrationen (100-4000 μM);
b) typische Michaelis-Menten Sättigungskurve zur Bestimmung von K_M

Das ABTS/H₂O₂-Assay wurde für mehrere Proben durchgeführt, die sich in der Belegung mit Enzym unterschieden. Für alle konnte eine Kinetik nach Michaelis-Menten angepasst werden. In Tabelle 5.3 sind die erhaltenen Ergebnisse für die verschiedenen Belegungsgrade an Enzym zusammengefasst. Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten bewegten sich im Bereich zwischen 0.81 und 1.35 mmol/l, ließen aber keine eindeutige Tendenz erkennen. Eine Abhängigkeit der K_M-Konstante von der Menge an immobilisierter HRP konnte nicht beobachtet werden.

Tab. 5.3: Vergleich der Aktivität des freien Enzyms in Lösung mit der Aktivität der auf HTSHP-CMC-EDC 6 immobilisierten HRP (M_{HRP}: 40000 g/mol; Fluss: 8.4·10⁻⁷ l/s; ε₄₁₄(ABTS): 36000 l/mol·cm; d: 1cm; A: 4.1·10⁻³ cm²)

Γ (HRP) [mg/m²]	K_M [mM]	K_{kat} [s⁻¹]	E_{max}	v_{max}
- (natives Enzym)	0.75 ± 0.074	462	-	2.31·10 ⁻⁷
56	1.35 ± 0.21	63	0.20	-
96	1.17 ± 0.22	530	2.4	-
114	1.14 ± 0.18	24	0.13	-
126	0.81 ± 0.18	36	0.20	-

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich eine leichte Erhöhung der K_M-Konstanten des immobilisierten Enzyms gegenüber der des freien Enzym beobachten, was sich vermutlich auf eine verringerte Affinität der HRP zum Substrat (ABTS) zurückführen lässt. Mit steigendem Belegungsgrad an HRP nähern sich die Werte für die K_M-Konstante jedoch immer mehr der des freien Enzyms in Lösung an.

Die Wechselzahl k_{kat} (turnover number N) eines Enzyms ist der Quotient aus maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge (in mol):

$$k_{kat} = \frac{v_{max}}{n_{HRP}} \quad (5.9)$$

Ersetzt man v_{\max} durch Gleichung (5.8) lässt sich aus der gemessenen Extinktion die Wechselzahl k_{kat} des immobilisierten Enzyms berechnen:

$$k_{\text{kat}} = \frac{E_{\max}}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{\text{Fluss} \cdot M_{\text{HRP}}}{m_{\text{HRP}}}$$

mit $m = \Gamma \cdot A$ folgt daraus:

$$k_{\text{kat}} = \frac{E_{\max} \cdot M_{\text{HRP}} \cdot \text{Fluss}}{\varepsilon \cdot d \cdot \Gamma \cdot A} \quad (5.11)$$

M_{HRP}	:	Molmasse (HRP)
E_{\max}	:	maximale Extinktion
Fluss	:	[l/s]
$\varepsilon_{(414 \text{ nm})}(\text{ABTS})$:	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von ABTS bei 414 nm [l/mol·cm]
d	:	Schichtdicke UV-Detektor [cm]
A	:	Au-Fläche in Zelle [cm ²]
Γ	:	Oberflächenbelegung mit Enzym [mg/m ²]

Wie aus den vorliegenden Daten (Tabelle 5.3) zu entnehmen ist, folgen auch die berechneten k_{kat} -Werte keinem Trend. Allerdings sind die nach der Immobilisierung erhaltenen k_{kat} -Werte stark abgesenkt.

Auffällig ist der große Wert von 530 s^{-1} , der aufgrund einer fast zehnfach erhöhten Extinktion bei dieser Messung erhalten wurde. Da die Extinktion proportional zur Konzentration der gemessenen Substanz ist, lässt sich der größere Wert für k_{kat} auf eine höhere Konzentration an ABTS* zurückführen: In Anwesenheit des Co-Faktors H_2O_2 wird ABTS mit der Zeit bereits durch Luftsauerstoff ins ABTS* überführt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, muss die Bestimmung der Enzymaktivität daher direkt nach dem Durchmischen der einzelnen Komponenten erfolgen. Vermutlich wurde die betreffende Messung nicht schnell genug gestartet, so dass ein größerer Umsatz an ABTS* durch das Enzym vorgetäuscht wurde.

Eine Änderung der Enzymaktivität lässt sich häufig dann beobachten, wenn in Folge der Immobilisierung eine Konformationsänderung des Enzyms (speziell am aktiven Zentrum) auftritt.^[301-304] Da die K_M -Werte jedoch nur leicht erhöht sind, kann ein Aktivitätsverlust durch Konformationsänderung wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Für die Änderung der Aktivität und der damit verbundenen kinetischen Parametern können noch weitere Ursachen in Betracht gezogen werden^[305]:

- Diffusionseffekte, die sich meist auf Änderungen der Dissoziationsgleichgewichte oder auf die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums zurückführen lassen^[306]
- Einfluss von Verteilungsgleichgewichten zwischen fester und flüssiger Phase^[307] aufgrund von π -Elektroneninteraktion, ionischer, polarer, Wasserstoffbrücken- oder hydrophober Wechselwirkungen zwischen Träger und Substraten, Produkten und/oder Inhibitoren
- Diffusionsbedingte Effekte, wie sie beispielsweise in Membranelektroden vorkommen. Dadurch werden die Kinetiken nicht durch die Enzym-Substrat Wechselwirkungen dominiert, sondern durch die Geschwindigkeit der Diffusion des Substrats

5.3 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel sollten die wasserlöslichen, reaktiven Thio-CMC Derivate **5**, **6** und **8** als Substrate zur kovalenten Immobilisierung der Meerrettichperoxidase an Goldoberflächen eingesetzt werden. Jedoch wurde weder beim neutralen OSu-Aktivester **5** noch beim anionischen MCT-Derivat **8**, ein merklicher Schichtzuwachs nach Injektion der HRP beobachtet ($\Delta\theta(\text{HRP}) \leq 20$ mdeg). Eine kovalente, reagenzfreie Kupplung der Meerrettichperoxidase konnte lediglich an den Monoschichten der kationischen HTSHP-CMC-EDC **6** erfolgreich durchgeführt werden.

Mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) konnte der Enzymschichtaufbau auf der Goldoberfläche in situ verfolgt und die optische Schichtdicke der immobilisierten Meerrettichperoxidase untersucht werden. Die Immobilisierung der HRP erfolgte aus 10 mM Carbonatpuffer in einem pH-Bereich von 7.5-9.0.

Die Bestimmung der Schichtdicke erfolgte, wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, durch Anpassung der experimentell bestimmten Reflektivitätskurven der jeweiligen Monolage an eine simulierte Kurve. Dazu wurde ein Vierschichtmodell bestehend aus Prisma, Gold, HTSHP-CMC-EDC **6** und HRP angenommen. Die ermittelten Schichtdicken lagen im Bereich von 0.8 bis 1.4 nm (entsprechend 0.8 bis 1.4 mg/m²). Verglichen mit der

Röntgenstruktur der Meerrettichperoxidase ($4.03 \times 6.57 \times 11.7 \text{ nm}^3$).^[285] fielen diese Werte sehr viel kleiner aus als erwartet. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die HRP keine geschlossene Monoschicht auf der Thio-CMC-Monoschicht ausgebildet hat.

Die Untersuchung der Schichtdicke bei unterschiedlichen pH-Werten des für die Immobilisierung der HRP eingesetzten Carbonatpuffers ließ keine Abhängigkeit erkennen.

Die immobilisierte HRP wurde bezüglich ihrer Aktivität untersucht und die Ergebnisse mittels Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet. Diese liefert die Michaelis-Menten-Konstante K_M , die ein Maß für die Affinität zwischen Substrat und Enzym ist sowie die Wechselzahl k_{kat} , die den Umsatz an Substrat pro Enzym und Zeit angibt. Die Aktivitätsuntersuchung der gelösten HRP unter gleichen Bedingungen diente als Vergleich. Aus der Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetiken der immobilisierten HRP auf Gold wurden für unterschiedliche Belegungsgrade an Enzym K_M -Konstanten im Bereich von 1.35 mM – 0.81 mM ermittelt. Diese waren gegenüber der des freien Enzyms in Lösung ($K_M = 0.75 \text{ mM}$) leicht erhöht, was sich auf eine verringerte Affinität der HRP zum Substrat (ABTS) zurückführen lässt.

Die Wechselzahl k_{kat} der immobilisierten HRP war in allen Messungen stark herabgesetzt, es wurde also weniger Substrat pro Zeiteinheit umgesetzt.

6. Oberflächenverankerte Modellmembranen (tethered lipid bilayer membranes, tLBMs)

6.1 Einleitung

Seit mehr als zwanzig Jahren sind Phospholipide, die auf festen Substraten abgeschieden werden, die am meisten verwendeten experimentellen Modellsysteme für Zelloberflächen^[308-314], da sie ein hohes Maß an Stabilität bieten.^[77,314] Ein großer Nachteil dieser Systeme ist jedoch, dass diese erhöhte Stabilität auf Kosten der Fluidität der unteren Monoschicht erzielt wird, wodurch auch der Einbau von integralen Proteinen erschwert wird.

Mithilfe eines sogenannten Abstandshalters (spacer), der die Membran vom festen Substrat abkoppelt, kann dieses Problem umgangen werden. Dieser Abstandshalter bewirkt, dass Konformation und Funktionalität von eingebauten Proteinen erhalten bleiben und gewährleistet zudem eine hinreichende Stabilität des gesamten Modellsystems^[134,315], welche durch kovalente Anbindung an die Oberfläche erreicht werden kann.^[316] Darüber hinaus erlauben diese synthetischen planaren Lipiddoppelschichtmembranen (tethered bilayer lipid membranes, tBLMs) eine Vielzahl von analytischen, oberflächensensitiven Untersuchungsmethoden, wie Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR), Ellipsometrie (ELL), Reflexionsinterferenzspektroskopie (RIFS), Impedanzspektroskopie (IS) oder die Quarzmikrowaage-technik (QCM), die auf die anderen Modellmembransysteme nicht anwendbar sind. Die Entwicklung solcher kombinierten Systeme führt letztendlich zu einer neuen Generation von Biosensoren^[317], die künstliche Membranen mit natürlichen Membranproteinen als analytisches Instrument nutzen.

Als Abstandshaltermoleküle werden vor allem ultradünne amphiphile Polymerfilme eingesetzt. Diese bilden dann eine weiche Zwischenschicht zwischen fluider Membran und festem Substrat, welche die Lipiddoppelschicht (insbesondere die untere Lipidschicht) vom Einfluss des Festkörpers abschirmt^[318], und sie zusätzlich durch spezifische Lipid-Polymer-Wechselwirkungen stabilisiert. Dies kann beispielsweise durch attraktive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Kopfgruppen des Lipids mit einem gegensätzlich geladenen Polymerfilm z. B. Polyethylenimin^[319-322], erreicht werden.^[323,324] Daneben kann auch die Fixierung von sogenannten Ankerlipiden auf der Oberfläche von

hochfunktionalisierten Polymerschichten, durch welche die untere Lipidschicht kovalent angebunden wird, zum Ziel führen.^[77,159,163,325-328]

Oberflächenverankerte Lipidmembran-Modellsysteme basieren häufig auf Polyethylenglykol (PEG) oder PEG-Derivaten, welche kovalent an das Substrat und die Doppelschicht gebunden sind^[329-331], sowie Oligoethylenoxid^[153,307,332] und Oligopeptide mit Thiol-Gruppen.^[333] Daneben wurden auch noch Dextrane^[149], Cellulose^[334], Agar-Gele^[335] oder Thio-Lipide^[336-338] mit Ethylenoxiden als mögliche polymere Abstandhalter eingesetzt und untersucht.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln berichtet, führt die Selbstorganisation von Thiol- oder Disulfidgruppen tragenden Molekülen zu hochgeordneten und stabilen Monoschichten auf Gold- und anderen Metalloberflächen.^[339] Daher werden vor allem Thio-Lipidschichten^[158,164] sowie selbst-organisierte (self-assembled) Alkanthiolmonolagen^[324,340-345] an Goldoberflächen^[167] zum Aufbau der oberflächenverankerten Lipiddoppelschichtmembranen eingesetzt. Für die Präparation der Membranfilme gibt es verschiedene Möglichkeiten: dünne Filme von Einzel- oder Doppelmembranen können mit bekannten Methoden wie Langmuir-Blodgett und Langmuir-Scheffer-Transfer^[346-348] oder durch Vesikelfusion^[349] (vesicle fusion) hergestellt werden. Dicke Filme von einigen hundert bis tausend Membranen können durch das Spreiten (spreading) aus organischer Lösung hergestellt werden.^[350]

Spinke et al. berichteten 1992 von selbstorganisierenden Monoschichten aus hydrophilen Methacryl-Coblockpolymeren mit aliphatischen Seitenketten. Durch Insertion von Phospholipidanaloga wurde im Anschluss eine Fusion von lipiden Vesikeln induziert, die zur Bildung einer Doppelschicht führte.^[161]

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, ein analoges Konzept auf Basis der funktionellen Thio-Carboxymethylcellulosen zu entwickeln.

Cellulose erfüllt die Anforderungen, die an die stützende Polymerschicht gestellt werden, sehr gut: so sorgen die vielen hydrophilen Gruppen am Polymer für einen quellbaren Belag, welcher für die Abkopplung der Lipiddoppelschicht von der Goldoberfläche benötigt wird. Zudem gewährleisten sie eine deformierbare und bewegliche Schicht, die Defekte oder andere Unregelmäßigkeiten auszugleichen vermag. In Kapitel 4 wurde bereits berichtet, dass sich Thiosulfatderivate wie die HTSHP-CMC-EDC **6** aufgrund der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Thiosulfatgruppen und Gold hervorragend für den Aufbau von selbst-organisierten stabilen Monoschichten auf Goldoberflächen eignen.

Durch Modifizierung der abgeschiedenen Thio-Cellulosemonoschicht mit hydrophoben Lipidanaloga soll anschließend die Fusion von Phospholipiden auf der Oberfläche ermöglicht werden.

6.2 Vesikel

6.2.1 Grundlagen

Vesikel bzw. Liposome wurden erstmals 1963 von Bangham beschrieben wurden.^[351] Dabei handelt es sich um kugelförmige Aggregate, deren Größe im Bereich von etwa 20 nm bis einigen μm liegen kann. Sie sind aus einer oder mehreren konzentrischen, biomembranähnlichen Doppelschichten aus Phospholipiden aufgebaut, die einen wässrigen Kern umhüllen. (Abbildung 6.1) In Abhängigkeit von der verwendeten Präparationsmethode entstehen verschiedene Systeme, die sich sowohl im Durchmesser, als auch in der Zahl der Lamellen unterscheiden.^[126,352]

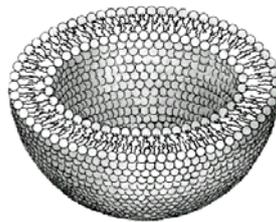


Abb. 6.1: Räumliche Darstellung eines Vesikels/Liposoms^[353]

Je nach Größe und Lamellenzahl lassen sich drei Vesikeltypen unterscheiden^[354]:

- **SUV (small unilamellar vesicle)** = kleine unilamellare Vesikel von bis zu 50 nm Größe, die eine stark gekrümmte Doppelschicht besitzen.^[355] Aufgrund des hohen Krümmungsradius können sich die Phospholipide nicht mehr ihrer optimalen Packung entsprechend in der Doppelschicht einlagern. Die Anzahl der Lipidmoleküle in der äußeren Monoschicht ist größer als in der inneren Schicht, was zu einer ausgeprägten Membranspannung führt.
- **LUV (large unilamellar vesicle)** = große unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von mehr als 50 nm. Dadurch weist die Lipiddoppelschicht nur noch eine kleine Krümmung auf. Bei weitgehend gleicher Verteilung von Lipidmolekülen im Inneren

und äußeren Monolayer sind sie nahezu frei von Membranspannungen und zeigen daher eine höhere Lagerstabilität mit geringerer Tendenz zur Fusion.

- **MLV (multilamellare vesicle)** = Vesikel, die mehrere oder viele konzentrische Bilayer aufweisen und einen Durchmesser von über 100 nm besitzen. Sie sind von Aggregaten zu unterscheiden, in die mehrere kleine Vesikel eingeschlossen sind (so genannte multi-vesiculare vesicles, MVV).

Als Modellmembranen eignen sich jedoch lediglich unilamellare Vesikel, da zum einen der zur Verfügung stehende wässrige Innenraum innerhalb des Vesikels durch die Anhäufung von Lamellen erheblich verringert wird und zum anderen eine exakte Charakterisierung der Vesikel aufgrund der unterschiedlich lamellaren Membranen sehr viel schwieriger ist. Daneben spielt aber auch die Größe der Vesikel bzw. die daraus resultierenden verschieden starken Krümmungen ihrer Oberflächen eine wichtige Rolle, da diese einen direkten Einfluss auf die Permeation oder Bindung von Molekülen durch bzw. an die Membran haben können. Große unilamellare Vesikel eignen sich am besten als Modellmembranen, da sie frei von inneren und äußeren Membranspannungen sind.

Zur Präparation von Vesikeln werden in erster Linie Phosphodiester-Derivate von Diacylglycerol-3-phosphat eingesetzt. Die physikalischen Eigenschaften der Liposomenmembranen sind vom Phasenzustand der eingesetzten Lipide abhängig. Um die Bildung unilamellarer Vesikel zu bevorzugen, muss daher bei der Herstellung bei Temperaturen oberhalb der entsprechenden Hauptphasenübergangstemperatur gearbeitet werden. Tabelle 6.1 zeigt einen Überblick über gebräuchliche Abkürzungen ausgewählter Vesikelbildner sowie deren Phasenübergangstemperatur T_m von der L_β -Gel-Phase in die flüssigkristalline L_α -Phase.

Tab. 6.1 Hauptphasenübergangstemperaturen ausgewählter Vesikelbildner

Vesikelbildner	Kette	T_m [°]
DOPC 1,2- Dioleoyl -sn-glycero-3- phosphatidylcholin	18:1-18:1	-18.3 ^[356]
POPC 1- Palmitoy -2- oleoyl -sn-glycero-3- phosphatidylcholin	16:0-18:1	-2.5 ^[357]
DEPC 1,2- Dielaidoyl -sn-glycero-3- phosphatidylcholin	18:1-18:1	11 ^[358]
DMPC 1,2- Dimyristoyl -sn-glycero-3- phosphatidylcholin	14:0-14:0	23.5 ^[359]
DPPE 1,2- Dipalmitoyl -sn-glycero-3- phosphatidylthioethanol	16:0-16:0	38 ^[144]
DPPC 1,2- Dipalmitoyl -sn-Glycero-3- phosphatidylcholin	16:0-16:0	41 ^[357]
DSPC 1,2- Distearoyl -sn-glycero-3- phosphatidylcholin	18:0-18:0	55 ^[357]

Die Zahlen in der Kettenspalte bezeichnen die Anzahl der Kohlenstoffe in den Fettsäureestern sowie die Anzahl an olefinischen Doppelbindungen. So besteht zum Beispiel DOPC aus zwei C₁₈-Resten, wobei jeder einzelne eine olefinische Doppelbindung enthält.

6.2.3 Präparation der Vesikel

Die Herstellung von Vesikeln kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Tabelle 6.2 fasst die zahlreichen literaturbekannten Methoden zur Herstellung der verschiedenen Vesikelarten zusammen. Im Folgenden soll jedoch lediglich auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren, die Filmmethode, eingegangen werden, bei dem durch Hydratisierung von bestimmten Phospholipiden zunächst multilamellare Vesikel (MLV) gebildet werden.

Tab. 6.2: Auswahl der Methoden zur Vesikelpräparation

Liposomenart	Herstellungsmethode	Partikelgröße (nm)
MLV	Filmmethode ^[360]	300-10000
LUV/OLV	Extrusion ^[361,362] Hochdruckextrusion ^[363] Freeze-Thaw Methode ^[364]	30-800 100-1000
SUV/LUV	Detergenzentfernung ^[365-369]	40-80
SUV	Hochdruckhomogenisation ^[370-372] Ultraschall ^[373] Ethanol/Etherinjektionsverfahren ^[374]	20-40 30-60 25-125

Die Herstellung von Liposomendispersionen nach der Filmmethode beruht auf der Entdeckung der Selbstassoziation von Phospholipiden in wässrigen System durch *Bangham*.^[360] Bei dieser Methode werden die Membranbestandteile (Phospholipide) zunächst in einem Rundkolben eingewogen und in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (-gemisch) gelöst. Das organische Lösungsmittel (-gemisch) wird anschließend bei moderater Temperatur ($T \leq 40^\circ\text{C}$) am Rotationsverdampfer abgezogen. Dadurch entsteht auf der Innenwand des Rundkolbens ein homogener, transparenter Lipidfilm, der im Hochvakuum zur Entfernung von Lösungsmittelresten nachgetrocknet wird. Der zurückbleibende Film kann anschließend in Pufferlösungen, Salzlösungen oder destilliertem Wasser aufgenommen werden, wobei spontan multilamellare Vesikel unterschiedlicher Größe entstehen. Um einen

homogen zusammengesetzten Bilayer zu erhalten, muss dabei oberhalb der Hauptphasentemperatur T_m des eingesetzten Phospholipids gearbeitet werden. Im Allgemeinen werden die erhaltenen Vesikel weiter verarbeitet, um eine geringere Größe, eine definierte Membranzahl und eine enge Partikelgrößenverteilung zu erhalten. Durch Ultraschallbehandlung^[375] der MLV-Dispersionen können beispielsweise kleine unilamellare Vesikel (SUVs) hergestellt werden. Die Bildung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) kann dagegen durch direkte Extrusion der multilamellaren Vesikel erfolgen. Dabei werden die MLV-Dispersionen mehrmals unter einem moderaten Druck durch Polycarbonatfilter definierter Porengröße (30 - 800 nm) gepresst. Dieser Prozess kann Partikel mit einer relativ einheitlichen Größenverteilung von 50 – 1000 nm erzeugen, die nahezu denselben Durchmesser besitzen wie die Poren des eingesetzten Filters und aus überwiegend 1 bis 2 Lamellen bestehen.^[343,345-377] Die Extrusion ist jedoch nur möglich, wenn sich die Membran der Vesikel im flüssigkristallinen Zustand befindet. Daher sollte auch die Extrusion bei einer Temperatur durchgeführt werden, die oberhalb der Hauptphasenübergangstemperatur T_m des verwendeten Lipids liegt.

Ein weiterer großer Vorteil der beschriebenen Methode besteht darin, dass keine weiteren Detergentien bzw. Lösungsmittel erforderlich sind, die schwierig zu entfernen wären. Zudem kann sie auf alle Lipide angewendet werden, die Doppelschichtstrukturen annehmen können.

6.2.3.1 Lipide für den Aufbau des beschriebenen Membranmodells

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Lipide zur Vesikelpräparation eingesetzt. Ausgewählt wurden sie aufgrund ihrer niedrigen Hauptphasenübergangstemperaturen T_m (siehe Tabelle 6.1), die eine gute Handhabung und Anwendung bei RT gestattet.

Zur Vesikelpräparation wurden entsprechende Mengen des jeweiligen Lipids in Chloroform gelöst. Nach Abtrennung des Lösungsmittels wurden die an der Glaswand haftenden Filme mindestens 3h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in 0.1M NaCl-Lösung aufgenommen. Für die Extrusion der Lipide wurde ein Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 200 nm verwendet. Die Bestimmung der mittleren Liposomengröße erfolgte durch Messung der dynamischen Lichtstreuung. Es konnte ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser von 250 nm ermittelt werden, der aufgrund der elastischen Verformung der Vesikel bei Passage der Pore leicht über dem Porendurchmesser des eingesetzten Polycarbonatfilters liegt.

