

Ladungs- und Peptidliganden-präsentierende *coiled coil*  
Peptide für multivalente Interaktionen mit Gold-  
Nanopartikeln und Tandem SH2-Domänen



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Chemiker DANIEL SCHÖNE

aus Berlin

Juni, 2016



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2011 bis Juni 2016 unter der Leitung von Prof. Dr. Beate Koksch an der Freien Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Beate Koksch
2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag

Disputation am: 02.11.2016

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, Juni 2016

Daniel Schöne

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Beate Koksch für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit und für die gewährten großzügigen Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas.

Prof. Dr. Rainer Haag Reißig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Christoph Böttcher, Dr. Boris Schade, Dr. Kai Ludwig und Andrea Schulz für ihre große Unterstützung und in mich investierte Zeit bei der Nutzung des Elektronenmikroskops, die mir in vielen Stunden die Nutzung ihres Mikroskops erklärten und mit mir die erhaltenen Ergebnisse sachkundig diskutierten.

Prof. Dr. Markus Wahl, insbesondere aber auch Dr. Alexander Ulrich und Nicole Holton danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des ITC-Geräts und deren Hilfe bei der Einführung in dieses Gerät.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Oliver Seitz und Michaela Marczyne für die angenehme Zusammenarbeit in dem gemeinsamen Kooperationsprojekt und für die Messung der Fluoreszenzanisotropie.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Koksch danke ich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe. Mein besonderer dank gilt dabei Dr. Enrico Brandenburg, der mir gerade am Anfang mit Rat und einem offenen Ohr zur Verfügung stand, und Dr. Jason Lee Heier für die allseits angenehme Arbeitsatmosphäre. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Allsion Ann Berger für die Korrekturlesung und Hilfe bei meinen Publikationen.

Desweiteren danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Promotionstätigkeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für die Hilfe und Unterstützung, gerade in den letzten Monaten, meiner Promotion bedanken. Ein

spezieller Dank gilt dabei meiner Freundin Franka Brey und meinem Sonnenschein Emma, die mir in jeder Lebenslage beiseite standen und mir immer ein Lächeln ins Gesicht zaubern.

## **Lebenslauf**

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf nicht sichtbar.

## Publikationen

D. Schöne, B. Schade, C. Böttcher, B. Kokschi, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 792-803.

U. I. M. Gerling-Driessen, N. Mujkic-Ninnemann, D. Ponader, D. Schöne, L. Hartmann, B. Kokschi, *Biomacromolecules*, **2015**, *16*, 2394-2402.

## Posterpräsentationen

13. Deutsche Peptid-Symposium, München 2013: Impact of positively charged amino acids f-position of a coiled poil peptide on the formation of peptide-nanoparticle networks.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. THEORIE</b> .....	<b>3</b>
2.1.  MULTIVALENTE GERÜSTARCHITEKTUREN .....	3
2.2.  ORGANISCHE POLYMERE.....	4
2.2.1. <i>Dendritische Polymere</i> .....	4
2.3.  ANORGANISCHE NANOPARTIKEL.....	9
2.3.1. <i>Multivalente Nanopartikel in der Medizin</i> .....	11
2.3.2. <i>Multivalente Nanopartikel zur Synthese von Nanopartikel-Hybridmaterialien</i> .....	15
2.4.  DNA UND PNA.....	20
2.4.1. <i>Multivalente DNA-Gerüststrukturen für medizinische Anwendungen</i> .....	21
2.4.2. <i>Multivalente DNA-Gerüststrukturen für die Strukturaufklärung</i> .....	25
2.5.  PEPTIDE UND PROTEINE.....	28
2.5.1. <i>Das coiled coil Faltungsmotiv</i> .....	29
2.5.2. <i>Zyklische, dendritische und random coil Peptide als Gerüststruktur</i> .....	31
2.5.3. <i><math>\beta</math>-Faltblatt-bildende Peptide als Gerüststruktur</i> .....	35
2.5.4. <i><math>\alpha</math>-helikale Peptide als Gerüststruktur</i> .....	37
<b>3. ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>45</b>
<b>4. METHODEN</b> .....	<b>47</b>
4.1.  ISOTHERMALE TITRATIONS-KALORIMETRIE .....	47
4.2.  TRANSMISSIONS-ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE .....	49
4.3.  ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE.....	53
4.4.  DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG .....	56
4.5.  UV-VIS SPEKTROSKOPIE.....	57
<b>5. ERGEBNISSE</b> .....	<b>59</b>
5.1.  PEPTID-INDUZIERTER NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	59
5.1.1. <i>Nanopartikel-Design und Synthese</i> .....	59
5.1.2. <i>Design und Synthese der Peptide für die kontrollierte Nanopartikel-Aggregation</i> .....	64
5.1.3. <i>Charakterisierung der Peptide</i> .....	68
5.1.4. <i>UV-Vis spektroskopische Untersuchung der Peptid-induzierten Nanopartikel-Aggregation</i> .....	79
5.1.5. <i>CD-spektroskopische Untersuchungen der Peptid-Nanopartikel-Interaktion</i> .....	89
5.1.6. <i>Gelelektrophoretische Untersuchung der Peptid-Nanopartikel-Aggregate</i> .....	92
5.1.7. <i>Isotherme Titrationskalorimetrie</i> .....	96
5.1.8. <i>Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Peptid-Nanopartikel-Aggregate</i> ....	102
5.2.  UNTERSUCHUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON DIVALENTEN COILED COIL PEPTIDEN AN DIE TANDEM SH2-DOMÄNE VON SYK UND ZAP70 .....	113
5.2.1. <i>Peptiddesign</i> .....	114
5.2.2. <i>Peptidsynthese und Charakterisierung</i> .....	116



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: UNTERSCHIED ZWISCHEN DIVALENTEN LIGANDEN MIT STARREM (A) UND FLEXIBLEM (B) RÜCKGRAT.....	3
ABBILDUNG 2: ÜBERSICHT DER STRUKTURELLEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN EINEM LINEAREN POLYMER (A) UND EINEM G3 DENDRIMER (B). ....	5
ABBILDUNG 3: STRUKTUR DES MONOMEREN AMINOLACTITOL (M) UND AMINOLACTITOL-FUNKTIONALISIERTEN DENDRIMERN AUFGEBAUT AUS DREI BZW. SECHS DENDRONEN SOWIE DEREN EFFIZIENZ BEI DER INHIBIERUNG VON HIV-1. DER $RIC_{50}$ -WERT ENTSPRICHT DABEI DEM $IC_{50}$ MULTIPLIZIERT MIT DER ANZAHL DER AMINOLACTITOL-EINHEITEN.....	6
ABBILDUNG 4: ENDOZYTOSE VON HIV IN T-ZELLEN (A) UND MÖGLICHE INHIBIERUNG DER ENDOZYTOSE IN GEGENWART VON DENDRIMERN (B).....	7
ABBILDUNG 5: STRUKTUR EINES PAMAM G2 DENDRIMERS (A) SOWIE DES AN PAMAM GEBUNDENE GLYKANS LACTO- <i>N</i> -FUCOPENTAOSE II (B) UND GRAFISCHE DARSTELLUNG DES INHIBITORISCHEN EFFEKTS VERSCHIEDENER GLYKAN-FUNKTIONALISierter PAMAM DENDRIMERE (G3 BIS G5) (C).	8
ABBILDUNG 6: MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VERSCHIEDENER NANOPARTIKEL-STRUKTUREN: KUGEL (A), STÄBCHEN (B), WÜRFEL (C), OKTAEDER (D), TRIGONALE BIPYRAMIDE (E), POLYEDER (F). ...	9
ABBILDUNG 7: STRUKTUR VON $MAN\alpha 1-2MAN\alpha$ UND $MAN\alpha 1-3MAN\alpha$ FUNKTIONALISIERTEN GOLD-NANOPARTIKELN (A) UND GRAFISCHE DARSTELLUNG DER NANOPARTIKEL-INDUZIERTEN BINDUNGSINHIBIERUNG VON GP120 AN DC-SIGN. ....	11
ABBILDUNG 8: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER WECHSELWIRKUNG VON POLY-SUMO3 MIT SIM IN GEGENWART VON DIPEPTID-FUNKTIONALISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL (A) SOWIE DEM KONTROLLEXPERIMENT MIT UNGEBUNDENEM DIPEPTID (B). ....	12
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NACHWEIS-KONZEPTS (A) UND GRAFISCHE DARSTELLUNG DER VERÄNDERUNG DER SPIN-SPIN-RELAXATION IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER MENGEN AN VIRUSPARTIKELN. <sup>[97]</sup> .....	15
ABBILDUNG 10: STRUKTUR DER MONO- BIS HEXAVALENTEN DNA-GOLD-NANOPARTIKEL UND DIE TEM AUFNAHMEN DER JEWEILS ERHALTENEN NANOPARTIKEL-AGGREGATE. ....	16
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZINK-INDUZIERTEN AGGREGATION VON GOLD-NANOPARTIKELN (A) SOWIE DER KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER NANOPARTIKEL-AGGREGATION (B). <sup>[105]</sup> .....	18

ABBILDUNG 12: GRAFISCHE DARSTELLUNG MÖGLICHER DNA-SEKUNDÄRSTRUKTUREN: DOPPELHELIX (A), TRIPHELIX (B) UND QUADRUPLEX (C). GRAFISCHE DARSTELLUNG EINER DREIARMIGEN (D), ACHTARMIGEN (E) UND KOMPLEXEN DREIDIMENSIONALEN (F) DNA-STRUKTUR. ....	21
ABBILDUNG 13: A) STRUKTUR DES VON HAMILTON <i>ET AL.</i> SYNTHETISIERTEN DNA PENTAPLEX. <sup>[117]</sup> B) STRUKTUREN DER VON ĒBARA <i>ET AL.</i> SYNTHETISIERTEN DNA-DENDRIMERE. ....	23
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GEBILDETEN BIBLIOTHEK AUS PNA/DNA KOMPLEXEN UND DEREN INHIBITORISCHE WIRKUNG AUF DIE BINDUNG VON C32 KREBSZELLEN AN VITRONECTIN. ....	25
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DNA PLÄTTCHEN, DIE IN DEFINIERTEN ABSTÄNDEN APTAMER-LIGANDEN PRÄSENTIEREN. ....	27
ABBILDUNG 16: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES $\alpha$ -HELIKALEN <i>COILED COIL</i> PEPTIDS IN DER <i>HELICAL</i> <i>WHEEL</i> -SCHREIBWEISE. ....	30
ABBILDUNG 17: STRUKTUR DER UNTERSUCHTEN RGD PRÄSENTIERENDEN ZYKLOPEPTIDE. ....	32
ABBILDUNG 18: SEQUENZEN DES $\beta$ -FALTBLATT-BILDENDEN PEPTIDS MIT UND OHNE TERMINAL GEBUNDENEN LIGANDEN, DAS IN WÄSSRIGEM MEDIUM $\beta$ -FALTBLÄTTER BILDET. ....	36
ABBILDUNG 19: BINDUNG DER $\alpha$ -HELIKALEN PEPTIDE AN L-SELEKTINE BEI EINEM KLEINEN ABSTAND ZWISCHEN DEN LIGANDEN (A) UND EINEM GROßEN ABSTAND ZWISCHEN DEN LIGANDEN (B). ....	39
ABBILDUNG 20: STRUKTUR DES KNORPEL-MATRIX-PROTEIN FRAGMENTES (COMP). ....	41
ABBILDUNG 21: NANOPARTIKEL-AGGREGATION AN PEPTIDFASERN AUF GRUND DER SELEKTIVEN WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN BIOTIN UND STREPTAVIDIN (A) UND PEPTID-INDUZIERT NANOPARTIKEL-AGGREGATION BASIEREND AUF ELEKTROSTATISCHEN ANZIEHUNGSKRÄFTEN (B). .	43
ABBILDUNG 22: IDEALISIERTER KURVENVERLAUF EINER ITC MESSUNG. ....	48
ABBILDUNG 23: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERLAUFS DES ELEKTRONENSTRAHLS UND DER WICHTIGSTEN BESTANDTEILE EINES TEMS. ....	51
ABBILDUNG 24: ERZEUGUNG VON ZIRKULAR POLARISIERTEM LICHT. ....	54
ABBILDUNG 25: IDEALISIERTES CD-SPEKTRUM VON IN PEPTIDEN AUFTRETENDEN SEKUNDÄRSTRUKTUREN: 1) $\alpha$ -HELIX, 2) $\beta$ -FALTBLATT UND 3) <i>RANDOM COIL</i> . ....	55
ABBILDUNG 26: A) EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER EIGENTLICHEN DLS MESSUNG ALS AUFTRAGUNG DER GEMESSENEN LICHTINTENSITÄT ÜBER DIE ZEIT. B) DARSTELLUNG DER KORRELATIONSFUNKTION $C(\delta\tau)$ FÜR 2 TEILCHEN UNTERSCHIEDLICHER GRÖßE. ....	57
ABBILDUNG 27: ZWEIDIMENSIONALE DARSTELLUNG DER GOLD-NANOPARTIKEL MIT IHREN JEWEILIGEN STABILISIERENDEN LIGANDEN. ....	59

ABBILDUNG 28: UV-VIS SPEKTREN DER MUDS-FUNKTIONALISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL IM BEREICH VON 400-700 NM. ....	62
ABBILDUNG 29: BESTIMMUNG DER GRÖßENVERTEILUNG MITTELS DYNAMISCHER LICHTSTREUUNG DER SYNTHETISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL BEI PH 9.....	62
ABBILDUNG 30: TEM AUFNAHME DER SYNTHETISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL BEI EINER 100.000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	63
ABBILDUNG 31: SEQUENZEN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE. ....	64
ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHER ABLAUF DER PEPTIDSYNTHESE AN DER FESTEN PHASE.....	67
ABBILDUNG 33: CD-SPEKTRUM VON 100 $\mu$ M VW05 IN 10 MM TRIS/HCL PH 9 UND PH 11. ....	69
ABBILDUNG 34: ZEITABHÄNGIGE CD-SPEKTREN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE R1A3, R2A2, R2A3, R2A4, R2A5 UND E4 BEI EINER PEPTIDKONZENTRATION VON 15 BZW. 100 $\mu$ M, GELÖST IN 10 MM TRIS/HCL PUFFER PH 9 BZW. PH 8 (FÜR DAS PEPTID E4). ....	70
ABBILDUNG 35: CD-SPEKTREN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE R1A3, R2A2, R2A3, R2A4 UND R2A5 BEI EINER PEPTIDKONZENTRATION VON 100 $\mu$ M, GELÖST IN 10 MM TRIS/HCL PUFFER PH 9 BZW. PH 11.....	71
ABBILDUNG 36: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER MITTELS DLS GEMESSENEN GRÖßENVERTEILUNG DER PEPTIDE VW05 (A), R1A3 (B), R2A2 (C), R2A3 (D), R2A4 (E), R2A5 (F), GELÖST IN 10 MM TRIS/HCL BEI PH 9 (ROT) UND PH 11 (GRÜN).....	73
ABBILDUNG 37: TEM-AUFNAHME VON R1A3 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	76
ABBILDUNG 38: TEM-AUFNAHME VON R2A2 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	76
ABBILDUNG 39: KRYO-TEM-AUFNAHME VON R2A2 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG. ....	77
ABBILDUNG 40: TEM-AUFNAHME VON R2A3 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	77
ABBILDUNG 41: TEM-AUFNAHME VON R2A4 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	78
ABBILDUNG 42: TEM-AUFNAHME VON R2A5 BEI EINER 60000-FACHEN VERGRÖßERUNG.....	78
ABBILDUNG 43: UV-VIS SPEKTRUM VON GOLD-NANOPARTIKELN IN GEGENWART VON 30 $\mu$ M R1A3 ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN.....	80
ABBILDUNG 44: R1A3-INDUZIERTER VERSCHIEBUNG DES ABSORPTIONSMAXIMUMS DER OBERFLÄCHENPLASMONBANDE VON GOLD-NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT DER PEPTID-KONZENTRATION NACH 0, 3 UND 72 STUNDEN. ....	81
ABBILDUNG 45: UV-VIS SPEKTRUM VON GOLD-NANOPARTIKELN IN GEGENWART VON 30 $\mu$ M R2A2 ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN.....	82

ABBILDUNG 46: R2A2-INDUZIERTER VERSCHIEBUNG DES ABSORPTIONSMAXIMUMS DER OBERFLÄCHENPLASMONBANDE VON GOLD-NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT DER PEPTID-KONZENTRATION NACH 0, 3 UND 72 STUNDEN. ....	83
ABBILDUNG 47: R2A3-INDUZIERTER VERSCHIEBUNG DES ABSORPTIONSMAXIMUMS DER OBERFLÄCHENPLASMONBANDE VON GOLD-NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT DER PEPTID-KONZENTRATION NACH 0, 3 UND 72 STUNDEN. ....	84
ABBILDUNG 48: R2A4-INDUZIERTER VERSCHIEBUNG DES ABSORPTIONSMAXIMUMS DER OBERFLÄCHENPLASMONBANDE VON GOLD-NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT DER PEPTID-KONZENTRATION NACH 0, 3 UND 72 STUNDEN. ....	84
ABBILDUNG 49: R2A5-INDUZIERTER VERSCHIEBUNG DES ABSORPTIONSMAXIMUMS DER OBERFLÄCHENPLASMONBANDE VON GOLD-NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT DER PEPTID-KONZENTRATION NACH 0, 3 UND 72 STUNDEN. ....	86
ABBILDUNG 50: UV-VIS SPEKTREN DER SPHÄRISCHEN AMINO-PEG-STABILISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL MIT UND OHNE PEPTID E4 ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN. ....	87
ABBILDUNG 51: UV-VIS SPEKTREN DER KUBISCHEN AMINO-PEG-STABILISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL MIT UND OHNE PEPTID E4 ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN. ....	87
ABBILDUNG 52: UV-VIS SPEKTREN DER SPHÄRISCHEN AMINO-PEG-STABILISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL NACH ZUGABE VON 300 $\mu$ M PEPTID E4 BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN. ....	88
ABBILDUNG 53: UV-VIS SPEKTREN DER KUBISCHEN AMINO-PEG-STABILISIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL NACH ZUGABE VON 300 $\mu$ M PEPTID E4 BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN. ....	88
ABBILDUNG 54: CD-SPEKTREN DER PEPTIDE VW05, R1A3, R2A2, R2A3, R2A4, R2A5 UND E4 NACH ZUGABE DER SPHÄRISCHEN BZW. KUBISCHEN GOLD-NANOPARTIKEL. DIE PEPTIDKONZENTRATION BETRÄGT JEWEILS 15 $\mu$ M. ....	90
ABBILDUNG 55: GELELEKTROPHORESE DER PEPTID-NANOPARTIKEL-AGGREGATE VON VW05 (A), R1A3 (B) UND R2A2 (C). ....	93
ABBILDUNG 56: GELELEKTROPHORESE DER PEPTID-NANOPARTIKEL-AGGREGATE VON R2A3 (A), R2A4 (B) UND R2A5 (C). ....	95
ABBILDUNG 57: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ITC DATEN (LINKS) SOWIE NACH INTEGRATION (RECHTS) DER VW05-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION. ....	97
ABBILDUNG 58: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ITC DATEN (LINKS) SOWIE NACH INTEGRATION (RECHTS) DER R2A2-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION. ....	99

ABBILDUNG 59: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ITC DATEN (LINKS) SOWIE NACH INTEGRATION (RECHTS) DER R2A3-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	100
ABBILDUNG 60: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ITC DATEN (LINKS) SOWIE NACH INTEGRATION (RECHTS) DER R2A4-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	101
ABBILDUNG 61: KRYO-TEM-AUFNAHME DER REINEN NANOPARTIKEL-LÖSUNG BEI PH 9. ....	103
ABBILDUNG 62: KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A2-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION BEI EINEM ÜBERSCHUSS AN PEPTID.....	104
ABBILDUNG 63: KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A2-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION BEI EINEM ÜBERSCHUSS AN NANOPARTIKELN. ....	105
ABBILDUNG 64: STEREO-KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A2-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION BEI EINEM ÜBERSCHUSS AN NANOPARTIKELN. ....	106
ABBILDUNG 65: KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A3-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION. .	107
ABBILDUNG 66: KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A4-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION. .	108
ABBILDUNG 67: KRYO-TEM-AUFNAHME DER R2A5-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION. .	109
ABBILDUNG 68: KRYO TEM AUFNAHME DER R2A2-INDUZIERTEN NANOPARTIKEL-AGGREGATION NACH EINER PH-BASIERTEN SCHALTUNG DER AGGREGATION. ....	110
ABBILDUNG 69: <i>HELICAL WHEEL</i> DARSTELLUNG DER PEPTIDSEQUENZEN DES DIMEREN <i>COILED COIL</i> PEPTIDS. ....	115
ABBILDUNG 70: LIGATIONSREAKTION FÜR DIE BINDUNG DES PEPTIDLIGANDEN. ....	116
ABBILDUNG 71: REAKTIONSSCHEMA DER SELEKTIVEN ENTSCHÜTZUNG DER LYSIN-SEITENKETTE MIT ANSCHLIEßENDER KUPPLUNG DES MALEIMIDS UND VOLLABSPALTUNG VOM HARZ. ....	117
ABBILDUNG 72: CD-SPEKTREN DER PEPTIDE PL <sub>2</sub> A, PL <sub>2</sub> B, PL <sub>2</sub> C UND D GELÖST IN 10 MM PHOSPHATPUFFER PH 7.5. ....	119
ABBILDUNG 73: CD-SPEKTREN DER ÄQUIMOLAREN PEPTIDGEMISCHE AUS PL <sub>2</sub> A, PL <sub>2</sub> B, PL <sub>2</sub> C MIT D GELÖST IN 10 MM PHOSPHATPUFFER PH 7.5.....	119
ABBILDUNG 74: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MESSUNG DER FLUORESZENZANISOTROPIE.....	121
ABBILDUNG 75: IC <sub>50</sub> -WERTE FÜR DIE BINDUNG DES REFERENZPEPTIDS (1) UND DER PEPTIDE PL <sub>2</sub> A (2), PL <sub>2</sub> A/D (3), PL <sub>2</sub> B (4), PL <sub>2</sub> B/D (5), PL <sub>2</sub> A (6), PL <sub>2</sub> A/D (7), D(8) AN DIE SYK SH2-DOMÄNE (A) SOWIE DIE ZAP70 SH2-DOMÄNE (B). ....	122
ABBILDUNG 76: RAUMANSPRUCH DER AMINOSÄURESEITENKETTEN DES PEPTIDS E4.....	126
ABBILDUNG 77: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REVERSIBLEN PH-SCHALTbaren PEPTID-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	133

ABBILDUNG 78: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS VW05. ....	145
ABBILDUNG 79: ESI-TOF SPEKTRUM DES PEPTIDS VW05.....	146
ABBILDUNG 80: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS R1A3.....	146
ABBILDUNG 81: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS R1A3.....	147
ABBILDUNG 82: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS R2A2.....	147
ABBILDUNG 83: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS R2A2.....	148
ABBILDUNG 84: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS R2A3.....	148
ABBILDUNG 85: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS R2A3.....	149
ABBILDUNG 86: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS R2A4.....	149
ABBILDUNG 87: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS R2A3.....	150
ABBILDUNG 88: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS R2A5.....	150
ABBILDUNG 89: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS R2A5.....	151
ABBILDUNG 90: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS E4. ....	151
ABBILDUNG 91: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS E4. ....	152
ABBILDUNG 92: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS A.....	152
ABBILDUNG 93: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS A.....	153
ABBILDUNG 94: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS B. ....	153
ABBILDUNG 95: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS B. ....	154
ABBILDUNG 96: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS C. ....	154
ABBILDUNG 97: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS C. ....	155
ABBILDUNG 98: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS D.....	155
ABBILDUNG 99: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS D.....	156
ABBILDUNG 100: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS L. ....	157
ABBILDUNG 101: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS L.....	157
ABBILDUNG 102: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> A. ....	158
ABBILDUNG 103: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> A. ....	158
ABBILDUNG 104: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> B. ....	159
ABBILDUNG 105: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> B. ....	159
ABBILDUNG 106: HPLC CHROMATOGRAMM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> C. ....	160
ABBILDUNG 107: MASSENSPEKTRUM DES PEPTIDS PL <sub>2</sub> C. ....	160



## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE BERECHNETEN UND GEMESSENEN MASSEN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE. ....	68
TABELLE 2: THERMODYNAMISCHE PARAMETER DER VW05-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	97
TABELLE 3: THERMODYNAMISCHE PARAMETER DER VW05- UND R2A2-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	98
TABELLE 4: THERMODYNAMISCHE PARAMETER DER VW05-, R2A2- UND R2A3-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	99
TABELLE 5: THERMODYNAMISCHE PARAMETER DER VW05-, R2A2, R2A3 UND R2A4-INDUZIERTEN GOLD-NANOPARTIKEL-AGGREGATION.....	101
TABELLE 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE BERECHNETEN UND GEMESSENEN MASSEN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE. ....	118
TABELLE 7: ÜBERSICHT DER AMINOSÄURE/ARGININ VERHÄLTNISSE DER VERWENDETEN PEPTIDE. ....	126
TABELLE 8: ÜBERSICHT ÜBER DIE PEPTID-NETTOLADUNG BEI PH 9 UND PH11.....	128



## Abkürzungsverzeichnis

CD	Zirkular Dichroismus
DBU	Diazabicycloundecen
DCM	Dichlormethan
DC-SIGN	<b>D</b> endritic <b>c</b> ell- <b>s</b> pecific intercellular adhesion molecule-3- <b>g</b> rabbing <b>n</b> on-integrin
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ITC	Isotherme Titrationskaloremetrie
LaB <sub>6</sub>	Lanthanhexaborit
Mtt	Methyltrityl
MUDS	Mercaptoundecansäure
MS	Massenspektrometrie

NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEG	Polyethylenglycol
PAMAM	Polyamidoamin
PNA	Peptidnukleinsäure
PTA	Phosphorwolframsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SIM	<b>SUMO-<i>interacting motif</i></b>
SUMO	small <b>Ubiquitin-related modifier</b>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i> (engl. Milz Tyrosin Kinase)
THF	Tetrahydrofuran
TBDPS	tert-Butyldiphenylsilyl
TEM	Transmission Elektronenmikroskop
TIPS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-vis	Ultraviolett-visible (engl. sichtbar)

Die ein- und drei-Buchstaben-Abkürzung, die für die Kennzeichnung der L-Aminosäuren in dieser Arbeit genutzt wurden, steht in Einklang mit der von der UIPAC-IUB Kommission vorgeschlagenen biochemischen Nomenklatur (*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37.).





## Kurzzusammenfassung

Das aus der Natur übernommene Konzept der multivalenten Wechselwirkung als Möglichkeit der Bindungsverstärkung spielt eine Schlüsselrolle bei der Lösung einer Vielzahl von Fragestellungen in der Biochemie und Medizin aber auch im Bereich der supramolekularen Chemie und den Materialwissenschaften. Da der Trend zu immer kleineren aber gleichzeitig leistungsfähigeren Geräten und Instrumenten geht, deren Bestandteile mit den gegenwärtigen Methoden nur schwer herzustellen sind, erhoffen sich speziell die Materialwissenschaften durch Kombination von organischen und anorganischen Molekülen die gezielte Synthese von submikrometergroßen Hybridmaterialien mit neuartigen optischen, elektronischen und katalytischen Eigenschaften. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Wahl eines passenden Templats, welches die für die Interaktion notwendigen Liganden im Raum präsentiert. Ein solches Templat stellt das *coiled coil* Faltungsmotiv dar, das eine gerichtete Präsentation einer Vielzahl von Liganden bei vollständiger Kontrolle über deren Abstand untereinander ermöglicht. Gleichzeitig erlaubt die chemische Variabilität der Aminosäureseitenkette eine Anwendbarkeit für eine Vielzahl von Fragestellungen.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Auswirkungen einer räumlich unterschiedlichen Präsentation geladener Aminosäuren in einem *coiled coil* Peptid auf die Organisation von Gold-Nanopartikeln mittels attraktiver elektrostatischer Anziehungskräfte untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein bestimmtes Verhältnis aus präsentierten geladenen Aminosäuren zur Peptidlänge ein entscheidendes Kriterium für die Organisation der Nanopartikel darstellt. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass die Quartärstruktur des Peptids sowohl eine entscheidende Rolle bei der Struktur der gebildeten Peptid-Nanopartikel-Aggregate spielt als auch einen großen Einfluss auf die Thermodynamik der Interaktion besitzt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das *coiled coil* Faltungsmotiv für die Strukturaufklärung verschiedener Tandem SH2-Domänen genutzt. Das Peptiddesign wurde dahingehend modifiziert, dass eine selektive Bindung von zwei phosphorylierten Peptidliganden ermöglicht wurde. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigten, dass sowohl eine definierte räumliche Ausrichtung der Liganden als auch ein definierter Abstand der zwei Liganden für eine ideale Bindung an die Tandem SH2-Domänen notwendig war.

## **Abstract**

The concept of multivalent interactions, which is borrowed from nature, offers the advantage of dramatically enhanced binding and thus plays a key role in solving a variety of problems in biochemistry and medicine, as well as in the fields of supramolecular chemistry and material science. In spite of the increasing demand for even smaller but more powerful devices and instruments, their components are difficult to manufacture with current methods. Therefore, especially materials science tries to synthesize hybrid materials in the submicrometer range by combining organic and inorganic building blocks with novel optical, electronic and catalytic properties. Thus, a crucial factor is the choice of an appropriate template, which presents the interacting ligands in a directed manner. The coiled-coil folding motif allows for the directed presentation of a variety of ligands with complete control over the distances between these ligands. At the same time, the chemical variability of amino acid side chains offers numerous control mechanisms.