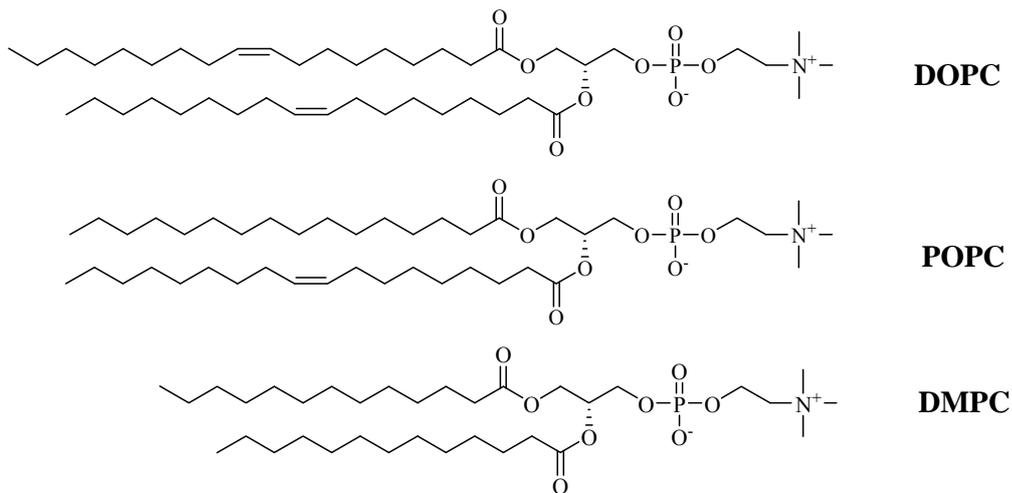


Abb. 6.2: Strukturformeln der eingesetzten Diacyl-glycero-3-phosphatidylcholone

Die gesamte Präparation musste bei Temperaturen oberhalb der Hauptphasenübergangstemperaturen der entsprechenden Lipide durchgeführt werden. Für **DOPC** und **POPC**, die aufgrund ihrer sehr niedrigen Hauptphasenübergangstemperaturen ($T_m = -2.5^\circ\text{C}$ bzw. $T_m = -18.3^\circ\text{C}$) bei RT in der flüssigkristallinen L_α -Phase vorliegen, erfolgten alle Schritte bei RT.

DMPC dagegen, liegt erst bei Temperaturen oberhalb von 23.5°C ^[357] in der L_α -Phase vor, so dass in diesem Fall bei einer Temperatur von $30\text{-}35^\circ\text{C}$ gearbeitet wurde.

6.2.3 Spreiten von Vesikeln

Durch Fusion der unilamellaren Vesikel auf einer entsprechend modifizierten Oberfläche können dann die oberflächenverankerte Lipiddoppelschichten hergestellt werden. (Abb. 6.3).^[378]

Die Technik beruht auf der Adsorption von Vesikeln an einer entsprechend präparierten Oberfläche mit anschließender Deformation und Spreiten zu einer Lipiddoppelschicht.

Die Fusion von Vesikeln ist ein temperaturabhängiger Prozess.^[379] Daher müssen Vesikelspreitungen ebenfalls bei Temperaturen oberhalb der Hauptphasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide durchgeführt werden.



Abb. 6.3: Schematische Darstellung der Vesikelfusion auf einer polymerbedeckten Oberfläche^[380]

Die Vesikelfusion wird mittels SPR-Spektroskopie in situ verfolgt, bis die Adsorption einen stationären Zustand erreicht, und es zu keiner weiteren Zunahme in der Reflektivitätskurven kommt. Durch Spülen mit Ethanol, bzw. 0.1M NaCl-Lösung werden überschüssige Vesikel von der Oberfläche entfernt. Die Auswertung der Reflektivitätskurven erfolgt auf die gleiche Weise, wie in Kapitel 4 beschrieben: durch Aufnahme der verschiedenen Reflektivitätskurven wird die Verschiebung des Resonanzwinkels $\Delta\theta$ bestimmt, und durch Simulation unter Verwendung des Brechungsindex $n = 1.45^{[77]}$ in eine optische Schichtdicke d_{Membran} umgewandelt.

6.3 Synthese von 2,3-Didodecyloxypropylamin

6.3.1 Synthesekonzept

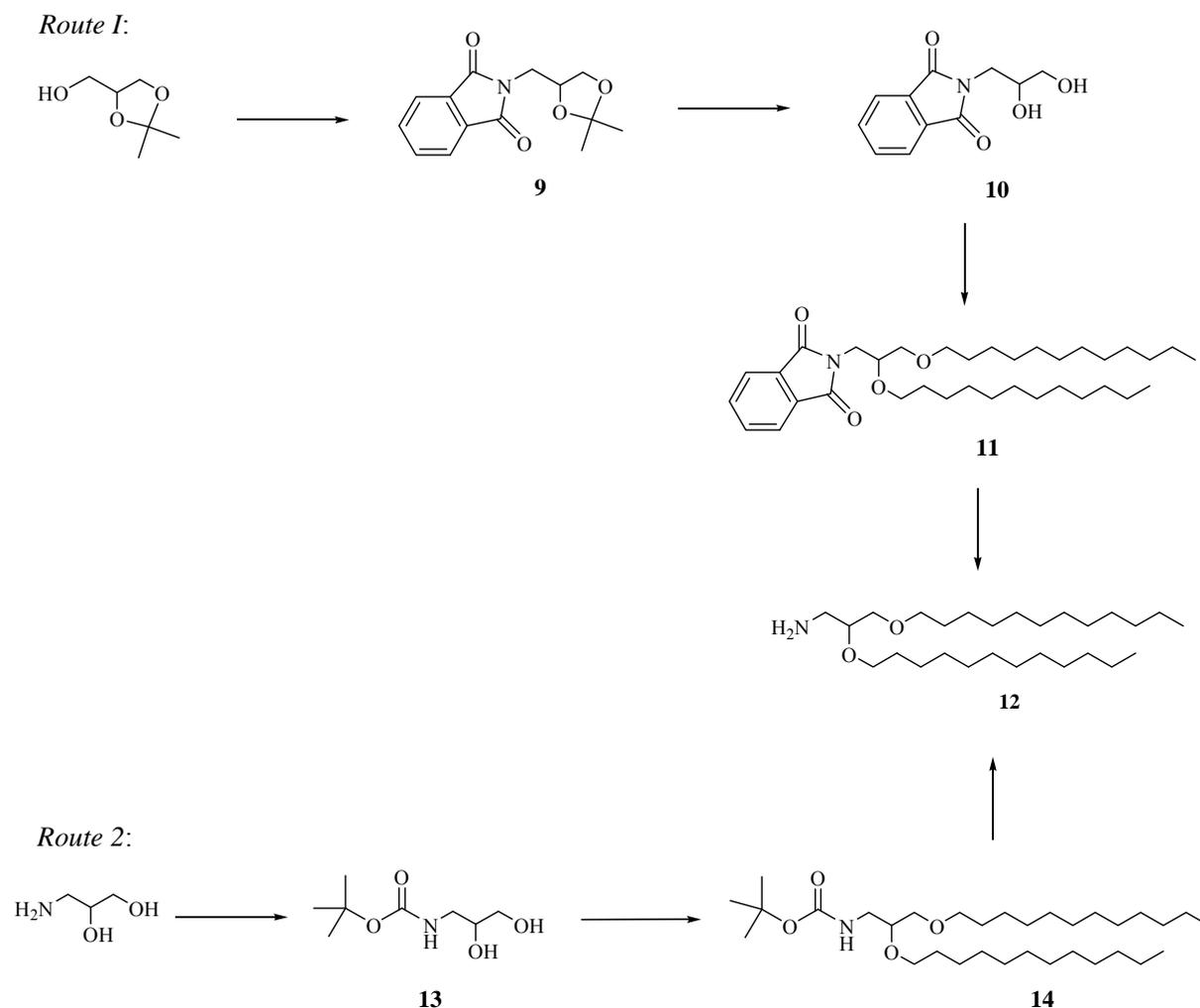
Zur Induktion der Vesikelfusion müssen die an der Goldoberfläche abgeschiedenen Thio-CMC-Derivate zunächst hydrophob modifiziert werden. Als Lipidanalogon wurde das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** gewählt.

Die Darstellung von **12** sollte auf zwei getrennten Wegen ausgehend von 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol bzw. aus 3-Aminopropandiol durchgeführt werden.

In einer Mitsunobu-Reaktion soll das 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol zunächst zum *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9** umgesetzt werden. Die Hydrolyse des Acetals **9** mittels wässriger Trifluoressigsäure soll das entsprechende Diol **10** liefern, welches dann durch eine Phasentransferreaktion in Benzol und wässriger Natronlauge mit Dodecylbromid

zum *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11** weiter umgesetzt werden soll. Die abschließende Hydrazinolyse des Phthalimids soll dann das Amin **12** liefern.

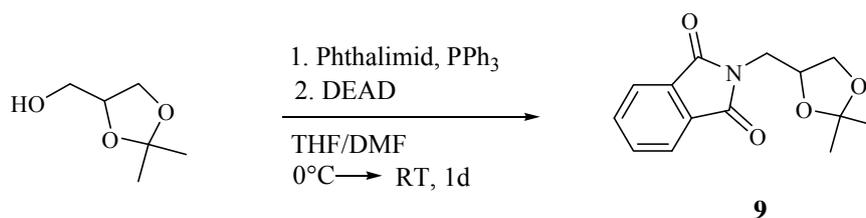
Die Darstellung von **12** aus 3-Aminopropandiol soll alternativ in einer 3-stufigen Synthese realisiert werden. Durch Reaktion des 3-Aminopropandiol mit Di-*tert*-butyldicarbonat soll zunächst das *N*-Boc-(2,3-dihydroxy)-propylamin **13** hergestellt werden. Die anschließende Umsetzung des geschützten Diols **13** mit Dodecylbromid in DMF soll dann zum *N-tert*-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbammat **14** führen. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Acetylchlorid in wasserfreiem Methanol soll schließlich das gewünschte Produkt **12** als Hydrochlorid liefern.



Schema 6.1: Syntheseweg zu 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**

6.3.2 *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9**

Die Darstellung des *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimids **9** erfolgte aus 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol unter Mitsunobu-Reaktionsbedingungen^[381] durch Umsetzung mit Triphenylphosphin, Phthalimid und Diethylazodicarboxylat (DEAD) in THF bei RT (Schema 6.2). Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde **9** in einer Ausbeute von 71% erhalten.



Schema 6.2: Synthese von *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9**

Das so erhaltene Produkt wurde durch ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 6.4) von **9** in CDCl₃ sind Signale im Aromatenbereich (δ = 7.83-7.69 ppm) zu beobachten, deren Kopplungsmuster auf einen 1,2-substituierten Aromaten schließen lassen. Die Signale bei δ = 4.42 ppm, δ = 4.05-3.90 ppm und δ = 3.84-3.70 ppm lassen sich den Protonen des Glycerin-Grundgerüsts (H-2, H-1 und H-3), die beiden Singulets bei δ = 1.43 ppm und δ = 1.37 ppm den beiden Methylgruppen zuordnen.

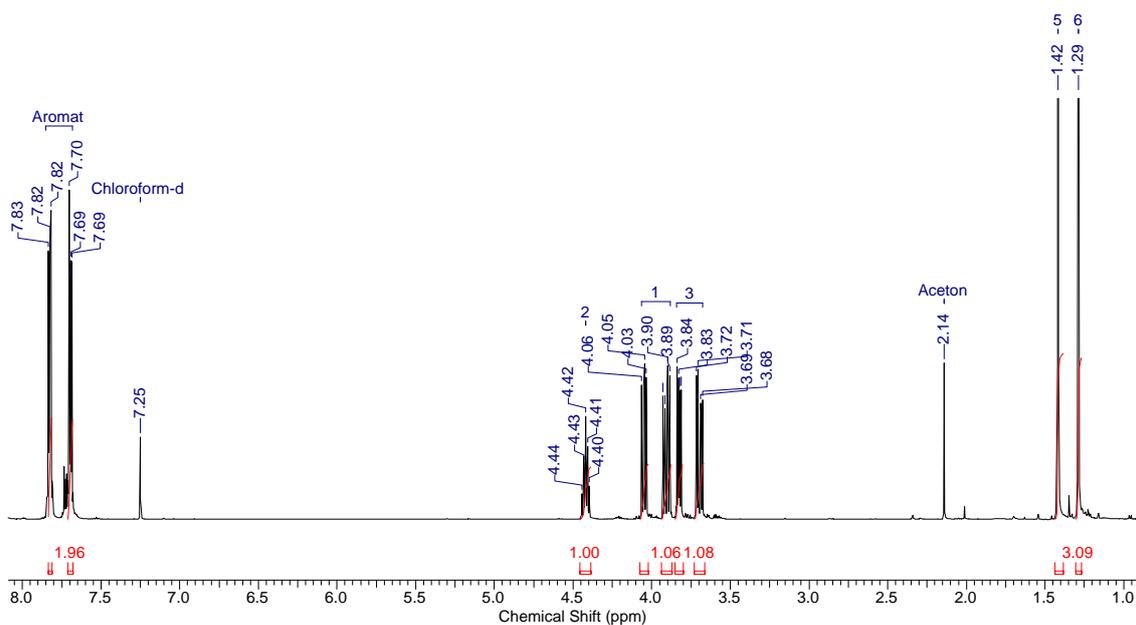
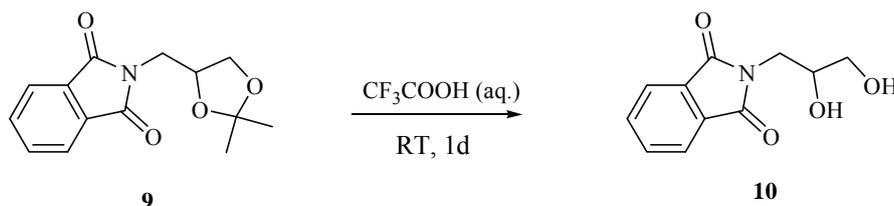


Abb. 6.4: ¹H-NMR-Spektrum von *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9**

Auch das ^{13}C -NMR-Spektrum von **9** in CDCl_3 belegt die erfolgreiche Umsetzung. Darin erscheinen die Signale der Kohlenstoffatome der eingeführten Phthalimidgruppe im Bereich der chemischen Verschiebung von 168.19 bis 123.35 ppm. Dem Kohlenstoffatom C-3 lässt sich eindeutig das Signal bei $\delta = 109.81$ ppm zuordnen, die Signale der beiden Methylgruppen treten bei $\delta = 26.80$ und 25.34 ppm auf. Die übrigen Signale (C-2, C-1, C-3) erscheinen im Bereich von $\delta = 73.28$ ppm – 40.95 ppm.

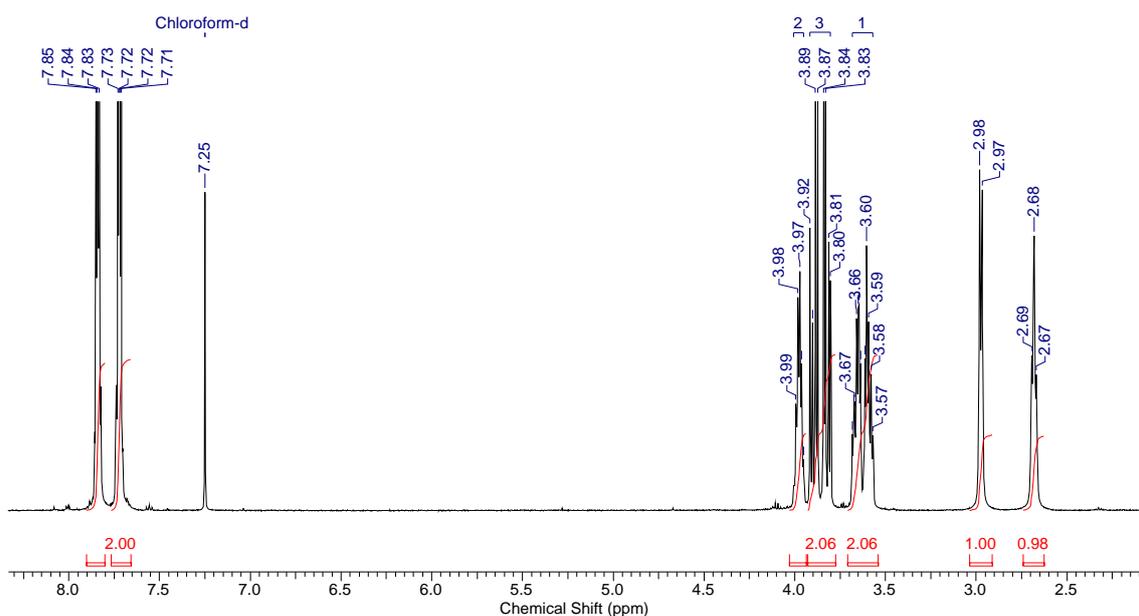
6.3.3 *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid **10**

Die Hydrolyse des Isopropylidinalacetals **9** erfolgte nach einer Vorschrift von *Lohray*^[382] mit wässriger Trifluoressigsäure (TFA) (Schema 6.3). Nach Reinigung durch Kristallisation aus einem Gemisch aus Benzol/Methanol/Hexan im Verhältnis 5:1:4 wurde das Diol **10** in einer Ausbeute von 95 % erhalten.



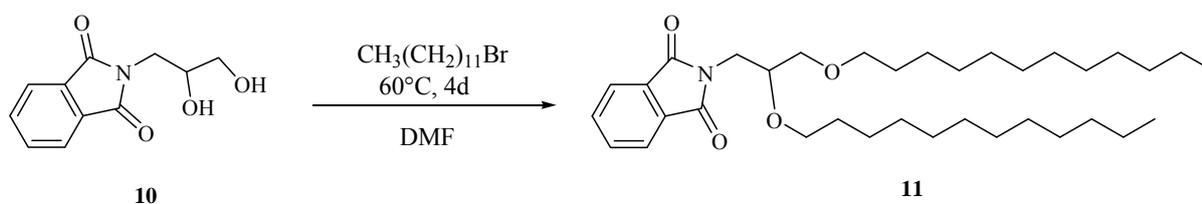
Schema 6.3: Synthese von *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid **10**

Abb. 6.5 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von **10** in CDCl_3 . Darin lassen sich zwei neue Signale bei $\delta = 2.97$ und $\delta = 2.68$ ppm beobachten, die den beiden freien Hydroxylgruppen zugeordnet werden können. Auch das ^{13}C -NMR Spektrum von **10** in CDCl_3 belegt die erfolgreiche Umsetzung, da sowohl die Signale der beiden Methylgruppen bei $\delta = 26.80$ und 25.34 ppm, als auch das Signal des Kohlenstoffatoms C-4 bei $\delta = 109.81$ ppm nicht mehr zu beobachten sind. Die Signale des Glycerins erfahren nach der Entschützung eine Hochfeldverschiebung; so erscheint das Signal des Kohlenstoffatom C-2 jetzt bereits bei $\delta = 73.98$ ppm. Die Signale der beiden Methylen-Gruppen sind dagegen nur leicht nach $\delta = 63.77$ ppm und $\delta = 40.46$ ppm verschoben.

Abb. 6.5: ^1H -NMR Spektrum von *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid **10**

6.3.4 *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11**

Durch Umsetzung des Diols **10** mit NaH und Dodecylbromid in DMF bei 60°C wurde das *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11** erhalten (Schema 6.4).

Schema 6.4: Synthese von *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11**

Die Charakterisierung des erhaltenen Produktes erfolgte mithilfe der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Zur exakten Zuordnung der Signale wurden das ^{13}C -Dept-NMR, sowie das HC-COSY-NMR Spektrum hinzugezogen.

Das ^1H -NMR Spektrum des erhaltenen Produktes lässt aufgrund der Abwesenheit der Signale für die beiden Hydroxylgruppen sowie dem Auftreten neuer Signale im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 1.57\text{-}0.84$ ppm, die sich den beiden Dodecylketten zuordnen lassen, auf eine erfolgreiche Umsetzung schließen. Die im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 6.6) hinzugekommenen Signale bei $\delta = 71.75$ ppm und $\delta = 70.58$ ppm entsprechen den

Methylengruppen der Dodecylketten am Ethersauerstoff (C-1^α, C-1^β). Die Signale der übrigen Kohlenstoffatome der Dodecylketten treten bei $\delta = 32.80$ bis 14.09 ppm auf.

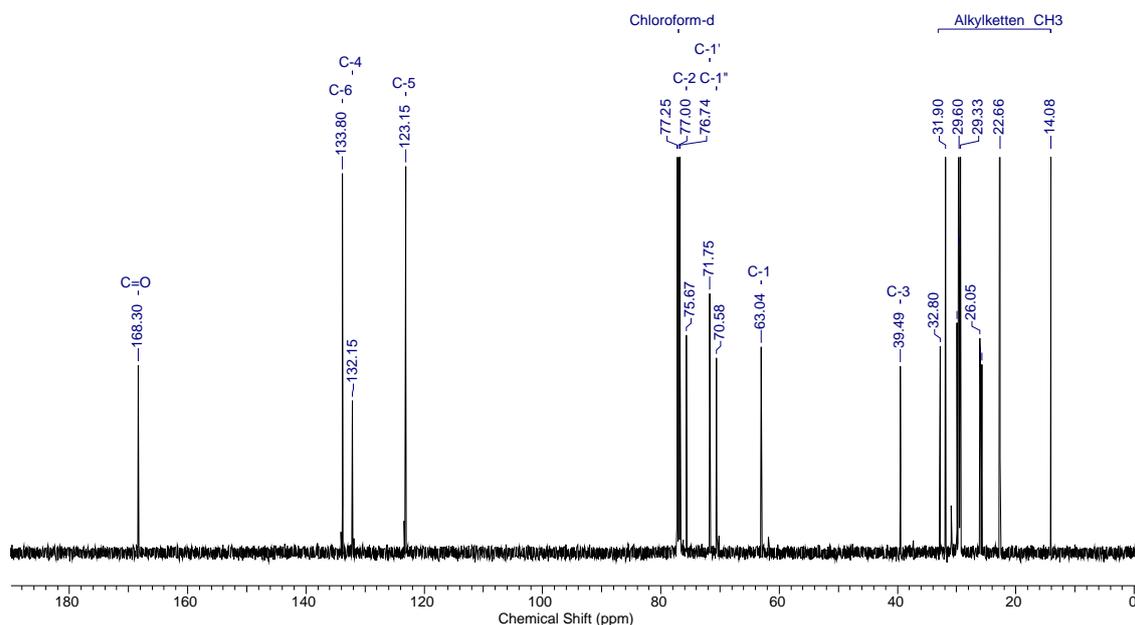
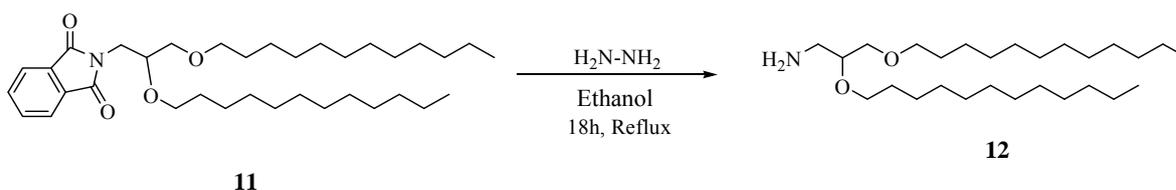


Abb. 6.6: ^{13}C -NMR-Spektrum von *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11**

6.3.5 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**

Schema 6.5 zeigt die Abspaltung der Phthalimidschutzgruppe durch Hydrazinolyse von *N*-1,2-Didodecyloxy-propylphthalimid **11** nach einer Vorschrift von *Heyes*.^[383]

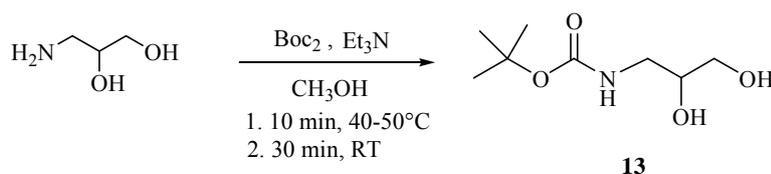


Schema 6.5: Synthese von 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**

Sowohl im ^1H -NMR- als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum des erhaltenen Produktes sind noch Signale der Phthalimid-Schutzgruppe zu erkennen, welche auf eine unvollständige Hydrazinolyse hinweisen. Versuche, diese durch Variation der Reaktionsbedingungen (längere Reaktionszeit, höhere Temperatur, verschiedene Eduktverhältnisse) zu vervollständigen, brachten leider nicht den gewünschten Erfolg. Daher wurde ausgehend von 3-Aminopropandiol eine alternative Syntheseroute für die Darstellung von 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** entwickelt.

6.3.6 *N*-tert-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-carbammat **13**

Zum Schutz der freien Amino-Funktionalität vor unerwünschten Nebenreaktionen wurde das 3-Aminopropandiol mit Di-*tert*-butyldicarbonat und Triethylamin als Base in Methanol zum *N*-*tert*-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-propylcarbammat **13** umgesetzt. (Schema 6.6) Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt in einer Ausbeute von 98 % isoliert.



Schema 6.6: Synthese von *N*-*tert*-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-carbammat **13**

Die Anknüpfung der Schutzgruppe kann im $^1\text{H-NMR}$ von **13** in CDCl_3 anhand des Signals bei $\delta = 1.42$ ppm beobachtet werden, dessen Integration 9 Protonen entspricht. Der NH-Gruppierung lässt sich das Signal bei $\delta = 5.18$ ppm zuordnen. Die Signale der Dihydroxypropyl-Gruppierung treten bei $\delta = 3.72$ ppm (H-2), $\delta = 3.54$ (H-3) und $\delta = 3.24$ ppm (H-1) auf.

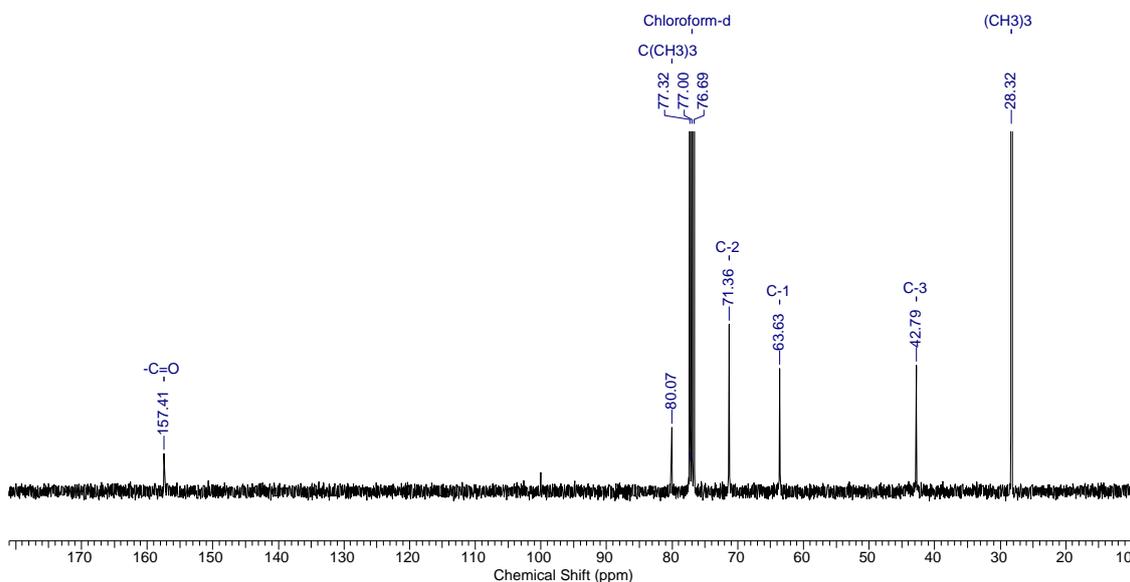


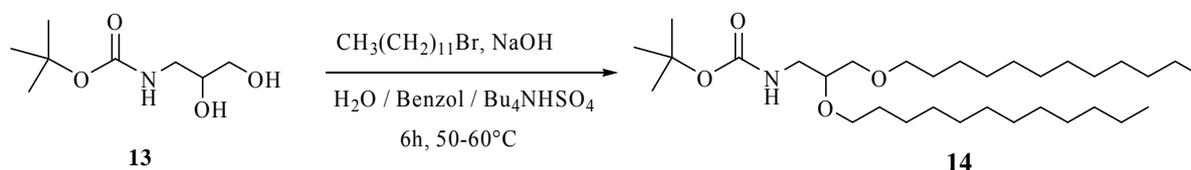
Abb. 6.7: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von *N*-*tert*-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-carbammat **13**

Abbildung 6.7 zeigt das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **13** in CDCl_3 . Darin sind die charakteristischen Signale der eingeführten Boc-Schutzgruppe deutlich zu erkennen. So

entspricht das Signal bei $\delta = 157.41$ ppm dem Carbonylkohlenstoff. Bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 80.07$ ppm und $\delta = 28.32$ ppm erscheinen die Signale der ¹Butyl-Gruppe. Die Signale im Bereich von 71.36 bis 42.79 ppm lassen sich den Kohlenstoffatomen der Propandiol-Gruppe zuordnen.

6.3.7 *N*-tert-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbamate **14**

Durch eine Phasentransferreaktion in Benzol und wässriger NaOH wurde das *N*-tert-Butyl-1,2-dihydroxypropylamin **13** mit Dodecylbromid zu *N*-tert-Butyl-2,3-(didodecyloxy)-propylcarbamate **14** umgesetzt (Schema 6.7). Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das kristalline Produkt in einer Ausbeute von 54% isoliert.



Schema 6.7: *N*-tert-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbamate **14**

Das ¹H-NMR Spektrum von **14** in CDCl₃ zeigt die erfolgreiche Umsetzung zum gewünschten Produkt. Die Signale der beiden Hydroxyl-Gruppen sind darin nicht mehr zu erkennen. Stattdessen treten Signale im Bereich der chemischen Verschiebung von 1.88 ppm bis 0.87 ppm auf, die sich eindeutig den Protonen der beiden Dodecylreste zuordnen lassen.

Im ¹³C-NMR-Spektrum sowie im ¹³C-DEPT-NMR (Abb. 6.8) von **14** in CDCl₃ erscheinen die Signale der Kohlenstoffatome der Methylengruppen der beiden Dodecylreste bei einer chemischen Verschiebung von 34.01 ppm bis 14.09 ppm. Aufgrund der Alkylierung erfahren die Signale der beiden Kohlenstoffatome C-2 und C-1 im Gegensatz zur Vorstufe eine leichte Tieffeldverschiebung nach 77.09 ppm und 70.24 ppm. Das Signal des Kohlenstoffatoms C-1 erscheint unverändert bei $\delta = 41.94$ ppm.

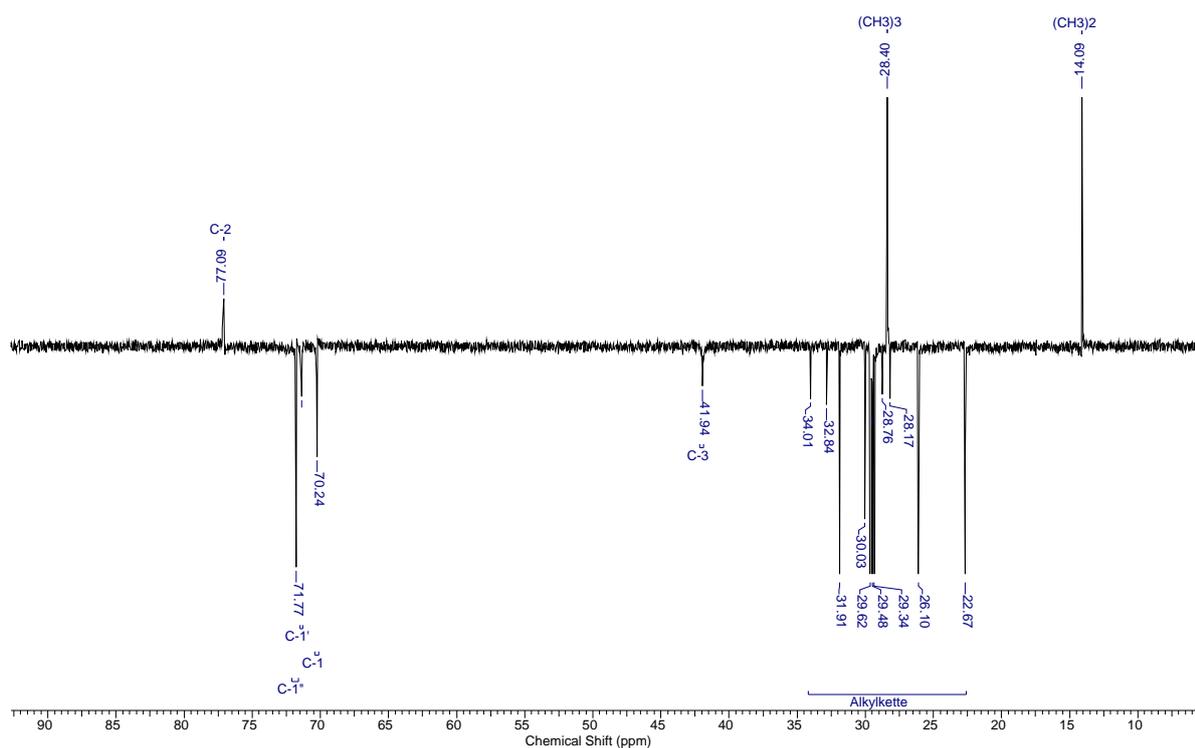
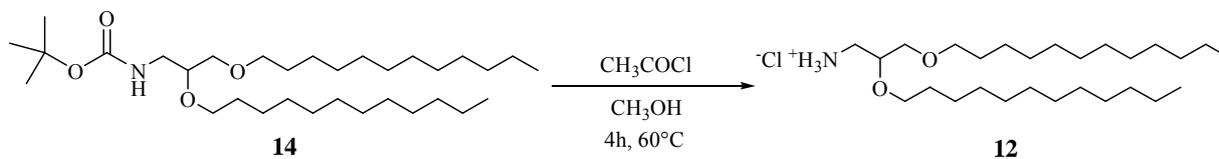


Abb. 6.8: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von *N*-tert-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbamate **14**

6.3.8 2,3-Didodecyloxypropylamin Hydrochlorid **12**

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde mittels Acetylchlorid in Methanol erreicht. (Schema 6.8). Nach Kristallisation aus Diethylether erhält man das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** als Hydrochlorid in einer Ausbeute von 54 %.



Schema 6.8: Synthese von 2,3-Didodecyloxypropylamin Hydrochlorid **12**

Die Signale der Boc-Schutzgruppe bei $\delta = 156.04$ ppm, 79.07 ppm und 28.40 ppm im ^{13}C -NMR bzw. bei $\delta = 1.43$ ppm im ^1H -NMR Spektrum, sind nicht mehr zu beobachten. Das Signal des Kohlenstoffatoms C-2 erfährt aufgrund der Deblockade des Amins eine leichte Hochfeldverschiebung und tritt jetzt bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 73.99$ ppm auf.

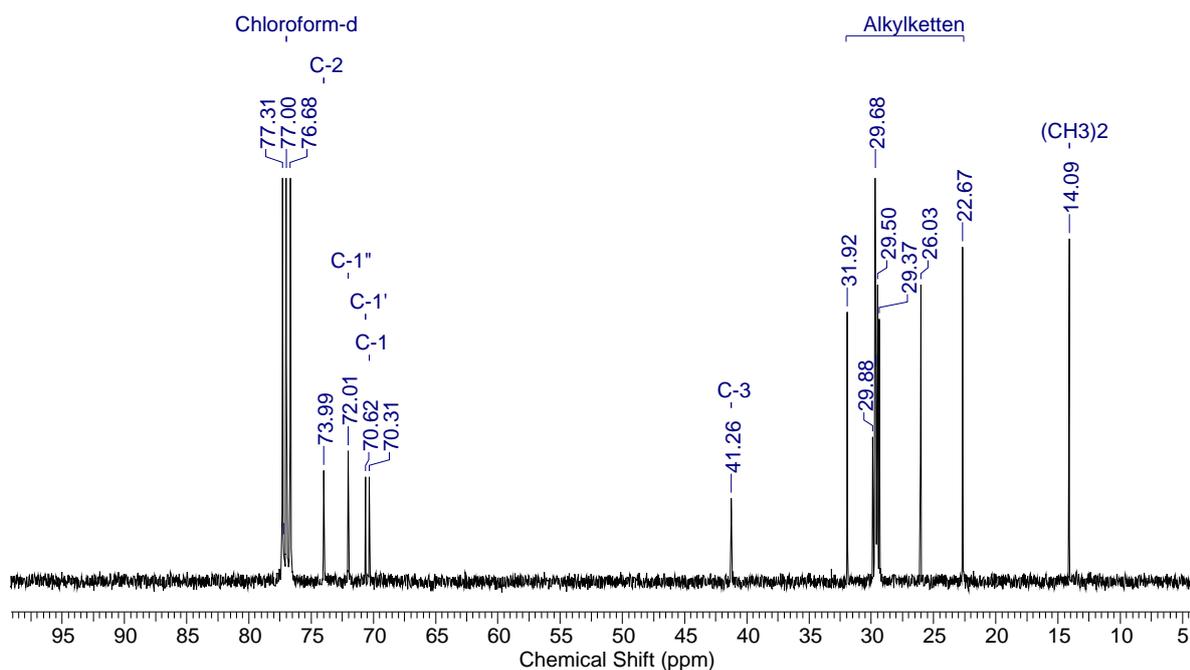


Abb. 6.9: ^{13}C NMR-Spektrum von 2,3-Didodecyloxypropylamin Hydrochlorid **12**

Das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** konnte somit in einer Gesamtausbeute von 32 % ausgehend von 3-Aminopropandiol erhalten werden.

6.3.3 Zusammenfassung

2,3-Didodecyloxypropylamin **12** wurde ausgehend von 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol und 3-Aminopropandiol synthetisiert.

Die Darstellung von **12** aus 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol gelang in einer 4-stufigen Synthese. In einer Mitsunobu-Reaktion wurde das Edukt zunächst in das entsprechende Phthalimid **9** überführt. Durch Hydrolyse mit wässriger Trifluoressigsäure konnte daraus das *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid **10** in 95%-iger Ausbeute dargestellt werden. Die Veretherung von **10** mit NaH und Dodecylbromid führte dann zum *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11**.

Die Freisetzung des Amins **12** erfolgte anschließend durch Hydrazinolyse von **11**.

Ausgehend von 3-Aminopropandiol wurde das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** in einer Gesamtausbeute von 32% über drei Stufen erhalten. Durch Umsetzung von 3-Aminopropandiol mit Di-*tert*-butyldicarbonat gelang die Synthese des BOC geschützten Diols

13 in nahezu quantitativer Ausbeute. Eine Phasentransferreaktion von **13** und Dodecylbromid in Benzol/TBAHS und wässriger Natronlauge führte zum *N*-tert-Butyl-2,3-Didodecyloxypropylcarbammat **14**. Schließlich erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Acetylchlorid in Methanol, wodurch das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** als Hydrochlorid in einer Ausbeute von 54% erhalten wurde.

6.4 Membranaufbau auf reaktiven Thio-CMC-Monoschichten auf Gold

Die Vorzüge bei der Verwendung von Polymeren als Abstandshalter für Lipiddoppelschichten wurden bereits in der Einleitung beschrieben. Da viele Reaktionen in Membranen auf der lateralen Mobilität und den fluiden Eigenschaften der Komponenten beruhen, wurden zahlreiche Versuche zur Entkopplung der Lipiddoppelschicht vom Substrat mittels Polymerkissen untersucht.^[134] Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun reaktive Thio-Carboxymethylcellulose-Derivate als polymere Abstandshalter eingesetzt werden. Der Aufbau der Membran erfolgte nach hydrophober Modifizierung der reaktiven Thio-CMC-Monoschicht auf Gold durch 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**. Da aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der hydrophilen Thio-Carboxymethylcellulosen und des hydrophoben 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** eine Kupplung in Lösung nicht möglich war, musste diese in einer insitu Reaktion an der Thio-CMC-Monoschicht erfolgen

Als Trägermaterial zur kovalenten Anknüpfung von **12** wurde der EDC Aktivester (HTSHP-CMC-EDC) **6** eingesetzt. Der Architekturaufbau wurde in situ mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie verfolgt.

6.4.1 Unspezifische Bindung von DMPC an eine reaktive HTSHP-CMC-EDC-Monoschicht

Um eine unspezifische Bindung der Vesikel an die reaktive Thio-Carboxymethylcellulose auszuschließen, wurden zunächst DMPC-Vesikellösung ohne vorherige hydrophobe Modifizierung der Thio-CMC-Monoschicht durch das 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** an diese Oberfläche adsorbiert.

Die Abscheidung der HTSHP-CMC-EDC **6** auf Gold erfolgte aus einer 0.1%-igen Lösung von **6** und TCEP in 0.4 M Acetatpuffer (pH 6.5) bei einem Fluss von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nach Ausbildung der stabilen Thio-CMC Monoschicht wurde die DMPC-Vesikellösung (Konzentration $c = 1\text{mg}/\text{ml}$ in 0.1 mM NaCl) injiziert. Da sich Vesikel nur bei Temperaturen oberhalb der Hauptphasenübergangstemperatur verarbeiten lassen, wurden sowohl das Lösungsmittel, als auch die DMPC-Lösung auf eine Temperatur von 30-35°C erwärmt. Die Adsorptionskinetik in Abbildung 6.10 zeigt eine kurzzeitige Zunahme der Schichtdicke während des Durchtritts der DMPC-Lösung durch die Zelle. Da sich danach keine nennenswerte Änderung der Schichtdicke beobachten ließ, kann eine Adsorption der Vesikel an der Thio-CMC Monoschicht ausgeschlossen werden.

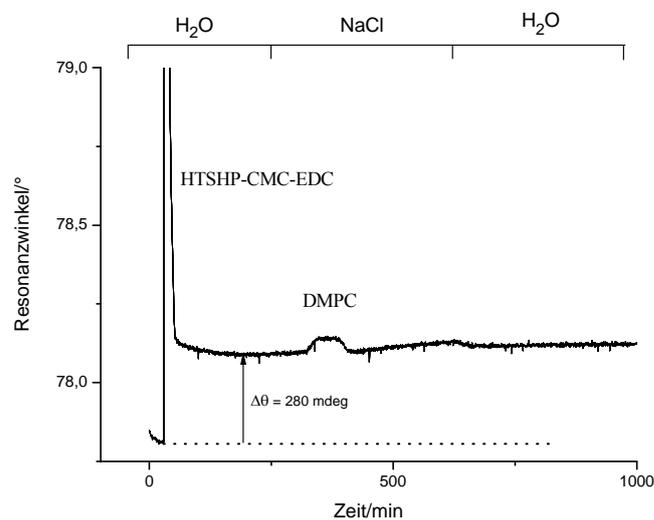


Abb. 6.10: Adsorptionskinetik von DMPC ($c = 1\text{mg}/\text{ml}$ in 0.1 mM NaCl) an einer mit HTSHP-CMC-EDC **6** (0.1%-ig in 0.4 M AcB + TCEP, pH 6.5) modifizierten Goldoberfläche mit

$$H_{\text{HTSHP-CMC-EDC-Monoschicht}} = 2.1 \pm 0.1 \text{ nm bzw. } \Gamma = 2.09 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$$

6.4.2 Aufbau der Lipidmembranen auf einer hydrophob modifizierten HTSHP-CMC-EDC-Monoschicht

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Vesikel keine unspezifischen Wechselwirkungen mit der Thio-CMC Monoschicht eingehen, soll nun ein Membranmodellsystem auf Basis der reaktiven Thiocarboxymethylcellulose **6** auf Gold aufgebaut werden.

Durch Abscheidung der HTSHP-CMC-EDC **6** auf Gold wird zunächst die dünne Polymerschicht aufgebaut. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, erfolgt die Adsorption aus wässriger Lösung nach Voraktivierung der Thiosulfatgruppen durch TCEP im Neutralen. Um eine unspezifische Haftung des Amins an der Goldoberfläche auszuschließen, wurde bei der Beschichtung der Au-Oberfläche mit der reaktiven Thio-CMC auf eine vollständige Belegung der Oberfläche (definiert durch die Messzelle) mit dem Cellulosederivat geachtet.

Im nächsten Schritt erfolgt die Modifizierung der reaktiven Cellulosemonoschicht mit 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**. Die kovalente Anbindung des Lipidanalogen **12** an die Cellulosemonoschicht **6** erfolgt über eine Amidbindung. Die Alkylketten des Didodecylamins sollen dann die Funktion einer Lipid-Submonoschicht (Pseudo-Lipidschicht) der Membran übernehmen.

Anschließend soll diese Submonoschicht durch Fusion von frisch präparierten Vesikeln zu einer Lipiddoppelschicht komplettiert werden.

Eine schematische Beschreibung des Aufbaus der 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** modifizierten Thio-CMC unterstützten Modellmembran ist in Abbildung 6.11 dargestellt.

Mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie werden die optischen Schichtdicken der Monolagen sowie deren Komplettierung zur Doppelschicht mit Hilfe der Vesikelfusionstechnik gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Reflektivitätskurven erfolgt mithilfe des Programms Winspill (2.20) (siehe Kapitel 4.2). Zur Untersuchung der Komplettierung der Monoschicht zur Doppelschicht durch Vesikelspreitung wird eine Kinetikmessung aufgezeichnet, mittels derer der stufenweise Aufbau der Schichten verfolgt werden kann. Die erhaltenen Reflektivitätskurven werden unter Annahme eines

Vierschichtmodells (Prisma, Goldschicht, adsorbierte Cellulosemonoschicht und Amin bzw. Lipiddoppelschicht) ausgewertet.

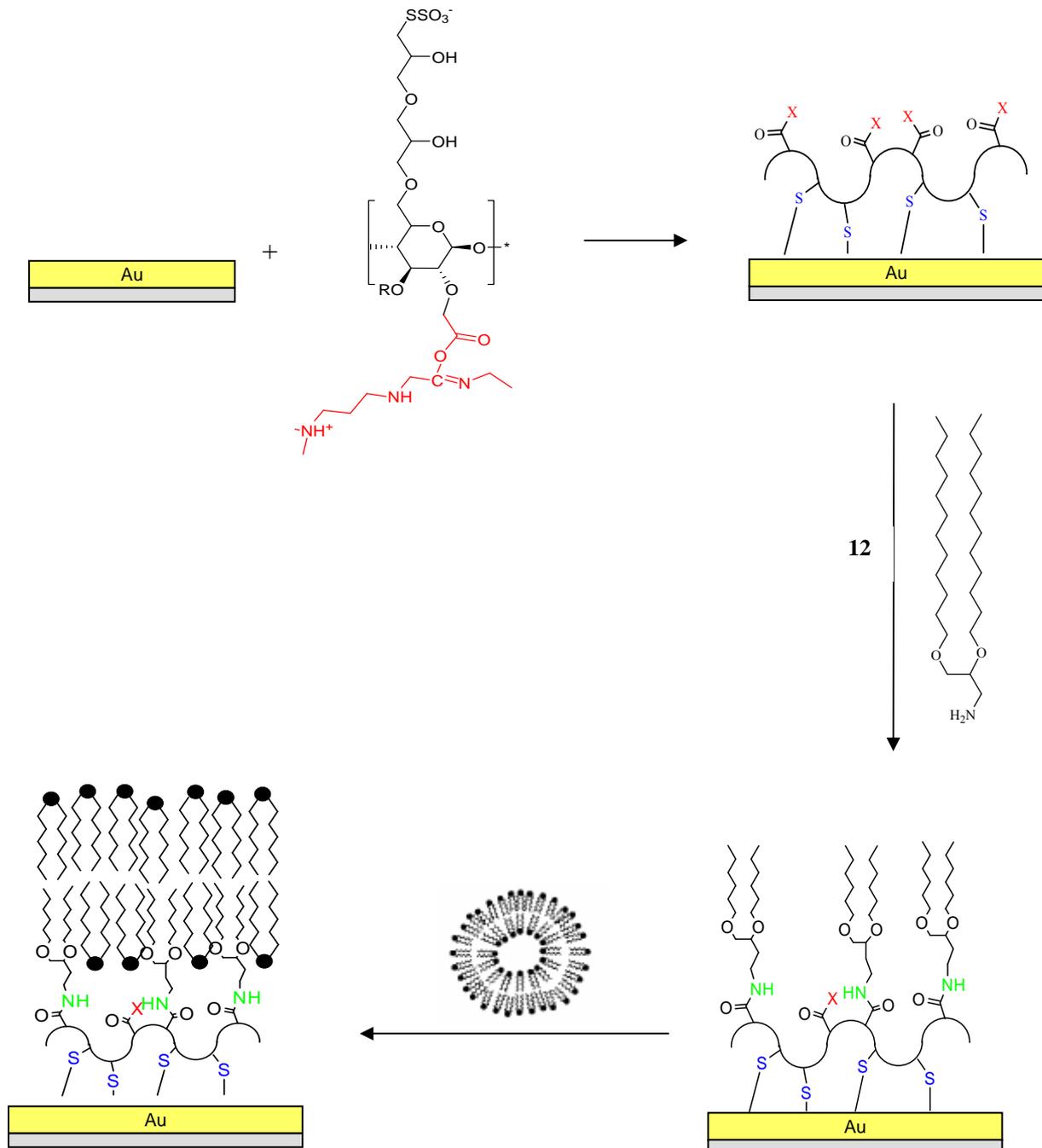


Abb. 6.11: Stufenweiser Aufbau der 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** modifizierten Thio-CMC unterstützten Modellmembran:

- Adsorption der HTSHP-CMC-EDC **6** auf einer Goldoberfläche mit X = EDC
- Modifikation mit 2,3-Didodecyloxypropylamin **12**
- Membranaufbau durch Vesikelfusion

Zum Aufbau der polymergestützten Lipidmembranen wurde zunächst wiederum die HTSHP-CMC-EDC **6** aus wässriger Lösung (0.1%-ige Lösung von **6** in Acetatpuffer, pH 6.5 + TCEP) auf die Goldoberfläche (Fluss 34 $\mu\text{l}/\text{min}$) abgeschieden. Anschließend wurde die Cellulosemonoschicht mit einer 0.5 mg/ml konzentrierten Lösung von 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** in Ethanol versetzt. Nach zwanzig Minuten hatte sich eine sehr stabile zweite Monolage ausgebildet, die auch nach sorgfältigem Spülen mit Wasser haften blieb. Abbildung 6.12 zeigt die aufgenommenen Plasmonenspektren von der aufgedampften Goldschicht, der darauf verankerten Thio-CMC-Monoschicht sowie deren Modifizierung durch das Lipidanalogon **12**.