In the first part of this thesis, the effects of altering the formal charge of amino acids in a coiled-coil peptide for the organization of gold nanoparticles by means of attractive electrostatic interactions was investigated. It was shown that a certain ratio of charged amino acids per unit peptide length is crucial for the organization of nanoparticles. In addition, the quaternary structure of the peptide plays an important role in the morphology of the formed peptide-nanoparticle aggregates as well as on the thermodynamics of the reaction.

In the second part of this thesis, the coiled coil folding motif was used for the structure elucidation of various tandem SH2 domains. The peptide design was modified for the selective attachment of two phosphorylated peptide ligands in the f-position of the coiled coil at different distances. The results presented here indicate that a directed presentation of the ligands by means of a coiled-coil peptide, as well as a characteristic distance between the two ligands, was necessary for favorable interaction with the tandem SH2 domain.







## 1. Einleitung

Auf dem Gebiet der supramolekularen Chemie gibt es seit den 90-iger Jahren ein wachsendes Interesse für das Potential der multivalenten Bindung, welches auch an Hand der gestiegenen Anzahl an Publikationen auf diesem Gebiet belegbar ist.<sup>[1]</sup> Die Valenz eines Objekts ist dabei als Anzahl von gleichen, räumlich voneinander getrennten Bindungsstellen definiert, die für Wirt-Gast-Wechselwirkungen mit einem anderen Objekt zur Verfügung stehen, wohingegen die Valenz eines Komplexes als die Anzahl von Bindungen zwischen zwei Partikeln definiert ist. Die multivalente Bindung ist folglich die simultane Ausbildung einer Vielzahl von Bindungen zwischen Partikeln wie Zellen, Viren, Bakterien aber auch Peptiden oder DNA.

Die Idee, dass Zellen oder supramolekulare Partikel mit ihrer Umgebung mittels multivalenter Bindungen interagieren, ist in der Biochemie bereits seit vielen Jahren bekannt.<sup>[1,2]</sup> Es wird angenommen, dass die multivalente Bindungsbildung eine fundamentale Rolle in unzähligen biochemischen Prozessen einschließlich der Signaltransduktion, der pathogenen Infektion und der Immunantwort spielt.<sup>[1,3-5]</sup> Sie stellt damit ein Schlüsselprinzip der biologischen Wechselwirkung dar, für die die Natur eine Vielzahl an Beispielen, wie die Infektion eines Organismus mit Viren oder die Zell-Zell-Kommunikation, liefert.<sup>[6,7]</sup>

Ein in diesem Zusammenhang viel zitiertes Beispiel ist die Anlagerung des Influenza Virus an Zellen mittels Hämagglutinin, einem Protein-Trimer, welches auf der Virusoberfläche lokalisiert ist.<sup>[6,7]</sup> Hämagglutinin ist in der Lage, selektiv an Sialinsäuren, die sich auf vielen Membranproteinen der Zellmembran befinden, zu binden. Da die Virusoberfläche jedoch mehrere Hundert Hämagglutinin-Trimere besitzt, bindet der Virus gleichzeitig mittels Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung mehrfach an die Zelle. Neben diesen aus der Natur bekannten Beispielen auf molekularer Ebene gibt es auch eine Vielzahl von praktischen Anwendungen der multivalenten Bindung im täglichen Leben. Exemplarisch kann dabei die Klette oder der Klettverschluss genannt werden, bei dem der Zusammenhalt durch das Verzahnen tausender Haken und Ösen zustande kommt.

An Hand des Klettverschluss kann ein entscheidender Vorteil einer multivalenten gegenüber der monovalenten Bindung erklärt werden: jede einzelne Bindung des

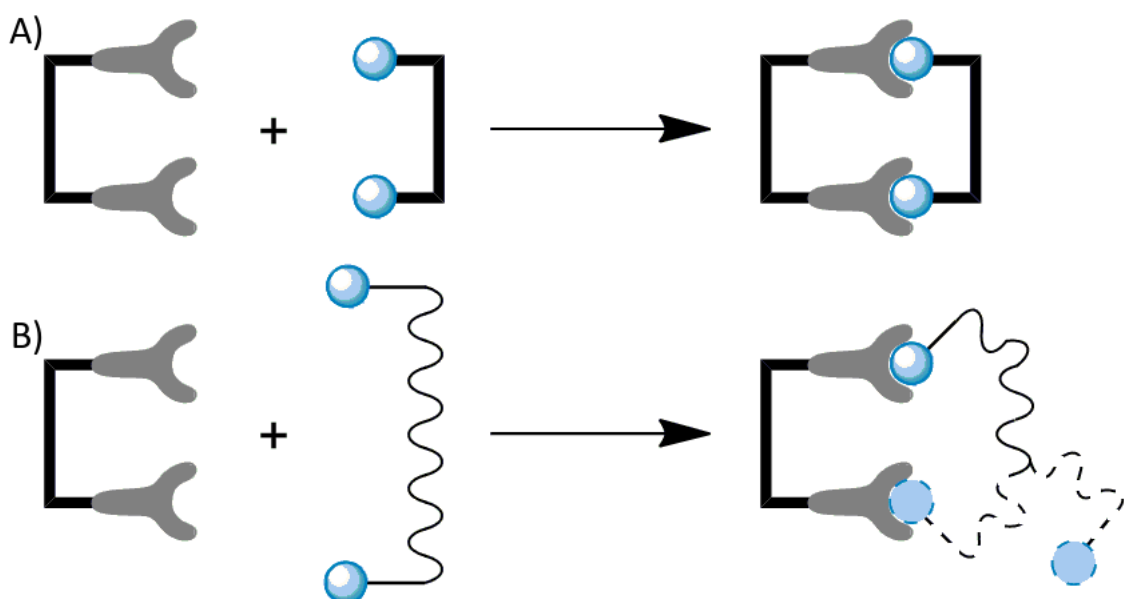
Klettverschluss für sich stellt eine relativ schwache Wechselwirkung dar. Erst die mehrfache Verzahnung führt zu dem starken Halt zwischen beiden Teilen des Klettverschlusses. Eine multivalente Bindung führt also zu einer Verstärkung der Bindung bei möglichst vollständiger Reversibilität der Bindung. Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung, da zum Beispiel die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und Peptiden bzw. Proteinen in der Regel sehr schwach ist und Dissoziationskonstanten von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  M aufweist. Die Natur kompensiert diesen Nachteil z. B., indem mehrere Kohlenhydratmoleküle mit multivalenten Rezeptoren interagieren.<sup>[8-12]</sup> Darüber hinaus besitzt die multivalente Wechselwirkung auch einen entropischen Vorteil, da nach der Bindung des ersten Liganden die lokale Konzentration erhöht ist,<sup>[13]</sup> was wiederum die Bindung des zweiten Liganden an eine benachbarte Bindungsstelle begünstigt.<sup>[14-18]</sup>

Die Nutzung von multivalenten Wechselwirkungen spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Medizin<sup>[1,19]</sup> sowie neuer funktionaler Materialien<sup>[3]</sup>. Dabei ist die Wahl einer passenden Gerüststruktur von entscheidender Bedeutung, da die Größe und Form einen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat.<sup>[20]</sup> So bindet ein Objekt, bei dem die Liganden in einer 2-dimensionalen, gerichteten Struktur angeordnet sind, bevorzugt multivalent nur an ein anderes Objekt, wohingegen Objekte mit einer 3-dimensionalen Anordnung der Liganden in der Lage sind multivalent an mehrere Objekte zu binden.<sup>[21,22]</sup> Die Natur bietet eine Vielzahl an Strukturen, die für den Aufbau multivalenter Bindungen geeignet sind. Um dies nachzuahmen, bietet die supramolekulare Chemie eine große Auswahl an Gerüststrukturen. Dazu gehören neben dendritischen Polymer-Nanopartikeln und anorganischen Nanopartikeln auch DNA- und Peptidmoleküle.

## 2. Theorie

### 2.1. Multivalente Gerüstarchitekturen

Ein entscheidender Faktor bei der Synthese von Molekülen für die multivalente Präsentation von Liganden ist die Wahl einer geeigneten Gerüstarchitektur sowie eines passenden Spacers, da neben der intrinsischen Affinität der Liganden für das Zielmolekül sowohl deren Abstände untereinander als auch ihre Orientierung im Raum von entscheidender Bedeutung ist. Um eine große Variabilität bei der räumlichen Orientierung der Liganden und deren Abstand zu erhalten, wäre eine möglichst flexible Gerüststruktur wünschenswert (Abbildung 1). Eine große Flexibilität hat jedoch einen großen Konformationsraum zur Folge, sodass nur ein geringer Teil an thermodynamisch möglichen Konformationen für die multivalente Wechselwirkung zur Verfügung steht. Die Folge ist eine schwächere Bindung auf Grund eines Verlusts an Konformationsentropie. Eine sehr starre Gerüststruktur würde diesem Verlust entgegenwirken, da nun nur wenige Konformationen eingenommen werden können. Dafür ist jedoch eine exakte Ausrichtung und Abstand der Liganden im Raum notwendig, was nur in seltenen Fällen erreicht wird und zu einem Verlust an Bindungsenthalpie führt.<sup>[1]</sup>



**Abbildung 1:** Unterschied zwischen divalenten Liganden mit starrem (A) und flexiblem (B) Rückgrat.

Darüber hinaus kann die chemische Zusammensetzung des Spacers Einfluss auf das Bindungsvermögen haben, da dieser mit dem Zielmolekül positiv oder negativ wechselwirken kann. Das Resultat wäre eine erneute Änderung der Bindungsenthalpie. Außerdem ist zu beachten, dass der Spacer die Eigenschaften des Liganden beeinflussen können und somit die Bindungsstärke verändern können.<sup>[13]</sup>

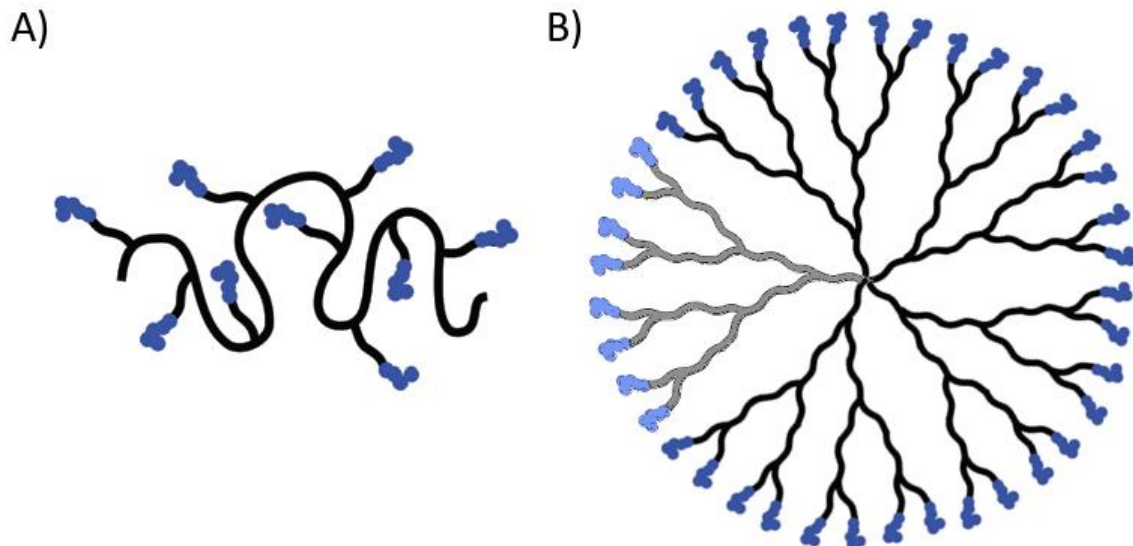
Auf Grund dieser einschränkenden Bedingungen haben sich verschiedene Verbindungsklassen herauskristallisiert, um der in der Natur vorkommenden Strukturvariabilität Rechnung zu tragen. Dazu gehören neben organischen Polymeren und anorganischen Nanopartikeln auch Peptide und Proteine sowie DNA.<sup>[23]</sup>

### 2.2. organische Polymere

Anfänglich wurden besonders lineare Polymere als Gerüststruktur für die multivalente Präsentation von Liganden favorisiert. Diese können mit relativ geringem Aufwand synthetisiert und funktionalisiert werden. Auf diese Weise war es WHITESIDES *et al.* bereits im Jahr 1996 möglich auf der Basis von Sialinsäure-funktionalisierten Polyacrylamiden einen wirksamen Inhibitor für die Bindung des Influenza Virus an Zellen zu synthetisieren.<sup>[24,25]</sup> Bis auf wenige Ausnahmen<sup>[13,26,27]</sup> wurde die Nutzung von linearen Polymeren seitdem größtenteils verworfen. Da lineare Polymere einen hohen Grad an Flexibilität besitzen (*random coil*), ist eine gerichtete Ligandenpräsentation nahezu unmöglich.

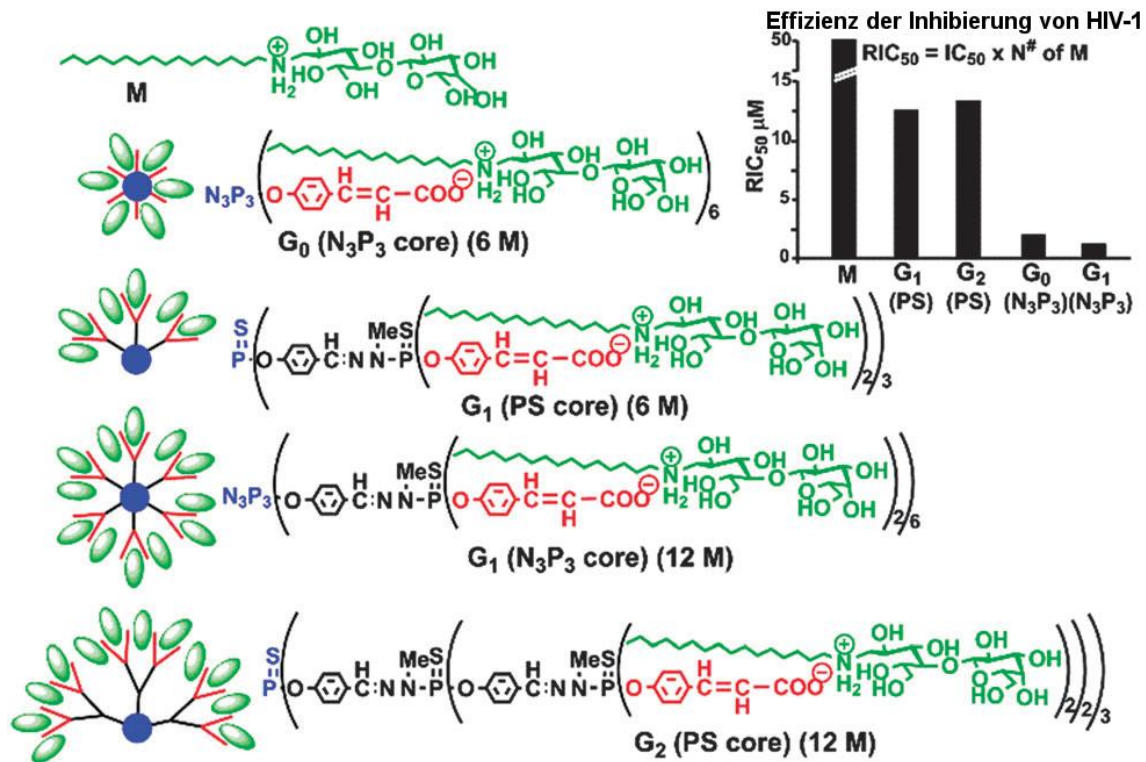
#### 2.2.1. Dendritische Polymere

Eine gerichtete Ligandenpräsentation kann jedoch durch den Einsatz von Dendrimeren erreicht werden (Abbildung 2). Auf Grund der zwei unterschiedlichen Synthesemöglichkeiten – divergent<sup>[28,29]</sup>, am Kern beginnend, und konvergent<sup>[30]</sup>, durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einzelnen Dendronen, – ist es möglich, unterschiedlichste Strukturen mit einer definierten Ausrichtung im Raum zu erzeugen. So bietet gerade die konvergente Syntheseroute einen gut zugänglichen Weg zur Synthese von asymmetrisch funktionalisierten Dendrimeren.<sup>[31,32]</sup>



**Abbildung 2:** Übersicht der strukturellen Unterschiede zwischen einem linearen Polymer (A) und einem G3 Dendrimer (B).<sup>[33]</sup> Ein Arm des Dendrimers (Dendron) ist farblich markiert.

Die Auswirkungen, die eine unterschiedliche Ausrichtung der Dendrone im Raum zur Folge haben, konnten LATTES *et al.* unter Beweis stellen (Abbildung 3).<sup>[34]</sup> Diese synthetisierten ausgehend von  $S=PCl_3$  und  $(N=PCl_2)_3$  Dendrimere, die entweder aus drei oder aus sechs Armen aufgebaut waren. Mittels der terminalen Carboxy-Funktion konnte Aminolactitol an das Dendrimer über elektrostatische Wechselwirkungen binden. Bei Aminolactitol handelt es sich um ein Galaktosylceramid ( $Gal\beta_1cer$ ) Analog, einem Glykolipid, welches spezifisch und mit hoher Affinität an die V3 Schleife des Membranproteins gp120 des HIV-1 Virus bindet.<sup>[35]</sup> Auf diese Weise sollte es möglich sein, den HIV-1 Virus an der Endozytose zu hindern und damit einer Infektion gesunder Zellen vorzubeugen.<sup>[36-38]</sup> Während das monomere Aminolactitol lediglich einen  $RIC_{50}$ -Wert ( $IC_{50} \times$  Anzahl der Aminolactitol-Einheiten) von 50 besitzt, konnte die Effizienz der Inhibierung durch den Einsatz der Dendrimere merklich gesteigert werden. Auffällig war dabei jedoch, dass die trimeren Dendrimere einen ca. 7-fach geringeren inhibitorischen Effekt besitzen als die hexameren Dendrimere, obwohl beide Dendrimere eine identische Anzahl an Aminolactitol-Einheiten besaßen. Folglich steigerte die gleichmäßig kubische Ausrichtung der Liganden im hexameren Dendrimer die Inhibition. Im trimeren Dendrimer war diese Gleichverteilung der Liganden auf Grund der P=S Doppelbindung am Kern nicht möglich.

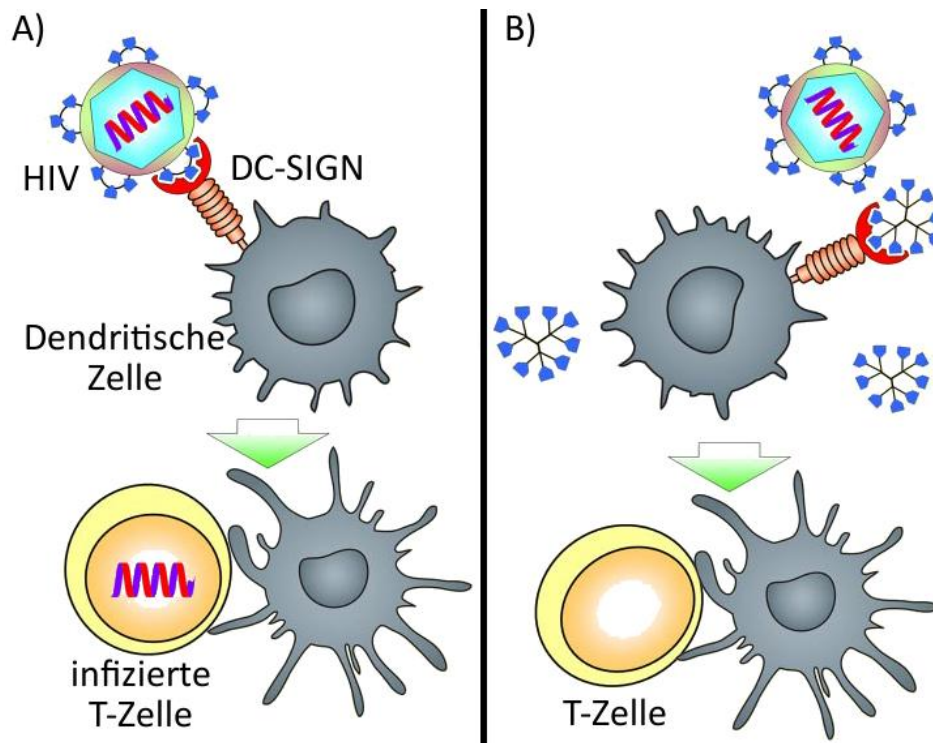


**Abbildung 3:** Struktur des monomeren Aminolactitol (M) und Aminolactitol-funktionalisierten Dendrimern aufgebaut aus drei bzw. sechs Dendronen sowie deren Effizienz bei der Inhibierung von HIV-1. Der  $RIC_{50}$ -Wert entspricht dabei dem  $IC_{50}$  multipliziert mit der Anzahl der Aminolactitol-Einheiten.<sup>[39]</sup>

Da die in der Natur weit verbreitete Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung sehr schwach ist und die multivalente Präsentation von Kohlenhydraten oftmals eine Bindungsverstärkung zur Folge hat,<sup>[4]</sup> werden vermehrt auch Dendrimere mit Kohlenhydraten funktionalisiert. Diese sich durch ihre geringe Immunogenität<sup>[40-42]</sup> auszeichnenden Glykodendrimere<sup>[43]</sup> basieren in vielen Fällen auf Polyamidoamin (PAMAM)<sup>[44]</sup>, Polypropylenimin (PPI)<sup>[45]</sup> und Polypropylenamin<sup>[46]</sup> Dendrimern. PAMAM (Abbildung 5A) basierende Glykodendrimere unterschiedlicher Generationen (G3 bis G5) nutzten VAN KOOYK *et al.* für die Funktionalisierung mit verschiedenen Glykanen (Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup> und Lewis<sup>x</sup>).<sup>[47]</sup> Diese Glykane sind in der Lage an das DC-SIGN Protein (**D**endritic **c**ell-specific intercellular adhesion molecule-3-**g**rabbing **n**on-integrin) zu binden, das sich auf der Oberfläche von dendritischen Zellen befindet. Durch Bindung des HIV-Hüllproteins gp120 an DC-SIGN wird der HI Virus in endosomale Vesikel aufgenommen,<sup>[48,49]</sup> um vor einem Abbau durch Langerhans Zellen



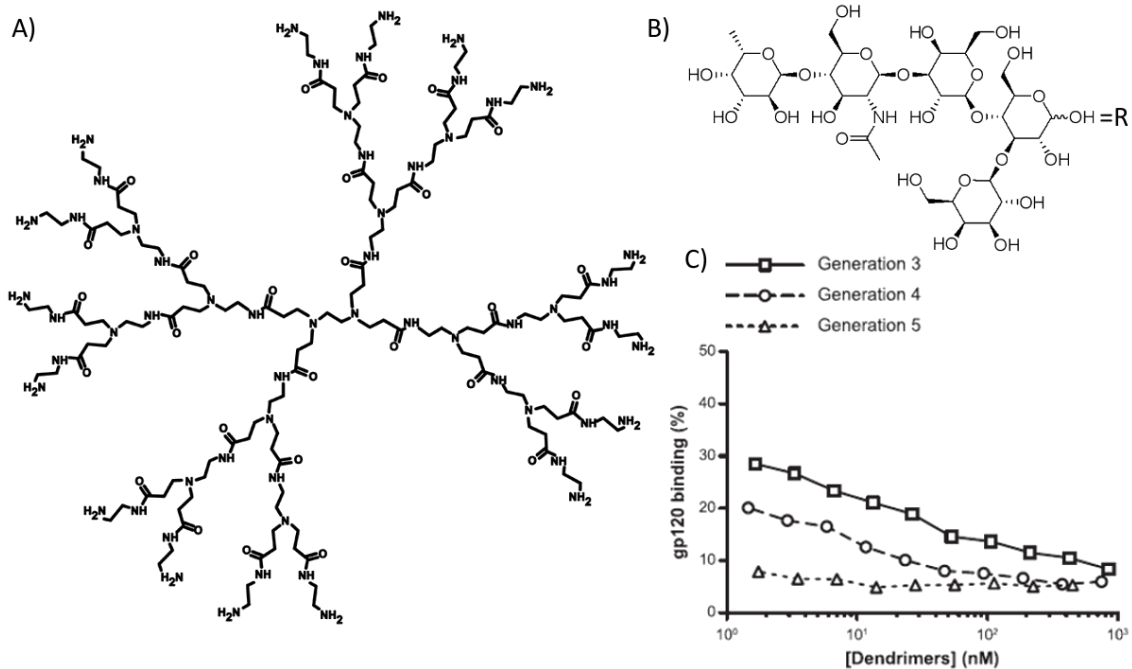
geschützt zu sein<sup>[50]</sup> und später mittels Endozytose in T-Zellen einzudringen (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Endozytose von HIV in T-Zellen (A) und mögliche Inhibierung der Endozytose in Gegenwart von Dendrimeren (B).<sup>[51]</sup>

Überraschenderweise wurde für alle Dendrimer-Generationen ein annähernd gleicher Glykosylierungsgrad von ca. 15 Glykanen pro Dendrimer erhalten, obwohl sich die Zahl an möglichen terminalen Bindungsstellen mit steigender Generation erhöht (G3: 32, G4: 64, G5: 128). Trotzdem zeigten die Dendrimere einen gravierenden Unterschied bei der Unterdrückung der Bindung von gp120 an DC-SIGN (Abbildung 5C). So konnte das G5 Dendrimer bereits im niedrigen nanomolaren Bereich die Bindung inhibieren, während in Gegenwart des G3 Dendrimers bei gleicher Konzentration noch ca. 30 % gp120 binden konnte. Dieser signifikante Unterschied wird mit der unterschiedlichen Größe der Dendrimere erklärt, der, bei einer vorausgesetzten Gleichverteilung der Glykane, in größeren Abständen zwischen den Glykanen resultiert (G3: 1.8 nm; G4: 2.4 nm; G5: 2.7 nm). Offensichtlich besitzt das G5 Dendrimer einen für die Bindung an DC-SIGN geeigneten Abstand zwischen den Glykanen, was in der Verstärkung des inhibitorischen Effekts resultiert. Folglich ist nicht nur die Erhöhung der Kohlenhydrat-Funktionalitäten für eine Bindungsverstärkung notwendig, sondern auch deren

Abstand zueinander, was wiederum von der Struktur des multivalenten Gerüsts abhängig ist.



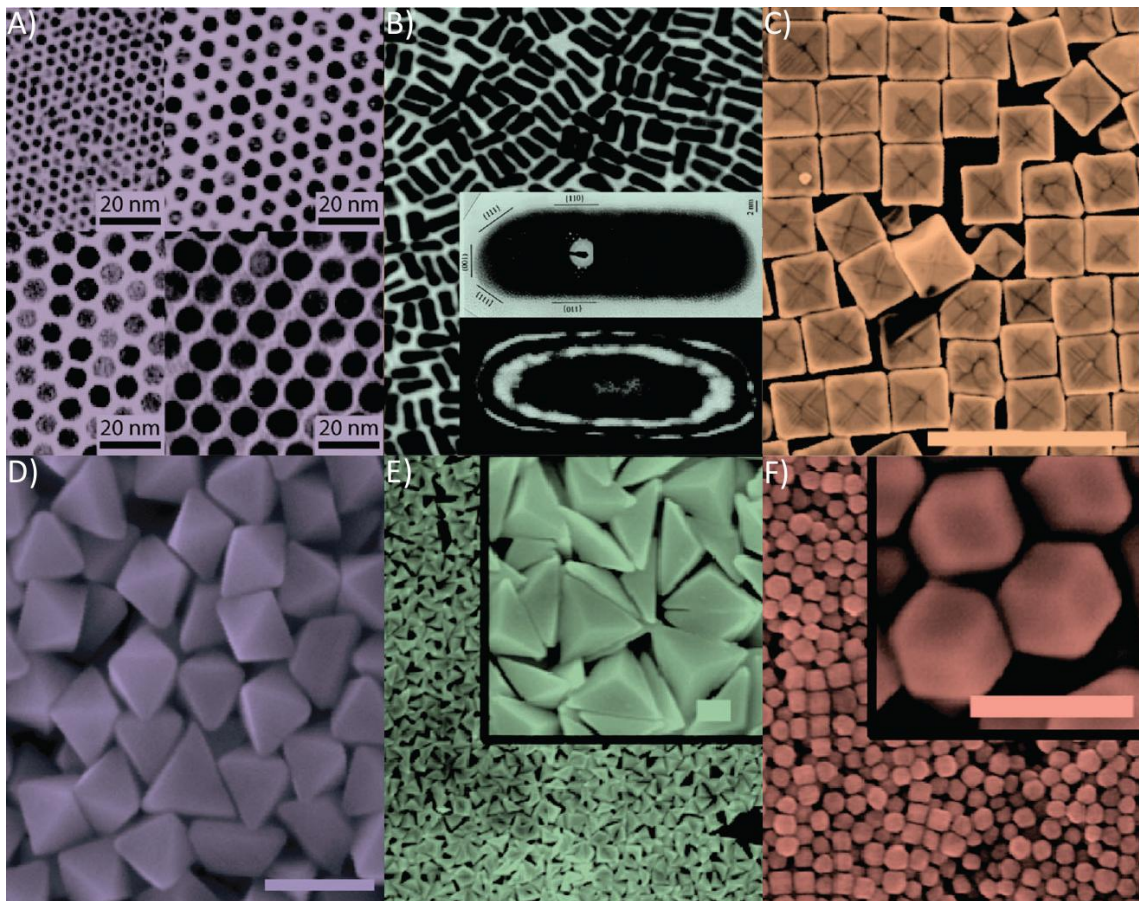
**Abbildung 5:** Struktur eines PAMAM G2 Dendrimers (A) sowie des an PAMAM gebundene Glykans Lacto-*N*-fucopentaose II (B) und grafische Darstellung des inhibitorischen Effekts verschiedener Glykan-funktionalisierter PAMAM Dendrimere (G3 bis G5) (C).