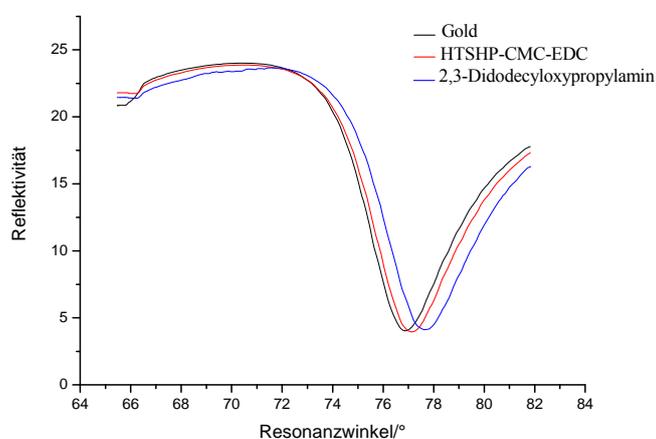


Abb. 6.12: Reflektivitätskurven für den schichtweisen Aufbau auf Goldoberflächen. Die Fixierung der HTSHP-CMC-EDC Monoschicht **6** (—) auf der Goldoberfläche ruft eine Verschiebung des Resonanzwinkels entlang der x-Achse zu größeren Werten hervor; ebenso die nachfolgend vorgenommene Modifizierung der Thio-CMC-Oberfläche mit 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** (—)

Die erhaltenen Reflektivitätskurven zeigen eine deutliche Zunahme der Schichtdicke nach Kupplung des 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** an die Thio-CMC-Monoschicht, erkennbar an der Verschiebung des Minimums des Resonanzwinkels zu größeren Werten.

Die Komplettierung dieser Submonoschicht zur Lipiddoppelschicht soll anschließend mithilfe der Vesikelspreittechnik ermöglicht werden.

- Spreiten von DOPC/POPC-Vesikeln

Das Spreiten der Vesikel aus DOPC bzw. POPC erfolgte aus wässriger Lösung bei RT ($c_{\text{Vesikel}} = 1 \text{ mg/ml}$ in 0.1 M NaCl) und unter stationären Bedingungen (Fluss gestoppt für etwa 1h). Die Fusion der Vesikel wurde mit SPR-Messungen im Kinetik-Modus verfolgt. Für beide Lipide zeigen die Kinetikkurven bereits kurz nach Zugabe der entsprechenden Vesikellösung einen relativ steilen Anstieg, der dann in einen stationären Zustand übergeht. Abbildung 6.12 zeigt die vollständige Adsorptionskinetik des Membran-Aufbauprozesses für POPC- und DOPC-haltige Vesikel.

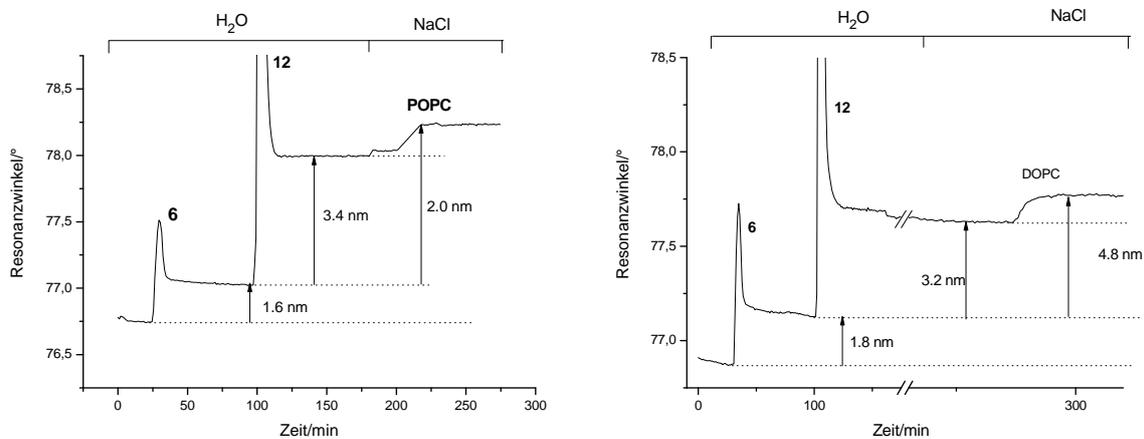


Abb. 6.12: Adsorptionskinetik des schrittweisen Aufbaus des 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** modifizierten HTSHP-CMC-EDC **6** unterstützten Membranmodell: HTSHP-CMC- CMC-EDC: 0.1%-ig in 0.4 M AcB ($\text{pH } 6.5$) (+TCEP), 2,3-Didodecyloxypropylamin: 0.5 mg/ml Ethanol, a) POPC bzw. b) DOPC 1 mg/ml in 0.1 M NaCl

Durch Messung der Reflektivitätskurven wird nach der Vesikelfusion die Verschiebung des Resonanzwinkels bestimmt und unter Verwendung des Brechungsindex $n = 1.5^{[77]}$ in eine optische Schichtdickenänderung umgerechnet. Um zu überprüfen, ob eine stabile Schicht entstanden ist, wird die Messzelle mit 0.1 M NaCl -Lösung gespült und wiederum eine Reflektivitätskurven aufgenommen. Es kommt zu keiner weiteren Änderung der Reflektivitätskurven. Abbildung 6.13 zeigt die gemessenen Reflektivitätskurven, die für die Bestimmung der jeweiligen Schichtdicken benötigt werden. Auch die Komplettierung der 2,3-Didodecyloxypropylamin Submonoschicht zur Doppelschicht kann durch eine erneute Verschiebung des Minimums der Reflektivitätskurven zu größeren Werten hin beobachtet werden.

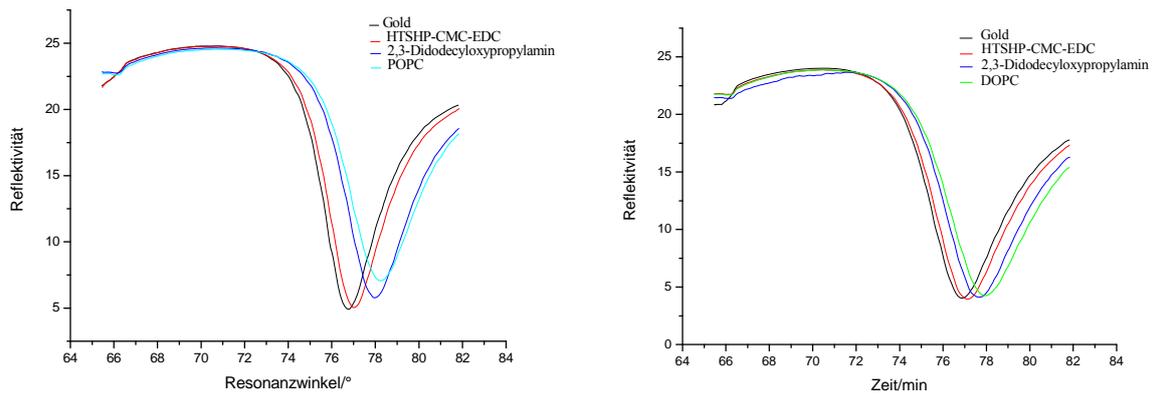


Abb. 6.13: ermittelte Reflektivitätskurven für das System Gold (—), HTSHP-CMC-EDC **6** (—), 2,3-Didodecyloxypropylamin (—), POPC (—) bzw. DOPC (—)

Laut Literatur beträgt die optische Schichtdicke einer Phospholipidmonoschicht $d_{\text{Lipid}} = 2.5$ nm.^[142,384] Die optische Schichtdicke der Submonoschicht sollte daher nach Vesikelfusion um etwa einen Lipidanteil zunehmen. In erster Näherung entspräche dies für die Lipiddoppelschicht (System 2,3-Didodecyloxypropylamin + POPC bzw. DOPC) einer Schichtdicke von $d_{\text{Membran}} = 5.8$ nm. Die Ergebnisse der SPR-Messungen sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

Tab. 6.3: optische Schichtdicken des Systems HTSHP-CMC-EDC **6** + 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** + POPC bzw. DOPC. Die Schichtdickenangabe zur Monoschicht **12** bezieht sich lediglich auf die Dicke der 2,3-Didodecyloxypropylamin-Schicht.

	Brechungsindex n	Schichtdicke d[nm]
HTSHP-CMC-EDC	1.47	1.6-1.8
2,3-Didodecyloxypropylamin	1.45	3.3
nach Vesikelspreitung		
POPC	1.45	5.4
DOPC	1.45	4.8

Die nach Aufbau der Submonoschicht vorgenommene Spreitung der POPC-Vesikeln ergibt einen Wert im Bereich der für eine Lipidmonoschicht typischen 2.5 nm. Im Fall des DOPC bewegt sich die Abweichung im Bereich von 1 nm.

▪ DMPC

Das Spreiten der Vesikel aus DMPC erfolgte ebenfalls aus wässriger Lösung ($c_{\text{DMPC}} = 1$ mg/ml in 0.1M NaCl) und unter stationären Bedingungen. Aufgrund der höheren Phasenübergangstemperatur des DMPC ($T_m = 23.5^\circ\text{C}$) wurde das Lösungsmittel jedoch auf 35-40°C erwärmt (Abb. 6.14)

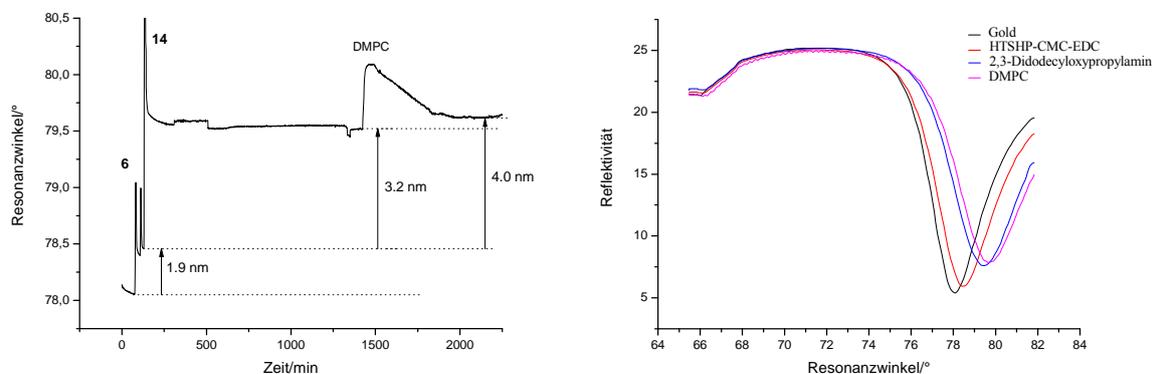


Abb. 6.14: a) Adsorptionskinetik des schrittweisen Aufbaus des 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** modifizierten HTSHP-CMC-EDC **6** unterstützten Membranmodell: HTSHP-CMC-EDC 0.1%-ig in 0.4 M AcB (pH 6.5) (+TCEP), $d_{\text{HTSHP-CMC-EDC}} = 1.9 \pm 0.1$ nm, $\Gamma = 1.98 \pm 0.1$ mg/m² DMPC: 1 mg/ml in 0.1 M NaCl
b) ermittelte Reflektivitätskurven für das System Gold (—), HTSHP-CMC-EDC **6** (—), 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** (—), DMPC (—)

Nach Zugabe der DMPC-Vesikellösung ließ sich zunächst ein steiler Anstieg der optischen Schichtdicke beobachten, der aufgrund der erreichten Schichtdicke von über 6 nm auf eine Vesikeladsorption hindeutet. Im weiteren Verlauf der Messung nahm die Schichtdicke dann kontinuierlich ab, bis nach etwa 6h ein konstanter Wert erreicht wurde.

Auch durch ein anschließendes Spülen mit 0.1M NaCl-Lösung ändert sich die optische Schichtdicke d_{Membran} nicht mehr. Die Messung der Reflektivitätskurve zeigt auch hier eine leichte Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Werten an. Tabelle 6.4 fasst die ermittelten Schichtdicken zusammen.

Tab. 6.4: optische Schichtdicken des Systems HTSHP-CMC-EDC **6** + 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** + DMPC. Die Schichtdickenangabe zur Monoschicht Amin beziehen sich lediglich auf die Dicke der 2,3-Didodecyloxy-propylamin-Schicht.

	Brechungsindex n	Schichtdicke d[nm]
HTSHP-CMC-EDC	1.47	1.9
2,3-Didodecyloxypropylamin	1.45	3.3
DMPC	1.45	4.0

6.4.3 Diskussion und Ausblick

Die SPR-Daten belegen den stufenweisen Aufbau der Modellsysteme. Die ermittelten Schichtdicken für die zunächst auf der Goldoberfläche adsorbierten Thio-CMC Monoschichten liegen im Bereich von 1.6-1.9 nm, was einer dichten Belegung der Goldoberfläche mit der Thio-CMC^[123] entspricht. Durch nachfolgende Modifizierung der Thio-CMC-Oberfläche mit **12** wurde diese für die Fusion lipidhaltiger Vesikel vorbereitet. Nach Spreitung der POPC- bzw. DOPC-haltigen Vesikel wurden Schichtdicken ermittelt, die etwas niedriger liegen, als der für die Komplettierung der Amin-Submonoschicht durch eine Phospholipidmonoschicht berechnete theoretische Wert von 5.8 nm. In beiden Fällen hat es jedoch den Anschein, dass die Submonoschicht durch die Vesikelfusion zu einer Lipiddoppelschicht ergänzt wird. Sowohl für die DOPC- als auch für die POPC-haltigen Vesikel sind mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie Schichtdickenzunahmen in der Größenordnung einer Lipiddoppelschicht (~ 5 nm) zu finden. Vermutlich bewirken die äußerst geringen Phasenübergangstemperaturen von POPC und DOPC, dass die Vesikel bei RT unmittelbar nach Adhärenz auf der Oberfläche spreiten und es spontan zur Ausbildung einer Doppelschicht kommt.

Die Spreitungsversuche mit DMPC auf der hydrophob modifizierten Cellulosemonoschicht führten dagegen nicht zu der gewünschten Celluloseunterstützten Lipiddoppelschicht. Der sehr steile Anstieg der Kinetikkurve weist auf eine lose Adsorption ganzer kolloidaler Teilchen hin, die im weiteren Verlauf der Messung zum größten Teil abgespült werden. Die mittels SPR ermittelte optische Schichtdicke $d_{\text{Membran}} = 4.0$ nm ist etwas zu klein für eine reine

Lipiddoppelschicht. Man muss daher davon ausgehen, dass es nicht zur Ausbildung einer planaren geschlossenen Lipidmembran gekommen ist. Da bei der Schichtdickenbestimmung über eine relativ große Fläche gemittelt wird, würde man in diesem Fall eine kleinere Schichtdicke bestimmen.

Um jedoch mehr Informationen über Belegung und Ausbildung einer Lipiddoppelschicht zu erhalten, sind weitere Untersuchungsmethoden erforderlich. Mit der Methode der Impedanzspektroskopie lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Modellmembranen (Kapazität C und Systemwiderstand R) charakterisieren, wodurch sich Aussagen über den erfolgenden Architekturaufbau und die Qualität der Membran treffen lassen.

Durch den Einbau von Membranproteinen wie beispielsweise Cytochrom-P450 lassen sich Modellmembranen auf ihre Eignung als solche testen.

6.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, eine polymerunterstützte Lipiddoppelschichtmembranen auf Basis der in Kapitel 3 beschriebenen reaktiven Thio-Carboxymethylcellulose, HTSHP-CMC-EDC **6**, darzustellen. Durch nachfolgende hydrophobe Modifizierung der Thio-CMC-Monoschicht sollte das Aufplatzen und Ausrollen von Lipidvesikeln ermöglicht werden. Als Lipidanalogen, welches die Lipidmembran an der aus wässriger Lösung adsorbierten Thio-CMC-Monoschicht verankert, wurde 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** gewählt. Dessen Darstellung gelang nach zwei alternativen Synthesewegen ausgehend von 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol und 3-Aminopropandiol. Die Fusion von Lipidvesikeln sollte letztlich zur Lipiddoppelschicht führen.

Der stufenweise Aufbau des Systems konnte mithilfe der SPR-Messtechnik in situ verfolgt werden. Abb. 6.12 und Abb. 6.14 zeigen den schichtweisen Aufbau der untersuchten Systeme auf der Goldoberfläche. Durch Aufnahme der jeweiligen Reflektivitätskurven konnten die Schichtdicken d der verschiedenen Monolagen ermittelt werden. Die Auswertung dieser Kurven erfolgte mit dem Programm Winspall 2.0 unter Annahme eines Drei- bzw. Vierschichtmodells.

Durch Adsorption der Thio-CMC **6** auf der Goldoberfläche wurde eine Monoschicht von etwa 1.6-2.0 nm Dicke erhalten. Nachfolgende Modifizierung dieser Oberfläche durch kovalente Anbindung des 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** an die reaktive Cellulosemonoschicht **6** erhöhte die Schichtdicke um 3.3 nm.

Die nach Aufbau der Submonoschicht vorgenommene Fusion zur Doppelschicht ergab schließlich für die DOPC-haltigen Vesikel eine Schichtdickenänderung von 1.5 nm; für die POPC-haltigen Vesikel wurden 2.1 nm erzielt. Die ermittelten Gesamtschichtdicken des Systems 2,3-Didodecyloxypropylamin **12** + DOPC bzw. POPC-Vesikel betragen 4.8 bzw. 5.4 nm, was in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert für eine Lipiddoppelschicht ist.

Dagegen konnte für die DMPC-haltigen Vesikel lediglich eine Schichtdicke von $d = 4.0$ nm bestimmt werden.

7. Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien

Alle Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Aldrich* und *Fluka* bezogen, und soweit nicht anders beschrieben, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Als Ausgangsmaterialien für die Synthesen der Cellulosederivate wurde die mikrokristalline Cellulose AVICEL PH 101 (Fluka; $M_w = 36000$ g/mol, DP = 280) und das Carboxymethylcellulose Natriumsalz (Aldrich, $M_w = 250000$ g/mol, DS = 0.7) verwendet.

Absolute Lösungsmittel (DMF, DMSO) wurden mit der Qualität *puriss.* bezogen; die übrigen Lösungsmittel wurden in mindestens „zur Synthese“ Qualität erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Zur Durchmischung der Reaktionen wurde ein Magnetrührer mit Heizplatte vom Typ MR 3001 K (*Heidolph*) sowie ein KPG-Rührer (*IKA Labortechnik*) verwendet. Zum Erhitzen der Reaktionsansätze wurden Ölbäder eingesetzt. Für Reaktionen, die unter niedrigen Temperaturen (-5°C) durchgeführt wurden, wurde ein Kryostat der Firma *Lauda* (Lauda RM 6) verwendet. Alle Produkte, die nicht durch Ultrafiltration und anschließende Gefriertrocknung isoliert wurden, wurden im Hochvakuum bei 10^{-3} mbar von Wasser und anderen Lösungsmittelresten befreit. Das für den Aufbau von Thio-Cellulosemonoschichten, Enzymschicht- und Lipidmembranschichtsystemen verwendete MilliQ-Wasser wurde durch eine Millipore Simplicity Reinstwasseranlage (*Millipore*) bzw. durch ein Purelab Option System (*Elga*) gereinigt. Das entionisierte Wasser besaß eine spezifische Leitfähigkeit von $\kappa \leq 0.054$ $\mu\text{S}/\text{cm}$.

7.2 Methoden und Geräte

Die **NMR-Spektren** wurden an einem Spektrometer des Typs AVANCE II (400 MHz) der Firma *Bruker Biospin AG* bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur Messung der Spektren der Cellulosederivate wurden jeweils 30-40 mg der Substanz in 1000 μl Lösungsmittel gelöst. Jede Probe wurde mit einem Titandraht (Aldrich, 0.25mm diam., 99.7 %) versetzt, und über Nacht in einem Bandelin Sonorex Ultraschallbad (*Bandelinelectronics*) partiell abgebaut.

Für ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen im Lösungsmittel D_2O wurde Acetonitril (ACN) als interner Standard verwendet. (^1H -NMR: 1,95 ppm bzw. ^{13}C -NMR: 1,30 ppm und 118,9 ppm). Im Lösungsmittel DMSO- d_6 bzw. CDCl_3 dienten jeweils die eigenen Lösungsmittelresonanzen (2.49 ppm (^1H -NMR) und 39.50 ppm (^{13}C -NMR) für DMSO- d_6 bzw. 7.26 ppm (^1H -NMR) und 77.00 ppm (^{13}C -NMR) für CDCl_3) als innerer Standard.

Die Kernresonanzspektren wurden mit der Software ACD/Labs 7.0 der Firma *Advanced Chemistry Development Inc.* ausgewertet.

Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) relativ zu Acetonitril bzw. der Lösungsmittelresonanzen angegeben.

Bei den Multiplizitäten in den ^1H -NMR-Spektren steht **s** für Singulett, **d** für Dublett, **t** für Triplett und **m** für Multipllett.

Die Protonen der Glcp-Einheiten der Cellulosederivate sind mit H-1, H-2, ..., H-6, die entsprechenden Kohlenstoffatome beginnend am anomeren Zentrum mit C-1, C-2, ..., C-6 gekennzeichnet. Protonen von Substituenten werden mit H-1', H-2', H-3', H-1'', H-2'', H-3'' beginnend an der Anknüpfungsstelle gekennzeichnet, die Kohlenstoffatome der Substituenten mit C-1', C-2', C-3', C-1'', C-2'', C-3''. Der Exponent A eines Kohlenstoffatoms C- β^A , kennzeichnet eine Substitution an diesem Kohlenstoffatom, während durch den Exponent B das nicht funktionalisierte Kohlenstoffatom bestimmt wird.

Die Reinigung der einzelnen Cellulosederivate von Salzen und anderen niedermolekularen Verunreinigungen erfolgte mittels **Ultrafiltration**. Dazu wurden die wässrigen Lösungen der Produkte mit dem jeweils fünf- bis zehnfachen Volumen an Wasser oder Salzlösung relativ zum Volumen des zu reinigenden Derivats gegen eine Membran kontinuierlich filtriert. Die verwendeten Membranen bestanden aus Regeneratcellulose und besaßen Ausschlussgrenzen von 5kDa bzw. 10kDa. (UF-C5- bzw. UF-C10-Membranen; *Microdyn-Nadir*). Die Ultrafiltrationen wurden in Rührzellen der Firma *ProMinent Dosiertechnik GmbH* mit kontinuierlichem Wasserzufluss (2-5 bar) durchgeführt.

Die C, H, N-**Elementaranalysen** wurden am *Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* (Arbeitskreis Prof. Dr. C. Huber) an der Universität des Saarlandes gemessen. Elementaranalysen für Cl, Br und S wurden von der Firma *Analytische Laboratorien, Prof. Dr. H. Malissa und G. Reuter GmbH*, in Lindlar durchgeführt. Die Genauigkeit der Messungen betrug $\pm 0.2\%$.

Die gemessenen und berechneten Daten sind immer auf die monomere Wiederholungseinheit des Cellulosemoleküls bezogen. Aus den Daten der Elementaranalyse wurden die

Substitutionsgrade an Funktionalitäten mithilfe der Software MMCALC 1.8 (SoftShell International) berechnet.

Die **Infrarot-Spektren** wurden mit einem FT-IR Spektrometer des Typs TENSOR 27 der Firma *Bruker Optik GmbH* als Reflexionsspektren aufgenommen. Dazu wurde die GoldenGate-Micro-ATR-Technik verwendet. Die Auswertung der IR-Spektren erfolgte mithilfe der Software OPUS 4 ebenfalls von der Firma *Bruker Optik GmbH*.

Die Wellenzahlen charakteristischer Banden sind in cm^{-1} angegeben. Die lokalisierten Schwingungen werden mit ν für Valenzschwingungen und δ für Deformationsschwingungen gekennzeichnet.

Das **ESI-Massenspektrum** von 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin wurde mit einem Massenspektrometer des Typs Micromass ZQ-4000 (*Waters*) aus methanolischer Lösung aufgenommen.

Die **Substitutionsgrade**, DS_{CM} , der kommerziellen Carboxymethylcellulose (CMC) bzw. DS_{Allyl} , der AHP-Cellulose **1** und der AHP-CMC **2** wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie aus dem Integrationsverhältnis der Signale der Protonen der Carboxymethyl- bzw. Allyl-Substituenten und des H-1 Protons der Glcp-Einheit und aus der Elementaranalyse bestimmt. Die Bestimmung der partiellen Substitutionsgrade der CMC aus der $^1\text{HNMR}$ -Spektroskopie erfolgte nach einem totalen Abbau der CMC mit TFA^[219]. Es wurde angenommen, dass die ermittelten partiellen Substitutionsgrade der Carboxymethyl-Gruppen der Ausgangsverbindung CMC, bei allen Derivaten unverändert bleiben.

Die Substitutionsgrade der Thio- und Bromo-Substituenten wurden ausschließlich aus der EA bestimmt; die DS-Grade an reaktiven Gruppen der Thio-Cellulosederivate, **5**, **6** und **8** sowohl aus der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie als auch aus der EA. Die Ermittlung der Substitutionsgrade an EDC- bzw. OSu-Gruppen, DS_{EDC} und DS_{OSu} , aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfolgte aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der Methylgruppen der EDC-Funktionalität bzw. der Protonen der OSu-Funktionalitäten und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit.

Die **Goldsubstrate für die SPR-Spektroskopie** wurden am *Institut für Experimentalphysik* (Arbeitskreis Prof. Dr. U. Hartmann) an der Universität des Saarlandes präpariert. Zum Sputtern wurde ein K575 Turbo Sputter Coater (*Emitech*, UK) verwendet. Die Schichtdicken der Au-Substrate lagen bei $d = 40 \pm 5$ nm, dies entspricht einer optischen Transmission von 8 %, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ nm.

Die **Messung der Aktivität der Meerrettichperoxidase (HRP)** in Lösung wurde mit dem UV/VIS Spektrometer LAMBDA 2 der Firma *Perkin Elmer* durchgeführt; die Messung der UV-Transmission der gesputterten Goldsubstrate (bei $\lambda = 500$ nm) für die SPR-Experimente wurden mit einem HELIOS UV/VIS Photometer der Firma *Unicam* durchgeführt.

Zur **in situ Kontrolle des Schichtaufbaus** der thiofunktionalisierten Cellulosederivate und des Membranschichtaufbaus auf Gold wurde das BIO-SUPLAR II SPR-Spektrometer der Firma *Analytical μ -Systems, Mivitec GmbH*, Regensburg eingesetzt, welches mit einem GaAs LED Laser ($\lambda = 670$ nm) und einem Glasprisma (mit Winkel von 65° , $n = 1.61$), ausgestattet ist. Die verwendete Durchflusszelle hat ein Volumen von ca. 20 ml (Totvolumen: ca. 170 ml). Die entgasten Lösungsmittel (MilliQ-Wasser, Puffer) wurden mithilfe einer Spritzenpumpe (kd Scientific) durch die Flüssigkeitszelle des SPR-Spektrometers befördert.

Die Probenvorbereitung beinhaltete die Aktivierung der Thiosulfatgruppen. Dabei wurden die Thiosulfat-CMC **4** sowie das MCT-Derivat **8** in 0.2 M Zitronensäure gelöst (0.1 Gew.-%ige Lösung). Die Aktivierung der reaktiven Thiosulfat-CMCs **5** und **6** erfolgte mittels TCEP. Dazu wurden jeweils 1-2 mg des Cellulosederivats und 1 mg TCEP in 1ml 0.4 M Acetatpuffer (pH6.9) gelöst.

Um eine vollständige Aktivierung der Thiosulfatfunktionalität zu gewährleisten, wurden alle Lösungen 1h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Zur Injektion der wässrigen Lösungen der Thiosulfatcellulosen ins Durchflusssystem wurde ein Rheodyne 7125, ausgestattet mit einer 50 μ l-Probenschleife eingesetzt. Die Abscheidung auf die Goldoberfläche erfolgte immer bei einem konstanten Fluss von 11 μ l/min. Für den Enzymschichtaufbau auf Gold wurde ebenfalls das BIOSUPLAR II Spektrometer eingesetzt. Die reaktiven Cellulosederivate, die Meerrettichperoxidase (HRP; Fluka, MW = 40000 g/mol, Aktivität, 560 U/mg bzw. 1067 U/mg), das Taurin (Fluka) und das Substrat ABTS (Fluka) wurden als wässrige Lösungen ebenfalls mittels Rheodyne 7125 im Durchflusssystem injiziert. Die Immobilisierung der Cellulose und der HRP (12,5mM in 10 mM CBS-Puffer, pH 7.5-9.5; CBS: Carbonatpuffer + 0.15M KCl) erfolgten bei einem Fluss von 11 μ l/min. Die Desaktivierung mit Taurin (0.1 M in Wasser) erfolgte unter statischen Bedingungen (Verweilzeit: 30 min). Das Spülen mit Wasser bzw. Puffer wurde bei einem Fluss von mindestens 34 μ l/min durchgeführt.

Zur **Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetiken**, wurde ein Wellchrom-K-2600 UV-Detektor (*Knaur*) an das Biosuplar-II-Spektrometer gekoppelt. Als Laufmittel diente ein 10mM AcB (AcB: 10mM Acetat-Puffer + H₂O₂ (0.01%-ig), pH 4.5). Die injizierten ABTS-

Lösungen besaßen Konzentrationen von 100 μM – 4000 μM . Alle SPR-Messungen wurden bei RT durchgeführt. Die Aufnahme der UV-Spektren von ABTS (ABTS $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$, ABTS* $\lambda_{\text{max}} = 414 \text{ nm}$) erfolgte mit der Software Endurance der Firma *SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH*. Die Auswertung der Kinetiken wurde mit dem Programm ORIGIN 7.0 der *OriginLab Corp* durchgeführt.

Auch zur in situ Kontrolle des Membranschichtaufbaus wurde das BIOSUPLAR II Spektrometer eingesetzt.

Zur **Präparation der Vesikel** wurden zunächst 10 mg des jeweiligen Lipids in ca. 10 ml Chloroform gelöst und einige Minuten lang kräftig gerührt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Das Lösemittel wurde anschließend bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C am Rotationsverdampfer abgezogen, sodass sich an den Glaswänden ein Lipid-Film bildete. Eventuelle Chloroformreste wurden anschließend durch dreistündiges Trocknen bei RT im Hochvakuum ($6 \cdot 10^{-2}$ mbar) entfernt.

Bei der Vesikelpräparation aus DMPC wurde der Lipidfilm in 10 ml 0.1M NaCl-Lösung aufgenommen und für 30 min unter gelegentlichem, kräftigem Rühren im Wasserbad erwärmt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur der Suspension nicht unter die Phasenumwandlungstemperatur des Lipids ($T_m(\text{DMPC}) = 23.5^\circ\text{C}$) abfällt. In einer zuvor mit 0.1M NaCl-Lösung gespülten und vorgewärmten Glaskolbenspritze mit Filtervorsatz (Durchmesser 25 mm) der Firma *Schleicher und Schuell* wurde die Vesikelsuspension insgesamt 31-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 250 nm extrudiert. Die Vesikelsuspension wurde vor jedem Einsatz frisch hergestellt.

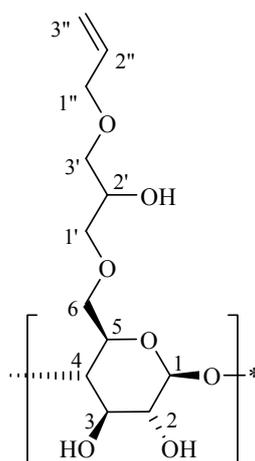
Für die Vesikelpräparation aus DOPC und POPC konnte aufgrund der niedrigen Phasenumwandlungstemperaturen ($T_m(\text{DOPC}) = -18.5^\circ\text{C}$, $T_m(\text{POPC}) = -2.5^\circ\text{C}$) bei RT gearbeitet werden.

Die **Größenbestimmung der Vesikel** konnte am *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie* (Arbeitskreis Prof. Dr. C.-M. Lehr) der Universität des Saarlandes durchgeführt werden.

7.3 Präparativer Teil

7.3.1 Synthese der Carboxymethylcellulose Derivaten

6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose Natriumsalz **1**



5 g (30.84 mmol) mikrokristalline Cellulose werden in 90 ml 25%-iger Natronlauge mercerisiert. Nach 2d wird die trübe Reaktionsmischung mit 90 ml Wasser verdünnt. 36.5 ml (310.0 mmol) Allylglycidylether werden langsam unter kräftigem Rühren zugetropft, die Reaktionsmischung anschließend 2 h bei Raumtemperatur, dann weitere 6 d bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Gemisch mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert.

Die Reaktionslösung wird mit destilliertem Wasser durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen eine UF-C5 Membran (5kDa) gereinigt, bis etwa 1000 ml Permeat entstanden sind. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 3.22 g (11.58 mmol, 64 %; $DS_{\text{Allyl}} = 0.78$)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 5.96$ (m, H-2^{''}), 5.37-5.34 (d, H-3^{''}_{trans}), 5.30 (m, H-3^{''}_{cis}), 4.53 (bs, 1H, H-1), 4.09 (s, H-1^{''}), 4.00 (m, H-5, H-4), 3.83 (m, H-6_{CH2}), 3.71-3.63 (m, H-3, H-4, H-5, H-3', H-1'), 3.56 (m, H-2^A), 3.36 (m, H-2^B) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 136.75$ (C-2^{''}), 121.14 (C-3^{''}), 105.21 (C-1), 81.16 (C-4), 77.68 (C-3), 76.87 (C-5), 74.92 (C-2), 75.78 (C-1^{''}), 73.73 (C-1', C-3'), 71.69 (C-2'), 65.80 (C-6), 62.73 (C-6') ppm.

^{13}C -Dept (DMSO-d₆): $\delta = 135.27$ (C-2^{''}), 116.19 (C-3^{''}), 102.70 (C-1), 80.14 (C-4), 74.62 (C-3, C-2), 72.88 (C-5), 71.19 (C-1^{''}), 69.69 (C-1', C-3'), 68.43 (C-2'), 60.11 (C-6) ppm.

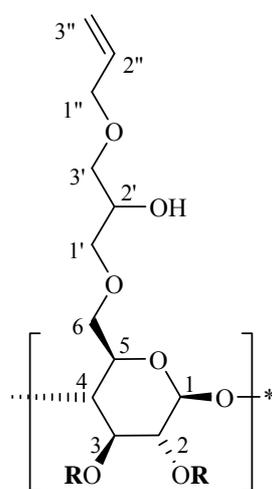
FT-IR: 3364 $\nu(\text{OH})$, 2866 $\nu(\text{CH})$, 1421, 1351 $\nu(\text{OH})$, 1067, 926, 666, 606 cm^{-1} .

EA: $[\text{C}_6\text{H}_9.22\text{O}_5][\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.78} \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 278 \text{ g/mol}$)

berechnet: C 46.11 %, H 7.54 %

gefunden: C 46.01 %, H 7.66 %.

6-O-(3^{''}-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **2**



R = H, CH_2COONa

Syntheseweg a:

5 g (20.34 mmol) CMC-Natriumsalz ($\text{DS}_{\text{CM}} = 0.74$, $x_2 = 0.3$, $x_3 = 0.13$, $x_6 = 0.31$) werden bei Raumtemperatur in 200 ml 5%-iger NaOH gelöst.

13.7 ml (115.7 mmol) Allylglycidylether werden in 4 gleiche Portionen aufgeteilt. Die erste Portion wird über einen Zeitraum von 30 min unter kräftigem Rühren zur CMC-Lösung zugetropft. Jeweils 24h nach der vorangegangenen Zugabe werden die übrigen Portionen ebenfalls unter kräftigem Rühren zugetropft. Die leicht viskose, gelbe Lösung wird insgesamt 5d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch dreimal mit je 250 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird abgetrennt und in ca. 2 l Isopropanol ausgefällt. Es bildet sich ein farbloser Niederschlag, welcher abgesaugt und mehrmals mit Isopropanol gewaschen wird. Der Rückstand wird anschließend in möglichst wenig destilliertem Wasser gelöst und durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen eine UF-C10

Membran (10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen farblosen, watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 5.24 g (17.47 mmol, 86 %; $DS_{\text{Allyl}} = 0.24$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.71$)

Syntheseweg b:

2 g (8.14 mmol) CMC-Natriumsalz ($DS_{\text{CM}} = 0.74$, $x_2 = 0.3$, $x_3 = 0.13$, $x_6 = 0.31$) werden bei Raumtemperatur in 25 ml 25%-iger NaOH gelöst. Nach 2d tropft man langsam und unter kräftigem Rühren 2.5 ml (21.02 mmol) Allylglycidylether zu. Die viskose Reaktionsmischung wird auf 60°C erwärmt und anschließend mit 60 ml Wasser verdünnt. Am darauf folgenden Tag werden 3.1 ml (26.07 mmol) Allylglycidylether zugetropft und die Reaktionsmischung einen weiteren Tag bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Mischung mit konzentrierter HCl neutralisiert, mit destilliertem Wasser gegen eine UF-C5 (5kD) Membran ultrafiltriert und gefriergetrocknet. Man erhält einen farblosen, watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 2.74 g (9.32 mmol, 86 %; $DS_{\text{Allyl}} = 0.21$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$)

Syntheseweg c:

1.76 g (5.46 mmol) 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose Natriumsalz **1** werden in einem Gemisch aus 88 ml Isopropanol und 53 ml Ethanol suspendiert. Nach 30 min werden 4.89 g (3.70 mmol) Chloressigsäure-Natrium Salz fest zugegeben. Die weiße Suspension rührt 1h bei Raumtemperatur und wird dann nach Zugabe von 3.75 ml 30%-iger NaOH auf 60°C erwärmt. Nach 2h wird sie auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Essigsäure neutralisiert. Es wird solange destilliertes Wasser zugegeben, bis das Produkt in Lösung geht. Anschließend wird die Lösung mittels destillierten Wassers gegen eine UF-C5 Membran (5kDa) durch kontinuierliche Ultrafiltration gereinigt und gefriergetrocknet. Man erhält einen watteartigen, farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.478 g (1.37 mmol, 25%; $DS_{\text{Allyl}} = 0.57$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.97$)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 5.85$ (m, H-2^{''}), 5.26-5.22 (d, H-3^{''}_{trans}), 5.18-5.16 (d, H-3^{''}_{cis}), 4.43 (bs, 1H, H-1), 4.14 (m, H-1', H-3', H-6_{CH₂}), 3.98 (s, H-1^{''}), 3.87 (bs, H-5, H-4), 3.66-3.45 (bs, H-1', H-2', H-3', H-3, H-CH₂(CM), H-6), 3.24 (s, 1H, H-2^B), 3.10 (s, 1H, H-2^A) ppm.

^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 178.84$ (COONa), 134.76 (C-2^{''}), 119.18 (C-3^{''}), 103.21 (C-1), 82.89 (C-2^A), 79.39 (C-2^B), 75.81 (C-4), 74.49 (C-3), 73.36 (C-2[']), 72.99 (C-1^{''}), 71.80 (C-1['], C-3[']), 70.21 ($\text{CH}_2(\text{CM})$), 69.83 (C-5), 60.71 (C-6^A), 59.87 (C-6^B) ppm.

FT-IR: 3286 $\nu(\text{OH})$, 2962 $\nu(\text{CH})$, 2909 $\nu(\text{CH})$, 1598 $\nu(\text{COONa})$, 1413, 1326 $\nu(\text{OH})$, 1258, 1011, 867, 792, 693, 581, 530, 503 cm^{-1} .

EA: $[\text{C}_6\text{H}_{9.05}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.71}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.24} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 300 g/mol)

berechnet: H 6.17 %, C 35.45 %

gefunden: H 6.41 %, C 35.41 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{9.03}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.23} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 302 g/mol)

berechnet: H 6.36 %, C 35.28 %

gefunden: H 6.32 %, C 35.29%.

$[\text{C}_6\text{H}_{9.05}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.21} \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 290 g/mol)

berechnet: H 6.00 %, C 36.18 %

gefunden: H 5.80 %, C 36.19 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{8.46}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.97}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.57} \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 350 g/mol)

berechnet: H 5.91 %, C 39.14%

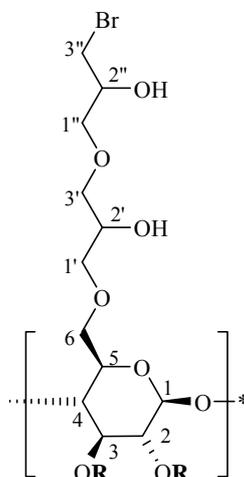
gefunden: H 6.24 %, C 39.00 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{8.06}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{1.34}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.59} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 373 g/mol)

berechnet: H 5.26 %, C 39.40%

gefunden: H 5.75 %, C 39.38 %.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose
Natriumsalz **3**



Zu einer Lösung von 2 g (6.97 mmol) **2a** in 100 ml Wasser wird eine 5%-ige Lösung von Br_2 in $CHCl_3$ über einen Zeitraum von mehreren Stunden zugetropft, bis die Gelbfärbung der Lösung bestehen bleibt. Durch Zugabe von einigen ml 0.1 M $Na_2S_2O_3$ -Lösung wird überschüssiges Brom entfernt. Nach Abtrennung von Chloroform wird die wässrige, leicht trübe Lösung durch Ultrafiltration mit destilliertem Wasser gegen eine UF-C5 Membran (5 kDa) gereinigt. Anschließende Gefriertrocknung ergibt einen watteartigen, farblosen Feststoff.

Ausbeute: 1.98 g (6.45 mmol, 93 %; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$, $DS_{\text{Brom}} = 0.23$)

Charakterisierung:

1H -NMR (D_2O): $\delta = 4.44$ (bs, 1H, H-1), 4.22-4.10 (m, H-6 $_{CH_2}$, H-2 $_{CH_2}$), 4.01 (H-1 $^{\prime\prime}$), 3.88 (s, H-6), 3.79 (m, H-2 $^{\prime\prime}$, H-3 $^{\prime\prime}$), 3.70-3.47 (bs, H-1 $^{\prime}$, H-3 $^{\prime}$, H5, H-4, H-3), 3.25 (H-2 A), 3.11 (H-2 B) ppm.

^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 178.69$ (COONa), 103.19 (C-1), 82.97 (C-2 A), 79.20 (C-2 B), 77.29 (C-4), 75.64 (C-3), 74.77-73.71 (C-2 $^{\prime}$, C-5), 72.83 (C-1 $^{\prime\prime}$), 72.07-71.01 (C-1 $^{\prime}$, C-3 $^{\prime}$, $CH_{2(CM)}$), 69.59 (C-2 $^{\prime\prime}$), 63.37 (C-2 $^{\prime\prime}$), 60.55 (C-6 B), 36.26 (C-3 $^{\prime\prime}$) ppm.

FT-IR: 3250 $\nu(OH)$, 2915 $\nu(CH)$, 1785, 1587 $\nu(COONa)$, 1419, 1326 $\nu(OH)$, 1265, 1047, 664 cm^{-1} .

EA: $[\text{C}_6\text{H}_9.03\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.23} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 306 g/mol)

berechnet: H 5.69 %, C 34.78 %, Br 6.01 %

gefunden: H 5.63 %, C 34.86 %, Br 6.03 %.

$[\text{C}_6\text{H}_9.01\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.77}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.22} \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 297 g/mol)

berechnet: H 5.49 %, C 35.81 %, Br 5.91 %

gefunden: H 5.25 %, C 35.34 %, Br 5.95 %.

$[\text{C}_6\text{H}_9.10\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.15} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 307 g/mol)

berechnet: H 6.04 %, C 32.78 %, Br 3.90 %

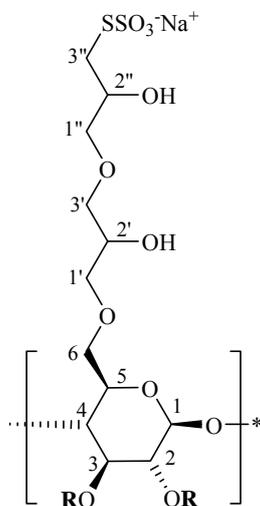
gefunden: H 5.97 %, C 32.30 %, Br 3.82 %.

$[\text{C}_6\text{H}_9.14\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.11}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.02} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 302 g/mol)

berechnet: H 6.08 %, C 32.90 %, Br 2.91 %

gefunden: H 6.25 %, C 32.81 %, Br 2.97 %.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfato-2'-hydroxypropyl)carboxymethylcellulose Natriumsalz **4**



$\mathbf{R} = \text{H}, \text{CH}_2\text{COONa}$

Zu einer Lösung von 1.5 g (4.97 mmol) HBrPHP-CMC Natrium Salz **3** in 150 ml Wasser werden 4.42 g (27.95 mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ fest zugegeben. Die Reaktionsmischung rührt 4d bei 95°C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit destilliertem Wasser gegen eine UF-C5 Membran ultrafiltriert und gefriergetrocknet. Man erhält das Produkt als weißen, farblosen Feststoff.

Ausbeute: 1.14 g (3.77 mmol = 76 %; $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.1$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4.44$ (bs, 1H, H-1), 4.17-4.10 (m, H-2^c, H-6_{CH₂}, H-2_{CH₂}), 4.01 (m, H-1^c), 3.89 (m, H-6), 3.7-3.44 (m, H-4, H-3, H-1['], H-3['], H-5), 3.25 (bs, H-2^A), 3.17 (d, H-3^c), 3.10 (m, H-2^B) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 178.84$ (COONa), 103.13 (C-1), 82.71 (C-2^A), 79.32 (C-2^B), 77.92-75.73 (C-4, C-3), 74.31 (C-2['], C-5), 72.96 -71.21 (C-1^c, C-1['], C-3[']), 69.61 (CH₂(CM)), 63.47 (C-6^A), 60.70 (C-6^B), 55.91 (C-3[']) ppm.