Diese Erkenntnis sowie die Tatsache, dass eine definierte räumliche Orientierung die Bindung verstärken kann, konnte durch die geringere inhibitorische Wirkung eines mit 15-25 Glykan-Einheiten funktionalisiertem linearem Polyacrylamids<sup>[52]</sup> bestätigt werden. Dieses besitzt zwar mehr Glykan-Einheiten, liegt jedoch ungeordnet als *random coil* vor. Obwohl es damit in der Lage wäre den richtigen Bindungsabstand einzustellen, konnten bei einer vergleichbaren Konzentration noch 40 % der gp120 Proteine an DC-SIGN binden.

Im von VAN KOOYK *et al.* beschriebenen Beispiel wurde auf einen zusätzlichen Spacer zwischen dem Dendrimer und dem Liganden verzichtet. Die Auswirkung, die ein Spacer auf die Bindungsstärke haben kann, konnten BAKER *et al.* beschreiben.<sup>[53]</sup> Sie konnten zeigen, dass die hemmende Wirkung von Sialinsäure-funktionalisierten PAMAM G4 Dendrimern für die Infektion mit dem Influenza Virus bei einer kurzen Spacerlänge gewährleistet ist. Die Verlängerung des Spacers führte dagegen zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung.<sup>[54]</sup>

### 2.3. anorganische Nanopartikel

Anorganische Nanopartikel stellen die vielleicht vielseitigste Plattform für multivalente Gerüststrukturen dar. Die Synthese von Nanopartikeln wurde in den letzten Jahren so verfeinert, dass es nun möglich ist, gezielt die gewünschte Form und Größe der Nanopartikel mit verschiedenen Funktionalitäten sowie deren Löslichkeit und Stabilität bei geringer Polydispersität einzustellen.<sup>[55,56]</sup> Dabei können neben sphärischen Partikeln auch Würfel,<sup>[57]</sup> Stäbchen<sup>[58]</sup> oder Röhren<sup>[59]</sup> und viele mehr hergestellt werden.



**Abbildung 6:** Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Nanopartikel-Strukturen: Kugel (A), Stäbchen (B), Würfel (C), Oktaeder (D), trigonale Bipyramide (E), Polyeder (F).<sup>[60-64]</sup>

Für die Synthese dieser Nanopartikel werden zwei gegensätzliche Methoden genutzt: die „*top-down*“ und die „*bottom-up*“ Methode.<sup>[65]</sup> Die Herstellung von Nanopartikeln mittels der „*top-down*“ Methode ist jedoch limitiert im Bezug auf die Größe der

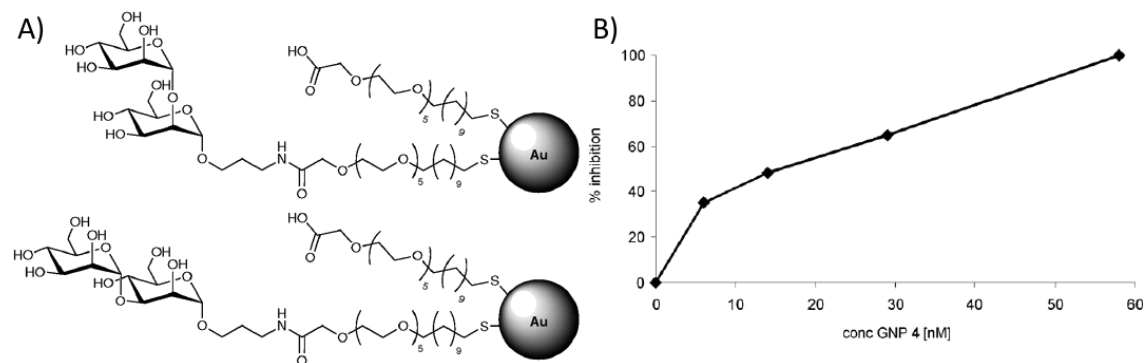
Nanopartikel. So können mit den verwendeten Verfahren wie Laserablation oder der Lithografie keine Partikel hergestellt werden, die kleiner als 100-200 nm sind.<sup>[66]</sup> Mit Hilfe der „*bottom-up*“ Methode, die meistens auf einer Synthese der Partikel in Lösung oder in Mikroemulsionen beruht, kann diese Größen-Limitierung umgangen werden. Dabei werden, ausgehend von Metall-Ionen und unter Verwendung eines Reduktionsmittels, die einzelnen Partikel durch Zusammenlagerung von Atomen aufgebaut. Dadurch ist es möglich, Nanopartikel mit einem Durchmesser von weniger als 2 nm zu synthetisieren.<sup>[67]</sup> Auf Grund ihrer einzigartigen optischen, magnetischen und elektronischen Eigenschaften<sup>[68]</sup> besitzen vor allem Gold-Nanopartikel ein weites Anwendungsspektrum. Insbesondere die Farbe resultiert von der für Gold-Nanopartikel charakteristischen Oberflächenplasmonbande (LSPR), die durch die Oszillation von Elektronen entsteht. Die Oberflächenplasmonbande erzeugt im Absorptionsspektrum eine Bande im sichtbaren Wellenlängenbereich, deren Lage und Breite stark von der Größe der Nanopartikel abhängt.<sup>[69]</sup> Neben Gold-Nanopartikeln werden auch verschiedene Metalle und Metalloxide für die Synthese von Nanopartikeln genutzt. Dazu gehören neben Silber,<sup>[70]</sup> Siliziumoxid<sup>[71]</sup> und Eisenoxid<sup>[72]</sup> auch Halbleitermaterialien wie Zinksulfid, Zinkselenid und Cadmiumselenid<sup>[73]</sup>.

Die weitere Funktionalisierung von Nanopartikeln erfolgt in vielen Fällen über Austauschreaktionen, bei denen der Ligand, der auf der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert ist, durch einen anderen Liganden ersetzt wird.<sup>[74]</sup> In Abhängigkeit der Reaktionszeit und der Konzentration an freiem Liganden kann die Effizienz der Reaktion kontrolliert werden.<sup>[75]</sup> Zusätzlich können Unterschiede in der Valenz der auszutauschenden Liganden die Umfunktionalisierung beeinflussen. So konnten GRAF *et al.* zeigen, dass die Austauschreaktion, bei der ein monovalenter Thiol-Ligand durch einen multivalenten Thiol-Liganden ersetzt wird, schneller erfolgt und die erhaltenen Partikel eine größere Stabilität aufweisen.<sup>[76]</sup> Darüber hinaus kann die Funktionalisierung auch über elektrostatische Adsorption,<sup>[77]</sup> hydrophobe Einschlüsse zwischen den Liganden<sup>[78]</sup> oder kovalente Bindung an den existierenden Liganden<sup>[79,80]</sup> erfolgen. Die erwähnten Funktionalisierungen der Nanopartikel liefern jedoch nur selten einen vollständigen Austausch und lediglich eine statistische Verteilung der Liganden. Dies wird gerade dann problematisch, wenn verschiedene Liganden auf der Oberfläche immobilisiert werden sollen. Die Synthese solcher asymmetrisch

funktionalisierter Nanopartikel konnten PENADÉS *et al.* beschreiben.<sup>[81]</sup> Ausgehend von verschiedenen Peptid- und Zucker-Liganden in unterschiedlicher Konzentration waren sie in der Lage Nanopartikel zu synthetisieren, die sich in der Zusammensetzung der Ligandenhülle unterschieden. Da es sich um eine statistische Verteilung der Liganden handelt, ist eine Kontrolle über den Abstand zwischen zwei funktionellen Gruppen, wie es bei anderen multivalenten Gerüststrukturen der Fall ist, nicht möglich. Dies kann für eine effektive Bindung an ein Molekül aber essentiell sein.

### 2.3.1. Multivalente Nanopartikel in der Medizin

Auch wenn der Focus für Anwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln im Bereich der Diagnostik, zellulären Bildgebung und der Materialwissenschaften liegt,<sup>[82]</sup> so finden sich nichtsdestotrotz Anwendungen als potentielle Wirkstoffe. Beispielsweise konnten PENADÉS *et al.* die Möglichkeit der Inhibierung der Bindung des gp120 Proteins des HI-Virus an DC-SIGN mit Hilfe von Kohlenhydrat-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln nachweisen (Abbildung 7).<sup>[83]</sup>

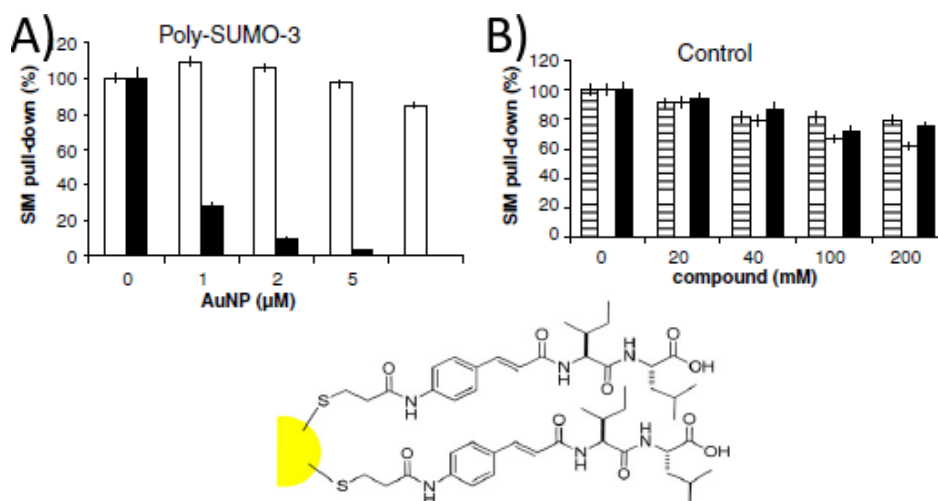


**Abbildung 7:** Struktur von Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  und Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$  funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (A) und grafische Darstellung der Nanopartikel-induzierten Bindungsinhibierung von gp120 an DC-SIGN.

Im Vergleich zu dem ungebundenen Disaccharid, das eine vollständige Inhibition der Bindung bei einer Konzentration von 2.2 mM zeigte, führte die Immobilisierung auf Gold-Nanopartikeln zu einer signifikanten Erhöhung des inhibitorischen Effekts. Dieser Effekt ist jedoch von der Art der Disaccharid-Verknüpfung abhängig. So verursachten 1-2 gebundene Disaccharide eine Hemmung der Bindung bei einer Konzentration von

115 nM, während eine Konzentration von 4.3  $\mu\text{M}$  des 1-3 gebundenen Disaccharids für eine vollständige Inhibition notwendig war. Der Grad der Funktionalisierung lag jedoch nur bei 66 %. Nanopartikel mit einer 100 %igen Beladung konnten zwar erfolgreich synthetisiert werden, zeigten aber keine Verbesserung der Bindungshemmung. Zusätzlich durchgeführte *in-vivo* Experimente lassen sogar den Schluss zu, dass sowohl eine geringe (10 %) als auch vollständige (100 %) Beladung der Nanopartikel mit Polysacchariden zu einer schlechteren Inhibition führen.<sup>[84]</sup> Zudem konnte kein Unterschied in der Inhibition zwischen den mit di-, tri-, tetra-, penta- und heptasaccharid-funktionalisierten Nanopartikeln gefunden werden.

Neben einer Funktionalisierung mit Kohlenhydraten können auch kurze Peptidsequenzen auf der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert werden, um diese anschließend als Wirkstoffe nutzen zu können.<sup>[85]</sup> So konnten CHEN *et al.* eindrucksvoll den Einfluss eines multivalent gebundenen Dipeptids auf die Bindung von SIM (SUMO-interacting motif) und SUMO (small Ubiquitin-related modifier) demonstrieren.<sup>[86]</sup>



**Abbildung 8:** Grafische Darstellung der Wechselwirkung von Poly-SUMO3 mit SIM in Gegenwart von Dipeptid-funktionalisierten Gold-Nanopartikel (A) sowie dem Kontrollexperiment mit ungebundenem Dipeptid (B).

Da SUMO Proteine an vielen zellregulatorischen Prozessen wie der Erkennung und Regulation von DNA-Schäden beteiligt sind,<sup>[87]</sup> kann die gezielte Hemmung dieser Regulation bei der Krebstherapie genutzt werden. Bei dieser kommt es in Folge der häufig notwendigen Strahlentherapie zu einer gewünschten Schädigung der DNA von Krebszellen, die durch SUMO repariert werden könnte.<sup>[88]</sup> Die mittels

Ligandenaustausch erhaltenen Gold-Nanopartikel, die ca. 100 gebundene Dipeptide pro Nanopartikel besaßen, waren in der Lage die Wechselwirkung zwischen Poly-SUMO3 und SIM mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $<1 \mu\text{M}$  zu hemmen (Abbildung 8). Im Vergleich dazu bewirkte das ungebundene Dipeptid, das nur sehr schwach ( $K_D$  1.2 mM) an SUMO bindet, trotz einer maximalen Konzentration von 200 mM nur eine geringfügige Bindungsinhibierung. Dem gegenüber konnte die Wechselwirkung für die monomeren SUMO1 und SUMO3 mit SIM kaum inhibiert werden. Offensichtlich ist eine multivalente Präsentation von Liganden nur dann sinnvoll, wenn eine mehrfache Bindung an einen oder mehrere benachbarte Bindungspartner möglich ist.

Neben der Nutzung als multivalent bindender Wirkstoff finden Nanopartikel auch auf vielfältige Weise Anwendung in der Diagnostik. Auf Grund ihrer sehr guten Biokompatibilität haben sich in diesem Bereich neben Gold-Nanopartikeln vor allem Eisenoxid-Nanopartikel bewährt.<sup>[89]</sup> GAO *et al.* nutzten diese für die selektive Markierung von Lungenkrebs verursachenden Zellen, der für den Tod von jährlich ca. 1.4 Mio. Menschen verantwortlich ist.<sup>[90]</sup> Das über einen PEG-Linker an die Eisenoxid-Nanopartikel gebundene Peptid LCP, das die Sequenz RGDLATLRQL besitzt, bindet dabei selektiv an das  $\alpha_V\beta_6$  Integrin,<sup>[91]</sup> welches im Vergleich zu gesunden Zellen vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert wird.<sup>[92]</sup> Um die Selektivität zu überprüfen wurde ein Referenzpeptid SP synthetisiert, das sich lediglich in der Reihenfolge der Aminosäuren zum LCP Peptid unterscheidet (Sequenz: DALRLQGTLR). *In-vivo* Experimente mit der  $\alpha_V\beta_6$ -positiven Zelllinie H2009 und der  $\alpha_V\beta_6$ -negativen Kontroll-Zelllinie H460 zeigten, dass die mit LCP-funktionalisierten Nanopartikel selektiv nur an  $\alpha_V\beta_6$ -positiven Zellen binden und durch Endozytose aufgenommen werden können. Eine Bindung an  $\alpha_V\beta_6$ -negativen Zellen konnte ebenso wenig beobachtet werden wie die Bindung des Referenzpeptids an eine der beiden Zelllinien.

Mit Hilfe von Nanopartikeln können nicht nur Zellen markiert werden, sondern auch kleine Moleküle wie DNA oder Viren nachgewiesen werden. Das Messprinzip beruht dabei im Wesentlichen auf eine Veränderung der intrinsischen Eigenschaften der Partikel auf Grund einer induzierten Aggregation bzw. der Auflösung der Nanopartikel-Aggregation in Anwesenheit des Analyten. Auf dieser Basis entwickelten STEVENS *et. al* ein Nachweis für Proteasen.<sup>[93]</sup> Dafür wurden Nanopartikel mit einem Fmoc-enthaltenen Linker synthetisiert, der mittels  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eine Aggregation

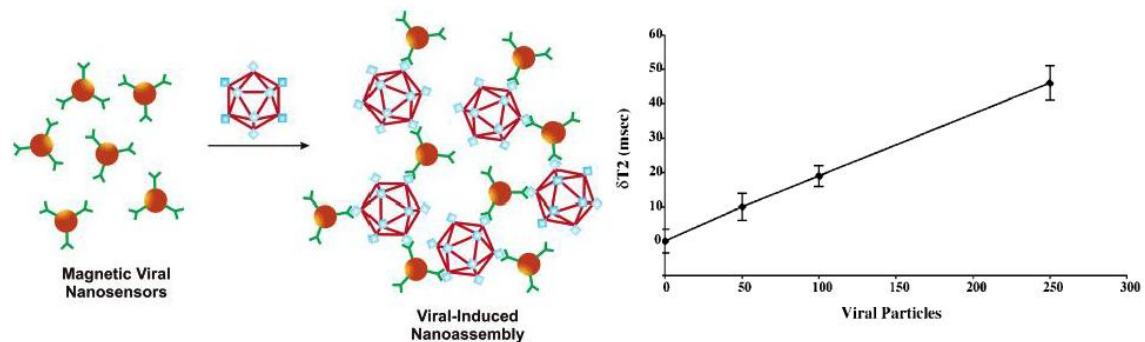
der Nanopartikel induziert. In Anwesenheit des nachzuweisenden Enzyms kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des Linkers, wodurch die Nanopartikel-Aggregation unterbrochen wurde. Da die Konzentration des Enzyms der limitierende Faktor des Nachweises war, modifizierten VELDERS *et al.* diesen um die Nachweisgrenze noch zu verringern.<sup>[94]</sup> Dafür wurden Nanopartikel-Aggregate, bestehend aus  $\beta$ -Zyklodextrin funktionalisierten Gold-Nanopartikeln und einem Ferrocen-Dimer, das an  $\beta$ -Zyklodextrin bindet, gebildet. Die Oxidation des Ferrocen durch Meerrettichperoxidase führte zu einem Bindungsbruch und damit zum Auflösen der Aggregate. Obwohl die Nachweisgrenze mit  $0.1 \text{ pgmL}^{-1}$  schon sehr gering war, konnte sie durch Zugabe von PEG-gebundenem Adamantan noch um den Faktor 10000 auf  $10 \text{ agmL}^{-1}$  gesenkt werden. Der Grund dafür lag in der Verdrängung des oxidierten Ferrocen aus der Bindungstasche des  $\beta$ -Zyklodextrin durch das monovalente Adamantan.

Demgegenüber konnten LETSINGER *et. al* mit Hilfe von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln die Präsenz von komplementärer Einzelstrang-DNA nachweisen.<sup>[95]</sup> Diese führte zu einer Aggregation der Nanopartikel und einer damit einhergehenden Verschiebung des Wellenlängenmaximums der Oberflächenplasmonbande der Nanopartikel. Da sich diese im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums befindet, ist eine Detektion ohne instrumentelle Hilfsmittel möglich. Zusätzlich kann auch der magnetische Charakter von Nanopartikeln für einen Nachweis ausgenutzt werden. So führen Eisenoxid-Nanopartikel im aggregierten Zustand zu einer messbaren Veränderung der Spin-Spin-Relaxation des NMR-Signals der umgebenen Lösungsmittelmoleküle.<sup>[96]</sup> Diese Veränderungen würden es erlauben, mittels der NMR-Spektroskopie die Anwesenheit eines Analyten *in vivo* zu bestimmen.

Auf dieser Grundlage synthetisierten WEISSLEDER *et al.* Antigen-präsentierende Eisenoxid-Nanopartikel für den Nachweis von Herpes- und Adenoviren. Um zu untersuchen, ob die Gegenwart von Adenoviren eine Aggregation von Eisenoxid-Nanopartikeln verursachte, die mit Anti-Adenoviren Antigenen funktionalisiert sind, wurden DLS Messungen durchgeführt. Durch die Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikel von 46 auf 494 nm, konnte bereits nach 30 Minuten eine einsetzende Aggregation der Nanopartikel beobachtet werden. Der von Ihnen entworfene Assay besticht zudem durch seine hohe Sensitivität, da schon die Anwesenheit von 50 Viruspartikeln für eine Aggregation der Nanopartikel ausreichend



ist und eine Veränderung der Spin-Spin-Relaxation der umgebenen Wassermoleküle gemessen werden kann (Abbildung 9).

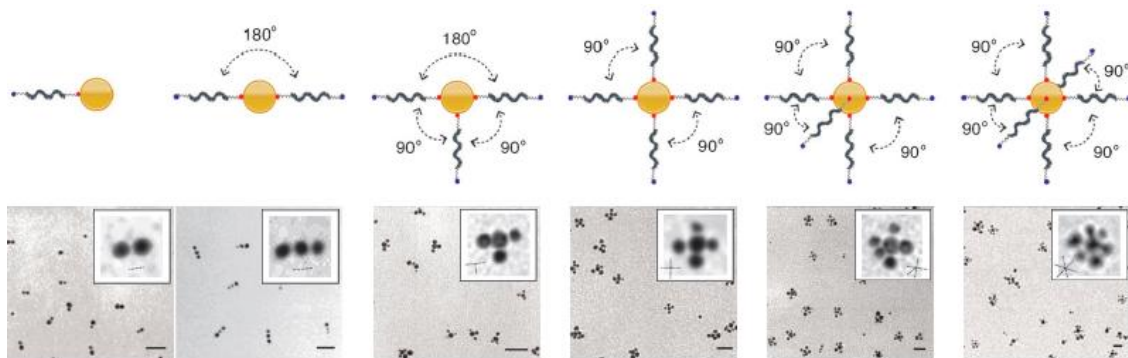


**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Nachweis-Konzepts (A) und grafische Darstellung der Veränderung der Spin-Spin-Relaxation in Abhängigkeit verschiedener Mengen an Viruspartikeln.<sup>[97]</sup>

### 2.3.2. Multivalente Nanopartikel zur Synthese von Nanopartikel-Hybridmaterialien

Darüber hinaus besteht innerhalb der Materialwissenschaften ein großes Interesse an der Nutzung von Nanopartikeln. Das Augenmerk liegt dabei auf der Nutzung von Biomolekülen für den Aufbau selbstorganisierter Nanopartikel-Hybridmaterialien, die neuartige Eigenschaften besitzen.<sup>[98]</sup> Ein wichtiges Kriterium stellt dabei die Reversibilität, dem schaltbaren Wechsel zwischen einer Zusammenlagerung und Dispersion der Nanopartikel, der gebildeten Aggregate dar. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet reichen bis in das Jahr 1996 zurück.<sup>[99]</sup> STORHOFF *et al.* verwendeten dabei DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel, die nach Zugabe eines kurzen DNA-Doppelstrangs, der an beiden Enden komplementäre *sticky ends* (engl., Klebeenden) besitzt, selbstorganisierte Nanopartikel-Aggregate bilden. Ein Vorteil der geformten Aggregate lag in der temperaturabhängigen Reversibilität der Aggregatbildung, da die Doppelstrang-DNA bei einer bestimmten Temperatur schmilzt und sich in zwei DNA-Einzelstränge teilt. Nachteilig war jedoch die Tatsache, dass auf diese Weise keine Kontrolle über die Struktur und Größe der erhaltenen Aggregate möglich ist. Durch eine Änderung in der Funktionalisierung der Nanopartikel, konnten DEATON *et al.* den kontrollierten Aufbau von Nanopartikel-Strukturen beschreiben.<sup>[100]</sup> Dafür wurden Nanopartikel synthetisiert, die nacheinander mit bis zu sechs DNA-Einzelsträngen

funktionalisiert wurden. Nachdem der erste DNA-Strang auf der Nanopartikel-Oberfläche gebunden hatte, wurde jeder weitere DNA-Strang in einem maximalen Abstand zu den schon gebundenen DNA-Strängen gebunden, um sterische und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den DNA-Strängen zu minimieren (Abbildung 10).



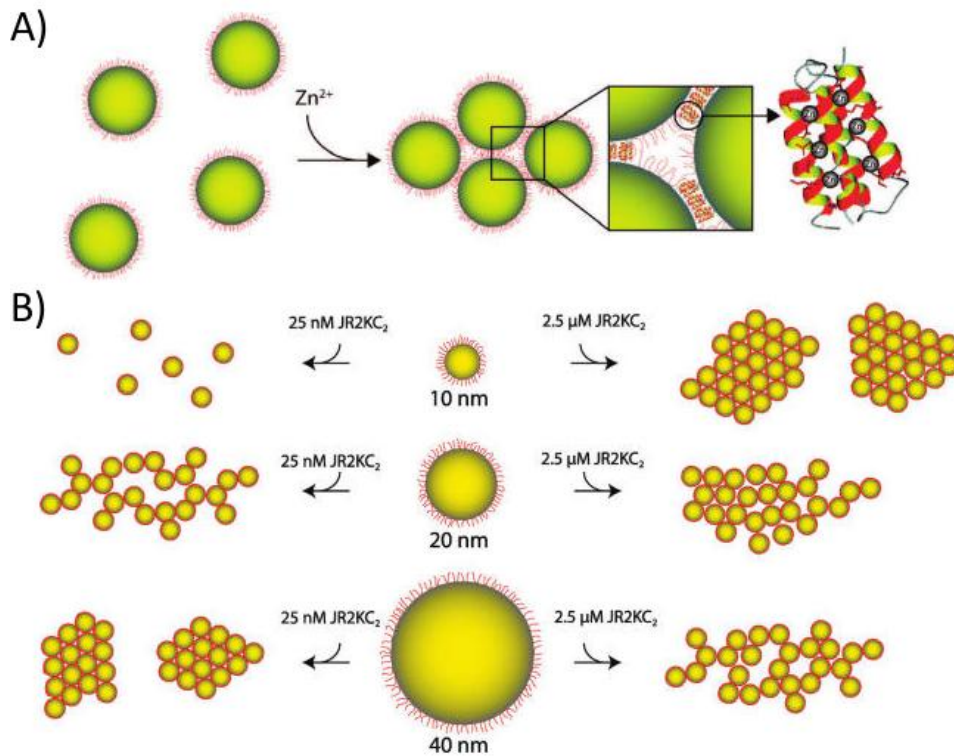
**Abbildung 10:** Struktur der mono- bis hexavalenten DNA-Gold-Nanopartikel und die TEM Aufnahmen der jeweils erhaltenen Nanopartikel-Aggregate.

Zusätzlich wurden Nanopartikel synthetisiert, die nur einen komplementären DNA-Strang besitzen. Nach Zugabe dieser zu den mono- bis hexavalent funktionalisierten Nanopartikeln, kam es auf Grund der DNA-Basenpaarung zur kontrollierten Zusammenlagerung der Nanopartikel. Anschließend durchgeführte TEM-Messungen bestätigten die Einheitlichkeit der erhaltenen Nanopartikel-Aggregate. Die ausgehend von mono- bis tetravalenten Gold-Nanopartikeln erhaltenen Strukturen besaßen außerdem einen ähnlichen Abstand der Nanopartikel untereinander von etwa 9.7 nm. Auf dieser Strategie basierend, konnten anschließend Song *et al.* neben der DNA-induzierten Zusammenlagerung zweier Nanopartikel auch die Ausbildung komplexerer triangulärer sowie rechteckiger Nanopartikel-Strukturen beschreiben.<sup>[101]</sup> Dabei war es durch Verwendung von Hairpin-bildenden DNA-Fragmenten möglich, den Abstand zwischen zwei Nanopartikeln in triangulären Strukturen reversibel zu verändern.

Neben der DNA-induzierten Zusammenlagerung von Nanopartikeln sind auch Peptide in der Lage eine Aggregation hervorzurufen. Das Prinzip beruht dabei auf der Selbstorganisation von Peptiden durch Bildung von *coiled coils*. Maßgebend dafür sind hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren eines oder mehrerer Peptide. In dieser Hinsicht ähnelt der Aufbau von *coiled coil* Peptiden

dem der DNA. Die Selbstorganisation von Peptiden für die Aggregation von Gold-Nanopartikeln konnten als erste WOOLFSON *et al.* ausnutzen.<sup>[102]</sup> Dafür synthetisierten sie Nanopartikel, auf deren Oberfläche entweder der N- oder C-terminale Teil eines ungefalteten Leucin-Zipper Peptids gebunden hatte. Die Zugabe des komplementären Templat-Peptids induzierte die Ausbildung eines heteromeren *coiled coils* und damit einhergehend die Aggregation der Nanopartikel. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Bildung des heteromeren *coiled coil* Peptids stark von der Wahl des pH-Wertes abhängig war, wurde auf eine mögliche Reversibilität der Aggregation durch Änderung des pH-Wertes nicht eingegangen. Den Ansatz der Peptid-induzierten Aggregation entwickelten LANGER *et al.* weiter, indem sie Nanopartikel synthetisierten, die auf der Oberfläche das gleiche Peptid präsentierten.<sup>[103]</sup> Im Gegensatz zu den von WOOLFSON *et al.* genutzten Peptiden waren diese in der Lage homomere *coiled coils* zu bilden. Da die Selbstorganisation der Peptide in diesem Fall sowohl von der Temperatur als auch von der Wahl des pH-Wertes abhängig war, konnten beide Parameter für die reversible Aggregation genutzt werden. Ein saures Milieu verursachte die Zusammenlagerung der Nanopartikel, die durch einen stark basischen pH-Wert rückgängig gemacht werden konnte.