FT-IR: 3280 ν (OH), 2923 ν (CH), 1656 ν (COONa), 1409, 1149, 1022 ν (S=O), 941, 858, 751, 653 cm^{-1} .

EA: $[\text{C}_6\text{H}_{9.16}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.10} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 302 g/mol)

berechnet: H 5.95 %, C 32.13 %, S 2.12 %

gefunden: H 5.50 %, C 31.94 %, S 2.06 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{8.87}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.13}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.09} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 319 g/mol)

berechnet: H 5.51%, C 34.42%, S 2.61 %

gefunden: H 5.87 %, C 34.40 %, S 2.65 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{9.07}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.19} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 362 g/mol)

berechnet: H 6.36 %, C 28.60 %, S 3.37%

gefunden: H 6.15 %, C 28.55 %, S 3.37 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{8.96}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.22}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.08} \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (M_{Glcp} : 337 g/mol)

berechnet: H 5.72 %, C 33.09 %, S 4.19 %

gefunden: H 6.12 %, C 33.10 %, S 4.24 %.

$[\text{C}_6\text{H}_{9.02}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.77}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.18}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.01}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.02} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

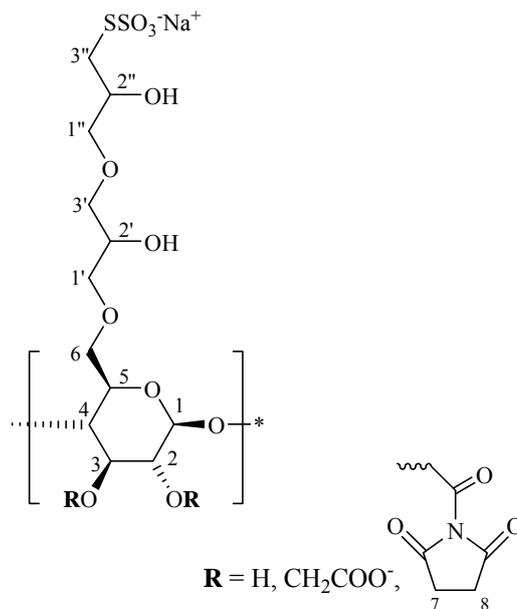
(M_{Glcp} : 322 g/mol)

berechnet: H 5.67 %, C 32.85 %, S 3.59 %

gefunden: H 5.45 %, C 32.93 %, S 3.61 %.

7.3.2 Synthesen der reaktiven Thio-Cellulose-Derivaten

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-succinimidyl-cellulose Natriumsalz **5**



200 mg (0.66 mmol) von **4** werden in 10 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 6.28) gelöst. Eine Lösung aus 767 mg (3.75 mmol) DCC und 215 mg (1.87 mmol) NHS in 1.5 ml DMSO wird über einen Zeitraum von 30 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 2d bei Raumtemperatur gerührt, anschließend bis zur Trockne eingengt. Der farblose Rückstand wird in 100 ml destilliertem Wasser aufgenommen, 30 min kräftig gerührt und abfiltriert. Das Filtrat wird durch kontinuierliche Ultrafiltration (UF-C5-Membran) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Man erhält einen farblosen, watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 237 mg (0.63 mmol, 95 %; $\text{DS}_{\text{NHS}} = 0.33$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$, $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.13$)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4.44$ (bs, 1H), 4.23-4.10 (m, H-2'', H-6_{CH2}, H-2_{CH2}), 4.01 (bs, H-1''), 3.89-3.80 (bs, H-6^A), 3.70 - 3.56 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.41 (H-2'), 3.32 (H-6^B, H-3''), 3.28, 3.16 (s, H-2^A), 3.11 (s, H-2^B), 2.33 (m, H-7, H-8) ppm.

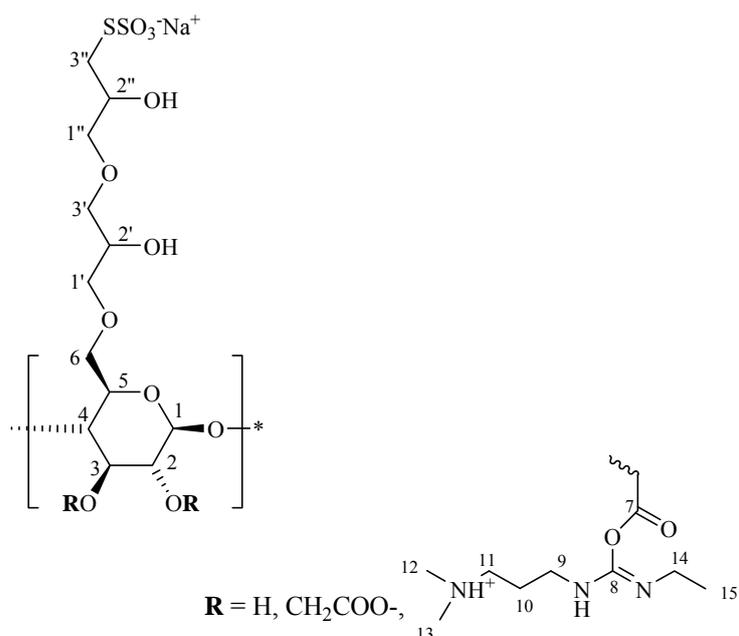
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 179.17$ (C=O_(CM)), 174.86 (C=O_(NHS)), 173.25 (CH₂C=O), 103.37 (C-1), 83.07 (C-2^A), 78.91 (C-2^B), 75.90 (C-4), 75.04 (C-3), 74.46 (C-3', C-2'), 73.10 (C-1''), 72.46

(C-1'), 71.04 (C-5), 70.64 (CH₂(CM)), 69.79 (C-2''), 60.91 (C-6), 38.63 (C-3''), 37.75 -36.38 (C-7, C-8) ppm.

FT-IR: 3298 ν(OH), 2929 ν(CH), 1756, 1632 ν(COONa), 1413, 1306, 1254, 1049ν(CO), 728 cm⁻¹.

EA: [C₆H_{8.98}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.55}[C₆H₁₂O₆S₂Na]_{0.13}[C₆H₆NO₄]_{0.36} · 4 H₂O (M_{Glep}: 369 g/mol)
 berechnet: H 5.95 %, C 32.71 %, N 1.37 %
 gefunden: H 5.97 %, C 32.83 %, N 1.27 %.

6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-*O*-2-(*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kaliumsalz **6**



Zu einer Lösung aus 1.35 g (7.06 mmol) EDC in ca. 20 ml Wasser werden 0.38 g (1.26 mmol) 6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfato-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **4** zugegeben. Mittels 0.1 M HCl wird ein pH von 7 eingestellt. Die klare Lösung rührt 27 h bei RT, wobei darauf geachtet werden muss, dass der pH im Neutralen bleibt. Anschließend wird die Reaktionslösung durch Ultrafiltration gereinigt (UF-C5-Membran): zunächst mit 0.2 M KCl-Lösung, dann mit destilliertem Wasser. Nach der Gefriertrocknung wird das Produkt als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 190 mg (0.59 mmol; 47 %; DS_{EDC} = 0.12, DS_{Carboxymethyl} = 0.74, DS_{Thiosulfat} = 0.08)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4.58$ (bs, 1H, H-1), 4.32-4.26 (m, H-2^{''}, H-6_{CH₂}, H-2'), 4.03-3.85 ($\text{CH}_{2(\text{CM})}$, H-6), 3.71-3.40 (H-1^{''}, H-3', H-5, H-3, H-4), 3.35 (H-1'), 3.27-3.24 (H-3^{''}, H-2^A), 3.17 (H-9, H-13), 3.16 (H-2^B), 3.15 (H-11), 2.92-2.86 (H-12, H-15), 2.05 (bs, H-10), 1.12 (t, H-14) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 178.98$ (COONa), 161.47 (C-7), 138.37 (C-8), 103.22 (C-1), 82.80 (C-2), 79.21 (C-5), 75.77 (C-3, C-4), 74.79-73,86 (C-2', C-5), 72.83-71.26 (C-1'', C-1', C-3', $\text{CH}_{2(\text{CM})}$), 69.62 (C-2''), 60.69 (C-6), 56.24 (C-11), 43.58 (C-12, C-13), 38.49 (C-3''), 37.31 (C-9, C-15), 25.91 (C-10), 15.27 (C-14) ppm.

FT-IR: 3394 $\nu(\text{OH})$, 2919 $\nu(\text{CH})$, 1595 (COONa), 1414, 1331, 1101, 1061 $\nu(\text{CO})$, 862, 664 cm^{-1} .

EA: $[\text{C}_6\text{H}_{8.93}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.14}[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{K}]_{0.6}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.08}[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2]_{0.12}$
 $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.13} \cdot 1.5 \text{ H}_2\text{O}$ (M_{Glep} : 324 g/mol)

berechnet: H 5.77 %, C 36.81 %, N 1.55 %, S 1.58 %;

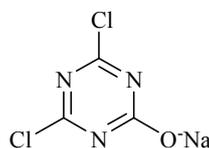
gefunden: H 5.71 %, C 36.83 %, N 1.38 %, S 1.54 %.

EA: $[\text{C}_6\text{H}_{8.85}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.01}[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{K}]_{0.59}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.08}[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2]_{0.27}$
 $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.13} \cdot 1.5 \text{ H}_2\text{O}$ (M_{Glep} : 344 g/mol)

berechnet: H 6.36 %, C 36.28 %, N 3.30 %

gefunden: H 7.02 %, C 36.30 %, N 3.29 %, S 1.28 %.

2, 4-Dichlor-6-oxido-1, 3, 5- triazin 7



Eine Suspension von 7.18 g (38.9 mmol) 2, 4, 6-Trichlor-1, 3, 5-triazin in 70 ml Wasser wird zunächst auf 1°C abgekühlt. Durch Zugabe von 2 M NaOH wird ein pH-Wert zwischen 10 und 12 eingestellt. Die Suspension wird etwa 1h unter regelmäßiger pH-Kontrolle gerührt, bis der Feststoff weitgehend in Lösung geht. Anschließend wird nicht umgesetztes Cyanurchlorid abfiltriert. Der pH-Wert der Lösung wird mittels 0.1 M HCl auf einen Wert zwischen 7 und 8 gebracht. Nach Gefriertrocknung der Lösung wird der weiße Feststoff in 150 ml Methanol

suspendiert und 30 min kräftig gerührt. Die Suspension wird filtriert, das klare Filtrat anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der farblose Rückstand wird im Hochvakuum (10^{-3} mbar) bei 60°C über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 4.52 g (27.40 mmol, 70 %)

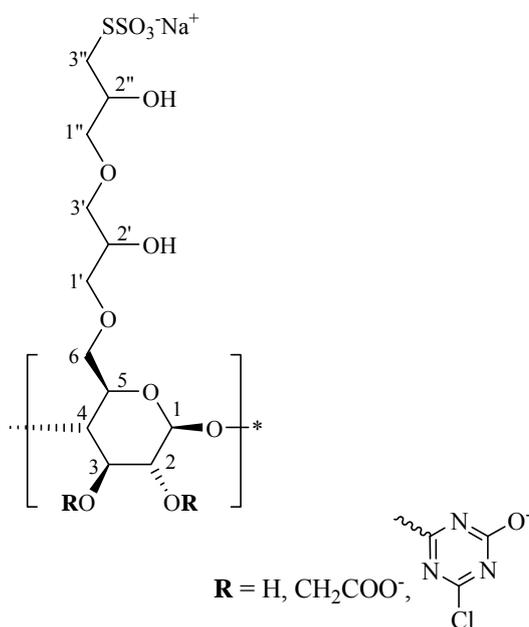
Charakterisierung:

^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 169.98$ (C-Cl), 168.76 (C-O) ppm.

FT-IR: 3360 $\nu(\text{OH})$, 1638 - 1537 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1431 , 1462 , 1371 , 1322 , 1221 , 1114 - 1036 $\nu(\text{C-Cl})$, 843 $\nu(\text{C-Cl})$, 812 $\nu(\text{C-Cl})$ cm^{-1} .

MS (ESI $^{-}$): $m/z_{\text{gef}} = 163.89$ [$\text{M}(\text{C}_3\text{HN}_3\text{Cl}_2\text{O})\text{-H}$], $m/z_{\text{ber}} = 164.95$ [$\text{M}(\text{C}_3\text{HN}_3\text{Cl}_2\text{O})$]

6-*O*-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-*O*-(2-chlor-4-oxido-1,3,5-triazinyl)-carboxymethylcellulose Natriumsalz **8**



1.04 g (6.30 mmol) von **7** werden in 20 ml Wasser gelöst und auf 1°C abgekühlt. Eine Lösung von 300 mg (0.82 mmol) HTSHP-CMC Na in 20 ml Wasser wird zugetropft. Nach 30 min werden 3.2 ml 2M NaOH portionsweise zugegeben, sodass sich der pH-Wert zwischen 12 und 13 bewegt. Die Reaktionslösung wird nun unter ständiger pH Kontrolle 1d bei 1°C

gerührt, dann 1d bei Raumtemperatur. Der pH-Wert der Lösung beträgt schließlich 8.0. Die Lösung wird mit Wasser auf das 10-fache Volumen verdünnt, und anschließend durch Ultrafiltration (UF-C5) gereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man das Produkt als farblosen, watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 176 mg (0.51 mmol, 61 %; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.09$, $DS_{\text{Chlor}} = 0.08$, $DS_{\text{Triazin}} = 0.46$)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 4.43$ (bs, 1H), 4.22-4.09 (m, H-2'', H-6_{CH2}, H-2_{CH2}), 4.00 (bs, H-1''), 3.88 (s, H-6^A), 3.66 - 3.60 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.55 (H-2', H-6^B), 3.24 (H-3''), 3.16 (s, H-2^A), 3.10 (s, H-2^B) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 178.98$ (C=O_(CM)), 171.01-170.20 (C-O⁻, C-Cl, COCH₂), 161.02 (C-O⁻), 102.83 (C-1), 83.24 (C-2^A), 80.89 (C-2^B), 75.71 (C-4, 3), 74.35 (C-3', C-2'), 72.92 (C-1''), 72.20 (C-1'), 71.82 (C-5), 71.21 (CH₂(CM)), 70.08 (C-2''), 63.40 (C-6^A_{MCT}), 60.74 (C-6^B), 38.45 (C-3'') ppm.

FT-IR: 3189 ν (OH), 2930 ν (CH), 1590 ν (COONa), 1410, 1325, 1254, 1056 ν (CO, C-Cl), 863 ν (C-Cl), 804 ν (C-Cl) cm^{-1} .

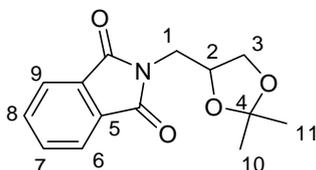
EA: $[\text{C}_6\text{H}_{8.63}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.74}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.09}[\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{HNa}]_{0.18}[\text{C}_3\text{HN}_3\text{OH}]_{0.28}[\text{Cl}]_{0.08} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M_{Glep} : 344 g/mol)

berechnet: H 4.97 %, C 32.84 %, N 5.63 %, S 1.68 %, Cl 0.81 %

gefunden: H 5.02 %, C 32.80 %, N 5.61 %, S 1.36 %, Cl 0.82 %.

7.3.3 Synthese von 2,3-Didodecyloxypropylamin

N-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9**



5.56 g (22.70 mmol) Triphenylphosphin und 4.6 g (28.38 mmol) Phthalimid werden in einer Lösung von 2.5 g (18.9 mmol) R-1,2-*O*-Isopropylidenglycerol in 40 ml wasserfreiem THF suspendiert. Durch Zugabe von 15 ml wasserfreiem DMF erhält man eine klare Lösung, welche zunächst auf 0°C abgekühlt wird. Über einen Zeitraum von 40 min werden 13.9 ml (75.75 mmol) einer 40%-igen Lösung von DEAD zugetropft. Die gelbe Lösung rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Das THF wird anschließend am Rotationsverdampfer abgetrennt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen (250 ml) und mit einigen Tropfen H₂O₂ versetzt. Das 2-Phasengemisch wird 2x mit je 200 ml 1 M Natronlauge extrahiert, die organische Phase anschließend über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie über eine kurze Kieselgelschicht gereinigt. Man erhält das Produkt als farblosen Feststoff.

Laufmittel: Hexan/Essigester 2:1

R_f = 0.46

Ausbeute: 3.5 g (13.40 mmol, 71 %)

Charakterisierung:

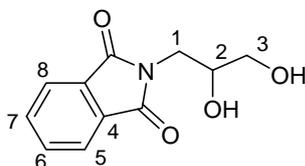
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.84 (m, 2H, H_{Aromat}), 7.7 (m, 2H, H_{Aromat}), 4.42 (m, 1H, H-2), 4.05 (dd, 1H, H-3), 3.92 (dd, 1H, H-3), 3.84 (dd, 1H, H-1), 3.71 (dd, 1H, H-1), 1.43 (s, 3H, H-10), 1.30 (s, 3H, H-11) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 168.19 (C=O), 134.01 (C-7), 131.97 (C-5), 123.35 (C-6), 109.81 (C-2), 73.28 (C-3), 67.34 (C-1), 40.95 (C-4), 26.80 (C-11), 25.34 (C-10) ppm.

EA: [C₁₄H₁₅NO₄], (M = 261.28 g/mol)

gegeben: H 5.75 %, C 64.37 %, N 5.36 %

gefunden: H 5.73 %, C 64.30 %, N 5.41 %.

N-(2,3-Dihydroxypropyl)-phthalimid **10***Synthesevorschrift a:*

5.2 g (19.9 mmol) *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9** werden in 150 ml eines 1:1-Gemisches aus CH₃OH/CH₂Cl₂ gelöst. Nach Zugabe von Dowex 50 W wird die Reaktionsmischung 2d bei 60°C gerührt. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert, das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgetrennt. Man erhält einen farblosen Feststoff, der aus Ethylacetat umkristallisiert wird.

Ausbeute: 1.8 g (8.14 mmol, 41 %)

Synthesevorschrift b:

1g (3.827 mmol) *N*-(4,4-Dimethyl-2,3-dioxolan-1-methyl)-phthalimid **9** wird 1d in 1 ml TFA (+ 0.01 ml Wasser) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird bis zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird aus einem Gemisch aus Benzol/Methanol/Hexan im Verhältnis 5:1:4 umkristallisiert. Man erhält das Produkt als farblose Blättchen.

Ausbeute: 280 mg (1.27 mmol, 33 %)

Charakterisierung:

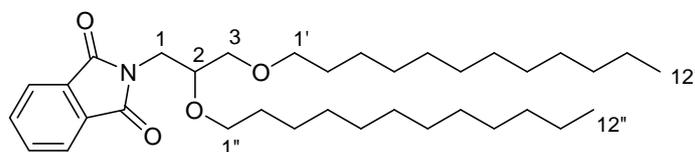
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.84 (m, 2H, H-5, H-8), 7.72 (m, 2H, H-6, 7), 3.97 (m, 1H, H-2), 3.9 (dd, 1H, H-1), 3.82 (dd, 1H, H-1), 3.65 (m, 1H, H-3), 3.6 (m, 1H, H-3), 2.40 (bs, OH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 169.01 (C=O), 134.26 (C-6), 131.80 (C-4), 123.53 (C-5), 70.25 (C-2), 63.79 (C-1), 40.46(C-3) ppm.

EA: [C₁₁H₁₁NO₄], (M = 221.21 g/mol)

gegeben: H 4.98 %, C 59.73 %, N 6.33%

gefunden: H 5.00 %, C 59.77 %, N 6.27 %.

N-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11**

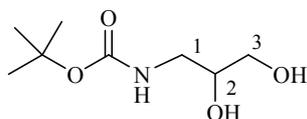
Zur Suspension von 272 mg (6.81 mmol) NaH in 25 ml wasserfreiem DMF tropft man langsam eine Lösung von 500 mg (2.27 mmol) **10** in 5ml absolutem DMF. Nach 30 min werden 2.26 g (9.08 mmol) Dodecylbromid sowie eine Spatelspitze CsI zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 4d bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung wird das Lösemittel einrotiert. Der gelbe Rückstand wird in Hexan aufgenommen, zunächst mit 200 ml Wasser und dann mit 200 ml ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird anschließend durch Chromatographie über eine kurze Kieselgelschicht im Laufmittel Hexan/Essigester 5:1 gereinigt. Man erhält das Produkt als gelbes Öl.

R_f = 0.44

Charakterisierung:

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.83 (dd, 2H, Aromat), 7.68 (dd, 2H, Aromat), 3.86-3.73 (m, 3H, H-2, H-1), 3.63-3.55 (m, 2H, H-3), 3.48-3.38 (m, 4H, H-1', 1''), 1.57-1.11 (m, CH₂(Dodecyl)), 0.86 (m, 2xCH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 168.30 (C=O), 133.80 (C-6,C-7), 132.15 (C-4,C-9), 123.15 (C-5,C-8), 75.67 (C-2), 71.75 (C-1'), 70.58 (C-1''), 63.04 (C-1), 39.49 (C-3), 32.80 (C-2'), 31.90 (C-10',10''), 29.93-29.33 (Dodecylketten), 26.05 (C-3'), 25.96 (C-3''), 14.08(2xCH₃) ppm.

N-tert-Butyl-(2,3-dihydroxypropyl)-carbamat 13

68.6 ml (0.49 mmol) NEt_3 und 22.92 g (105.00 mmol) Boc_2O werden portionsweise zu einer Lösung aus 6.38 g (70 mmol) 3-Aminopropandiol in 700 ml Methanol gegeben. Die Reaktionsmischung wird zunächst 10 min bei 40-50°C, dann 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen des Gemisches bis zur Trockne erhält man ein kristallines Rohprodukt, welches durch Chromatographie über eine kurze Kieselgelschicht gereinigt wird. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1 Man erhält einen farblosen Feststoff.

$R_f = 0.5$ (CHCl_3)

Ausbeute: 13.1 g (68.5 mmol, 98 %)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5.18$ (s, 1H; NH), 3.71 (m, 1H; H-2), 3.59-3.53 (m, 2H; H-3), 3.45 (bs, 2H; 2 x OH), 3.24 (m, 2H; H-1), 1.42 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 157.41$ (C=O), 80.07 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 71.36 (C-2), 63.63 (C-1), 42.79 (C-3), 28.32 ($(\text{CH}_3)_3$) ppm.

EA: $[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_4]$ (M = 191.23 g/mol)

gegeben: H 8.96 %, C 50.25 %, N 7.32 %

gefunden: H 8.90 %, C 50.46 %, N 7.22 %.

0.5 g (2.61 mmol) *N*-*tert*-Butyl-2,3-dihydroxypropylcarbammat **13** und 3.91 g (15.70 mmol) Dodecylbromid werden in 5 ml Benzol suspendiert. 0.46 g (1.35 mmol) TBAHS und 2 ml 50%-ige NaOH werden zugegeben. Die heterogene Reaktionsmischung rührt 6h bei 60 °C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die nun klare Lösung in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird 2x mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingengt.

Das ölige Rohprodukt wird durch Chromatographie über eine kurze Kieselgelschicht gereinigt. Man erhält das Produkt als farbloses Öl, welches bei längerem Stehen kristallisiert.

Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 9:1

R_f = 0.37

Ausbeute: 831 mg (1.58 mmol, 60 %)

Charakterisierung:

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4.87 (bs, 1H, NH), 3.58-3.53 (m, 1H, H-1), 3.49-3.45 (m, 2H, H-3, H-2), 3.44-3.36 (m, 4H, H-1', H-1''), 3.35-3.32 (m, 1H, H-1), 3.17-3.13 (m, 1H, H-1), 1.86-1.25 (m, 40H, Dodecylkette), 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.87 (t, 6H; 2x CH₃) ppm.

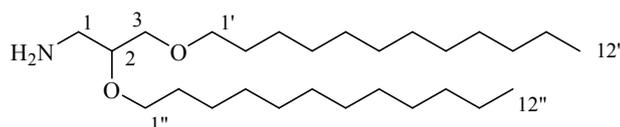
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 156.04 (C=O), 79.09 ((CH₃)₃C), 77.09 (C-2), 71.77 (C-1''), 71.37 (C-1'), 70.24 (C-3), 41.94 (C-1), 34.01-22.67 (Dodecylkette), 28.40 ((CH₃)₃C), 14.09 (2x CH₃) ppm.