In einigen Fällen werden für die Faltung der Peptide in  $\alpha$ -helikale *coiled coil* Strukturen Metallionen wie Zink-, Kobalt- oder Nickelionen benötigt. Solche Peptide, die nur nach Zugabe von Metallionen in eine *coiled coil* Struktur falten, nutzten LIEBERG *et al.* für die Oberflächendekoration ihrer Nanopartikel.<sup>[104]</sup> Die Zink-induzierte *coiled coil* Bildung war dabei ursächlich für die mit der Peptidfaltung einhergehende Aggregation der Nanopartikel (Abbildung 11 A). Die Reversibilität der Aggregation wird in diesem Fall durch ein Entfernen der Zinkionen möglich. Durch Zugabe eines Komplexbilders wie EDTA werden die Zinkionen gebunden und stehen nicht mehr für die Peptidfaltung zur Verfügung, wodurch die Peptide aus der  $\alpha$ -helikalen Struktur in eine ungeordnete *random coil* Struktur umfalten. In Folge dessen lösen sich die Nanopartikel-Aggregate. Durch Zugabe eines Überschusses an Zinkionen kann die Wirkung des Komplexbilders aufgehoben und eine erneute Zusammenlagerung induziert werden.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Zink-induzierten Aggregation von Gold-Nanopartikeln (A) sowie der Konzentrationsabhängigkeit der Nanopartikel-Aggregation (B).<sup>[105]</sup>

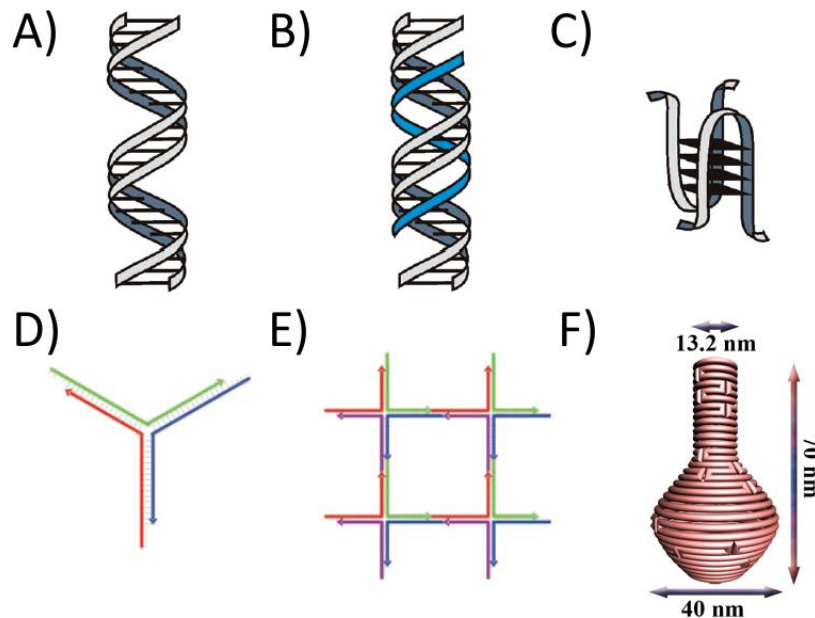
In darauf aufbauenden Arbeiten beschrieben STEVENS *et al.* zudem den Einfluss der Nanopartikel-Größe und Peptidkonzentration auf das Aggregationsverhalten.<sup>[105]</sup> Dafür wurden Gold-Nanopartikel in verschiedenen Größen synthetisiert, die eine gleichmäßige Beladung von ca. 60 % mit dem *coiled coil*-formenden Peptid JR2EC aufwiesen. Da die absolute Zahl an gebundenem Peptid mit steigendem Partikeldurchmesser ansteigt, wurden die größeren Nanopartikel in einer entsprechend geringeren Konzentration eingesetzt, um die effektive Konzentration an gebundenem Peptid an der Oberfläche für alle drei Nanopartikel-Spezies konstant zu halten. Dies hatte jedoch signifikante Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Nanopartikel. So bewirkte die Zugabe des komplementären Peptids JR2KC<sub>2</sub> in einer geringen Konzentration von 25 nM keine Aggregation der 10 nm Nanopartikel, da statistisch nur 4 Peptide an einen Nanopartikel binden konnten und somit die elektrostatische Abstoßung überwog. Erst durch eine höhere Konzentration an JR2KC<sub>2</sub> konnte die elektrostatische Abstoßung überwunden und eine Nanopartikel-Aggregation induziert werden. Dieser Effekt wurde für größere Nanopartikel nicht

beobachtet, da mehr Peptid pro Nanopartikel gebunden und damit die elektrostatische Abstoßung schon bei einer geringen Menge an komplementärem Peptid kompensiert werden konnte (Abbildung 11 B).

## 2.4. DNA und PNA

Nachdem Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und kürzere Oligonukleotide lange Zeit lediglich als Träger der Erbinformation angesehen wurde,<sup>[106]</sup> finden diese mittlerweile auch Beachtung als multivalentes Strukturtemplat.<sup>[107]</sup> Trotz ihrer, verglichen mit anorganischen Nanopartikeln, geringeren strukturellen Vielfalt, besitzen sie gegenüber diesen einen entscheidenden Vorteil: durch das gezielte Design der Oligonukleotide können monodisperse Moleküle in unterschiedlichen Längenskalen mit einer auf wenige Ångström genauen Positionierung und Ausrichtung der Liganden synthetisiert werden. Dabei kann die Valenz der Ligandenpräsentation über die selbstorganisierenden Eigenschaften der DNA gesteuert und beliebig eingestellt werden. Grundlegend dafür ist die zwischen den DNA-Basen Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin auftretende Watson-Crick Basenpaarung und die damit einhergehende Ausbildung einer Doppelhelix,<sup>[108]</sup> welche der DNA ihre große strukturelle Stabilität verleiht. So verhält sich ein DNA-Doppelstrang bis zu einer Länge von ca. 50 nm wie ein starrer Stab, wodurch eine Ligandenpräsentation über große Distanzen möglich wird.<sup>[109]</sup> Gleichzeitig zeichnet sich die DNA-Doppelhelix, im Gegensatz zu ähnlichen stabförmigen Strukturen, durch ihre geringe Tendenz zur Aggregation und sehr gute Wasserlöslichkeit aus. Neben der weitverbreiteten Doppelhelix sind auch Tripelhelices,<sup>[110]</sup> Quadruplex DNA<sup>[111]</sup> und höher dimensionale DNA-Gerüste<sup>[112]</sup> bekannt. Dadurch ist es möglich, neben den bekannten linearen Strukturen auch drei- und mehrarmige sowie komplexe dreidimensionale Strukturen zu erzeugen, besser bekannt unter dem Begriff DNA-Origami.<sup>[113]</sup> Trotzdem sind die DNA-Einzelstränge dieser Strukturen synthetisch durch Reaktion an der festen Phase<sup>[114]</sup> oder im Falle von längeren Oligonukleotiden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)<sup>[115]</sup> sehr gut zugänglich. Nachteilig ist jedoch, dass Nukleotide im Körper enzymatisch mit Hilfe von Nukleasen abgebaut werden können. Um diesen Nachteil auszugleichen, werden mittlerweile vermehrt Peptid-Nukleinsäuren (PNA) genutzt. Dabei handelt es sich um ein nichtionisches DNA-Analogon, das über ein Pseudopeptidrückgrat verfügt, an dem die DNA-Basen in der Seitenkette gebunden sind. Dies hat eine Steigerung der Affinität und Spezifität der PNA zu DNA und RNA zur Folge, da elektrostatische Abstoßungen mit dem Phosphat-haltigen Rückgrat der DNA

nicht auftreten.<sup>[116]</sup> Folglich besteht die mit komplementärer DNA/RNA gebildete Doppelhelix, verglichen mit einer äquivalenten DNA-Doppelhelix, durch eine höhere Stabilität. Zusätzlich zeichnet sich die PNA durch eine hohe biologische Stabilität aus, da sie weder durch Nukleasen noch durch Proteasen abgebaut werden kann.



**Abbildung 12:** Grafische Darstellung möglicher DNA-Sekundärstrukturen: Doppelhelix (A), Tripelhelix (B) und Quadruplex (C). Grafische Darstellung einer dreiarmigen (D), achtarmigen (E) und komplexen dreidimensionalen (F) DNA-Struktur.<sup>[112,117,118]</sup>

#### 2.4.1. Multivalente DNA-Gerüststrukturen für medizinische Anwendungen

Auf Grund der kontrollierbaren Ausrichtung und Positionierung von Liganden an multivalenten Gerüststrukturen, konnten unter anderem verschiedene Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Medizin entwickelt werden. Jedoch zeigten sich auch hier teils gravierende Unterschiede in der Wirkstoffaktivität in Abhängigkeit von der Rigidität, Position und Ausrichtung sowie der Anzahl der Liganden.

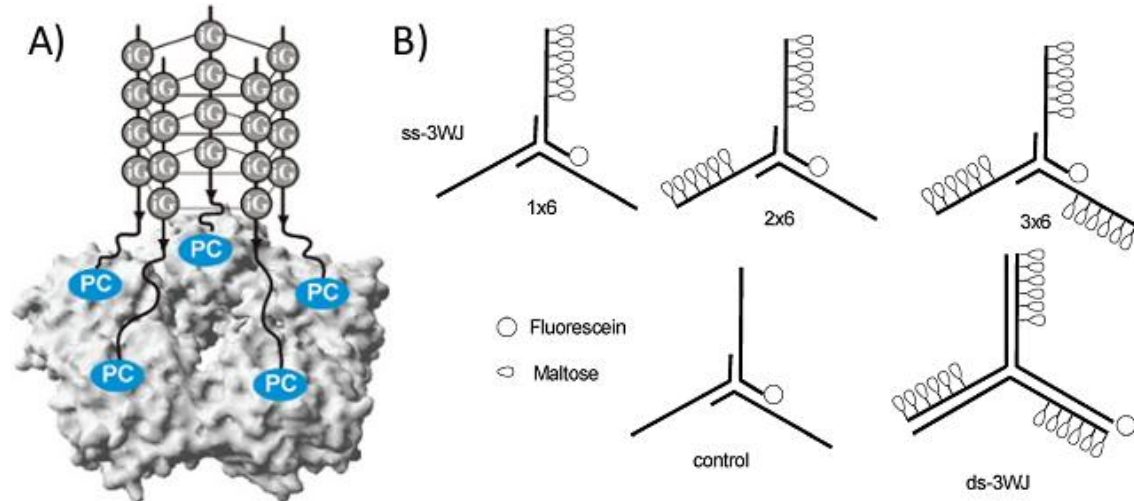
So konnten beispielsweise MONTESARCHIO *et al.* die Verwendung von glykosylierten Oligonukleotiden als potentiell Anti-HIV Medikament beschreiben.<sup>[119]</sup> Die am 3'- bzw. 5'-Ende mit Mannose, Glukose oder Saccharose modifizierten Oligonukleotide, die die Sequenz  $5' \text{TGGGAG} 3'$  besaßen, bildeten parallele DNA-Quadruplexe, die jeweils vier Kohlenhydrate präsentierten. Obwohl die Modifizierungen der Oligonukleotide nur an den 3'-/5'-Enden durchgeführt wurden, zeigten die verschiedenen Varianten in

Abhängigkeit von der Position der Modifizierung ein höchst unterschiedliches Verhalten. CD-Messungen ergaben, dass die 3'-modifizierten Varianten eine höhere thermische Stabilität aufwiesen, die sich anschließend auch in ihrer Anti-HIV Aktivität widerspiegelte. Dazu wurden die, auch unter dem Begriff cytophatischer Effekt bekannten, morphologischen Veränderungen von infizierten T-Lymphozyten untersucht. So zeigten grundsätzlich alle 3'-modifizierten Varianten eine signifikant höhere Aktivität als die vergleichbaren 5'-Varianten. Darüber hinaus besaß das am 3'-Ende mit Mannose funktionalisierte Oligonukleotid, das die höchste thermische Stabilität aufwies, auch die höchste inhibitorische Wirkung mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 14  $\mu$ M. Außerdem konnte durch eine zusätzliche Funktionalisierung des 5'-Endes mit TBDPS-Gruppen die Stabilität und inhibitorische Wirkung nochmals gesteigert werden. Neben Quadruplexen können Oligonukleotide auch höher geordnete Strukturen wie DNA-Pentaplexe ausbilden. Die Ausbildung dieser Struktur kann jedoch nur dann erfolgen, wenn mindestens vier aufeinanderfolgende Isoguanin Basen in der Sequenz sowie chelatisierende Cäsium Kationen vorhanden sind.<sup>[120]</sup> Durch Selbstorganisation der Einzelstränge in einer parallelen Anordnung können pentavalente Strukturen erhalten werden, die homo- oder heterofunktionalisiert sind. Nach der Funktionalisierung der 5'-Enden mit fünf Phosphocholin Gruppen nutzten HAMILTON *et al.* dieses Pentaplex für die Bindung an das menschliche C-reaktive Protein (CRP).<sup>[121]</sup> Dabei handelt es sich um ein in der Leber gebildetes homopentamer Protein, das als Immunantwort auf eine Entzündung oder Infektion gebildet wird.<sup>[122]</sup> Mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionsassay (ELISA) konnte anschließend die Effektivität der pentavalenten Präsentation des Phosphocholin-Liganden nachgewiesen werden. Während der DNA Einzelstrang mit einem  $K_D = 50 \mu$ M bindet, bindet das DNA-Pentaplex (141 nM) mehr als 350-mal besser.

Oligonukleotide können, neben linearen stabförmigen Anordnungen und Quadru- bzw. Pentaplexen, auch dendritische Strukturen ausbilden. EBARA *et al.* synthetisierten verschiedene am 3'-Ende mit Maltose Gruppen (0, 3, 6 und 12) funktionalisierte kurze DNA-Sequenzen, welche im Bereich des 5'-Endes komplementäre Basenpaare besaßen und nach Basenpaarung dreier DNA-Stränge eine dendritische Struktur ausbildeten (Abbildung 13B).<sup>[123]</sup> Da sich die Basenpaarung nicht über die gesamten Oligonukleotide erstreckte, war eine hohe Flexibilität der drei Dendrone gewährleistet.



Auf diese Weise war es möglich, Dendrimere zu erhalten, die an keinem bzw. an einem, zwei oder allen drei Armen Maltose-Gruppen besaßen. Mittels Fluoreszenztitration sollte anschließend die Bindungsaffinität der gebildeten Dendrimere an das Lektin Concanvalin A (Con A) untersucht werden. EBARA *et al.* konnten dabei eindrucksvoll zeigen, dass die Affinität für Con A mit steigendem Funktionalisierungsgrad des Dendrimers um den Faktor 12 bzw. 83 ansteigt. Ein überraschendes Ergebnis lieferte die Messung der Bindungsaffinität eines Dendrimers, das 12 anstatt 6 Maltose-Gruppen an jedem Arm besaß. Denn obwohl im Allgemeinen die Bindungsstärke zwischen Kohlenhydraten und Proteinen mit steigender Zahl an Kohlenhydraten steigt, zeigte sich hier ein gegenteiliger Effekt. So sank die Affinität des DNA-Dendrimers. Folglich ist die räumliche Verteilung der Liganden in diesem Fall von größerer Bedeutung als die Anzahl an präsentierten Kohlenhydraten. Darüber hinaus führte eine Verlängerung des Doppelstrang-bildenden Sequenzbereichs, der die Bildung von doppelsträngiger DNA an den Armen des Dendrimers und damit einem Verlust an Flexibilität zur Folge hatte, ebenfalls zu einer geringeren Bindungsaffinität.



**Abbildung 13:** A) Struktur des von HAMILTON *et al.* synthetisierten DNA Pentaplex.<sup>[117]</sup> B) Strukturen der von EBARA *et al.* synthetisierten DNA-Dendrimere.<sup>[124]</sup>

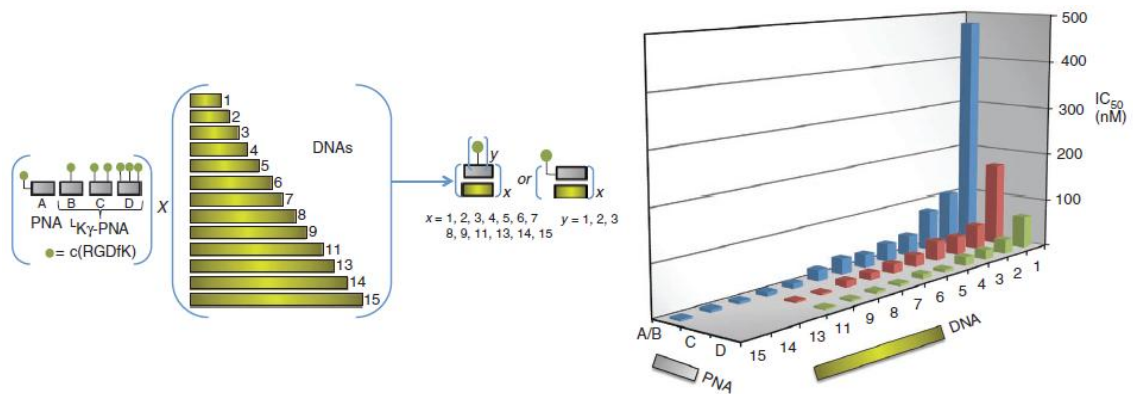
Doch obwohl Oligonukleotide mit einer Quadru- oder Pentaplex-Struktur unterschiedliche Möglichkeiten der Ligandenpräsentation besitzen, ist die Vielfalt der Ligandenpräsentation, die mit Hilfe der DNA-Doppelhelix erzeugt werden kann, unübertroffen. Durch den Einsatz von nur fünf verschiedenen, teilweise glykosylierten PNA-Oligomeren war es SEITZ *et al.* möglich, eine Bibliothek an DNA/PNA Doppelhelices

zu erzeugen, deren Flexibilität und Multivalenz sowie den Abstand der Kohlenhydrat-Liganden nur durch die Wahl eines geeigneten DNA-Templats kontrolliert eingestellt werden konnte.<sup>[125]</sup> Das DNA-Templat fungiert dabei als „Effektor“, indem durch Hybridisierung der einzelnen monovalenten Fragmente ein DNA-Komplex entsteht, der die Liganden multivalent präsentiert. Damit konnten SEITZ *et al.* das von KOBAYASHI *et al.* entwickelte Konzept der Selbstorganisation von kurzen DNA-Fragmenten mit Hilfe eines DNA-Templats auf PNA erweitern.<sup>[126,127]</sup> Diese synthetisierten mit Galaktose funktionalisierte DNA-Fragmente, welche sich lediglich in der Länge der DNA-Sequenz unterschieden. Nach Hybridisierung und Selbstorganisation dieser Fragmente an einem DNA-Templat wurde eine Doppelhelix erhalten, die multivalent in definierten Abständen Galaktose präsentierten. Anschließend wurde die Bindungsaffinität der erhaltenen linearen DNA-Helices gegenüber dem Lektin RCA<sub>120</sub> untersucht, das spezifisch an Galaktose bindet. Dabei stellte sich heraus, dass neben dem Abstand und der Anzahl an präsentierten Galaktose Liganden auch der Torsionswinkel zwischen den Liganden von großer Bedeutung für die Bindung an das Lektin waren.

Einen leicht abgewandelten Ansatz nutzen WINSSINGER *et al.* für die Bindung an den HIV Antikörper 2G12.<sup>[128]</sup> Hierfür synthetisierten sie eine Bibliothek an PNA-Sequenzen, die an ihrem C- bzw. N-Terminus, über einen kurzen PEG-Linker verbunden, verschiedene Mannose- bzw. Oligomannose-Liganden gebunden hatten. In Anwesenheit unterschiedlicher DNA-Templates, die sich durch Permutation der DNA-Basen voneinander unterschieden, kam es zur Selbstorganisation zweier PNA-Sequenzen, wodurch die Liganden in einem definierten Abstand zueinander präsentiert werden konnten. Für die Bindung an den HIV Antikörper 2G12 war ein kurzer Abstand zweier Tetramannosid-Liganden von Vorteil. WINSSINGER *et al.* konnten somit gleichzeitig eine künstliche Kohlenhydrat-Struktur erzeugen, die das Kohlenhydrat-Epitop des HIV-Oberflächenproteins gp120 simuliert. Damit wurde erstmals aus leicht zugänglichen Bausteinen eine komplexe, in der Natur vorkommende Kohlenhydratstruktur nachgeahmt, was vorteilhaft für die Entwicklung von Impfstoffen sein kann.

Die Hybridisierung kurzer PNA-Sequenzen an einem längeren DNA-Templat kann jedoch auch, wie von APPELLA *et al.* gezeigt, für den direkten Einsatz als Wirkstoff genutzt werden.<sup>[129]</sup> Die verwendeten PNA-Fragmente präsentierten einen, zwei oder drei zyklische Peptidliganden der Sequenz c(RGDfK). Das Tripeptid RGD, das in vielen

Proteinen der extrazellulären Matrix zu finden ist, dient dabei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion<sup>[130]</sup> und kann die Bildung von Metastasen fördern, da in vielen Krebszellen das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  an der Zelloberfläche überexpressiert wird und damit die Anlagerung von Krebszellen in anderen Teilen des Körpers verursacht.<sup>[131]</sup> Durch Basenpaarung mit Einzelstrang DNA unterschiedlichster Länge wurde eine Bibliothek an PNA/DNA-Komplexen generiert, die über mindestens einem aber maximal 45 Peptidliganden verfügten. Mittels *in vitro* Zelltests, bei denen die Bindung von C32 Krebszellen, die auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für die Bindung an das RGD-Tripeptid präsentieren, an das in der extrazellulären Matrix befindliche Glykoprotein Vitronectin in Gegenwart der PNA/DNA Komplexe gemessen wurde,<sup>[132]</sup> sollte die inhibitorische Wirkung bestimmt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass schon die bivalente Präsentation des Peptidliganden eine signifikante Hinderung der Bindung der Krebszellen an Vitronectin zur Folge hatte. Andererseits konnte bei PNA/DNA-Komplexen, die mehr als 15 Liganden präsentierten, kein weiterer Anstieg der Inhibierungsaktivität beobachtet werden.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der gebildeten Bibliothek aus PNA/DNA Komplexen und deren inhibitorische Wirkung auf die Bindung von C32 Krebszellen an Vitronectin.

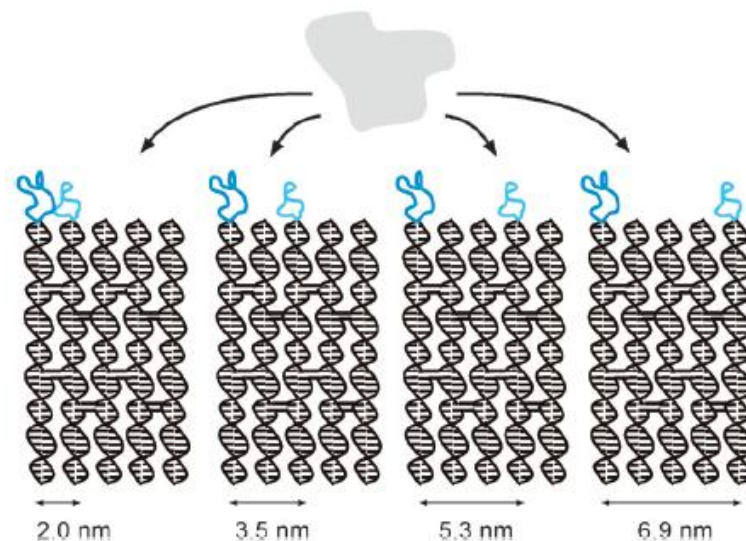
#### 2.4.2. Multivalente DNA-Gerüststrukturen für die Strukturaufklärung

Auf Grund der sequenzabhängigen, programmierbaren Einstellung von Abständen zwischen zwei oder mehreren Liganden eignen sich helikale DNA-Moleküle auch für die Ångström-genaue Bestimmung von Bindungsabständen in bisher strukturell

unbekannten Proteinen. Dies nutzen SEITZ *et al.* aus, um die Abstände der Bindungstaschen von Tandem SH2-Domänen zu bestimmen.<sup>[133]</sup> Die untersuchte *Syk* Kinase besitzt SH2-Domänen, welche selektiv zwei voneinander getrennte Peptide binden können, die ein phosphoryliertes Tyrosin besitzen.<sup>[134-137]</sup> Dafür wurden Oligonukleotide synthetisiert, die an zwei Positionen in der Sequenz über ein mit Cystein modifiziertes Thymin einen Peptidliganden binden konnten. Eine Hybridisierung dieser modifizierten Oligonukleotide an einem DNA-Templat führte zur Bildung starrer, divalenter Peptid-DNA-Konjugate, die die zwei Peptidliganden in einem definierten Abstand und Torsionswinkel zueinander präsentierten. Mittels Verdrängung eines fluoreszenzmarkierten Referenzpeptids, das an die Tandem SH2-Domäne gebunden hatte, wurde anschließend die Affinität der einzelnen Peptid-DNA-Konjugate bestimmt. Dabei wurde die höchste Affinität für das Konjugat erhalten, welches einen Abstand von 11 DNA-Basen zwischen den Peptid-Liganden aufwies. Das entspricht einem Abstand von etwa 37 Å. Darüber hinaus konnte für einen geringen Abstand von lediglich zwei DNA-Basen eine erhöhte Affinität beobachtet werden. Dies konnte mit der hohen strukturellen Flexibilität der untersuchten *Syk* SH2-Domäne erklärt werden. Bei einem Abstand von fünf DNA-Basen wurde dagegen eine sehr geringe Affinität gemessen. Es wurde geschlossen, dass dafür der ungünstige Torsionswinkel von etwa 180° verantwortlich ist. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurden ternäre DNA-Peptid-Konjugate synthetisiert, bei denen jeweils ein Peptidligand an einem Oligonukleotid-Fragment gebunden hat und erst durch das DNA-Templat ein divalenter Komplex hergestellt wird. Dabei wurde ein Sequenzbereich im DNA-Templat so modifiziert, dass er nicht hybridisiert und somit eine freie Rotation des Konjugats ermöglicht. Das vorher beobachtete Affinitätsminimum bei einem Ligandenabstand von fünf DNA-Basen konnte mit den ternären Konjugaten nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen kommt es zu einem dramatischen Abfall der Affinität bei einem Abstand von 13 DNA Basen, was einem maximalen, kritischen Abstand von circa 50 Å entspricht. Die resultierende Differenz von 13 Å kann mit der semiflexiblen Struktur der ternären Konjugate erklärt werden.

Für die Bestimmung von Bindungsabständen eignen sich jedoch nicht nur lineare DNA-Moleküle. YAN *et al.* nutzten DNA-Plättchen, die durch Hybridisierung von fünf DNA-

Einzelsträngen erhalten wurden.<sup>[138]</sup> Daraus ergab sich eine rechteckige Struktur aus fünf miteinander verbundenen Helices. An den Enden der Helix wurden für die Wechselwirkung mit dem zu untersuchende Protein Thrombin zwei Aptamer Liganden gebunden. Bei Aptameren handelt es sich um kurze DNA-Einzelstränge, die ein spezifischen Molekül, z. B. ein Protein, auf Grund ihrer dreidimensionalen Struktur binden können.<sup>[139]</sup> An Thrombin, ein wichtiger Blutgerinnungsfaktor bei Wirbeltieren,<sup>[140]</sup> können zwei sich in ihrer Sequenz unterscheidende Aptamere A und B binden. Durch Variation der Bindungsstelle von Aptamer B am Ende einer Helix des DNA-Plättchens konnten mehrere Bindungsabstände eingestellt werden. Daraus resultierten vier Abstände zwischen den Aptameren von 2, 3.5, 5.3 und 6.9 nm. Das DNA-Plättchen, welches die zwei Aptamere in einem Abstand von 5.3 nm präsentierte, konnte mit 40 % des vorgelegten Thrombins am besten binden. Demgegenüber führte eine Vergrößerung bzw. Verkleinerung des Aptamer-Abstands zu einer annähernd gleichgroßen Verschlechterung auf einen Wert von 25-30 % des eingesetzten Thrombins.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der DNA Plättchen, die in definierten Abständen Aptamer-Liganden präsentieren.

## 2.5. Peptide und Proteine

Proteine gehören neben der DNA zu einer zweiten großen Klasse von Biopolymeren. In Abhängigkeit von der Größe des Proteins wird dabei zwischen einem Peptid, das im Allgemeinen aus maximal 100 Aminosäuren besteht, und einem Protein unterschieden. Ähnlich der Synthese von Oligonukleotiden können auch Peptide und Proteine sowohl mittels Proteinbiosynthese<sup>[141]</sup> als auch an der festen Phase<sup>[142]</sup> unter Bildung von  $\alpha$ -Peptidbindungen zwischen Aminosäuren synthetisiert werden. Letztere ist jedoch hauptsächlich für die Herstellung von Peptiden mit einer maximalen Kettenlänge von etwa 50 Aminosäuren praktikabel, da selbst bei einer Ausbeute von 95 % pro Kopplungsschritt die Gesamtausbeute nach 20 Aminosäuren auf 35 % fällt. Dieser Nachteil kann jedoch durch diverse Ligationstechniken wie der nativen chemischen Ligation<sup>[143]</sup> und der Fragmentkondensation<sup>[144]</sup> umgangen werden. Die Nutzung orthogonaler Schutzgruppen erlaubt dabei das selektive Entschützen einzelner Aminosäuren für deren gezielte Modifizierung während oder nach der Synthese des Peptids.<sup>[145]</sup> Dies ermöglicht die Bildung von Peptidbindungen über die Seitenkette der Aminosäure, was im Vergleich zur DNA zu einer größeren strukturellen Vielfalt führt. Proteine, die mittels Proteinbiosynthese synthetisiert wurden, bieten die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation.