EA: [C₃₂H₆₅NO₄] (M = 528 g/mol)

gegeben: C 72.80 %, H 12.42 %, N 2.65 %

gefunden: C 72.62 %, H 12.37 %, N 2.78 %.

2,3-Didodecyloxypropylamin **12**



Syntheseweg a:

Zu einer warmen Lösung (ca. 40°C) von 200 mg (0.36 mmol) *N*-(2,3-Didodecyloxypropyl)-phthalimid **11** in 4 ml Ethanol werden 449.9 mg (9.00 mmol) Hydrazin-Monohydrat zugespritzt. Die klare Lösung wird 18h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird

der entstandene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Man erhält ein gelbes Öl, welches durch Chromatographie über eine kurze Kieselgelschicht gereinigt wird.

Laufmittel: CH₃OH/CH₂Cl₂ 1:9

R_f = 0.3

Syntheseweg b:

2.54 g (4.82 mmol) *N*-tert-Butyl-(2,3-didodecyloxypropyl)-carbammat **10** werden in 25 ml absolutem Methanol gelöst. Die Lösung wird auf 0°C heruntergekühlt und anschließend mit 0.68 ml (9.48 mmol) Acetylchlorid versetzt. Nach Entfernen des Eisbads werden die Reaktionsmischungen langsam auf 60 °C erwärmt und 5h bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abgetrennt, der Rückstand in Diethylether aufgenommen und 30 min kräftig gerührt. Nach Absaugen des Lösungsmittels erhält man das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 1.23 g (2.88 mmol = 54%)

Charakterisierung:

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.29 (bs, 2H, NH₂), 3.75 (m, 1H, H-2), 3.61-3.53 (m, 2H; H-1'), 3.52-3.46 (m, 2H; H-1''), 3.44-3.37 (m, 2H, H-3), 3.23-3.19 (dd, 1H, H-1), 3.09-3.04 (dd, 1H, H-1), 1.61-1.51 (m, 4H, H-2', 2''), 1,24 (bs, 36H; CH₂(Dodecyl)), 0.86 (t, 6H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 73.99 (C-2), 72.01 (C-1'), 70.62 (C-3), 70.31 (C-1''), 41.26 (C-1), 31.91- 22.67 (Dodecylketten), 14.09 (2 x CH₃) ppm.

EA: [C₂₇H₅₇NO₂·HCl] (M = 464 g/mol)

berechnet: C 69.86 %, H 12.59 %, N 3.02 %

gefunden: C 69.70 %, H 12.30 %, N 2.97 %.

8. Literaturverzeichnis

- [1] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, **2005**, 3358-3393.
- [2] E. Ott, H. G. Tennent, *Cellulose and Cellulose Derivatives Part I*, Interscience Publishers, **1954**.
- [3] a) D. Klemm, H.-P. Schmauder, T. Heinze, *Biopolymers*, Vol. 6 (Eds.: E. Vandamme, S. de Beats, A. Steinbüchel), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 290-292; b) D. L. Kaplan, *Biopolymers from renewable resources*, (Ed.: D. L. Kaplan), Springer, Berlin, **1998**, 1-29.
- [4] T. P. Nevell, S. H. Zeronian, *Cellulose Chemistry and its applications* **1985**.
- [5] H. P. Schmauder, U. Gregor, L. Einfeldt, D. Klemm, S. Marsch, *Meded. Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet.* **1994**, 2411.
- [6] M. Takai, *Bacterial cellulose composites*, Carl Hanser Verlag **1994**.
- [7] R. M. Brown, Jr., T. K. Scott, *Science* **1999**, *71*, 204-212.
- [8] H. A. Krässig, *Cellulose-Structure, Accessibility and Reactivity* **1993**.
- [9] D. Fengel, G. Wegener, *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*; Walter de Gruyter, **1983**.
- [10] D. Klemm, U. Erler, W. Wagenknecht, I. Nehls, B. Phillip, *Cellulosics Materials for Selective Separation and Other Technologies*, Kennedy, J. F., **1993**.
- [11] R. H. Atalla, *The structures of cellulose: Characterization of the solid state*, **1987**.
- [12] J. Sugiyama, R. Vuong, H. Chanzy, *Macromolecules* **1991**, *24*, 4168-4175.
- [13] R. H. Atalla, D. L. Van der Hart, *Science* **1984**, *223*, 283-285.
- [14] A. A. Baker, W. Heibert, J. Sugiyama, M. J. Miles, *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 1139-1145.
- [15] P. Langan, Y. Nishiyama, H. Chanzy, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 410-416.
- [16] Y. Z. Lai, *Chemical modification of lignocellulosic materials*, D. N.-S. Hon, Ed., Marcel Dekker Inc.; New York, Basel, Hong Kong, **1996**, 35.
- [17] T. Heinze, U. Erler, I. Nehls, D. Klemm, *Angew. Makromol. Chem.* **1994**, *215*, 93-106.
- [18] H. Schleicher, *Papier* **1984**, *38*, 589-595.
- [19] H. Herlinger, M. Hengstberger, *Lenzinger Berichte* **1985**, *59*, 96-104.

- [20] W. M. Hearon, G. D. Hiatt, C. R. Fordyce, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 2449-2452.
- [21] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1452-1457.
- [22] J. W. Green, *Triphenylmethyl Ethers* **1963**.
- [23] W. Koch, H. Herlinger, *Textilpraxis internat.* **1964**, 902-910.
- [24] W. Mormann, T. Wagner, *Silylierung von Cellulose. Eine realistische Alternative als Zugang zu Cellulosederivaten?*, VCH, **1996**.
- [25] W. Choi, *Regioselektive Synthese von 6-Brom-6-deoxy-2,3-di-O-methylcellulose und anionischen Cellulosederivaten*, Shaker Verlag, Universität. Karlsruhe **1998**.
- [26] T. R. Dawsey, *Applications and limitations of LiCl/N,N-Dimethylacetamide in the homogenous derivatization of cellulose*, Carl Hanser Verlag **1994**.
- [27] T. R. Dawsey, C. L. McCormick, *J. Macromol.Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1990**, *30*, 405-440.
- [28] P. Klüfers, W. Burchard, N. Habermann, B. Seger, U. Wilhelm, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 936-939.
- [29] K. Götze, **1967**, 1-778.
- [30] D. Klemm, A. Stein, *J. M. S. –Pure Appl. Chem.* **1995**, *A32*, 899-904.
- [31] H. Chanzy, P. Noe, M. Paillet, P. Smith, *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Synmp.* **1983**, *37*, 239.
- [32] I. N. Gonobolev, G. A. Petropavlovskij, *Lenz. Beit. fafn* **1981**, *18*, 293.
- [33] D. Klemm, persönliche Mitteilung **1989**.
- [34] G. A. Petropavlovskij, A. M. Bocek, V. M. Sek, *Chimija dredesing* **1987**.
- [35] A. El-Kafrawy, *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27*, 2435.
- [36] G. Conio, P. Corazza, E. Bianchi, A. Tealdi, A. Cifferi, *J. Polym. Sci. Polym. Lett.* **1984**, *22*, 273.
- [37] C. L. McCormick, P. A. Callais, B. H. Hutchinson, jr., *Macromolecules* **1985**, *18*, 2394.
- [38] G. T. Ciacco, T. F. Liebert, E. Trollini, T. J. Heinze, *Cellulose* **2003**, *10*, 125-132.
- [39] T. Heinze, R. Dicke, A. Koschella, A. H. Kull, E.-A. Klohr, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 627-631.
- [40] S. Zhu, Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding, G. Wu, *Green Chemistry* **2006**, *8*, 325-327.

- [41] O.A. El Seoud, A. Koschella, L. C. Fidale, S. Dorn, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2629-2647.
- [42] T. Heinze, S. Dorn, M. Schöbitz, T. Liebert, S. Köhler, F. Meister, *Macromol. Symp.* **2008**, *262*, 8-22.
- [43] K. F. Gadd, *Polymer* **1982**, *32*, 1867-1869.
- [44] P. Navard, J. M. Haudin, S. Dayan, P. Sixou, *J. Polym. Sci. Polym. Lett.* **1981**, *19*, 379.
- [45] G. Jayme, W. Verburg, *Reyon, Zellwolle und Chemiefasern* **1954**, *32*, 193.
- [46] M. A. Abou-State, A. F. H. Ali, N. Y. S. Mostafa, *Angew. Macromol. Chem.* **1988**, *161*, 69.
- [47] R. Dönges, *Papier* **1997**, *12*, 653-660.
- [48] J. Reuben, H. T. Conner, *Carbohydr. Res.* **1983**, *115*, 1-13.
- [49] F. F. L. Ho, D. W. Klosiewicz, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 913-916.
- [50] G. Wenz, P. Liepold, N. Bordeanu, *Macromol. Symp.* **2004**, *210*, 203-208.
- [51] G. Wenz, P. Liepold, N. Bordeanu, *Cellulose* **2005**, *12*, 85-86.
- [52] H. Staudinger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1920**, *53*, 1073-1085.
- [53] D. Klemm, T. Heinze, B. Philipp, W. Wagenknecht, *Acta Polym.* **1997**, *48*, 277-297.
- [54] M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430.
- [55] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821.
- [56] E. Ohtsuka, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2195.
- [57] U. Erler, D. Klemm, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1992**, *13*, 195-201.
- [58] J. A. Camacho Gómez, U. W. Erler, D. Klemm, *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 953-964.
- [59] B. Harkness, D. Gray, *Polym. Preprints* **1990**, *31*, 644.
- [60] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Canadian Journal of Chemistry* **1990**, *68*, 1135-1139.
- [61] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Polym. Prep. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **1990**, *31*, 644-645.
- [62] T. Kondo, D. G. Gray, *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *45*, 417-423.
- [63] D. Klemm, T. Heinze, A. Stein, T. Liebert, *Macromol. Symp.* **1995**, *99*, 129.
- [64] A. Koschella, D. Klemm, *Macromol. Symp.* **1997**, *120*, 115.

- [65] A. Stein, W. Wagenknecht, D. Klemm, B. Phillip, DD298644, *Chem. Abstr.* **1989**, 117, 92503.
- [66] A. Stein, D. Klemm, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1988**, 9, 569.
- [67] T. Heinze, K. Röttig, *Macromol. Rapid Commun.* **1994**, 15, 311-317.
- [68] B. Philipp, D. Klemm, A. Stein, *Papier* **1995**, 102-108.
- [69] D. Horton, E. Luetzow, O. Theander, *Carbohydr. Res.* **1973**, 26, 1-19.
- [70] F. Liu, X. Yu, S. Li, *J. Polym. Sci.: Part A: Polymer Chemistry* **1993**, 31, 3245.
- [71] S. Suto, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* **1984**, 22, 637-646.
- [72] E. Heuser, M. Heath, W. H. Shochley, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 670-674.
- [73] T. Fujimoto, S. Takahashi, B. M. Barua, T. Miyamoto, H. Inagaki, *J. of Polymer Sciences* **1986**, 24, 2981-2993.
- [74] L. H. Dubois, G. R. Nuzzo, *Annu. Rev. Chem.*, **1992**, 43, 437-463.
- [75] G. Wenz, D. F. Petri, S. W. Choi, in *Chem. Abstr.* 130, 183895, Universität Karlsruhe, USA, **2001**, p.1.
- [76] L. Valli, S. Trusso, G. Mondio, N. Fortunato, *Thin Solid Films* **2003**, 71-94.
- [77] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, New York, **1991**.
- [78] K. Kamide, M. Saito, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1983**, 4, 33-39.
- [79] T. Kawaguchi, *Thin Solid Film* **1985**, 133, 29-38.
- [80] T. Kawaguchi, H. Nakahara, K. Fukuda, *J. Of Colloid & Interface Sci.* **1985**, 104, 290-293.
- [81] G. Gabrielli, P. Baglioni, *J. Of Colloid & Interface Sci.* **1980**, 73, 582-587.
- [82] G. Wegner, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1991**, 95, 1326-1333.
- [83] M. Schaub, C. Fakirov, A. Schmidt, G. Lieser, G. Wenz, G. Wegner, P. A. Albouy, H. Wu, M. D. Foster, C. Majrzak, S. Satija, *Macromolecules* **1995**, 28, 1221-1228.
- [84] M. Schaub, G. Wenz, G. Wegner, A. Stein, D. Klemm, *Adv. Mater.* **1993**, 12, 919-921.
- [85] M. Schaub, M. Seufert, C. Fakirov, H. Tebbe, V. Buchholz, G. Wegner, *Macromol. Symp.* **1997**, 120, 237-245.
- [86] S. Schwiegk, T. Vahlenkamp, Y. Xu, G. Wegner, *Macromolecules* **1992**, 25, 2513-2525.

- [87] M. Schaub, K. Mathauer, S. Schwiegk, P. A. Albouy, G. Wenz, G. Wegner, *Thin Solid Films* **1992**, 210, 397-400.
- [88] Y. Lvov, G. Decher, H. Möhwald, *Langmuir* **1993**, 9, 481-486.
- [89] G. Decher, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol 9, Pergamon Press, Oxford, **1996**, pp. 507-528.
- [90] G. Decher, *Comprehensive Supramolecular Chemistry* **1996**.
- [91] G. Decher, B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov, J. Schmitt, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 677-684.
- [92] H. Kern, *Dissertation*, Shaker Verlag **2000**.
- [93] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102.
- [94] L. Netzer, J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 674.
- [95] R. Maoz, J. Sagiv, *J. Colloid Interf. Sci.* **1984**, 100, 465.
- [96] R. Maoz, J. Sagiv, *Langmuir* **1987**, 3, 1045.
- [97] G. M. Whitesides, S. R. Wassermann, Y.-T. Tao, *Langmuir* **1989**, 5, 1074.
- [98] S. R. Wassermann, G. M. Whitesides, I. M. Tidswell, B. M. Ocko, P. S. Pershan, J. D. Axe, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5852.
- [99] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Langmuir* **1985**, 1, 45.
- [100] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Langmuir* **1985**, 1, 52.
- [101] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1989**, 4, 110.
- [102] T. Kowalik, H.-J. Adler, A. Plagge, M. Stratmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 15, 2064-2069.
- [103] E. Jaehne, T. Kowalik, H.-J. Adler, A. Plagge, M. Stratmann, *Macromol. Symp.* **2002**, 177, 97-109.
- [104] G. Wenz, S. Choi, M. Bruns, T. Schimmel, H. Beyer, D. F. Siqueira Petri, *Polymer* **1999**, 40, 1593-1601.
- [105] R. G. Nuzzo, P. E. Laibinis, D. L. Allara, G. M. Whitesides, Y. T. Tao, A. N. Parikh, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7152-7167.
- [106] P. E. Laibinis, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 7017-7021.
- [107] J. Lukkari, M. Meretoja, I. Kartio, K. Laajalehto, M. Rajamäki, M. Lindström, J. Kankare, *Langmuir* **1999**, 15, 3529-3537.
- [108] H. Takiguchi, K. Sato, T. Ishida, K. Abe, K. Yase, K. Tamada, *Langmuir* **2000**, 16, 1703-1710.

- [109] M. W. J. Beulen, B.-H. Huisman, P. A. van der Heijden, F. C. J. M. van Veggel, M. G. Simons, E. M. E. F. Biemond, P. J. de Lange, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1996**, *12*, 6170-6172.
- [110] M. W. J. Beulen, J. Bögler, B. Lammerink, F. A. J. Geurts, E. M. E. F. Biemond, K. G. C. Van Leerdam, F. C. J. M. van Veggel, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1998**, *14*, 6424-6429.
- [111] C. Jung, O. Dannenberger, Y. Xu, M. Buck, M. Grunze, *Langmuir* **1998**, *14*, 1103-1107.
- [112] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321-335.
- [113] G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, R. G. Nuzzo, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5097-5105.
- [114] M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsay, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3568.
- [115] C. J. Zhong, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11616-11617.
- [116] G. Nelles, *Dissertation*, Universität Mainz, **1995**.
- [117] G. Nelles, M. Weisser, R. Back, P. Wohlfart, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5039-5046.
- [118] M. Weisser, G. Nelles, P. Wohlfart, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17893-17900.
- [119] M. W. J. Beulen, J. Bugler, M. R. De Jong, B. Lammerink, J. Huskens, H. Schonherr, G. J. Vancso, B. A. Boukamp, H. Wieder, A. Ofenhauser, W. Knoll, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Chemistry - A European Journal* **2000**, *6*, No. 7, 1176-1183.
- [120] Erdelen, L. Häussling, R. Naumann, H. Ringsdorf, H. Wolf, J. Yang, M. Liley, J. Spinke, W. Knoll, *Langmuir* **1994**, *10*, 1246-1250.
- [121] P. Liepold, *Dissertation*, Karlsruhe, **2001**.
- [122] S. Busse, M. DePaoli, G. Wenz, S. Mittler, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2001**, *80*, 116-124.
- [123] N. Bordeanu, *Dissertation*, Saarbrücken **2005**.
- [124] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [125] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, *Molekulare Zellbiologie 2*, de Gruyter, Berlin, **1996**.

- [126] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et al., *Molecular Biology of the Cell* 3, Garland Publishing, New York und London, **1994**.
- [127] L. Stryer, *Biochemistry* 4, Freeman, New York, **1995**.
- [128] R. Winter, Chemie in unserer Zeit: *Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen* **1990**, 24, 71-81.
- [129] B. Silver. *The physical chemistry of membranes*. Allen and Unwin, Winchester / Mass., **1985**.
- [130] F. Szoka, D. Papahadjopoulos, *Ann. Rev. Biophys.* **1980**, 9, 467.
- [131] T. Henkel, S. Mittler, W. Pfeiffer, H. Rotzer, H. J. Apell et al., *Biochimie* **1985**, 71, 89-86.
- [132] C. A. Naumann, W. Knoll, C. W. Frank, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1097-1103.
- [133] M. Seitz, J. Y. Wong, C. K. Park, N. A. Alcantar, J. Israelachvili, *Thin Solid Films* **1998**, 327-329, 767-771.
- [134] M. Seitz, C. K. Park, J. Y. Wong, N. A. Alcantar, J. N. Israelachvili, *Langmuir* **2001**, 17, 4616-4626.
- [135] E. Sackmann, *Science* **1996**, 271, 43-48.
- [136] G. L. Jr. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, John Wiley & Sons: New York, London, Sidney, **1966**.
- [137] O. Albrecht, H. Gruler, E. Sackmann, *Journal de Physique* **1978**, 39, 301-313.
- [138] M. C. Phillips, B. D. Ladbrooke, D. Chapman, *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1970**, 196, 35-44.
- [139] K. H. Bauer, K.-H. Froemming, C. Fuehrer, *Pharmazeutische Technologie 5.*, Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, **1997**.
- [140] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature* **1962**, 194, 979.
- [141] A. W. Clowes, R. J. Cherry, D. Chapman, *Biochim. Et Biophys. Acta* **1971**, 249, 301-317.
- [142] G. Stark, *Ber. Der Bunsenges. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1978**, 82, 890-891.
- [143] P. Mueller, D. O. Rudin, *Biochem. And Biophys. Research Communications* **1967**, 26, 398-404.
- [144] T. E. Andreoli, *Methods in Enzymology* **1974**, 32, 513-539.
- [145] R. B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York, **1989**.

- [146] B. Raguse, V. Braach-Maksvytis, B. A. Cornell, L. G. King, P. D. J. Osman et al., *Langmuir* **1998**, *14*, 648-659.
- [147] H. Wieder, *Dissertation*, Fachbereich Chemie und Pharmazie **2000**.
- [148] H. M. McConell, T. H. Watts, R. M. Weis, A.A. Brian, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *864*, 95-106.
- [149] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. Osman, R. J. Pace et al., *Biophys. J.* **1997**, *72*, Th289-Th289.
- [150] M. L. Wagner, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1400-1414.
- [151] G. Elender, M. Kühner, E. Sackmann, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 565-577.
- [152] L. Häußling, W. Knoll, H. Ringsdorf, F. J. Schmitt, J. Yang, *J. Macromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, *46*, 145.
- [153] G. Krishna, J. Schulte, B. A. Cornell, R. Pace, L. Wiczorek et al., *Langmuir* **2001**, *17*, 4858-4866.
- [154] H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, *Langmuir* **1994**, *10*, 197-210.
- [155] L. M. Williams, S. D. Evans, T. M. Flynn, A. Marsh, P. F. Knowles et al., *Supramolecular Science* **1997**, *4*, 513-517.
- [156] C. Steinem, A. Janshoff, K. von dem Bruch, K. Reihls, J. Goossens et al., *Bioelectrochemistry & Bioenergetics* **1998**, *45*, 17-26.
- [157] J. Lahiri, P. Kalal, A. G. Frutos, S. T. Jonas, R. Schaeffler, *Langmuir* **2000**, *16*, 7805-7810.
- [158] R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartmann et al., *Langmuir* **2003**, *19*, 5435-5443.
- [159] C. A. Naumann, O. Prucker, T. Lehmann, J. Ruhe, W. Knoll, C. W. Frank, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 27-35.
- [160] O. Purrucker, A. Fortig, R. Jordan, M. Tanaka, *Chem. Phys Chem.* **2004**, *5*, 327-335.
- [161] L. Q. Zhang, M. L. Longo, P. Stroeve, *Langmuir* **2000**, *16*, 5093-5099.
- [162] M. Hausch, R. Zentel, W. Knoll, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 174-179.
- [163] J. Spinke, J. Yang, H. Wolf, M. Liley, H. Ringsdorf, W. Knoll, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1667-1671.
- [164] M. Kühner, R. Tampé, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 217-226.
- [165] A. T. A. Jenkins, J. Hu, J. Z. Wang, S. Schiller, R. Foerch et al., *Langmuir* **2000**, *16*, 6381-6384.

- [166] U. Rothe, H. Aurich, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1989**, *11*, 18-30.
- [167] U. Rothe, H. Aurich, H. Engelhardt, D. Oesterheldt, *FEBS Letters* **1990**, *263*, 308-312.
- [168] R. Naumann, A. Jonczyk, R. Kopp, J. Van Esch, H. Ringsdorf et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2056-2058.
- [169] C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Becucci, M. R. Moncelli, R. Guidelli, *Langmuir* **2001**, *17*, 6585-6592.
- [170] T. D. Stora, Z. Dienes, H. Vogel, C. Duschl, *Langmuir* **2000**, *16*, 5471-5478.
- [171] E. Györvary, B. Wetzer, U. B. Sleyir, A. Sinner, A. Offenhausser et al., *Langmuir* **1999**, *15*, 1337-1347.
- [172] A. Berquand, P. E. Mazeran, J. Pantigny, V. Proux-Delrouyre, J. M. Laval et al., *Langmuir* **2003**, *19*, 1700-1707.
- [173] V. Proux-Delrouyre, C. Elie, J. M. Laval, J. Moiroux, C. Bourdillon, *Langmuir* **2002**, *18*, 3263-3272.
- [174] V. Proux-Delrouyre, J. M. Laval, C. Bourdillon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9176-9177.
- [175] T. Tashiro, Y. Shimura, *J. of Applied Polymer Science* **1982**, *27*, 747-132.
- [176] K. Furuhashi, K. Koganei, H. Chang, A. Nobuyoshi, M. Sakamoto, *Carbohydr. Res.* **1992**, *230*, 165-77.
- [177] K. Rahn, *Dissertation*, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **1997**.
- [178] T. Heinze, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 2341-2364.
- [179] S. Choi, H. Lauer, G. Wenz, M. Bruns, D. F. S. Petri, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 11-15.
- [180] F. Micheel, J. Ewers, *Makromolekulare Chemie*, **1949**, *3*, 200-209.
- [181] J. Turkova, J. Vajcnev, D. Vancurova, J. Stamberg, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1979**, *44*, 3411.
- [182] F. Dan, S. Dumitriu, M. Popa, V. Artenie, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 283-290.
- [183] S. R. Haseley, F. G. Vliegthard, *Topics in Current Chemistry* **2002**, *218*, 94-114.
- [184] M. Kobayashi, S. Yanagihara, T. Kitae, E. Ichishima, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, *53*, 2211-2216.
- [185] K. Nilson, K. Mosbach, *Methods in Enzymology*, (K. Mosbach, ed.), Academic Press, Orlando, Fl, **1987**, *135 Part B*, 65.
- [186] G. Hermanson, A. Mallia, P. Smith, *Academic Press INC.*, San Diego, **1992**.

- [187] M. Schnabelrauch, T. Heinze, D. Klemm, *Acta Polym.* **1990**, *41*, 112-120.
- [188] O. Kinstlers, M. Pomale, *Khim. Drev.* **1976**, *24*.
- [189] P. Gemeiner, M. Benes, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1983**, *48*, 267-278.
- [190] S. Dumitriu, M. Popa, C. Beldie, *Makromol. Chemie Macromol. Symp.*, **1988**, *19*, 313.
- [191] M. Hartmann, G. Geschwend, D. Klemm, *Z. Chemie* **1982**, *22*, 176.
- [192] D. Klemm, G. Geschwend, M. Hartmann, *Acta Polym.* **1984**, *35*, 176.
- [193] V. Stefuca, P. Gemeiner, V. Bales, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1988**, *10*, 306.
- [194] E. Maekawa, T. Koshijima, *Cellulose Chem. Technol.*, **1984**, *18*, 31.
- [195] E. Maekawa, T. Kosaki, T. Koshijima, *Wood Res.*, **1986**, *73*, 44.
- [196] L. Reichelt, S. Poller, *Acta Polym.* **1981**, *32*, 172.
- [197] P. Gemeiner, A. Breier, *Biotechnol. Bioeng.*, **1982**, *24*, 2573-2582.
- [198] M. A. Krysteva, P. M. Grigorova, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1987**, *9*, 538.
- [199] W. B. Okita, D. B. Bonham, J. L. Gainer, *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 632.
- [200] L. F. Chen, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 1463.
- [201] M. Przybyt, H. Sugier, *Starch/Stärke* **1988**, *40*, 275.
- [202] S. Hasegaza, R. Uenoyama, F. Takeda, H. Chuma, S. Baba, F. Kamaiyama, M. Iwakawa, M. Fushimi, *J. Chromatography* **1983**, *278*, 25.
- [203] P. Ferruti, M. C. Tanzi, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1986**, *2*, 175.
- [204] P. Henklein, M. Becker, W. Büttner, C. Rupprich, F. Loth, H. Dautzenberg, DD-Pat. **1983**, 219490, 220969.
- [205] P. Berlin, D. Klemm, A. Jung, H. Liebegott, R. Rieseler, J. Tiller, *Cellulose* **2003**, *10*, 343-367.
- [206] A. F. S. A. Habbeb, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264.
- [207] J. J. Linko, R. Viskari, L. Pohjola, P. Linko, *Enzym. Eng.* **1978**, *345*.
- [208] J. J. Linko, R. Viskari, L. Pohjola, P. Linko, C. A. **1980**, *93*, 93741 d.
- [209] G. Kay, E. M. Crook, *Nature (London)* **1967**, *216*, 514.
- [210] G. Kay, M. D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *198*, 276-285.
- [211] W. B. Okita, D. B. Bonham, J. L. Gainer, *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 632.
- [212] W. Schössler, H. F. Boeden, M. Holtzhauer, F. Loth, F. Hiepe, D. Bertram, R. Müller, D. Konjuchowa, DD-Pat. **1986**, 256721.

- [213] M. T. W. Heran, *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), Academic Press, Orlando, FL **1987**, *135 Part B*, 102.
- [214] D. Stöllner, F. W. Scheller, A. Warsinke, *Analytical Biochemistry* **2002**, *304*, 157-165.
- [215] S. Jung, B. Angerer, F. Löscher, S. Niehren, J. Winkle, S. Seeger, *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7(6)*, 900-903.
- [216] P. W. Arisz, H. J. J. Kauw, J. J. Boon, *Carbohydr. Res.*, **1995**, *271*, 1-14.
- [217] A. S. Perlin, B. Casu, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 2921-2924.
- [218] W.-M. Kulicke, A. H. Kull, W. Kull, H. Thielking, J. Engelhardt, J.-B. Pannek, *Polymer*, **1996**, *37*, 2723-2731.
- [219] K. Vollhardt, N. Schore, VCH, **1989**.
- [220] S. Löfas, B. Johnsson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *Vol?*, 1526-1528.
- [221] B. Johnsson, S. Löfas, G. Linqvist, *Analytical Biochemistry*, **1991**, *198*, 268-1277.
- [222] B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R.-M. Müller Hilgren, A. Hansson, *J. of Molecular Recognition*, **1995**, *8*, 125-131.
- [223] J. Bergström, S. Löfas, B. Johnsson, *United States Patent*, *5*, 436, 161 **1995**.
- [224] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum akad. Verlag **2003**, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage.
- [225] N. Seewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag **2002**.
- [226] H.-J. P. Adler, M. Stratmann, R. Feser, J. Heitbaum, *FATIPEC Congress* **1989**, *24th (Vol.B)*, B/233-B249.
- [227] U. Schuldt, B. Phillip, D. Klemm, H. Jancke, I. Nehls, *Papier*, **1994**, 3.
- [228] R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 733.
- [229] G. Nelles, H. Schoenherr, G. J. Vancso, H. J. Butt, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. A66* **1998**, 1261.
- [230] G. Nelles, H. Schoenherr, M. Jaschke, H. Wolf, M. Schaub, J. Küther, W. Tremel, E. Bamberg, H. Ringsdorf, H. J. Butt, *Langmuir* **1998**, *14*, 808-815.
- [231] V. Chechik, H. Schoenherr, G. J. Vancso, C. J. M. **1998**, *14*, 3003.
- [232] C. J. M. Stirling, R. Crooks, V. Chechik, *Adv. Materials* **2000**, *12*, 1161-1171.
- [233] M. W. J. Beulen, M. I. Kastenber, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1998**, *14*, 7463.

- [234] G. Nelles, M. Weisser, R. Back, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Supramol. Science* **1994**, in Vorbereitung.
- [235] M. Weisser, G. Nelles, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Sensors and Actuators B* **1997**, 38-39, 58-67.
- [236] B.-H. Huisman, D. M. Rudkevich, F. C. J. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Soc.* **1996**, 118, 3523.
- [237] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2358-2368.
- [238] J. Spinke, *Diplomarbeit*, **1992**.
- [239] E. F. Aust, M. Sawodny, S. Ito, W. Knoll, *TRIP* **1994**, 2, 313.
- [240] W. Knoll, *Makromol. Chem.* **1991**, 192, 2827.
- [241] E. Yeatman, *Biosensor & Bioelectronics* **1996**, 11, 635.
- [242] J. Sambles, G. Bradery, F. Yang, *Contemporary Physics* **1991**, 32, 173.
- [243] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* **1968**, 23a, 2135.
- [244] E. Kretschmann, *Z. Physik* **1971**, 241, 313-324.
- [245] J. Spinke, *Diplomarbeit*, **1992**.
- [246] T. Liebermann, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1999**.
- [247] W. Knoll, M. Zizlsperger, T. Liebermann, S. Arnold, A. Badia, M. Liley, D. Piscevic, F. J. Schmitt, J. Spinke, *Colloid. Surf. A.* **2000**, 161, 115-137.
- [248] H. Distler, *Angew. Chem., Int. Edt.* **1967**, 6, 544-553.
- [249] D. S. Iyengar, S. Rajaram, K. Purushothama Chary, *Synthetic Comm.* **2000**, 30, 3905.
- [250] G. M. Whitesides, J. Moran, J. C. Butler, J. A. Burns, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648.
- [251] I. H. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* **1966**, 35, 873.
- [252] A. M. Klibanov, *Science* **1983**, 219, 722.
- [253] O. Ariga, M. Kato, T. Sano, Y. Nakazawa, Y. Sano, *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 76, 203.
- [254] A. L. Crumbliss, J. G. Stonehuerner, R. W. Henkens, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 331.
- [255] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1986**.
- [256] S. V. Klinov, N. P. Sugrobova, B. T. Kurganov, *Molec. Biol. (Moscow)* **1979**, 13, 55.
- [257] C. Huitron, J. Limon-Lason, *Biotechnol. Bioeng.* **1978**, 20, 1377.
- [258] S. W. Carleysmith, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 22, 735. 305

- [259] J. Lasch, R. Koelsch, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 82, 101.
- [260] J. Kohn, J. Wilchek, *FEBS Lett.* **1984**, 154, 209.
- [261] H. Kise, A. Hayakawa, H. Noritomi, *Enzym Microbiol. Technol.* **1991**, 13, 584.
- [262] C. Mannhalter, *Sensors and Actuators B* **1993**, 11, 273-279.
- [263] C. I. Simionescu, S. Dimitriu, M. I. Popa, L. Denisova, *Makromol. Chem. Suppl.* **1985**, 9, 179-187.
- [264] H. Kaboli, P. J. Reilly, *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 22, 1055.
- [265] R. Ohba, T. Shibata, S. Ueda, *J. Ferment. Technol.* **1979**, 57, 146-150.
- [266] J. Woodward, In: *Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 3-17.
- [267] R. Axen, S. Ernback, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 18, 351.
- [268] W. Göpel, T. A. Jones, M. Kleitz, J. Lundström, T. Seiyame, In: *Göpel W., Hesse J. and Zemel J. N. (eds.), Sensors – A Comprehensive Survey*, VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Germany **1992**, 3.
- [269] J. C. Puyn, A. S. Jang, J. S. Park, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1996**, 18, 41-44. 316
- [270] T. Tsuchida, K. Yoda, *Clin. Chem.* **1983**, 29, 51-55.
- [271] K. G. I. Nilsson, C. F. Mandenius, *Biotechnology* **1994**, 12, 1376-1378.
- [272] F. Palmisano, A. de Santis, G. Tantillo, T. Voloicella, P. G. Zambonin, *Analyst* **1997**, 122, 1125-1128.
- [273] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Anal. Chem.* **1987a**, 59, A9, 33.
- [274] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Phil. Trans. R. Soc. London B* **1987b**, 316, 95-106.
- [275] M. L. Fultz, R. A. Durst, *Anal. Chim. Acta* **1982**, 140, 1-18.
- [276] M. N. Gupta, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1991**, 14, 1-11.
- [277] W. H. Scouten, In: *Mosbach K. V. (ed.), Methods in Enzymology*. Acad. Press INC, San Diego, USA **1987**.
- [278] G. G. Guilbault, N. G. Olivera, In: *Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 55-74.
- [279] M. P. J. Kierstan, Coughlan, In: *Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 39-48.
- [280] H. E. Klei, D. W. Sundstrom, D. Shim, In: *Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 49-54.

- [281] A. V. Barmin, A. V. Eremenko, A. A. Sokolovskij, S. F. Chernov, I. N. Kurochkin, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, *18*, 369-376.
- [282] J.-R. Li, Y.-K. Du, P. Boullanger, L. Jiang, *Thin Solid Films* **1999**, *352*, 213-217.
- [283] A. T. Smith, N. Santama, S. Dacey, M. Edwards, R. C. Bray, R. N. F. Thorneley, J. F. Burke, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13335-13343.
- [284] M. Gajhede, D. L. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 1032-1038.
- [285] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen, J. Hajdu, *Nature* **2002**, *417*, 463-468.
- [286] K. G. Welinder, *FEBS Lett.* **1976**, *72*, 19-23.
- [287] N. C. Veitch, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249-259.
- [288] R. H. Haschke, J. M. Friedhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 1039-1042.
- [289] R. Krieg, K.-J. Hallhuber, *Cellular Mol. Biol.* **2003**, *49*, 547-563.
- [290] O. Ryan, M. R. Smyth, C. O'Fagain, In: *Ballou, D. K. (ed.), Essays in Biochemistry*, Portland Press, London, UK **1994**, *28*, 129-146.
- [291] N. V. Veitch, A. T. Smith, *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, *51*, 107-162.
- [292] K. Folkes, P. Wardman, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 129-136.
- [293] O. Greco, S. Rossiter, C. Kanthou, L. K. Folkes, P. Wardman, G. M. Tozer, G. U. Dachs, *Mol. Cancer Therapeutics* **2001**, *1*, 151-160.
- [294] P. Wardman, *Current Pharmaceutical Design* **2002**, *8*, 1363-1374.
- [295] P. D. Josephy, T. Eling, R. P. Mason, *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 3669-3675.
- [296] K. Monde, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 913-921.
- [297] J. Tiller, R. Rieseler, P. Berlin, D. Klemm, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1021-1029.
- [298] J. Borch, P. Roepstorff, *Analytical Chem.* **2004**, *76*, 5243-5248.
- [299] D. Hobara, Y. Uno, T. Kakiuki, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 3437-3441.
- [300] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger's Principles of Biochemistry*, Springer, New York **2001**.
- [301] C. J. Epstein, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2175.
- [302] M. D. Lilly, C. Money, W. E. Hornby, E. M. Crook, *Biochem. J.* **1965**, *95*, 45.

- [303] H. D. Brown, S. K. Chattopadhyay, A. Patel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 25, 304.
- [304] W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, *Biochem. J.* **1966**, 98, 420.
- [305] T. Kobayashi, K. J. Laidler, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 302,1.
- [306] L. Goldstein, S. Blumberg, Y. Levin, M. Pecht, D. Atlas, *Biochemistry* **1970**, 9, 2322.
- [307] J. Gryszkiewicz, *Folia Biol.* **1971**, 19, 119.
- [308] A. A. Brian, H. M. McConell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 6159-6163.
- [309] P. Chan, *J. Cell. Biol.* **1991**, 10, 245-255.
- [310] E.-M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Müller, J. Engel, *Biochemistry* **1997**, 36, 7395-7402.
- [311] A. Kloboucek, A. Berish, J. Faix, *Biophys. J.* **1999**, 77, 2311-2328.
- [312] S. Y. Qi, J. T. Groves, A. Chakraborty, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 6548-6553.
- [313] A. Grakoui et al., *Science* **1999**, 285, 221-227.
- [314] L. K. Tamm, M. H. McConnell, *Biophys. J.* **1985**, 47, 105-113.
- [315] D. Beyer, G. Elender, W. Knoll, M. Kühner, S. Maus, H. Ringsdorf, E. Sackmann, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1791.
- [316] D. Pink, M. Kühner, B. Quinn, E. Sackmann, H. Pham, *Langmuir* **1995**, 11, 2696 ff.
- [317] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. King, P. D. J. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, 387, 580-583.
- [318] N. Thompson, C. Poglitsch, M. Timbs, M. Pisarchick, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 567.
- [319] U. Sohling, A. J. Schouten, *Langmuir* **1996**, 12, 3912-3919.
- [320] J. Y. Wong, C. K. Park, M. Seitz, J. N. Israelachvili, *Biophys. J.* **1999**, 77, 1458.
- [321] J. Y. Wong, J. Majewski, M. Seitz, C. K. Park, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *Biophys. J.* **1999**, 77, 1445.
- [322] J. Majewski, J. Y. Wong, C. K. Park, M. Seitz, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *Biophys. J.* **1998b**, 75, 2363-2367.
- [323] L. Chi, R. Johnston, H. Ringsdorf, N. Kimizuka, T. Kunitake, *Langmuir* **1992**, 8, 1360.
- [324] M. Stelzle, G. Weissmüller, E. Sackmann, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 2974-2981.
- [325] D. Beyer, T. M. Bohanon, W. Knoll, H. Ringsdorf, G. Elender, E. Sackmann, *Langmuir* **1996**, 12, 2514.
- [326] D. Beyer, A. Nakao, M. Matsuzawa, W. Knoll, *Langmuir* **1998**, 14, 3030.

- [327] Y. Zhou, M. L. Bruening, D. E. Bergbreiter, R. M. Crooks, M. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3773.
- [328] O. Prucker, C. A. Naumann, J. Ruehe, W. Knoll, C. W. Frank, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8766.
- [329] H. L. Jin, B. L. Hai, J. D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.* **1995**, *20*, 1043-1079.
- [330] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, *252*, 1164-1167.
- [331] K. Arnold, O. Zschoernig, D. Barthel, W. Herold, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1022*, 303-310.
- [332] S. M. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, W. Knoll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 208-211.
- [333] N. Bunjes et al., *Langmuir* **1997**, *13*, 6188-6194.
- [334] M. Setaka, T. Yamamoto, N. Sato, M. Yano, T. Kwan, *J. of Biochem.* **1982**, *91*(1), 79-85.
- [335] X. D. Lu, A. L. Ottova, H. T. Tien, *Bioelectrochem. Bioenerget.* **1996**, *39*, 285-289.
- [336] C. Duschl, M. Liley, G. Corradin, H. Vogel, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1299-1237.
- [337] L. Santesson, T. Wong, M. Taborelli, P. Descouts, M. Liley, C. Duschl, H. Vogel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1038-1045.
- [338] L. M. Williams, S. D. Evans, T. M. Flynn, D. Marsh, P. F. Knowles, R. J. Bushby, N. Boden, *Langmuir* **1997**, *13*, 751-757.
- [339] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 522.
- [340] E. L. Florin, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 375-383.
- [341] K. Seifert, K. Fendler, E. Bamberg, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 384.
- [342] A. L. Plant, M. Tarlov, *Biophys. J.* **1993**, *64*, A298-A298.
- [343] A. L. Plant, M. Guegueichkeri, W. Yap, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1126-1133.
- [344] A. L. Plant, *Langmuir* **1993**, *9*, 2764-2767.
- [345] C. Steinem, A. Janshoff, W. P. Ulrich, M. Sieber, H.-J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1279*, 169-180.
- [346] H. M. Mc Connell, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **1985**, *47*, 104-113.
- [347] G. Fragneto, T. Charitat, F. Graner, K. Mecke, L. Perino-Gallice, E. Bellet-Almaric, *Europhys. Lett.* **2001**, *53*, 100-106.
- [348] E. Evans, R. Merkel, E. Sackmann, *J. Phys. Fr.* **1989**, *50*, 1535.
- [349] H. M. Mc Connell, A. A. Brian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6159-6163.

- [350] M. J. Sammon, M. Seul., *Thin Solid Films* **1990**, 185, 287.
- [351] A. D. Bangham, *Adv. Lipid Res.* **1963**, 1, 65-104.
- [352] *Liposomes. From Biophysics to Therapeutics*, Dekker, New York, **1987**.
- [353] R. Schubert, *Liposomen in Arzneimitteln. Pharmazeutische Technologie* in: *Moderne Arzneiformen.*, R. H. Müller und G. E. Hildebrand, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. Auflage, 219-242.
- [354] D. Papahadjopoulos, New York Academy of Sciences, **1978**.
- [355] T. E. Thompson, C. Huang, B. L. Litman, *Bilayers and Biomembranes: Compositional Asymmetries Induced by Surface Curvature*, in "The Cell Surface in Development", New York, John Wiley & Sons.
- [356] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1376, 91-145.
- [357] G. Cevc (Editor), *Phospholipids Handbook*, (Marcel Dekker, Inc.), **1993**.
- [358] R. Winter, W. C. Pilgrim, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1989**, 93, 707-717.
- [359] R. C. Mc Donald, G. W. Ashley, M. M. Shida, V. A. Rakhmanova, Y. S. Tarahovsky et al., *Biophys. J.* **1999**, 77, 2612-2629.
- [360] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13 (1), 238-252.
- [361] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 557 (1), 9-23.
- [362] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 858 (1), 161-168.
- [363] N. Berger, A. Sachse, J. Bender, R. Schubert, M. Brandl, *Int. J. Pharma* **2001**, 223 (1-2), 55-68.
- [364] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, A. S. Janshoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 817 (1), 193-196.
- [365] R. Schubert, *Methods Enzymol.* **2003**, 367, 46-70.
- [366] J. R. S. Phillipot, J. P. Liautard, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 821 (1), 79-84.
- [367] J. Brunner, P. Skrabal, H. Hauser, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 455 (2), 322-331.
- [368] M. H. Milsman, R. A. Schwendener, H. G. Weder, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 512 (1), 147-155.
- [369] R. Peschka, T. Purmann, R. Schubert, *Int. J. Pharm.* **1998**, 162, 177-183.
- [370] R. L. Hamilton Jr., J. Goerke, L. S. Guo, M. C. Williams, R. J. Havel, *J. Lipid Res.* **1980**, 21 (8), 981-992.

- [371] M. D. Brandl, D. Bachmann, M. Drechsler, K. H. Bauer, *Drugs Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2167-2191.
- [372] E. Mayhew, R. Lazo, W. J. Vail, J. King, A. M. Green, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *775* (2), 169-174.
- [373] C. Huang, *Biochemistry* **1969**, *8* (1), 344-352.
- [374] S. Batzri, E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *298*, 1015-1019.
- [375] J. H. Morrissey, *Morrissey lab protocol for preparing phospholipid vesicles (SUV) by sonication: Urbana-Champaign*, **2001**.
- [376] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. et Biophys. Acta* **1985**, *812*, 55-65.
- [377] R. C. Mc Donald, R. I. Mc Donald, B. Ph. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. Hu, *Biochim. et Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297-303.
- [378] C. Heibel, S. Maus, W. Knoll, J. Ruhe, ACS Book Series **1998**, *104*, 695.
- [379] E.-K. Schmidt, *Dissertation*, Universitat Hannover, **1998**.
- [380] P. Theato, R. Zentel, *Langmuir* **2000**, *16*, 1801-1805.
- [381] O. Mitsunobu, The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [382] B. B. Lohray, A. S. Reddy, V. Bushan, *Tetrahedron:Asymmetry* **1996**, *Vol. 7*, *8*, 2411-2416.
- [383] J. A. Heyes, D. Niculescu-Duvaz, R. G. Cooper, C. J. Springer, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 99-114
- [384] M. Shinitzky, *Biomembranes: Physical Aspects*, VCH Verlagsgesellschaft, **1993**.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Arbeit, die konstruktive Kritik und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.
- Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Hartmann (Experimentalphysik, UdS, Saarbrücken) möchte ich mich für die Benutzung des Sputter-Gerätes bedanken.
- Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Wenz: Thomas Albuzat, Tobias Bernard, Dr. Nico Bordeanu, Anne Engelke, Daniela Hausen, Jutta Ganz, Irina Grasmück, Dr. Mathias Großer, Ronny Heisel, Dr. Patrick Jost, Thomas Jung, Anja Kasten, Manuel Keil, Christoph Michel, Dr. Axel Müller, Tanja Seibert, Dr. Melanie Schnabel, Thomas Stauner, Thomas Stöhr, Dr. Christian Strassnig, Christian Teuchert, Carolin Thiele und Sebastian Wittl danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.
- Ein spezieller Dank geht an Thomas Albuzat und Thomas Stöhr für die vielen sehr unterhaltsamen, fachlichen und außerfachlichen Gesprächen während der gemeinsamen Mittagspausen.
- Bei Dr. Mathias Großer möchte ich mich für die Aufnahme der Masse-Spektren und für seine Hilfe beim Aufbau diverser Geräte und bei technischen Problemen bedanken.
- Anne Engelke danke ich für die Unterstützung bei den SPR-Messungen, vor allem im ‚Endspurt‘.
- Jutta Ganz danke ich für die Durchführung der GPC-Messungen.
- Joachim Kriesamer und Thomas Scherer danke ich für die technische Unterstützung und die Reparatur diverser Geräte; Frau Gerti Radünz für die Abwicklung von administrativen Angelegenheiten.

- Frau Christine Schulze (Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Arbeitskreis Prof. Dr. C.-M. Lehr) danke ich für die Größenbestimmung der Vesikel.
- Herrn Andreas Englisch (Arbeitskreis Hartmann) danke ich fürs Sputtern der Goldsubstrate für die SPR-Spektroskopie.
- Meinen ehemaligen Laborkollegen Ronny Heisel und Tobias Bernard möchte ich ganz herzlich für das meist sehr angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken, was die Arbeit im Labor sehr erleichtert hat.
- Weiterhin möchte ich Ronny Heisel für die vielen fachlichen und privaten Diskussionen sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit danken.
- Ganz besonders danke ich meiner gesamten Familie für ihre jahrelange Unterstützung und Förderung.