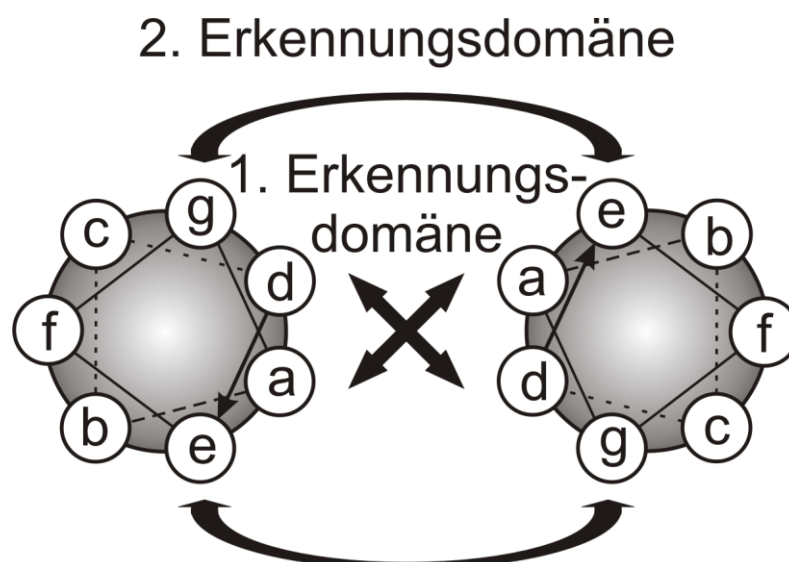
Peptide und Proteine bilden, ähnlich der DNA, in Abhängigkeit ihrer durch die Aminosäuresequenz vorgegebenen Primärstruktur diverse Sekundärstrukturen aus. Dafür ist die eingeschränkte Rotation der Peptidbindung im Peptidrückgrat ursächlich, die durch das Vorhandensein von zwei Resonanzstrukturen verursacht wird. Die bekanntesten Strukturelemente der Sekundärstruktur sind die  $\alpha$ -Helix,<sup>[146]</sup> das  $\beta$ -Faltblatt<sup>[147]</sup> sowie ungefaltete Bereiche, sogenannte *random coils*, wobei letzteres streng genommen keine Struktur darstellt. Für die Ausbildung dieser Strukturen sind hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem Carbonyl-Sauerstoff und einem benachbarten Proton der Peptidbindung verantwortlich. Im Gegensatz zur DNA, die eine Ganghöhe von 3.4 nm und einen Anstieg pro DNA Base von 0.34 nm besitzt,<sup>[108]</sup> beträgt die Ganghöhe einer  $\alpha$ -Helix nur 0.54 nm bei einem Anstieg von 0.15 nm pro Aminosäure.<sup>[146]</sup> Damit ist es möglich, kürzere Abstände bzw. eine bessere Feineinstellung der Abstände zwischen zwei Liganden zu realisieren. Zusätzlich zur

Primär- und Sekundärstruktur besitzen Peptide und Proteine mit der Tertiär- und Quartärstruktur zwei übergeordnete Strukturebenen. Während die Tertiärstruktur die dreidimensionale Anordnung einer einzelnen Polypeptidkette beschreibt, die vornehmlich durch Disulfidbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen erzeugt wird, wird die Ausbildung von Peptid/Proteinkomplexen aus mehreren einzelnen Proteinen/Peptiden als Quartärstruktur bezeichnet. Eine der am häufigsten vorkommenden Quartärstrukturen ist das *coiled coil* Motiv, welches beispielsweise auch im Membranprotein gp41 des HI Virus vorhanden ist.

### 2.5.1. Das *coiled coil* Faltungsmotiv

Vorhersagen basierend auf der Analyse der Primärsequenzen aller bekannten Proteine erwarten, dass 2-3 % aller Aminosäuren in Proteinen *coiled coil* Strukturen ausbilden und das *coiled coil* damit eines der am häufigsten vorkommenden Struktur motive ist.<sup>[148]</sup> Allgemein besteht ein *coiled coil* aus zwei bis sieben umeinander gewickelten amphipathischen  $\alpha$ -Helices und formen dabei eine linksgängige Superhelix.<sup>[149]</sup> Dies hat eine geringe Stauchung der einzelnen Helices zur Folge, sodass für eine komplette Helixwindung nun 3.5 Aminosäuren benötigt werden anstatt der 3.6 Aminosäuren in einer regulären  $\alpha$ -Helix.<sup>[150,151]</sup> Charakteristisch für *coiled coils* ist die Periodizität von sieben Aminosäuren, die mit Hilfe des sogenannten *heptad repeat* beschrieben werden kann, wobei die einzelnen Aminosäuren mit (a b c d e f g)<sub>n</sub> beschriftet werden.<sup>[152]</sup> Daraus ergeben sich für die Besetzung der einzelnen Positionen im *coiled coil* allgemeine Konstruktionsregeln.<sup>[149]</sup> Da die thermodynamische Stabilität der Quartärstruktur hauptsächlich durch die Bildung eines hydrophoben Kerns zwischen den Helices erzielt wird, werden die Positionen a und d hauptsächlich mit hydrophoben Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin oder Valin besetzt.<sup>[153]</sup> Diese bilden gleichzeitig die erste Erkennungsdomäne. Dabei kommt es ähnlich einem Reißverschluss zu einem Ineinandergreifen der Seitenketten, was als „*knobs-into-holes*“ bezeichnet wird.<sup>[154]</sup> Die Wahl der richtigen Aminosäure in diesen Positionen hat dabei großen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad des *coiled coils*. Ursächlich sind dafür die verschiedenen Geometrien und möglichen Packungen der Aminosäureseitenketten.<sup>[155]</sup> Zum Beispiel sind für die Bildung eines dimeren *coiled*

*coils* Aminosäuren mit einer Verzweigung in der Seitenkette, wie sie bei Isoleucin oder Valin auftritt, in Position d ungünstig, während sie in Position a begünstigt sind. Darüber hinaus können die einzelnen Helices in einer zweiten Erkennungsdomäne auch über Salzbrücken miteinander wechselwirken, weshalb bevorzugt entgegengesetzt geladene Aminosäuren wie Lysin und Glutaminsäure in den Positionen e und g zu finden sind.<sup>[152]</sup> Gleichzeitig kann durch die entsprechende Wahl der Aminosäuren in diesen zwei Positionen die Homo- oder Heterooligomerisierung sowie eine parallele oder antiparallele Anordnung der Helices des *coiled coils* gesteuert werden. Beispielsweise wird bei einer ausschließlichen Besetzung der Positionen e und g eines Peptids mit einer positiv geladenen Aminosäure wie Lysin die Bindung eines zweiten Peptids mit komplementär geladenen Aminosäuren in den Positionen e' und g' und damit die Bildung von Heteromeren begünstigt.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung eines  $\alpha$ -helikalen *coiled coil* Peptids in der *helical wheel*-Schreibweise.

Die drei übrigen Positionen b, c und f haben nur geringen Einfluss auf die *coiled coil* Struktur, da sie die zwei Erkennungsdomänen lediglich geringfügig bis gar nicht beeinflussen. Da es sich dabei um Lösungsmittlexponierte Positionen handelt, werden hier vermehrt polare und geladene Aminosäuren gefunden.<sup>[156]</sup> Diese Positionen eignen sich daher besonders für die Bindung und Präsentation von Liganden. Zusätzlich können aber auch posttranslationale Modifikationen wie eine

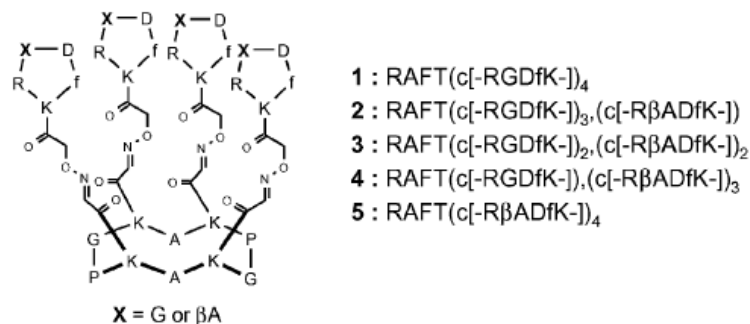


Phosphorylierung<sup>[157,158]</sup> oder die Wechselwirkung mit Ionen<sup>[159]</sup> Einfluss auf die *coiled coil* Bildung haben.

### 2.5.2. Zyklische, dendritische und *random coil* Peptide als Gerüststruktur

Auf Grund der chemischen Diversität der Aminosäureseitenketten können verschiedene multivalente Gerüststrukturen mit Hilfe von Peptiden realisiert werden. Dazu zählen u.a. dendritische oder zyklische Strukturen. Damit ist es möglich, auf die verschiedensten strukturellen Anforderungen der Zielmoleküle mit großer struktureller Flexibilität zu reagieren. So konnten FAN *et al.* durch Variation einzelner Aminosäuren zyklische Peptide synthetisieren, die sich im Durchmesser unterschieden.<sup>[160]</sup> Während das zyklische Decapeptid, das aus einer alternierenden Abfolge von Lysin und Glycin aufgebaut war, einen Durchmesser von 9.7 Å besaß, resultierte der Austausch von Glycin durch Aminobuttersäure oder Aminohexansäure in einer signifikanten Vergrößerung des Ringdurchmessers auf 13.8 bzw. 15.9 Å. Über die Aminofunktion der Lysinseitenketten konnten FAN *et al.* anschließend fünf Galaktose Liganden an das Peptidgerüst binden und deren Affinität für das Cholera-Toxin untersuchen. Dabei handelt es sich um ein aus 755 Aminosäuren bestehendes Protein, das sich aus einer A-Untereinheit und fünf, symmetrisch um die A-Untereinheit angelagerten, B-Untereinheiten zusammen setzt, welche für die Rezeptorbindung verantwortlich sind.<sup>[161]</sup> Überraschenderweise wurde für alle untersuchten Zyklopeptide in Abhängigkeit von der Spacerlänge eine ähnliche Bindungsaffinität beobachtet. So wurden für die zwei Zyklopeptide mit dem größten Ringdurchmesser lediglich zwei Linkereinheiten für eine optimale Bindung benötigt, während das kleinere Glycin-Lysin Zyklopeptid drei Linkereinheiten benötigt. Dem gegenüber führt jeweils eine größere bzw. kleinere Spacerlänge zu einer geringeren Bindungsaffinität. Als Grund für diese Beobachtung werden die unterschiedlichen Durchmesser der Zyklopeptide genannt, die den Abstand der Liganden und damit das Bindungsverhalten an das Cholera-Toxin maßgeblich beeinflussen. Zusätzlich verursachte die pentamere Anordnung der Galaktose Liganden im Vergleich mit monomerer Galaktose eine Steigerung der Bindungsaffinität um den Faktor 100000.

Mittels Variationen Aminosäuresequenz des zyklischen Templatpeptids können auf einfachem Weg die Zahl der möglichen Liganden verändert werden. So können neben dem pentavalenten Templat auch tetravalente Peptidtemplate durch Eliminierung eines Lysins erhalten werden. Ein solches Templat nutzten DUMY *et al.* für die multivalente Präsentation von zyklischen RGD Peptiden der Sequenz c(RGDfK), die als Vitronektin Rezeptor an das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  binden, der auf vielen Tumorzellen überexprimiert wird.<sup>[130,162]</sup> Um den Einfluss der Multivalenz auf die Bindung zu untersuchen, wurden Peptidtemplate mit mono-, di-, tri- und tetravalenter Ligandenpräsentation synthetisiert, die nach Austausch des RGD Peptids durch das Nonsenspeptid R $\beta$ AD erhalten wurden (Abbildung 17). Zelladhäsionsuntersuchungen bestätigten, dass die tri- und tetravalenten Komplexe mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.66 bzw. 0.58  $\mu$ M die höchste und der monovalente Komplex (IC<sub>50</sub>= 0.99  $\mu$ M) die niedrigste Bindungsaffinität besaß. Unter Berücksichtigung der Anzahl an vorhandenen Liganden zeigte sich jedoch, dass das relative Bindungspotential des monovalenten Komplexes höher ist als des tetravalenten Komplexes.



**Abbildung 17:** Struktur der untersuchten RGD präsentierenden Zylopeptide.<sup>[162]</sup>

In darauf aufbauenden Arbeiten von BOTURYN *et al.* konnte anschließend gezeigt werden, dass neben der Anzahl der Liganden auch der Linker zwischen Ligand und dem zyklischen Peptidtemplat von Bedeutung ist.<sup>[163]</sup> Dabei wurde beobachtet, dass die Nutzung des längeren Triazol-Linkers im Vergleich zum kürzeren Oxim-Linker eine Erhöhung der Bindungsaffinität bewirkte. Verdeutlicht wurde dieser Effekt bei einem trivalenten Komplex, bei dem das Nonsenspeptid über den kürzeren Oxim-Linker gebunden wurde, während die zur Bindung befähigten RGD Liganden über den Triazol-Linker mit dem Templat verbunden waren. Trotz der geringeren Zahl an Liganden

konnte hier eine Steigerung der Affinität beobachtet werden, da im Vergleich mit ungebundenem RGD Peptid durch den kürzeren Linker eine geringere sterische Abschirmung stattfindet.

Die selektive Entschützung der Seitenkette der Aminosäure Lysin an der festen Phase erlaubt neben der Ligandenpräsentation auch die Synthese von verzweigten, dendritischen Peptiden.<sup>[164-166]</sup> Der große Vorteil von Peptid-Dendrimern im Vergleich zu den meisten herkömmlichen organischen Dendrimern liegt dabei in der gezielten Veränderung der Wasserlöslichkeit sowie der Hydrophobizität und Anzahl an Ladungen, die durch Variationen in der Aminosäuresequenz erreicht werden kann. Darüber hinaus kann über den Grad an Verzweigungen die proteolytische Stabilität beeinflusst werden. So können Peptid-Dendrimere, die drei Aminosäuren zwischen den Verzweigungen besitzen, durch Proteolyse gespalten werden, während die Reduzierung auf eine Aminosäure zwischen den Verzweigungen in einer vollständigen proteolytischen Resistenz resultiert.<sup>[167]</sup> Auf Grund der Möglichkeit einer vielfachen Verzweigung eignen sich speziell Dendrimere für die multivalente Präsentation von Liganden, was bei der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Kohlenhydraten vorteilhaft ist, da sich diese mit der Zahl an Bindungspartner signifikant verstärkt. Diese Möglichkeit der Ligandenpräsentation nutzten DARBRE *et al.*, die eine Bibliothek an Peptid-Dendrimere für die Fucose-selektive Bindung an das tetramere Lektin LecB synthetisierten.<sup>[168-170]</sup> Die G2 Dendrimere variierten jeweils in ihrer Aminosäuresequenz, wobei in der G1 Generation immer vier Aminosäuren und in der G2 Generation drei Aminosäuren verknüpft waren. Unabhängig davon wurde für die Verzweigung die Aminosäure Lysin verwendet. Die erhaltenen Dendrimere waren damit in der Lage in ihrer Peripherie vier Fucose-Liganden zu binden. In den anschließend durchgeführten Bindungsstudien an das Lektin LecB wurde für Dendrimere, die in ihrer Sequenz negativ geladene Aminosäuren beinhalteten, eine geringere Bindungsaffinität nachgewiesen. Außerdem war zu beobachten, dass sich der Einbau von Argininen negativ auf die Bindungsaffinität auswirkte. Die erwartungsgemäß höchste Bindungsaffinität konnte für ein G3 Dendrimer, das über acht Fucose-Liganden verfügte, bestimmt werden. Dabei kam es zu einer 55-fachen Verstärkung der Bindung pro präsentierten Liganden, während das am besten bindende G2 Dendrimer lediglich eine 25-fache Verstärkung bewirkte. Wie sich nach

der Synthese eines Referenz G3 Dendrimers herausstellte, bei dem Lysin durch 2,3-Diaminopropionsäure substituiert wurde, ist ein entscheidender Faktor für eine hohe Bindungsaffinität die Nutzung von Lysin als verzweigende Aminosäure. Diese nur minimale Veränderung in der Struktur hatte eine 37-fach geringere Bindungsaffinität zur Folge. Ursächlich für diese Beobachtung sind die höhere Kompaktheit und die damit einhergehende geringere Flexibilität der 2,3-Diaminopropionsäure.

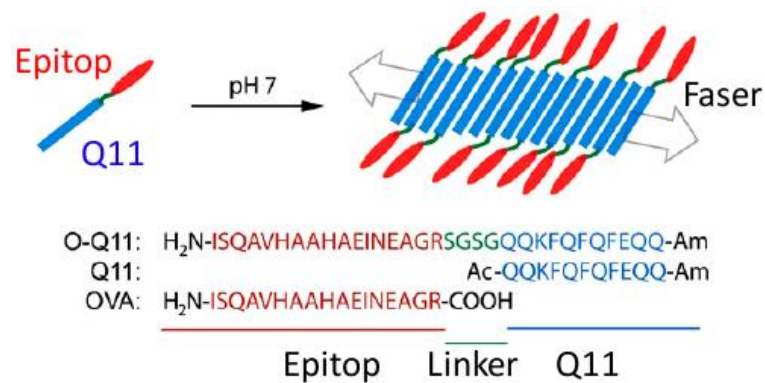
In Analogie zu den von WHITESIDES *et al.* genutzten Sialinsäure-funktionalisierten Polyacrylamiden für die Inhibierung der Bindung von Hämagglutinin des Influenza Virus an Zellen,<sup>[171]</sup> untersuchten USUI *et al.* die Möglichkeit einer Bindungsinhibierung mit Hilfe von Sialyloligosaccharid-funktionalisierten Polyglutaminsäuren.<sup>[172]</sup> Ähnlich dem Polyacrylamid besitzt auch Polyglutaminsäure keine geordnete Struktur, sodass eine Ausrichtung der Liganden erneut nicht möglich war. Jedoch kann im Fall der Polyglutaminsäure die Position der einzelnen Linker, auf Grund der Möglichkeit der Synthese an der festen Phase, kontrolliert gewählt werden. Im Gegensatz zu WHITESIDES *et al.* wurde als Influenza-bindender Ligand nicht die reine Sialinsäure sondern Sialinsäure enthaltene Oligosaccharide verwendet. Dabei ist die Verknüpfung der einzelnen Saccharide untereinander von großer Bedeutung für ihr Bindungsverhalten gegenüber Influenza A und Influenza B.<sup>[173,174]</sup> Die synthetisierten Glykopolymere unterschieden sich jedoch nicht allein in der Struktur der Oligosaccharide, sondern auch in der Anzahl an präsentierten Liganden sowie der Länge des Polymers. Unabhängig vom Virusstamm zeigten die Polymere die besten inhibitorischen Eigenschaften, die sowohl die meisten Oligosaccharide präsentierten als auch das längste Polymerrückgrat besaßen. Einzig auf Grund der Struktur der Liganden zeigten sich Unterschiede in der Bindungsspezifität für einen der drei untersuchten Virusstämme. Vergleichende Untersuchungen mit Polyacrylamiden, die die gleichen Oligosaccharide präsentierten, wiesen ähnliche inhibitorische Fähigkeiten auf. Ein zusätzlich durchgeführter Zytotoxizitätstest zeigte jedoch, dass Polyacrylamide im Gegensatz zu Polyglutaminsäure zelltoxisch ab einer Konzentration von 1000-10000 µg/mL sind. Der große Vorteil von Polyglutaminsäure gegenüber herkömmlichen Polymeren liegt daher weniger in einer höheren Inhibitionskraft sondern vielmehr in der geringeren Zytotoxizität.

Das eine hohe Ligandendichte an einem Polyglutaminsäure-Rückgrat nicht immer von Vorteil ist, konnten KILICK *et al.* anhand der Bindung an das Cholera Toxin nachweisen.<sup>[175]</sup> Im Gegensatz zu Influenza Viren, die den mit Sialinsäure bzw. Sialyloligosacchariden wechselwirkenden Rezeptor Hämagglutinin statistisch auf ihrer Oberfläche verteilt haben, befinden sich die fünf Bindungstaschen des Cholera Toxins in einem definierten Abstand zueinander. Dies hatte zur Folge, dass von den untersuchten Glykopolyglutaminsäuren solche am besten an das Toxin binden konnten, die den geringsten Galaktoseanteil besaßen (12 % Galaktoseanteil:  $IC_{50}=0.158$  mM; 53 % Galaktoseanteil:  $IC_{50}=14$  mM), da bei ihnen der Abstand zwischen den Liganden ausreichend groß war, um in die Bindungstaschen zu passen. Eine Erhöhung des Galaktoseanteils würde dagegen eine sterische Behinderung darstellen und die Bindung schwächen.

### 2.5.3. $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptide als Gerüststruktur

Während dendritische und zyklische Peptide in den meisten Fällen keinerlei Sekundärstruktur ausbilden und folglich die Präsentation der Liganden nur bedingt gerichtet ist, können auch peptidische Gerüststrukturen mit einer gerichteten Präsentation synthetisiert werden. Dafür ist jedoch eine strukturelle Regelmäßigkeit, wie sie durch Ausbildung einer Sekundärstruktur entsteht, essentiell. Neben  $\alpha$ -helikalen Strukturen kommen daher auch  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptide in Betracht. Bei  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptiden beruht das Prinzip in den meisten Fällen auf der Verlängerung der selbstorganisierenden Domäne mit dem gewünschten Liganden, welche meist mit dem N-Terminus der selbstorganisierenden Domänen verknüpft werden (Abbildung 18).<sup>[176]</sup> Diesem Prinzip folgend synthetisierten COLLIER *et al.* Peptide an der festen Phase, die sich in wässrigem Medium zu  $\beta$ -Faltblatt-reiche Fasern organisieren.<sup>[177]</sup> Über einen Tetrapeptid-Linker war das  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptid mit einem kurzen 17 Aminosäure Fragmentabschnitts des Proteins Ovalbumin verbunden, welches die Funktion eines Epitops einnimmt. Epitope werden in der Immunologie verwendet, um eine Immunantwort durch verstärkte Produktion von Antikörpern zu induzieren.<sup>[178]</sup> Auch in Gegenwart des Peptidliganden konnte die Bildung von  $\beta$ -Faltblättern beobachtet werden. Um eine Immunantwort auszulösen,

wurden die Peptide anschließend subkutan in Mäuse induziert. Wie sich herausstellte, zeigte weder das  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptid ohne Epitop noch das freie Epitop eine entsprechende Immunantwort. Erst die multivalente Präsentation des Epitops auf der Faseroberfläche bewirkte eine Immunantwort, die durch eine Konzentrationserhöhung an Antikörpern nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 18:** Sequenzen des  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Peptids mit und ohne terminal gebundenen Liganden, das in wässrigem Medium  $\beta$ -Faltblätter bildet.<sup>[177]</sup>

Neben der Präsentation eines Liganden an der Oberfläche des  $\beta$ -Faltblatts, der direkt mit dem Zielmolekül wechselwirken soll, können an der Oberfläche auch Liganden gebunden haben, die beispielsweise den Transport in Zellen ermöglichen. LEE *et al.* nutzten ein Fragment des zellpenetrierenden Proteins Tat, welches auch für die Endozytose des HI Virus verantwortlich ist,<sup>[179]</sup> und verknüpften es über einen kurzen Linker mit dem  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Peptid T $\beta$ P.<sup>[180]</sup> Das erhaltene Peptid lag in wässrigem Medium ungefaltet vor. Erst die Zugabe von Salzen wie Natriumchlorid führte zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt-reichen Fasern. Diese Eigenschaft des Peptids wurde ausgenutzt, um hydrophobe Moleküle im Inneren der Fasern aufzunehmen und zu speichern. Die beladenen Fasern waren auf Grund des multivalent auf der Oberfläche präsentierten zellpenetrierenden Peptids in der Lage die Zellmembran zu passieren und anschließend die eingeschlossenen Moleküle freizusetzen. Der Vergleich mit dem monomeren Peptid ergab, dass die Endozytoserate um den Faktor fünf gesteigert werden konnte. Begründet wird dies mit der Tatsache, dass das monomere Peptid ungefaltet vorliegt und sich nicht selbstorganisieren kann. Im Gegensatz dazu kann sich das Peptid im gefalteten Zustand zu Fasern zusammenlagern. Folglich ist

die Konzentration an zellpenetrierendem Peptid an der Oberfläche stark erhöht was eine verbesserte Endozytose zur Folge hat.

Neben eher medizinischen Anwendungsmöglichkeiten können  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptide auch für die Peptid-induzierte Organisation bzw. Aggregation von Nanopartikeln genutzt werden. Durch den Einbau von Liganden oder Ladungen in die regelmäßige Struktur von  $\beta$ -Faltblättern, die für eine Wechselwirkung mit Nanopartikeln in der Lage sind, können  $\beta$ -Faltblätter als Template für die kontrollierte Nanopartikel-Aggregation genutzt werden. Durch den Einbau einer Histidin-reichen Sequenz in die Primärstruktur eines Peptids, welches in der Lage war bei einem pH-Wert von 2.3 eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur zu bilden, war es POCHAN *et al.* möglich, gegensätzlich geladene Nanopartikel in diesen Stellen zu binden.<sup>[181]</sup> Wegen der periodischen Anordnung der Peptide wiederholte sich der Histidin-reiche Abschnitt der Sequenz in einem Abstand von 5.5 nm innerhalb der Peptidfaser. Dies hatte zur Folge, dass sich die Nanopartikel in einem Abstand von ebenfalls 5.5 nm auf der Faseroberfläche anordneten. Auf Grund der elektrischen Abstoßung der Nanopartikel untereinander, konnte trotz höherer Nanopartikel-Konzentrationen nur ein Nanopartikel pro Histidin-Abschnitt binden. Daraus resultierend konnte mittels TEM eine perlenschnurartige Anordnung der Nanopartikel auf der Peptidfaser beobachtet werden.

#### 2.5.4. $\alpha$ -helikale Peptide als Gerüststruktur

Während  $\beta$ -Faltblätter zwar eine gerichtete Präsentation der Liganden erlauben, haben sie jedoch oftmals den Nachteil, dass ein definierter Abstand zweier oder mehrerer Liganden nur in den seltensten Fällen und mit hohem synthetischem Aufwand eingestellt werden kann. Ein weiterer Nachteil von  $\beta$ -Faltblättern ist die Ausbildung von teilweise unlöslichen Fasern, die eine *in vivo* Anwendung nahezu unmöglich machen. Dem gegenüber kann mit Hilfe von  $\alpha$ -Helices bzw.  $\alpha$ -helikalen Aggregaten wie *coiled coils* als Gerüststruktur auch eine gerichtete Präsentation der Liganden erreicht werden. Darüber hinaus bieten sie die Möglichkeit einer kontrollierten Einstellung der Ligandenabstände bei einer geringen Tendenz zur

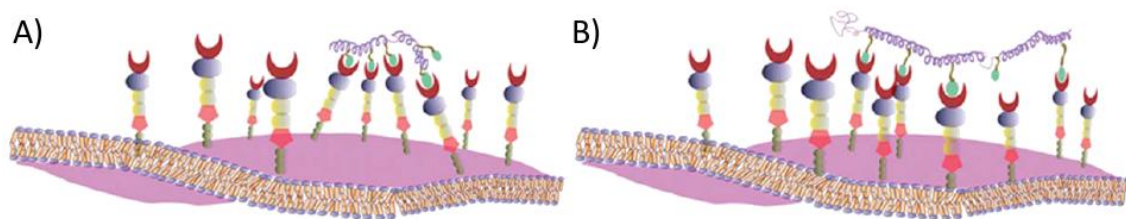
Ausbildung von löslichen oder unlöslichen Fasern. Sie sind damit auch prädestiniert für *in vivo* Anwendungen.

Eine einzelne  $\alpha$ -Helix ist dabei die einfachste Gerüststruktur für eine gerichtete Ligandenpräsentation. Eine solches Galaktose-präsentierendes  $\alpha$ -helikales Peptid nutzten KICK *et al.* für die Wechselwirkung mit dem Cholera Toxin.<sup>[182]</sup> Diese mittels Proteinexpression erhaltenen Alanin-reichen Polypeptide variierten sowohl in der Länge als auch im Funktionalisierungsgrad, welcher über die Anzahl an enthaltenen Glutaminsäuren geregelt werden konnte. Die biologische Aktivität wurde anschließend an Hand von Bindungsstudien an das pentamere Cholera Toxin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das Peptid, welches sechs Galaktose-Liganden in einem Abstand von etwa 35 Å präsentierte, mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 160 µM die besten Bindungseigenschaften besaß. Ein geringerer Abstand von nur 17 Å der Galaktose-Liganden hatte eine signifikante Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Werts auf 3340 µM zur Folge. Dieser Wert konnte zwar durch eine Verdopplung der Liganden auf 725 µM verringert werden, jedoch ist die erreichte Bindungsverstärkung um den Faktor 74 pro Galaktose bedeutend geringer als für die  $\alpha$ -Helix mit längerem Ligandenabstand (Faktor 340). Verglichen mit ungefalteten Polypeptiden ergibt sich unabhängig von der Zahl an Liganden oder deren Abstand zueinander eine bedeutende Bindungsverstärkung, die aus der räumlich gerichteten Präsentation der Liganden resultiert.

Wie vielfältig eine multivalente Gerüststruktur einsetzbar ist, konnten KICK *et al.* an Hand ihrer  $\alpha$ -helikalen Peptidgerüste demonstrieren, indem durch eine minimale Veränderung des bindenden Liganden die Wechselwirkung mit L-Selektinen möglich wurde.<sup>[183]</sup> L-Selektine befinden sich hauptsächlich auf der Oberfläche von Leukozyten, sind für deren Migration aus dem Blutstrom durch die Endothelzellen in das umliegende Gewebe zuständig und fungieren dabei als Adhäsionsmoleküle für die Bindung an Endothelzellen.<sup>[184,185]</sup> Eine Regulation dieser Funktion erfolgt über eine proteolytische Spaltung der L-Selektine, was als *shedding* (engl. Abstoßung, Abfallen) bezeichnet wird.<sup>[186]</sup> Die durch eine multivalente Bindung an L-Selektine induzierte Konformationsänderung wollten KICK *et al.* ausnutzen, um eine Abstoßung der L-Selektine von den Leukozyten zu verursachen. Zu diesem Zweck wurde das bestehende  $\alpha$ -helikale System durch eine Sulfatierung der Galaktose-Liganden modifiziert. Um die Notwendigkeit einer abstandsspezifischen Ligandenpräsentation zu



unterstreichen, wurden zusätzlich Peptide genutzt, die nicht in der Lage waren Sekundärstrukturen auszubilden. Es wurde nachgewiesen, dass weder das Peptidrückgrat ohne Liganden noch der freie, ungebundene Ligand in der Lage waren eine Abstoßung zu induzieren. Weiterhin wurde auch für das ungefaltete ligandenpräsentierende Peptid sowie für  $\alpha$ -helikale Peptide, deren Liganden in einem Abstand von 35 Å am Peptidrückgrat angebracht waren, keine Aktivität beobachtet werden. Lediglich die  $\alpha$ -helikalen Peptide, die einen Ligandenabstand von etwa 17 Å aufwiesen, konnten ein Ablösen auf Grund einer Konformationsänderung der L-Selektine einleiten. Dieses Verhalten wird damit begründet, dass ein Abstand von 35 Å zwischen zwei Liganden keine ausreichend starke Konformationsänderung der L-Selektine hervorruft, sodass keine Abspaltung von den Leukozyten beobachtet werden konnte.

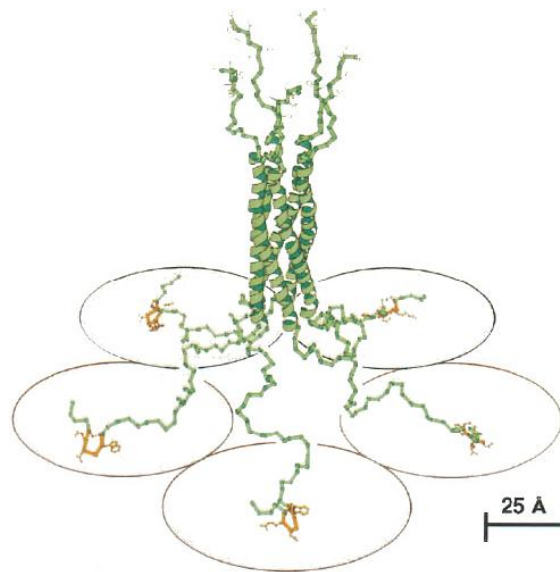


**Abbildung 19:** Bindung der  $\alpha$ -helikalen Peptide an L-Selektine bei einem kleinen Abstand zwischen den Liganden (a) und einem großen Abstand zwischen den Liganden (b).

Während die von KICK *et al.* verwendete  $\alpha$ -Helix ein künstlich konstruiertes Peptid nicht natürlichen Ursprungs ist, ist auch eine Nutzung natürlich vorkommende Peptidfragmente aus Proteinen möglich. Dazu zählt das aus 33 Aminosäuren bestehende Ankyrin Fragment, welches als Sekundärstruktur zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices sowie eine  $\beta$ -Schleife ausbildet.<sup>[187]</sup> Ankyrin gehört wie das Tetratricopeptid<sup>[188]</sup> oder das Armadillo-Fragment<sup>[189]</sup> zu den sich mehrfach nacheinander wiederholenden Proteinfragmenten, welche in etwa 14 % der bekannten Proteine vorkommt.<sup>[190]</sup> Durch Wiederholung eines Fragments entstehen ausgedehnte Strukturen verschiedenster Größe, welche auch als Gerüststruktur für eine multivalente Ligandenpräsentation Verwendung finden. ROBERTS *et al.* modifizierten einen vom hydrophoben Kern abgewandten Bereich der ersten und

letzten  $\beta$ -Schleifen des tetrameren Ankyrinpeptids, um an dieser Position eine posttranslationale Modifikation durchzuführen.<sup>[191]</sup> Durch den Einbau eines Cysteins an diesen Stellen, konnten zwei Mannose-Liganden in einem Abstand von 25 Å zueinander über einen Maleimid-Linker an das Peptidgerüst gebunden werden. Anschließend wurde an Hand der Wechselwirkung mit tetrameren Concanavalin A eine mögliche biologische Aktivität der synthetisierten Peptide überprüft. Mittels dynamischer Lichtstreuung war schon nach kürzester Zeit ein Anstieg der Partikelgröße von 7 nm für Concanavalin A auf über 100 nm zu beobachten, was auf eine Peptid-induzierte Vernetzung einzelner Con A Tetramere mit einhergehender Aggregation zurückzuführen ist.

Die multivalente Ligandenpräsentation muss jedoch nicht zwingend über ein Polypeptid erfolgen. Da die Bindung eines Liganden an ein  $\alpha$ -helikales Peptid in den meisten Fällen zu einer Schwächung der  $\alpha$ -Helix führt, ist die Anzahl an möglichen Liganden je Peptid limitiert. Ähnlich der DNA können sich  $\alpha$ -helikale Peptide jedoch zu höher geordneten Systemen zusammenlagern, den sogenannten *coiled coils*. Da die *coiled coil* Bildung eine Stabilisierung der Sekundärstruktur darstellt, ist es grundsätzlich möglich eine höhere Ligandendichte zu erzeugen bei unterschiedlichsten Ausrichtungen im Raum. Das im Knorpel vorkommende Knorpel-Matrix-Protein (*cartilage oligomeric matrix protein*; COMP), das ein pentameres *coiled coil* bildet, nutzten KAJAVA *et al.* für die multivalente Präsentation eines peptidischen Liganden, der an die variable Region des Immunglobulin M (IgM) Antikörpers, der auf der Oberfläche von BCL1 Zellen lokalisiert ist, bindet (Abbildung 20).<sup>[192]</sup> Jedoch wurde lediglich ein 55 Aminosäuren langes Fragment, das für die *coiled coil* Bildung verantwortlich ist, genutzt. Die Struktur des am besten an IgM bindenden Peptids wurde mittels *phage display* bestimmt und die DNA Sequenz für dieses Peptidfragment in das COMP kodierende Plasmid kloniert. Bindungsexperimente an auf BCL<sub>1</sub> Zellen immobilisierten IgM ergaben einen um den Faktor  $2 \cdot 10^5$  kleineren IC<sub>50</sub>-Wert des pentavalenten *coiled coils* (2 nM) im Vergleich zu dem monomeren Peptidliganden (200  $\mu$ M).

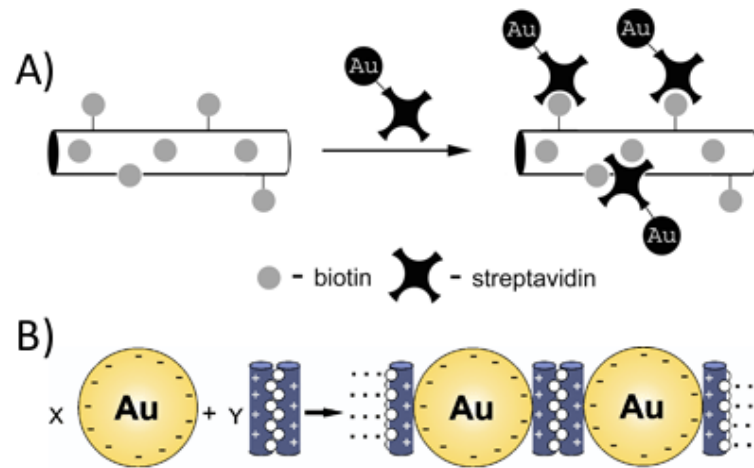


**Abbildung 20:** Struktur des Knorpel-Matrix-Protein Fragments (COMP). Das Protein bildet ein pentameres *coiled coil* und besitzt an seinem N-Terminus die mit dem Rezeptor wechselwirkende Peptidsequenz.

Die multivalente Ligandenpräsentation an  $\alpha$ -helikalen Peptiden kann auch im Bereich der Materialwissenschaften genutzt werden. Dabei wird durch gezielte Funktionalisierung von Nanopartikeln eine Aggregation bzw. Organisation der Nanopartikel mit Hilfe von Peptiden induziert. Die erhaltenen Hybridmaterialien zeichnen sich durch neuartige bzw. veränderte Eigenschaften verglichen mit den einzelnen Nanopartikeln aus.<sup>[98]</sup> In Abhängigkeit von der Quartärstruktur der Peptide ergeben sich dabei unterschiedliche Anordnungen der Nanopartikel. Um eine Nanopartikel-Organisation zu induzieren kann neben der Nutzung von elektrostatischen Anziehungskräften, die durch gegensätzliche Ladungen erzeugt werden, auch die selektive Wechselwirkung zwischen Akzeptor-Rezeptor Paaren genutzt werden. So modifizierten WOOLFSON *et al.* ein Faser-bildendes *coiled coil* Peptid mit Biotin, das über einen Linker an die f-Position des Peptids gebunden wurde.<sup>[193]</sup> Biotin, auch unter dem Namen Vitamin B7 bekannt,<sup>[194]</sup> zeichnet sich durch seine sehr hohe Bindungsaffinität zu dem Protein Streptavidin aus. Durch Immobilisierung von Streptavidin auf der Oberfläche der Gold-Nanopartikel konnten die Biotin-präsentierenden Peptidfasern mit den Nanopartikel wechselwirken. Dabei kam es zu einer Organisation der Nanopartikel durch Anordnung auf der Peptidfaser.

Das von WOOLFSON *et al.* beschriebene Konzept der Nanopartikel-Organisation besitzt jedoch einen entscheidenden Nachteil, da eine Reversibilität der Nanopartikel-

Organisation nicht möglich ist. Demgegenüber konnten KOKSCH *et al.* eine reversible Organisation von Gold-Nanopartikeln mit Hilfe eines trimeren *coiled coil* Peptids zu größeren Aggregaten beobachten.<sup>[195]</sup> Die Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel wurde dabei über elektrostatische Anziehungskräfte realisiert, da das *coiled coil* bildende Peptid auf Grund mehrerer Arginine in f-Position über eine positive Nettoladung bei einem pH-Wert von 9 verfügte, während die Nanopartikel durch terminale Carboxylatgruppen ihrer stabilisierenden Liganden eine negative Gesamtladung besaßen. Dies hatte zur Folge, dass schon in Gegenwart einer geringen Peptidkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine messbare Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV-Vis Spektrum detektiert werden konnte, die auf eine Zusammenlagerung der Nanopartikel hindeutet. Diese Annahme konnte anschließend mittels Kryo-TEM bestätigt werden, wobei die erhaltenen Aggregate eher ungeordnet vorlagen. Im Gegensatz zu der von WOOLFSON *et al.* erzielten Nanopartikel-Organisation konnten KOKSCH *et al.* zusätzlich eine Reversibilität der Aggregation in Abhängigkeit vom pH-Wert nachweisen. Durch Protonierung der Arginin-Seitenkette bei einem stark basischen pH-Wert, wurde eine negative Peptidnettoladung erhalten. In Folge dessen kam es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Peptid und Nanopartikel und einer damit einhergehenden Auflösung der Aggregate. Darüber hinaus konnten KOKSCH *et al.* die Notwendigkeit der räumlichen Ausrichtung der für die Nanopartikel-Wechselwirkung notwendigen Aminosäure Arginin beweisen. Dafür wurde ein Kontrollpeptid synthetisiert, welches zwar über dieselbe Aminosäurezusammensetzung aber eine veränderte Reihenfolge verfügte. Daraus resultierend konnte das Peptid keine Sekundärstruktur ausbilden, wodurch eine räumliche Ausrichtung der Argininseitenketten nicht möglich war. Da das Kontrollpeptid nicht in der Lage war eine Zusammenlagerung der Nanopartikel zu induzieren, schlussfolgerten KOKSCH *et al.*, dass für eine Nanopartikel-Aggregation nicht nur eine grundsätzlich positive Nettoladung des Peptids notwendig ist, sondern vielmehr auch deren Positionierung und Ausrichtung im Raum und damit ihre Zugänglichkeit für eine Interaktion mit Nanopartikeln.



**Abbildung 21:** Nanopartikel-Aggregation an Peptidfasern auf Grund der selektiven Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin (A) und Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation basierend auf elektrostatischen Anziehungskräften (B).



### 3. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Möglichkeiten einer Nutzung von *coiled coil* Peptiden als multivalente Gerüststruktur für die Präsentation von Ladungen und Liganden aufzuzeigen. In vorherigen Arbeiten konnte bereits die kontrollierte und reversible Aggregation von Gold-Nanopartikeln mit Hilfe der multivalenten Präsentation von geladenen Aminosäuren in einem *coiled coil* Peptid beschrieben werden. Auf diesen Arbeiten aufbauend sollte im ersten Teil dieser Dissertation die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und *coiled coil* Peptiden genauer untersucht werden. Dazu sollten Peptide mit variablen Sequenzlängen und einer unterschiedlichen Anzahl an geladenen Aminosäuren synthetisiert und die Auswirkung dieser Veränderungen auf die Nanopartikel-Aggregation, auch hinsichtlich thermodynamischer Parameter, untersucht sowie die Frage beantwortet werden, ob eine Verlängerung des Peptids bei gleichbleibender Zahl an Ladungen die Nanopartikel-Aggregation beeinflusst. Darüber hinaus sollten auch die eventuell daraus resultierenden Änderungen in der Struktur der Nanopartikel-Aggregate studiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Nutzung von *coiled coil* Peptiden für die divalente Präsentation von Peptidliganden für die Interaktion mit Tandem SH<sub>2</sub>-Domänen studiert werden. Während Oligonukleotide schon in vielen Fällen für die Strukturaufklärung genutzt wurden, wurden Peptide bisher nicht genutzt. Dabei eignen sich speziell *coiled coil* Peptide auf Grund der kurzen Abstände zwischen den einzelnen Aminosäuren (Anstieg pro Aminosäuren: 0.15 nm gegenüber Anstieg pro DNA-Base: 0.34 nm) sehr viel besser für die Strukturaufklärung, da damit die Abstände zwischen Liganden sehr viel genauer eingestellt werden können. Das Hauptaugenmerk lag daher in der Untersuchung des Einflusses der Ligandenabstände auf das Bindungsverhalten. In diesem Zusammenhang sollte auch geprüft werden, ob die relativ starre Struktur des *coiled coil* Peptids oder eher ein flexibles Rückgrat wie in einem *random coil* Peptid von Vorteil für die Ligandenpräsentation ist





## 4. Methoden

### 4.1. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine leistungsfähige biophysikalische Methode, die zur Bestimmung von thermodynamischen Parametern chemischer oder biochemischer Reaktionen bzw. intermolekularen Wechselwirkungen, wie der Bindung von Nanopartikeln an Peptiden, eingesetzt wird.<sup>[196]</sup> Mit Hilfe dieser Messmethode kann die Bindungsaffinität ( $K_B$ ), Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ) und Bindungsstöchiometrie ( $n$ ) der untersuchten Reaktion bestimmt werden. Zusätzlich geben auf Grundlage der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (1) die erhaltenen Parameter Rückschluss auf die Gibbs'sche Enthalpie ( $\Delta G$ ) sowie die Entropie ( $\Delta S$ ):<sup>[197]</sup>

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

wobei  $R$  die Gaskonstante und  $T$  die Temperatur ist. Damit bietet es ein großes Anwendungsspektrum für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei Reaktanden.

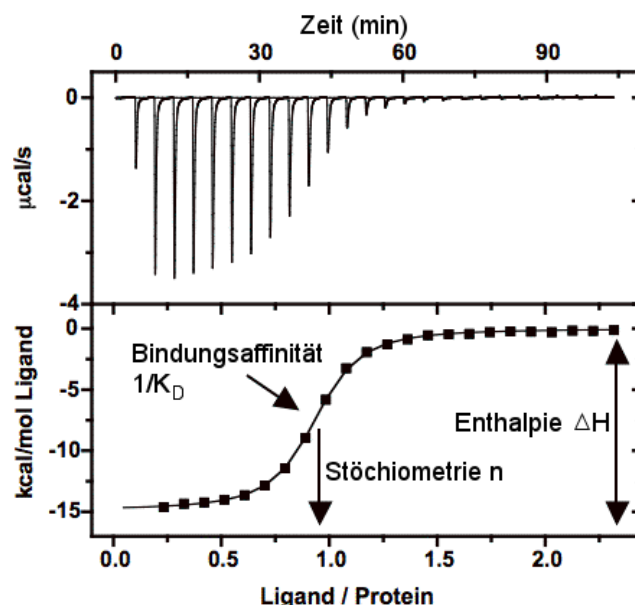
Ein isothermaler Titrationskalorimeter besteht aus zwei identischen, hoch wärmeleitenden, adiabatischen Zellen; der Probenzelle, in der die zu untersuchende Reaktion stattfindet, und der Referenzzelle, die mit Wasser oder Puffer gefüllt ist. Beide Zellen werden anfangs mit konstanter Leistung auf einen bestimmten Wert temperiert. Während einer typischen ITC Messung wird schrittweise ein Reaktant in die Probenzelle injiziert, die den anderen Reaktanten beinhaltet. Durch die Injektion kommt es im Inneren der Zelle zu einer Reaktion, die entweder Energie in Form von Wärme verbraucht (endotherm) oder erzeugt (exotherm). Mittels eingebauter Halbleiter Thermolemente können diese kleinsten Temperaturschwankungen detektiert werden. Auf diese Schwankungen reagiert das System, indem es die Temperaturunterschiede durch Aufwendung von Energie kompensiert, um beide Zellen wieder in ein thermisches Gleichgewicht zu bringen. Der eigentlich gemessene Wert ist daher die zeitabhängige Energiezufuhr ( $\mu\text{cal/s}$ ), reguliert durch den Heizmechanismus der Probenzelle, welche benötigt wird, um die Temperatur auf dem

Niveau der Referenzzelle zu halten. Dabei ist die Wärme ( $q_i$ ), welche durch die Injektionen freigesetzt oder verbraucht wird, proportional zu der Menge an Ligand, der während einer einzelnen Injektion an den Rezeptor ( $v\Delta L_i$ ) bindet, sowie der molaren Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ).<sup>[198]</sup> Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$q_i = v \cdot \Delta L_i \cdot \Delta H \quad (2)$$

wobei  $\Delta L_i$  die Änderung der Konzentration des Liganden nach der i-ten Zugabe und  $v$  das Volumen in der Probenzelle ist.

Die gemessenen Rohdaten werden als eine Reihe von Peaks ( $\mu\text{cal/s}$ ) über der Zeit aufgetragen (Abbildung 22). Im Allgemeinen ist während der ersten Injektionen die höchste Wärmefreisetzung zu verzeichnen, wie in Abbildung 22 für eine exotherme Reaktion dargestellt, da alle injizierten Ligandenmoleküle an freie Rezeptoren binden können. Da im Laufe der Titration immer mehr Bindungsstellen besetzt sind, nimmt die Wärmeentwicklung pro Injektion ab, bis alle Bindungsstellen belegt sind. Eine gegebenenfalls noch auftretende Wärmefreisetzung resultiert nun lediglich aus der Verdünnungswärme des Liganden.



**Abbildung 22:** Idealisierter Kurvenverlauf einer ITC Messung. Die nach Integration der Peaks erhaltene Isotherme gibt an Hand des Anstiegs im Wendepunkt Aufschluss über die Bindungskonstante.

Nach Integration der erhaltenen Peaks wird die Bindungsisotherme erhalten, aus deren Verlauf die Bindungsaffinität  $K_B$  (wobei gilt:  $K_B = 1/K_D$ ), Bindungsenthalpie  $\Delta H$  und Stöchiometrie  $n$  abgelesen werden kann. Zur Beurteilung der Messergebnisse dient der Wiseman  $c$  Parameter, der als eine Art Qualitätsmerkmal für den Verlauf der Bindungsisotherme angesehen kann.<sup>[199]</sup> Dieser ist sowohl von der Bindungsaffinität als auch der Konzentration an Bindungsstellen abhängig gemäß folgender Gleichung (3):

$$c = n \cdot [M] \cdot K_b \quad (3)$$

wobei  $[M]$  die Gesamtkonzentration an Rezeptoren,  $n$  die Anzahl der Bindungsstellen pro Rezeptor und  $K_b$  die Bindungskonstante ist. Werte für den Wiseman  $c$  Parameter zwischen 10 und 500 werden als ideal angesehen,<sup>[200-202]</sup> da in diesem Bereich die Kurve sigmoidal verläuft. Während sich die Kurve für kleinere  $c$ -Werte immer mehr bis zu einer Geraden abflacht und eine genaue Bestimmung der thermodynamischen Parameter unmöglich macht, ist der Kurvenverlauf für  $c$ -Werte größer 500 zwar noch immer sigmoidal, jedoch ist der Anstieg so groß, sodass eine genaue Bestimmung des Wendepunkts der Kurve und damit der Bindungskonstante extrem erschwert wird.

Die ITC Daten, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden mittels der *one-set of binding* Methode angepasst, bei der davon ausgegangen wird, dass nur eine Art der Bindungsmöglichkeit für die Temperaturveränderungen verantwortlich ist.

#### 4.2. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

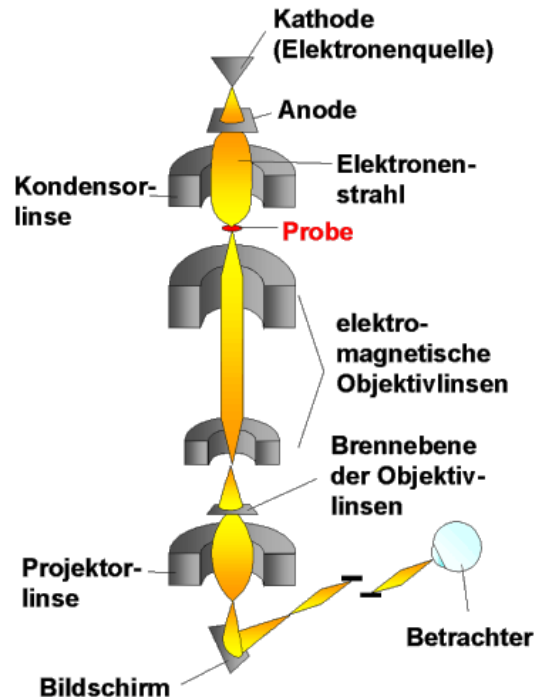
Die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) ist eine der wichtigsten Möglichkeiten der Charakterisierung von Nanopartikeln hinsichtlich ihrer Größe und Anordnung sowie für die Visualisierung von Peptidstrukturen.

Der prinzipielle Aufbau eines Elektronenmikroskops ähnelt sehr stark dem eines Lichtmikroskops.<sup>[203,204]</sup> Jedoch werden neben der unterschiedlichen Lichtquelle anstatt von Glaslinsen magnetische Linsen verwendet. Die Emission der Elektronen erfolgt über eine aus Wolfram oder Lanthanhexaborid ( $\text{LaB}_6$ ) bestehende Kathode.<sup>[205]</sup> Der mittels thermischer Emission erzeugte Elektronenstrahl muss dabei eine hohe Kohärenz, also eine geringe Phasenverschiebung, besitzen. Mit Hilfe einer

Beschleunigungsspannung, die in der Regel bei 100 kV liegt, werden die emittierten Elektronen durch eine nachgeschaltete Anode beschleunigt und mittels Kondensorlinsen fokussiert. Da die Auflösung des Mikroskops von der Wellenlänge des Elektronenstrahls abhängig ist, ist das Mikroskop mit einem sehr sensitiven Vakuumsystem ausgestattet, um elastische Stöße zwischen Elektronen und Luftmolekülen zu vermeiden und eine größtmögliche Beschleunigung der Elektronen zu erzielen. Dies ist notwendig, da mit steigender Geschwindigkeit die Wellenlänge der Elektronen sinkt. So kann bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV eine Wellenlänge von 0.0037 nm erreicht werden. Damit ist eine maximale Auflösung von weniger als 0.05 nm sowie eine 100000-fache Vergrößerung erreichbar.<sup>[206]</sup> Dieser Zusammenhang wird durch Gleichung (4) dem Abbe'schen Gesetz verdeutlicht, wobei  $n \cdot \sin \alpha$  die numerische Apertur,  $d$  die maximale Auflösung und  $\lambda$  die Wellenlänge des Elektronenstrahls ist:

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad (4)$$

Das Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe hat eine Streuung der Elektronen zur Folge, welche abhängig ist von der Ordnungszahl der Elemente. Grundsätzlich gilt, dass Elemente niedriger Ordnungszahl den Elektronenstrahl weniger stark streuen und mehr Elektronen die Probe ungehindert durchdringen. Durch nachgeschaltete Blenden wird sicher gestellt, dass lediglich nicht gestreute Elektronen passieren können, mittels Objektivlinsen fokussiert werden und mit Hilfe mehrerer Linsensysteme, wie der Projektionslinse, vergrößert. Zur Visualisierung trifft der Elektronenstrahl anschließend auf das Abbildungssystem, bei dem es sich um einen Fluoreszenzschirm oder eine Photoemulsion handeln kann.



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung des Verlaufs des Elektronenstrahls und der wichtigsten Bestandteile eines TEMs.

Allerdings ist für eine aussagekräftige TEM-Aufnahme nicht nur die Vergrößerung und Auflösung von Bedeutung, sondern auch der Kontrast der Probe, der von den Streueigenschaften abhängt. Da biologische Proben zu einem großen Anteil aus leichten Elementen mit geringer Massendichte wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel zusammengesetzt sind, die nur ein geringes Streuvermögen besitzen, ist der erhaltene Kontrast sehr schwach. Demgegenüber sind speziell Schwermetalle wie Gold, Uran oder Wolfram in der Lage, auf Grund ihrer hohen Ordnungszahl und Massendichte, die Elektronen stärker zu streuen und damit einen guten Kontrast zu liefern. Dies wird ausgenutzt, indem biologische Proben mit Metallionen beschichtet werden, um diese sichtbar zu machen. Dieses Verfahren wird als *negative staining* bezeichnet. Dafür wird die wässrige biologische Probe auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfergrid aufgebracht und für etwa 1 Minute inkubiert, um eine Adsorption zu ermöglichen. Nach Entfernen des wässrigen Überstands, wird auf das Grid ein Tropfen der Färbelösung aufgetragen, erneut für 1 Minute inkubiert und mit Filterpapier entfernt. Während der TEM Messung ergibt sich der beobachtete Kontrast aus der Streuung an den Metallionen, welche die Probe komplett bedeckten

und somit die Oberflächenstruktur abbilden. Das Verfahren des *negative staining* birgt jedoch einige Nachteile, die beachtet werden müssen. Da die wässrigen Färbelösungen aus Metallionen bestehen, muss bei der Auswahl auf die Gesamtladung der biologischen Probe geachtet werden. Zusätzlich sollte der pH-Wert der Färbelösung im Bereich der Probe liegen, da dieser andernfalls die Struktur der zu untersuchenden Probe verändern kann. Ein weiterer Nachteil liegt im Trocknen der Probe. Dadurch wird die Hydrathülle um die Probe entfernt, was die native Struktur der Probe verändern kann. Deshalb wird versucht durch Zugabe von Trehalose die Struktur der biologischen Probe während des Trockenvorgangs zu erhalten.<sup>[207]</sup>

Eine weitere Möglichkeit Veränderungen in der Struktur der Probe zu verhindern liegt in der Kryo-Präparation der Probe, die jedoch sehr aufwendig ist und viel Erfahrung voraussetzt.<sup>[208,209]</sup> Dafür wird nach dem Auftragen der Probe und einer 1 minütigen Inkubationszeit nur soviel Probenüberstand entfernt, dass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Grid zurück bleibt. Anschließend wird das Grid mit einer Vorrichtung, die einer Guillotine ähnelt, in verflüssigtes Ethan getaucht. Im Gegensatz zu Stickstoff besitzt flüssiges Ethan eine Kühlrate von 100000 K/s, was zur Folge hat, dass eine Kristallisation der Wassermoleküle verhindert wird und es stattdessen einen amorphen Zustand behält. Dieser Umstand ist von immenser Bedeutung, da kristallines Wasser ebenfalls die Elektronen streut und die Probe für eine TEM Messung unbrauchbar macht. Auf Grund des amorphen, Glas-ähnlichen Zustands des Wassers wird dieser Vorgang auch als Vitrifizieren bezeichnet. Durch das Vitrifizieren der Probe kann jedoch die native Struktur der Probe erhalten und mittels Kryo-TEM untersucht werden. Basierend auf Aufnahmen, die mittels Kryo-TEM erhalten wurden, ist es anschließend möglich, dreidimensionale Strukturen der Proben zu erstellen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten TEM und Kryo-TEM Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln wurden, auf Grund ihrer guten Streueigenschaften, ohne Zusatz von Färbereagenzien erhalten. Die Charakterisierung einzelner Peptide mittels TEM erfolgte nach einer Färbung mit Phosphorwolframsäure (PTA), wohingegen Kryo-TEM Messungen der Peptide und Peptid-Nanopartikel-Komplexe ohne eine Färbung durchgeführt wurden.

### 4.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist, neben der NMR-Spektroskopie und der Röntgenkristallstrukturanalyse, eine der gängigsten Methoden zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen in Lösung.<sup>[210]</sup> Während bei linear polarisiertem Licht der elektrische Feldvektor  $E$  nur in einer Ebene schwingt, rotieren ihre Feldvektoren ( $E_L$  und  $E_R$ ) bei zirkular polarisiertem Licht gegensinnig um ihre Ausbreitungsrichtung. Da optisch aktive Medien unterschiedliche Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$  für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht besitzen und damit das Licht unterschiedlich stark absorbieren, ändert sich die Intensität und Ausbreitungsgeschwindigkeit des links- bzw. rechtspolarisierten Lichts, während es die optisch aktive Probe passiert. Das Prinzip beruht daher auf der unterschiedlichen Absorption von rechts- bzw. linkszirkular polarisiertem Licht einer optisch aktiven, chiralen Probe in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Die unterschiedliche Absorption von beiden kreispolarisierten Wellenanteilen führt zu elliptischer Polarisation sowie einer Drehung  $\alpha$  der Polarisationssebene, auf Grund des verursachten Phasenunterschieds, im austretenden Licht (Abbildung 24). In Analogie zur Absorptionsspektroskopie benutzt die CD-Spektroskopie die Differenz der Extinktionskoeffizienten  $\Delta\varepsilon$  zur Beschreibung der Absorption des rechts- und linkszirkularpolarisierten Lichts. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt:

$$\Delta E = E_L - E_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (5)$$

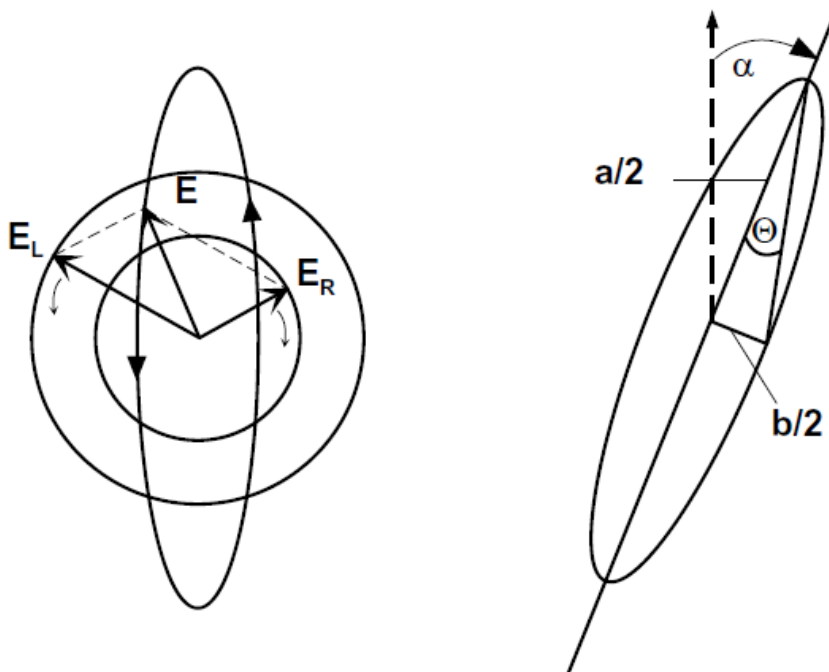
wobei  $c$  die Konzentration der Probe und  $d$  die optische Weglänge ist. Obwohl die Differenz der Extinktionskoeffizienten  $\Delta\varepsilon$  der gemessene Wert ist, werden aus historischen Gründen die Messungen als Grad der molaren Elliptizität  $[\Theta]$  ausgegeben, die über folgende Gleichungen zusammenhängen:

$$\Theta = \Delta E \cdot \left(\frac{\ln 10}{4}\right) \cdot \left(\frac{180}{\pi}\right) = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \cdot \left(\frac{\ln 10}{4}\right) \cdot \left(\frac{180}{\pi}\right) \quad (6)$$

$$[\Theta] = \frac{100 \cdot \Theta}{c \cdot d} = 100 \cdot \left( \frac{\ln 10}{4} \right) \cdot \left( \frac{180}{\pi} \right) \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) = 3298.21 \cdot \Delta\varepsilon \quad (7)$$

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen untereinander, wird die molare Elliptizität in Abhängigkeit der optischen Weglänge  $l$ , der Anzahl an Aminosäuren  $n$  und Konzentration  $c$  verwendet, die den durchschnittlichen Betrag der einzelnen Aminosäure am Gesamtsignal ausdrückt:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{[\Theta]}{10000 \cdot l \cdot c \cdot n} \quad (8)$$

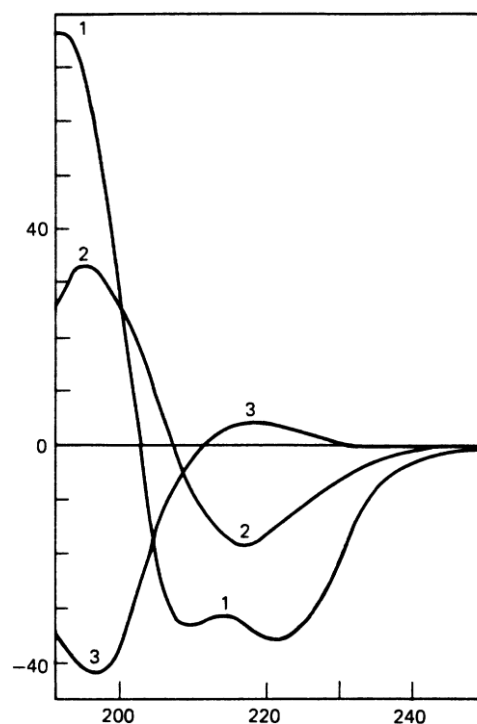


**Abbildung 24:** Erzeugung von zirkular polarisiertem Licht. Elliptisch polarisiertes Licht (Vektor  $E$ ) entsteht durch die Überlagerung eines links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls (Vektoren  $E_L$  und  $E_R$ ) ungleicher Intensität. Das Maß für den Zirkulardichroismus ist die Elliptizität  $\Theta$ , die als Tangens vom Verhältnis der kleinen ( $b/2$ ) zur großen ( $a/2$ ) Ellipsenachse definiert ist.<sup>[211]</sup>

Da mit Ausnahme von Glycin alle Aminosäuren als Enantiomere auftreten, eignen sie sich für den Einsatz in der CD-Spektroskopie. Das mit Abstand wichtigste Chromophor in Peptiden und Proteinen ist jedoch die Aminosäuren-verknüpfende Peptidbindung. Im kurzwelligen UV Bereich ( $\lambda = 190\text{-}250$  nm) besitzt die Peptidbindung mit dem



schwachen und verbreitertem  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 220 nm und dem intensiven  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 190 nm zwei charakteristische Absorptionsbanden.<sup>[212]</sup> Auf Grund der Unterschiede in der Geometrie der Peptidbindung zwischen den verschiedenen Sekundärstrukturen kommt es zu charakteristischen Verschiebungen der Bandenlage, mit Hilfe derer eine Aussage über die Sekundärstruktur eines unbekanntes Peptids oder Proteins getroffen werden kann. So werden für ein ungefaltetes Peptid eine stark ausgeprägte negative Bande bei 195 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) sowie eine sehr schwache, verbreiterte Bande bei etwa 215 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) beobachtet. Demgegenüber besitzt das  $\beta$ -Faltblatt eine positive Bande bei etwa 195 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) sowie eine markante negative Bande bei etwa 216 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ). Während diese beiden Sekundärstrukturen nur zwei Banden aufweisen, besitzt die  $\alpha$ -Helix drei charakteristische Banden im CD-Spektrum; auf Grund einer Excitonen-Kopplung kommt es zu einer Aufspaltung der  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergangs in einen senkrecht polarisierten Übergang, der eine positive Bande bei etwa 192 nm verursacht, sowie einen parallel polarisierten Übergang, der eine negative Bande bei etwa 208 nm zur Folge hat. Außerdem senkt die Excitonen-Kopplung die Energie des  $n \rightarrow \pi^*$  Übergangs, sodass eine Rotverschiebung der Bande hin zu 222 nm erfolgt (Abbildung 25)



**Abbildung 25:** Idealisiertes CD-Spektrum von in Peptiden auftretenden Sekundärstrukturen: 1)  $\alpha$ -Helix, 2)  $\beta$ -Faltblatt und 3) *random coil*.

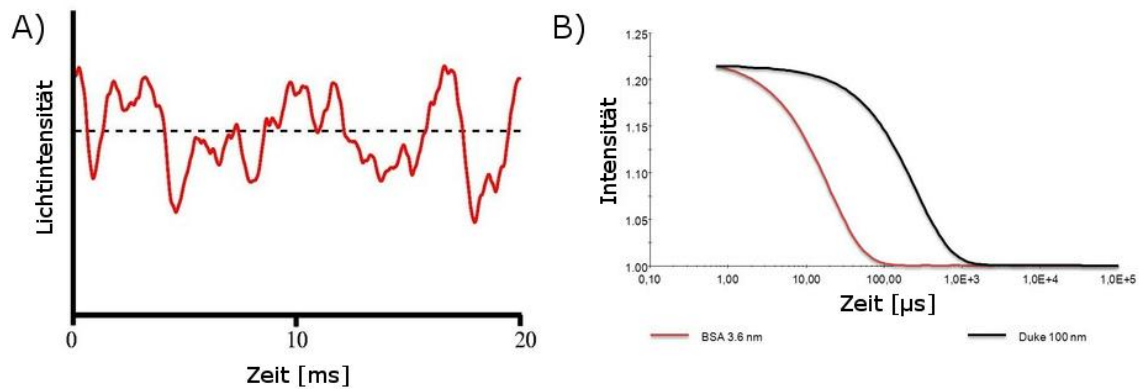
#### 4.4. Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als quasielastische Lichtstreuung bezeichnet, ist eine der wichtigsten Methoden um die Größe und Größenverteilung von Nanopartikeln oder Polymeren zu bestimmen. Im Gegensatz zur Transmissions-Elektronen-Mikroskopie wird hierbei jedoch der hydrodynamische Durchmesser  $D_h$  bestimmt.<sup>[213,214]</sup>

Unter der Bedingung, dass sich einzelne Teilchen in einer Lösung unabhängig voneinander im Medium bewegen können, können mit Hilfe die Stokes-Einstein Gleichung genaue Information über die Partikelgröße erhalten werden, da der während der DLS Messung erhaltene Diffusionskoeffizient  $D$  antiproportional zum Teilchendurchmesser ist.<sup>[215]</sup> Es gilt folgender Zusammenhang:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (9)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die Temperatur,  $\eta$  die dynamische Viskosität und  $R_H$  der hydrodynamische Radius ist. Um die Diffusionskonstante zu erhalten, wird bei der dynamischen Lichtstreuung die zeitliche Änderung der Streulichtintensität gemessen. Dafür wird Laserlicht durch die zu untersuchende Probe geschickt, welches an den Teilchen gestreut wird. Dabei kann Interferenz zwischen den gestreuten Lichtwellen auftreten. Da sich auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung die Orientierung und der Abstand der Teilchen mit der Zeit ändern, kommt es zu Veränderungen im Interferenzmuster und damit zu einer Intensitätsfluktuation. Die Fluktuation der Lichtintensität  $I(t)$  ist umso schneller, je kleiner die Partikel in der Lösung sind. Teilchen unterschiedlicher Größe erzeugen demnach unterschiedlich schnelle Schwankungen der sich überlagernden Lichtintensität, welche anschließend durch mathematische Operationen wie der Fourier-Transformation oder der Autokorrelationsanalyse separiert werden können. Dabei werden die Intensitätsfluktuationen hinsichtlich der Zeit, in der sie passieren, analysiert. Mittels der daraus erhaltenen Korrelationsfunktion  $C(\delta t)$  kann die Geschwindigkeit mit der sich die Teilchen bewegen und anschließend der Diffusionskoeffizient berechnet werden.



**Abbildung 26:** A) exemplarische Darstellung der eigentlichen DLS Messung als Auftragung der gemessenen Lichtintensität über die Zeit. B) Darstellung der Korrelationsfunktion  $C(\delta t)$  für 2 Teilchen unterschiedlicher Größe.

#### 4.5. UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektroskopie, auch als Elektronenabsorptionsspektroskopie bekannt, beruht auf der Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch die Probe. Wenn Licht geeigneter Frequenz  $\nu$  auf ein Molekül im Grundzustand  $\psi_0$  trifft, dann kann dieses absorbiert werden und das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand  $\psi_1$  anheben. Durch spontane Emission oder unter dem Einfluss von Licht erfolgender stimulierter Emission von Licht kann das System anschließend in den Grundzustand zurückkehren. Mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes lässt sich an Hand der gemessenen Absorption  $A$  und unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  die Konzentration  $c$  der Probe bestimmen:<sup>[216]</sup>

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (10)$$

wobei  $I$  die Intensität des austretenden Lichtstrahls,  $I_0$  die Intensität des eintretenden Lichtstrahls und  $d$  die Schichtdicke ist. Damit eignet sich die UV-Vis Spektroskopie für die Bestimmung der Konzentration von Peptiden bzw. Proteinen in Lösung. Darüber hinaus ist sie ein Standardverfahren für die Charakterisierung der Aggregation von Gold-Nanopartikeln. Ihre kolloidalen Lösungen besitzen eine charakteristische rote Farbe sowie ein detektierbares Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich des Lichts. Diese optische Eigenschaft der kolloidalen Goldlösung beruht auf der Tatsache, dass

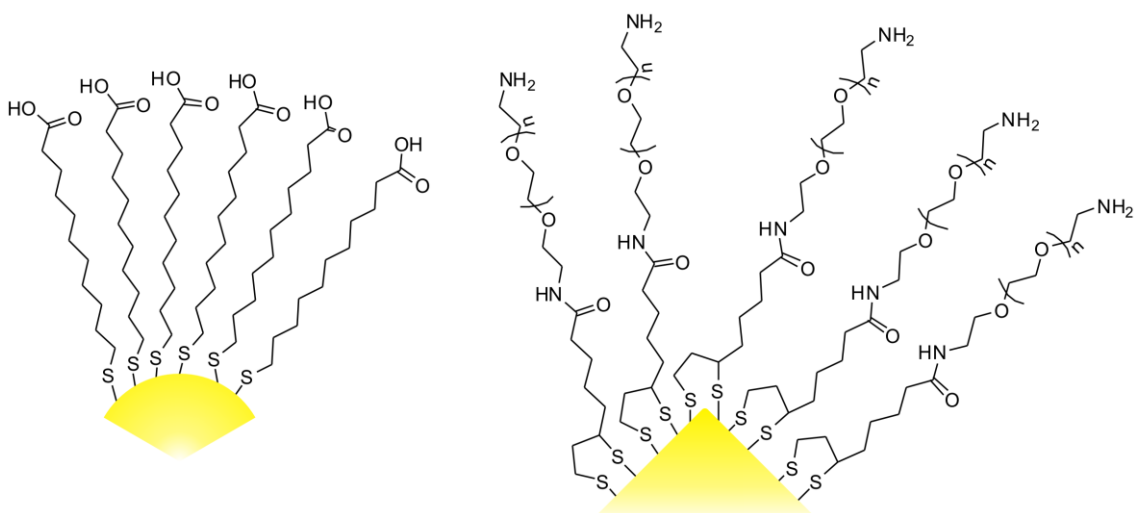
die Elektronenwolke aus freien Elektronen auf der Goldoberfläche oszilliert und elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge absorbieren kann. Dieser Effekt wird als Oberflächenplasmonresonanz bezeichnet.<sup>[217,218]</sup> Dieser Effekt ist jedoch abhängig von der Größe der Nanopartikel und tritt erst ab einer Größe von etwa 2 nm auf. Die genaue Lage des Absorptionsmaximums hängt dabei von mehreren Faktoren wie der Oberflächenfunktionalisierung, der Temperatur und des Lösungsmittels ab. Darüber hinaus kann unter Voraussetzung der Kenntnis des Extinktionskoeffizienten die Oberflächenplasmonbande für die Konzentrationsbestimmung der kolloidalen Goldlösung genutzt werden.<sup>[219,220]</sup> Noch wichtiger ist jedoch die Möglichkeit der Quantifizierung von Nanopartikel-Aggregationen mit Hilfe der Oberflächenplasmonbande. Durch Zusammenlagerung von immer mehr Nanopartikel vergrößert sich die Kopplung der Oberflächenplasmonen der einzelnen Partikel. Dies hat die charakteristische Rotverschiebung und Verbreiterung der Absorptionsbande zur Folge.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation

#### 5.1.1. Nanopartikel-Design und Synthese

Da die Peptid-induzierte Organisation der Nanopartikel auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Partnern beruhen, wurden die aus einem Gold Kern bestehenden Nanopartikel entweder mit dem anionischen Liganden Mercaptoundecansäure (MUDS) oder mit dem kationischen Amino-funktionalisiertem PEG-Liganden beschichtet, um eine hoch geladene Oberfläche zu generieren. Die geladene Oberfläche ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der Nanopartikel im wässrigen Medium, da diese mit dem Grad der Protonierung bzw. Deprotonierung von funktionellen Gruppen auf der Nanopartikel-Oberfläche ansteigt. Dies ist wiederum vom pKa-Wert der funktionellen Gruppe abhängig. So beträgt der theoretisch ermittelte pKa-Wert für die Carboxyl-Gruppe der Mercaptoundecansäure 6,5, was zur Folge hat, dass mit diesem Liganden stabilisierte Nanopartikel bis zu pH 7 in wässrigen Lösungen aggregieren und ausfallen. Da mit steigendem pH-Wert auch der Grad an Deprotonierung und somit auch die Stabilität zunimmt, wurde die Peptid-induzierte Aggregation bei pH 9 durchgeführt.



**Abbildung 27:** zweidimensionale Darstellung der Gold-Nanopartikel mit ihren jeweiligen stabilisierenden Liganden.

Demgegenüber besitzt die terminale Amino-Gruppe einen pKa-Wert von etwa 10, wodurch eine vollständige Protonierung bereits bei einem pH-Wert von 8 erreicht wird, der folglich auch für die Aggregation der Nanopartikel, die mit dem Amino-PEG-Liganden stabilisiert waren, genutzt wurde.

Beide Liganden wurden für unterschiedliche Nanopartikel verwendet; kleine, etwa 2.5 nm bzw. 6 nm Nanokugeln wurden mit Mercaptoundecansäure (MUDS) stabilisiert, während der Amino-PEG-Ligand für Nanokugeln mit einem Durchmesser von 34 nm sowie für Nanowürfel mit einer Kantenlänge von 45 nm genutzt wurde. Die Amino-PEG stabilisierten Nanopartikel wurden von der AG Graf zur Verfügung gestellt.

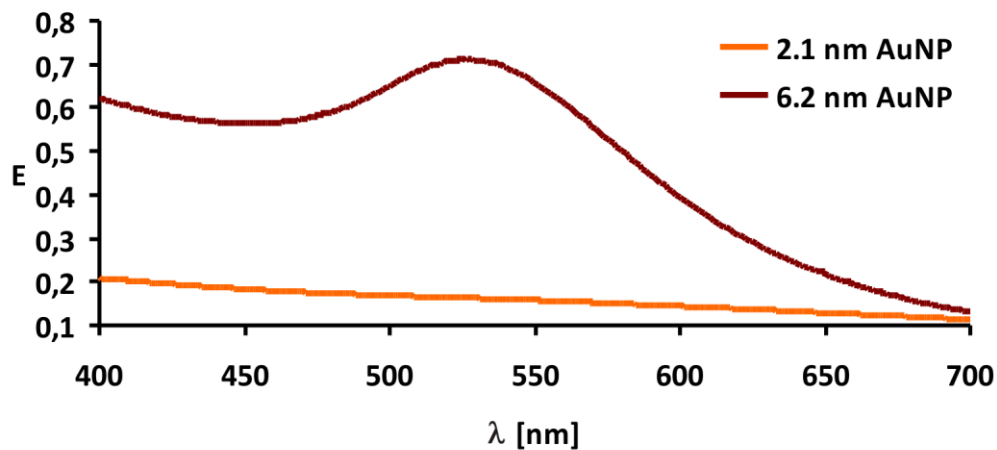
Die Synthese von Gold-Nanopartikeln beruht auf der Reduktion eines Goldsalzes in Gegenwart eines stabilisierenden Liganden. Der resultierende Partikeldurchmesser kann durch Wahl der Lösungsmittelpolarität, der Reaktionstemperatur und -dauer sowie der Stöchiometrie der Edukte variiert werden. Die Synthese der MUDS-stabilisierten Nanopartikel erfolgte nach einem von STUCKY *et al.* beschriebenen Syntheseprotokoll.<sup>[221]</sup> Dafür wurden Chloro(triphenylphosphin)gold(I) und Dodecanthiol in Chloroform gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur das Reduktionsmittel, ein tert-Butylamin-Boran-Komplex, hinzugegeben. Die Lösung nahm nach kurzer Zeit eine braune Farbe an. Nach etwa einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethanol unterbrochen. Auf Grund des unpolaren Dodecanthiols als stabilisierendem Liganden führte die Zugabe von Ethanol zu einer Präzipitation der Nanopartikel, die mittels Zentrifugation vom Überstand getrennt werden konnten. Die Synthese der größeren etwa 6 nm Nanopartikel erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Jedoch wurde die Lösungsmittelpolarität durch die Nutzung von Benzol verringert. Das zusätzliche Erwärmen der Lösung auf 60 °C bewirkte die verbesserte Anlagerung von Goldatomen an die wachsenden Gold-Cluster und resultierte in einer Vergrößerung des Partikeldurchmessers. Im Gegensatz zu der Synthese der kleineren Nanopartikel kam es zur Ausbildung der für Gold-Nanopartikel charakteristischen rot-violetten Färbung der Lösung während der Reaktion.

Die Wasserlöslichkeit der Nanopartikel ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Wechselwirkung mit Peptiden. Da der bisherige Ligand eine Wasserlöslichkeit der Nanopartikel unmöglich machte, musste ein Ligandenaustausch durchgeführt werden. Dieser erfolgte durch Zugabe eines großen Überschusses an Mercaptoundecansäure,

gelöst in Dichlormethan. Erst dieser Austausch machte die Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen, auf Grund der terminalen Carboxyl-Gruppe, möglich. Der Verlauf dieser Reaktion war sehr gut an der einsetzenden Präzipitation der Nanopartikel, auf Grund der veränderten Löslichkeit in Dichlormethan, sowie dem Verlust der rot-violetten Färbung zu verfolgen. Das Ende der Reaktion war an der farblosen DCM-Phase klar erkennbar. Eine erneute Zugabe von Mercaptoundecansäure bei einer unvollständigen Reaktion, war nicht möglich, da als Resultat die Dispersität der Nanopartikel sehr stark anstieg. Nach Zentrifugation und mehrmaligem Waschen mit Dichlormethan wurden die Nanopartikel in frisch hergestelltem TRIS/HCl Puffer bei pH 9 resuspendiert.

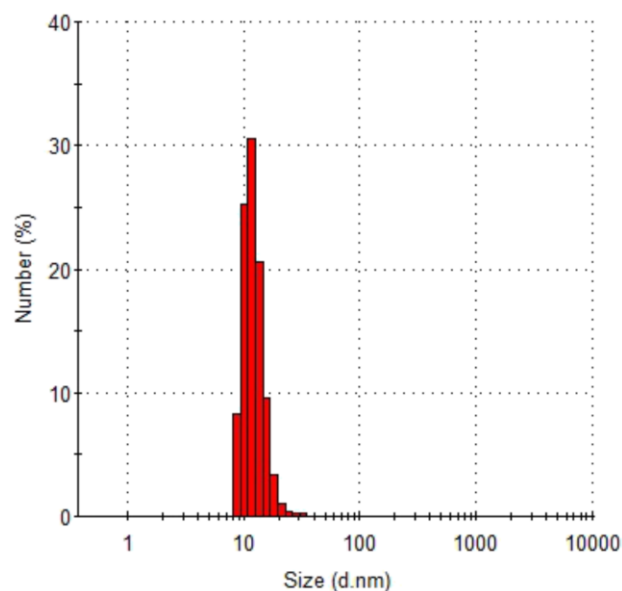
Die Charakterisierung der synthetisierten Gold-Nanopartikel erfolgte auf verschiedenen Wegen. Zum einen wurde durch Messung des hydrodynamischen Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung die Größenverteilung der Nanopartikel bestimmt, zum anderen wurde mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie der tatsächliche Durchmesser der Nanopartikel ermittelt. Zusätzlich wurden UV-Vis Spektren der Nanopartikel aufgenommen, um sie auf ihre Eignung für die anschließenden Aggregationsversuche zu untersuchen, da für das Verfolgen der Peptid-induzierten Aggregation mittels UV-Vis Spektroskopie ein definiertes Absorptionsmaximum erforderlich ist. Bei allen Messungen wurden die Gold-Nanopartikel in 10 mM TRIS/HCl Puffer bei pH 9 gelöst und über einen Spritzenfilter filtriert.

Die Messung der UV-Vis Spektren erfolgte an einem CARY 50 Bio Spektrophotometer in semi-mikro Küvetten. Dabei wurde in Abständen von jeweils 0.25 nm die Absorption gemessen. Während die größeren 6.2 nm großen Nanopartikel ein definiertes Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 527 nm aufwiesen, konnte für die kleinen Nanopartikel kein Maximum bestimmt werden. Die beobachteten Unterschiede lassen sich mit der unterschiedlich starken Ausprägung der Oberflächenplasmonbande erklären, die erst ab einer Nanopartikel-Größe von 2 nm beobachtet wird und mit steigendem Partikeldurchmesser an Intensität gewinnt.<sup>[217,218]</sup> Auf Grund des Fehlens der Absorptionsbande wurden die kleineren Nanopartikel verworfen und im weiteren Verlauf nicht weiter genutzt.



**Abbildung 28:** UV-Vis Spektren der MUDS-funktionalisierten Gold-Nanopartikel im Bereich von 400-700 nm.

Um zu überprüfen, ob die synthetisierten Gold-Nanopartikel eine einheitliche Größe besitzen, wurde anschließend mittels dynamischer Lichtstreuung die Größenverteilung bestimmt. Dies erfolgte am Zetasizer Nano ZS analyzer™ durch Berechnung des Mittelwerts aus drei unabhängigen Messreihen.

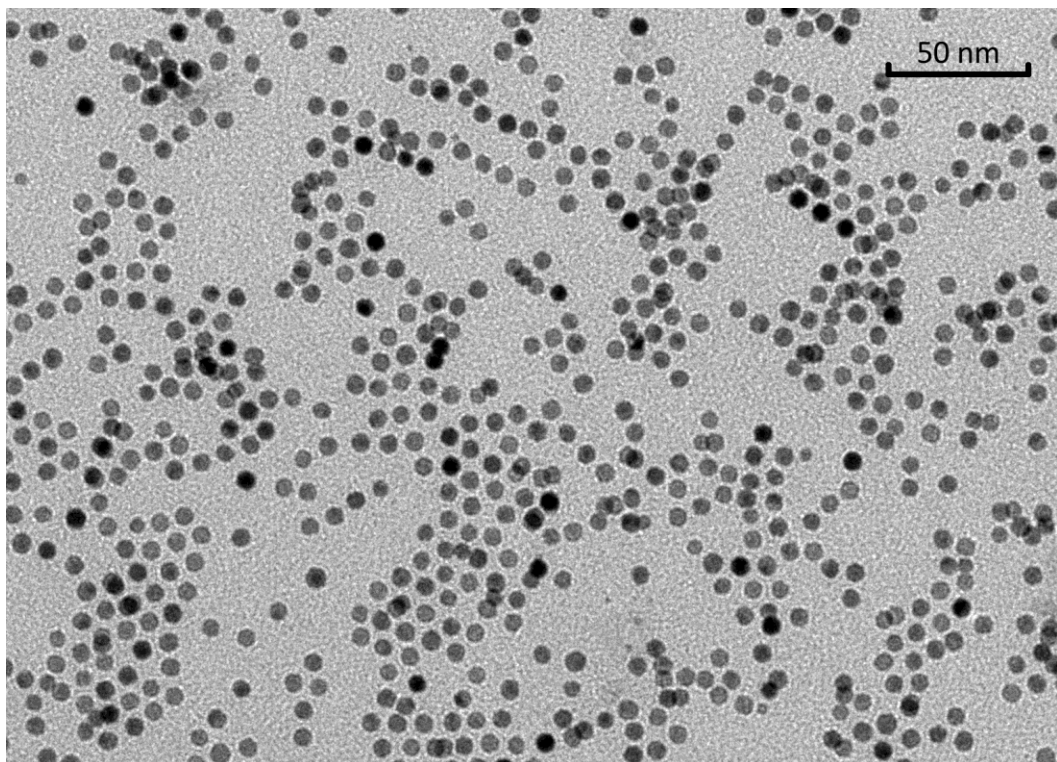


**Abbildung 29:** Bestimmung der Größenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung der synthetisierten Gold-Nanopartikel bei pH 9.

Der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel betrug  $12.2 \pm 1$  nm. Zudem war an Hand von Abbildung 29 sehr gut zu erkennen, dass die



Probe eine geringe Dispersität aufwies; also eine enge Größenverteilung der Nanopartikel vorliegt. Da sich der hydrodynamische Durchmesser sowohl aus dem Radius des Goldkerns als auch aus dem Radius der Ligandenhülle sowie der Solvathülle zusammensetzt, gibt dieser Wert keinen Rückschluss auf die tatsächliche Größe und Form der Nanopartikel, die jedoch für die Konzentrationsbestimmung notwendig ist. Um die Größe und Form des Goldkerns zu bestimmen, wurden von der Probe elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 31). Auf Grund der sehr guten Streueigenschaften der Gold-Nanopartikel war die Zugabe eines Kontrastmittels wie Phosphorwolframsäure nicht erforderlich. Die Messung der auf einem Kupfer-Grid aufgetragenen und getrockneten Probe erfolgte am Philips CM12. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit dem Programm *Image J* ergab einen durchschnittlichen Durchmesser von  $6.2 \pm 0.4$  nm und eine regelmäßig sphärische Struktur der Nanopartikel.



**Abbildung 30:** TEM Aufnahme der synthetisierten Gold-Nanopartikel bei einer 100.000-fachen Vergrößerung.



Um ein *coiled coil*-bildendes Peptid zu erhalten, wurden die im hydrophoben Kern befindlichen a- und d-Positionen des *heptad repeats* mit der hydrophoben Aminosäure Leucin sowie die dazu benachbarten e- und g-Positionen mit den gegensätzlich geladenen Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure besetzt. Die Lösungsmittel-exponierten f-Positionen, die für die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Gold-Nanopartikeln verantwortlich sind, wurden mit der positiv geladenen Aminosäure Arginin besetzt. Grundsätzlich hätte auch Lysin als positiv geladene Aminosäure verwendet werden können. Da für die Wechselwirkung mit den Gold-Nanopartikeln ein pH-Wert von 9.0 erforderlich war und die Argininseitenkette (pKa-Wert von 12.5) gegenüber der Lysinseitenkette (pKa-Wert von 10.5) den höheren pKa-Wert besitzt und damit die stärkere Base darstellt, wurde Arginin favorisiert. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde für das Referenzpeptid VW05 bereits der Oligomerisierungsgrad bestimmt. Dabei handelt es sich um ein *coiled coil*-Trimer.<sup>[195]</sup>

Um den Einfluss einer geringeren Ladungspräsentation auf die Wechselwirkung mit Gold-Nanopartikeln zu untersuchen, wurden ausgehend vom Peptid VW05 zuerst zwei (R2A2) bzw. drei (R1A3) Arginine durch Alanin ersetzt (Abbildung 31). Der Austausch erfolgte dabei so, dass eine gleichmäßige Verteilung der restlichen Arginine erreicht wurde. Auf Grund seiner kleinen, unreaktiven Methylgruppe eignet sich speziell Alanin, um die Funktion einer Aminosäure zu identifizieren.<sup>[222]</sup> Theoretisch wäre zwar auch eine vollständige Entfernung der Seitenketten durch einen Austausch mit der Aminosäure Glycin denkbar, doch hat eine solche Substitution dank der konformationellen Flexibilität der Peptidbindung des Glycins einen starken Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids. Folglich wäre nicht gewährleistet gewesen, dass die erhaltenen Peptide eine definierte Sekundärstruktur ausbilden. Darüber hinaus besitzt Alanin eine mit Arginin vergleichbare  $\alpha$ -Helixpropensität.<sup>[223]</sup>

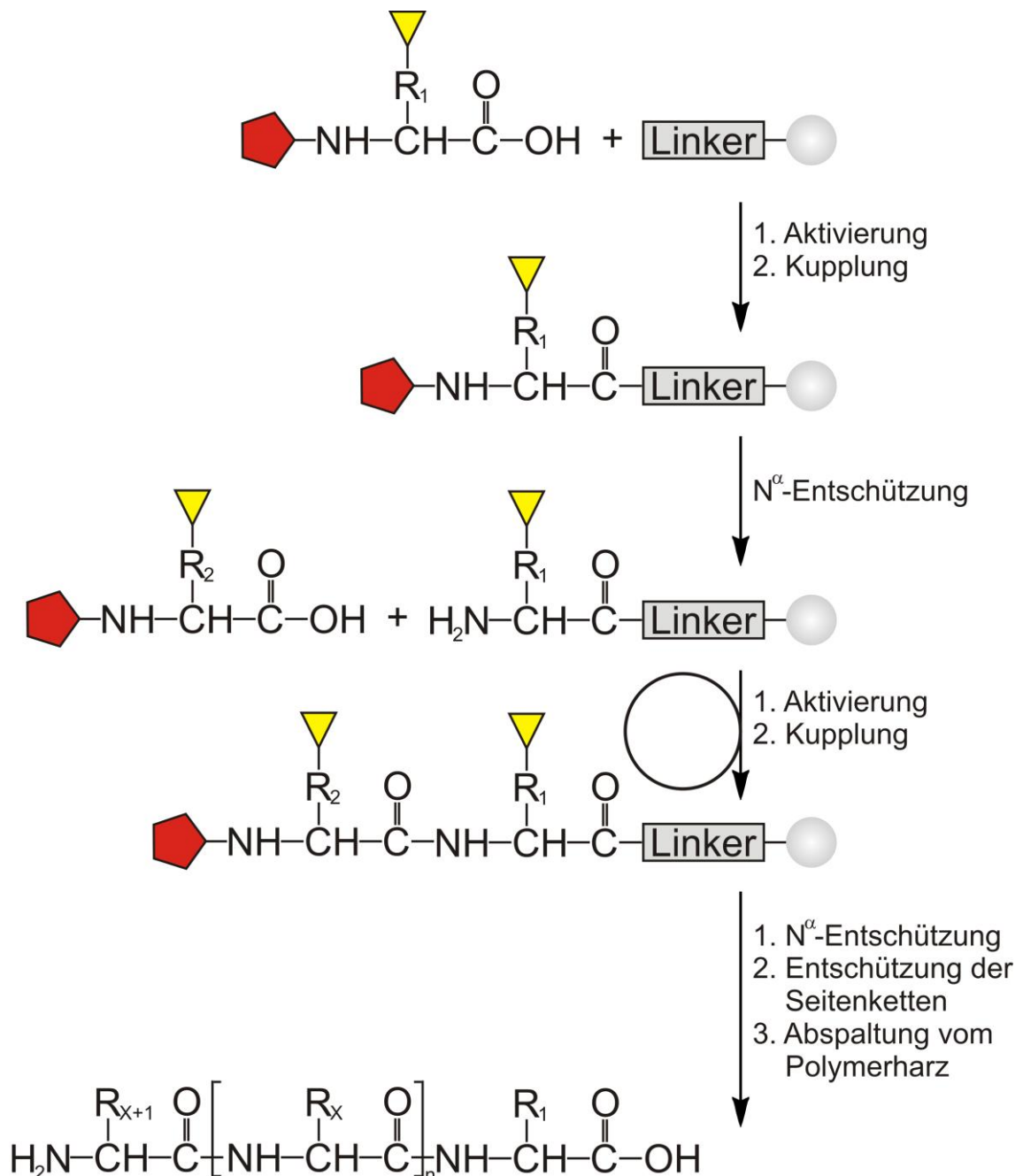
Zusätzlich sollten mögliche Veränderungen in der Nanopartikel-Aggregation, die durch eine Verlängerung der Peptidsequenz verursacht wurden, untersucht werden. Dafür wurde ausgehend von dem Peptid R2A2 die Sequenz schrittweise um jeweils sieben Aminosäuren verlängert. Um dabei die Zahl an wechselwirkenden Aminosäuren konstant zu halten, wurde jede weitere f-Position wiederum mit Alanin besetzt. Diese Sequenzverlängerung wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, sodass neben dem aus 33 Aminosäuren bestehenden Peptid R2A3 auch die Peptide R2A4 (40 Aminosäuren)

und R2A5 (47 Aminosäuren) synthetisiert wurden. Da die Veränderungen nicht den hydrophoben Kern des *coiled coils* betrafen, wurde erwartet, dass sich die Peptideigenschaften, wie die gebildete Sekundärstruktur und der Oligomerisierungsgrad, nicht ändern sollten. Obwohl sich das Verhältnis von positiven Ladungen zur Peptidlänge u. a. durch die Reduzierung der Zahl an Argininen stetig veränderte, besaßen alle Peptide bei einem pH-Wert von 9 eine positive Nettoladung, sodass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Peptid und Nanopartikel grundsätzlich möglich waren.

Auf Grund der terminalen Aminfunktion des Liganden, den die von der AG Graf zur Verfügung gestellten Nanopartikel besaßen und der daraus resultierenden positiven Gesamtladung, waren die Arginin-haltigen Peptide für eine Interaktion nicht nutzbar. In Folge dessen wurden alle Arginine im Peptid VW05 durch Glutaminsäure ausgetauscht. Dies hatte zur Folge, dass sich die Nettoladung umkehrte, wodurch eine Wechselwirkung zwischen Peptid und Amin-funktionalisierten Nanopartikeln bei pH 7 möglich war. Auch hier wurde erwartet, dass die Veränderungen in der Sequenz keine Auswirkung auf die Sekundärstruktur sowie die *coiled coil* Bildung haben sollten.

Alle Peptide wurden nach der Standard-Fmoc-Methode an der festen Phase von Hand gekuppelt, deren allgemeiner Ablauf in Abbildung 32 dargestellt ist. An einem auf quervernetztem Polystyrol basierenden Polymerharz, das bereits mit der ersten Aminosäure beladen war, wurde nacheinander vom C- zum N-Terminus schrittweise jede einzelne Aminosäure gekuppelt. Um Mehrfachkupplungen derselben Aminosäure zu verhindern, waren sowohl die reaktiven Seitenketten als auch die Aminofunktion mit einer Schutzgruppe versehen, die getrennt voneinander abgespalten werden konnten. Als Kupplungsreagenzien wurden für alle Peptide Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) genutzt. Beide Kupplungsreagenzien reagieren mit der Fmoc-geschützten Aminosäure und bilden einen Aktivester, der an die N-terminale Aminosäure der wachsenden Peptidkette bindet. Nach erfolgter Kupplung einer Aminosäure wurde die an der Aminofunktion befindliche Fmoc-Schutzgruppe mit Hilfe von Piperidin und Diazabicycloundecen (DBU) selektiv abgespalten. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der UV-Marker Aminobenzoessäure gekuppelt. Da die Peptide im Bereich des Absorptionsmaximums der Aminobenzoessäure bei etwa 310 nm nicht oder nur zu einem sehr geringen Maße

absorbieren, kann diese zur Konzentrationsbestimmung mittels UV-Vis Spektroskopie genutzt werden. Abschließend wurden die Peptide mit Hilfe von Trifluoressigsäure vom Polymerharz abgespalten. Da die Seitenketten auch mit säurelabilen Schutzgruppen geschützt waren, wurden diese bei der Vollabspaltung vom Harz ebenfalls abgespalten. Nach der Ether-Fällung wurden die Peptide säulenchromatographisch gereinigt und mittels Massenspektrometrie charakterisiert.



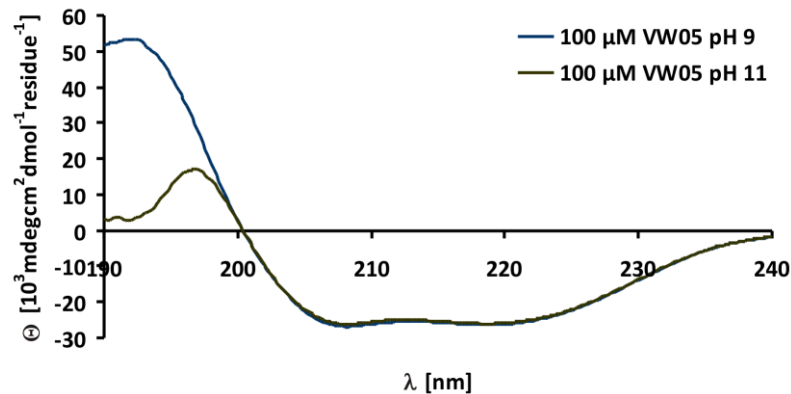
**Abbildung 32:** Schematischer Ablauf der Peptidsynthese an der festen Phase.

**Tabelle 1:** Übersicht über die berechneten und gemessenen Massen der synthetisierten Peptide.

Peptid	Peak	berechnet [m/z]	gemessen [m/z]
<b>VW05</b>	+2	1734.0329	1734.0367
	+3	1156.3579	1156.3615
<b>R1A3</b>	+2	1606.4369	1606.4401
	+3	1071.2939	1071.2898
<b>R2A2</b>	+2	1648.9689	1648.9655
	+3	1099.6485	1099.6513
<b>R2A3</b>	+3	1370.1420	1370.1453
	+4	1027.8584	1027.8612
<b>R2A4</b>	+3	1640.6354	1640.6378
	+4	1230.7285	1230.7321
<b>R2A5</b>	+4	1433.5986	1433.6001
	+5	1147.0804	1147.0794
<b>E4</b>	+2	1679.9159	1679.9118
	+3	1120.2799	1120.2824

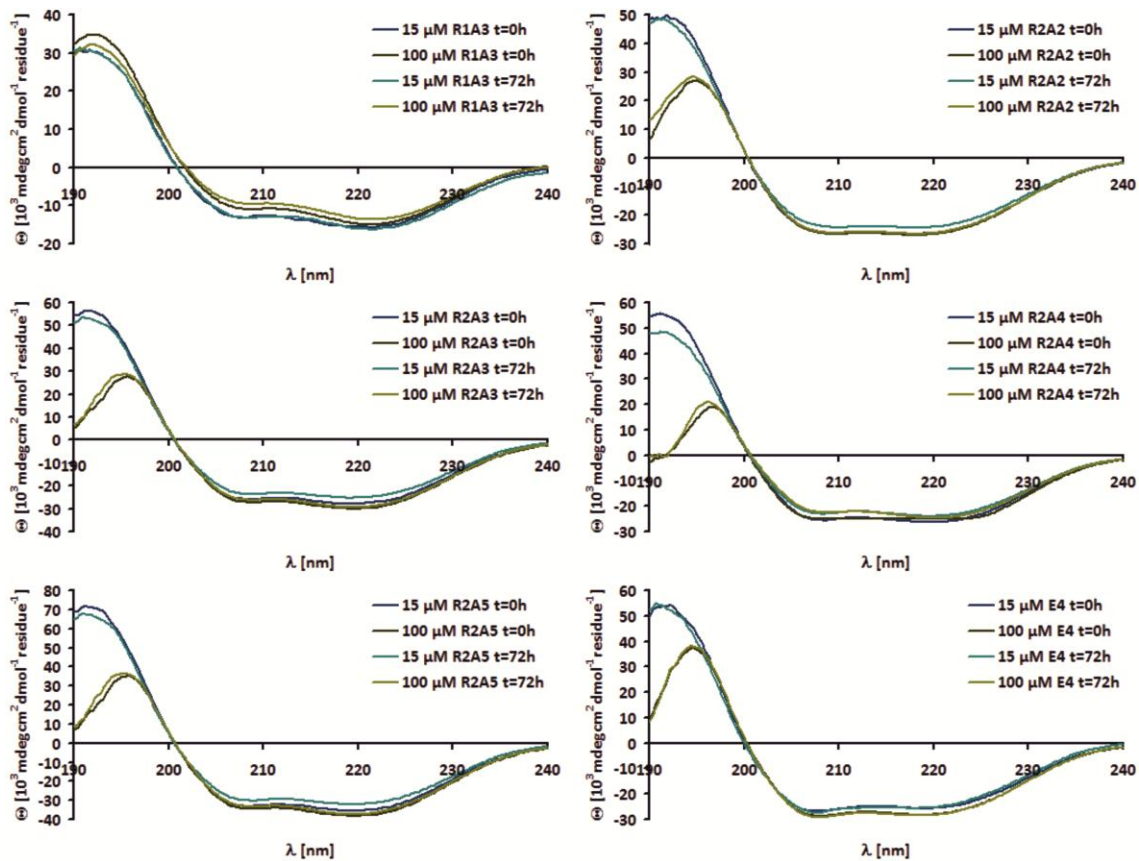
### 5.1.3. Charakterisierung der Peptide

Um zu prüfen, ob die Änderungen in der Aminosäuresequenz Auswirkungen auf die Sekundärstruktur der Peptide hatten, wurden konzentrations- und zeitabhängige CD-Spektren aller Peptide aufgenommen.  $\alpha$ -Helikale Peptide besitzen mehrere charakteristische Banden im kurzwelligen UV-Bereich. Dazu zählt eine Bande mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 195 nm, die durch einen  $\pi$ - $\pi^*$  Übergang zustande kommt, sowie zwei Banden mit Minima bei 208 bzw. 222 nm, die aus  $n$ - $\pi^*$  und  $\pi$ - $\pi^*$  Übergängen resultieren. Die CD-Spektroskopie liefert jedoch keine Information über die *coiled coil* Struktur. Das Spektrum des Referenzpeptids VW05, von dem bereits bekannt war, dass es eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur besitzt, diente als Vergleich für alle gemessenen Spektren. Das trimere *coiled coil* VW05 lieferte ein für  $\alpha$ -Helices charakteristisches CD-Spektrum, das auch bei höheren Peptidkonzentrationen oder pH-Wert-Erhöhungen unverändert blieb.



**Abbildung 33:** CD-Spektrum von 100  $\mu\text{M}$  VW05 in 10 mM TRIS/HCl pH 9 und pH 11.

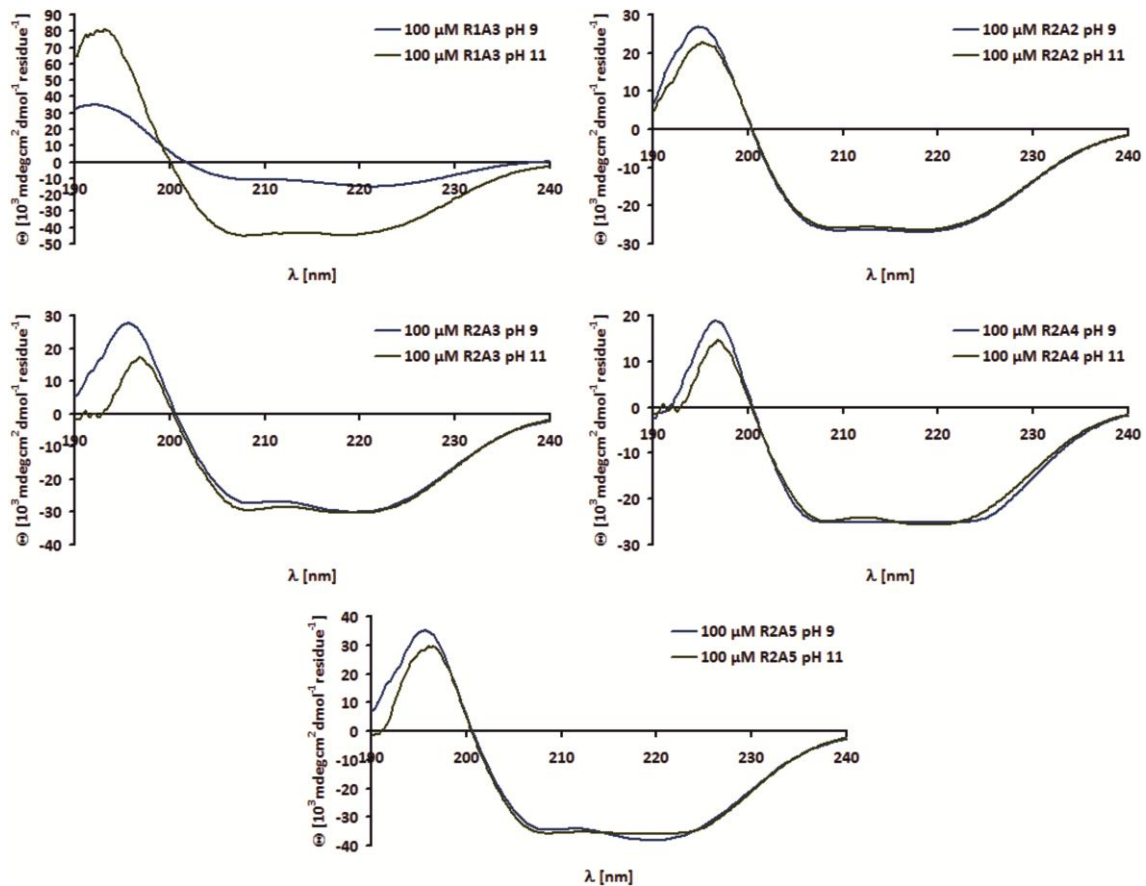
Die CD-Spektren wurden als Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen auf einem Jasco J-810 Spektrophotometer bei einer Peptidkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  in 10 mM TRIS/HCl pH 9 bzw. pH 8, für das Peptid E4, aufgenommen und nach drei Tagen wiederholt. Bei einer Peptidkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  zeigten die Spektren den für  $\alpha$ -Helices charakteristischen Verlauf mit einem Bandenmaximum bei etwa 195 nm sowie zwei Bandenminima bei etwa 208 und 222 nm und ähneln in ihrem Verlauf sehr stark dem Spektrum des Referenzpeptids VW05. Auffällig war jedoch, dass für das Peptid R1A3 die Kurvenintensität, trotz einer Normalisierung der Spektren, merklich geringer war. Zusätzlich war eine Veränderung in den Intensitäten der beiden Minima zu erkennen. Denn während alle anderen Spektren etwa gleich große Minima aufwiesen, konnte für das Peptid R1A3 ein größeres Minimum bei 222 nm beobachtet werden. Dies kann möglicherweise als Hinweis auf die Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Peptidfasern gewertet werden. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf 100  $\mu\text{M}$  bewirkte keine signifikanten Veränderungen im Kurvenverlauf. Sie führte lediglich zu einer definierten Ausprägung der Bande bei 195 nm, da diese speziell bei geringen Peptidkonzentrationen oftmals nur schwer zu erkennen ist. Zudem konnten neben marginalen Änderungen in der Intensität der Kurven keinerlei Unterschiede der CD-Spektren nach drei Tagen beobachtet werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Peptide über diesem Zeitraum eine stabile Sekundärstruktur ausbilden.



**Abbildung 34:** Zeitabhängige CD-Spektren der synthetisierten Peptide R1A3, R2A2, R2A3, R2A4, R2A5 und E4 bei einer Peptidkonzentration von 15 bzw. 100  $\mu\text{M}$ , gelöst in 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 9 bzw. pH 8 (für das Peptid E4).

Da KOKSCH *et al.* eine Reversibilität der Nanopartikel-Aggregation durch Erhöhung des pH-Werts, auf Grund einer damit einhergehenden Änderung der Peptid-Nettoladung, erzielen konnten, wurden ebenfalls die Auswirkungen einer pH-Wert-Erhöhung auf pH 11 auf die Sekundärstruktur der Peptide R1A3, R2A2, R2A3, R2A4 und R2A5 studiert. Auf Grund der Tatsache, dass das Peptid E4 eine gegensätzliche Nettoladung besitzt und sich in dem untersuchten pH-Bereich die Nettoladung nicht ändern würde, wurde auf eine Messung der CD-Spektren bei pH 11 verzichtet.

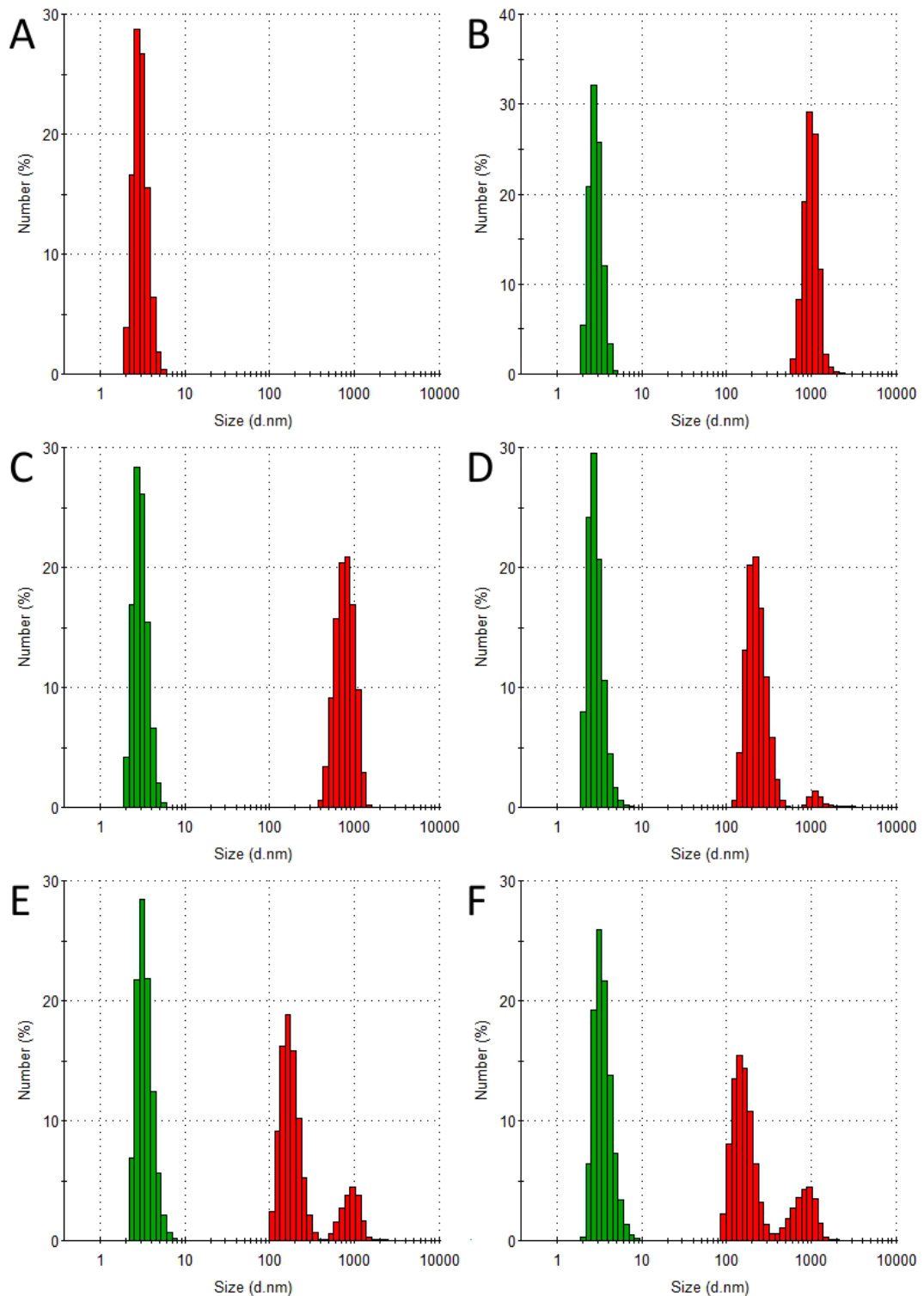




**Abbildung 35:** CD-Spektren der synthetisierten Peptide R1A3, R2A2, R2A3, R2A4 und R2A5 bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$ , gelöst in 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 9 bzw. pH 11.

Ein Vergleich der CD-Spektren bei pH 9 und pH 11 ergab, dass, mit Ausnahme des Peptids R1A3, eine Erhöhung des pH Werts keinerlei Auswirkungen auf die Sekundärstruktur hat. In diesen Fällen waren die Spektren nahezu identisch und Veränderungen in der Bandenlage konnten nicht beobachtet werden. Demgegenüber waren die Veränderungen für das Peptid R1A3 sehr gravierend, gleichwohl davon auszugehen ist, dass die Sekundärstruktur erhalten blieb, da alle charakteristischen Banden weiterhin vorhanden waren. Neben einer allgemein starken Intensitätserhöhung war vor allem die erhöhte Intensität des Bandenminimums bei 208 nm bemerkenswert. Dies hatte zur Folge, dass beide Minima, ähnlich den anderen untersuchten Peptiden, gleiche Intensität aufwiesen. Auf Grund dessen musste davon ausgegangen werden, dass R1A3 gegenüber allen anderen Peptiden bei pH 9 Unterschiede in der Tertiär- bzw. Quartärstruktur aufweist, die durch die pH-Erhöhung rückgängig gemacht wurden.

Da die CD-Spektroskopie nur für die Bestimmung der Sekundärstruktur eines Peptids genutzt werden kann, musste die Charakterisierung der Quartärstruktur auf anderem Weg erfolgen. Um eine Vorstellung über die zu erwartende Struktur zu erhalten, hat sich die dynamische Lichtstreuung als sehr einfache und schnellzugängliche Methode erwiesen. Da der hydrodynamische Durchmesser eines *coiled coil*-Trimers nicht bekannt war, wurde auch hier das Referenzpeptid VW05 als Vergleich herangezogen. Alle DLS Messungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  in TRIS/HCl pH 9 bzw pH 11 durchgeführt. Während das Referenzpeptid VW05 einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 3 nm bei einer geringen Dispersität besaß, lieferten die DLS Messungen aller davon abgeleiteten Peptide sehr überraschende Ergebnisse. So wurde für keines dieser Peptide ein ähnlicher Durchmesser bei pH 9 beobachtet. Stattdessen wurden Partikel mit bedeutend größeren Durchmessern detektiert. Diese hatten teilweise eine Größe von über 1  $\mu\text{m}$ . Außerdem war zu beobachten, dass mit steigender Peptidlänge die Dispersität der Probe anstieg und neben einer Spezies, die etwa 1  $\mu\text{m}$  groß war, eine zweite Peptidspezies auftritt, die zwischen 200 und 300 nm groß war. Folglich kann es sich bei diesen Peptiden nicht um das zu erwartende *coiled coil*-Trimer handeln. Unter Beachtung der CD-spektroskopischen Ergebnisse, die für alle Peptide eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur voraussagten, könnte es sich bei den beobachteten Spezies möglicherweise um  $\alpha$ -helikale Peptidfasern handeln. Auch die Erhöhung des pH-Werts resultierte in einem nicht weniger überraschenden Ergebnis. Ausnahmslos alle Peptide besaßen nun einen Durchmesser von etwa 3 nm, der mit dem Durchmesser des Referenzpeptids übereinstimmt. Eine weitere, größere Peptidspezies konnte in diesem Fall nicht beobachtet werden. Auf Grund dessen war zu erwarten, dass die Peptide nun als *coiled coil* vorliegen.



**Abbildung 36:** Grafische Darstellung der mittels DLS gemessenen Größenverteilung der Peptide VW05 (A), R1A3 (B), R2A2 (C), R2A3 (D), R2A4 (E), R2A5 (F), gelöst in 10 mM TRIS/HCl bei pH 9 (rot) und pH 11 (grün).

Um schlussendlich die Struktur der mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesenen Peptidpartikel aufzuklären, wurden von allen Peptiden elektronenmikroskopische

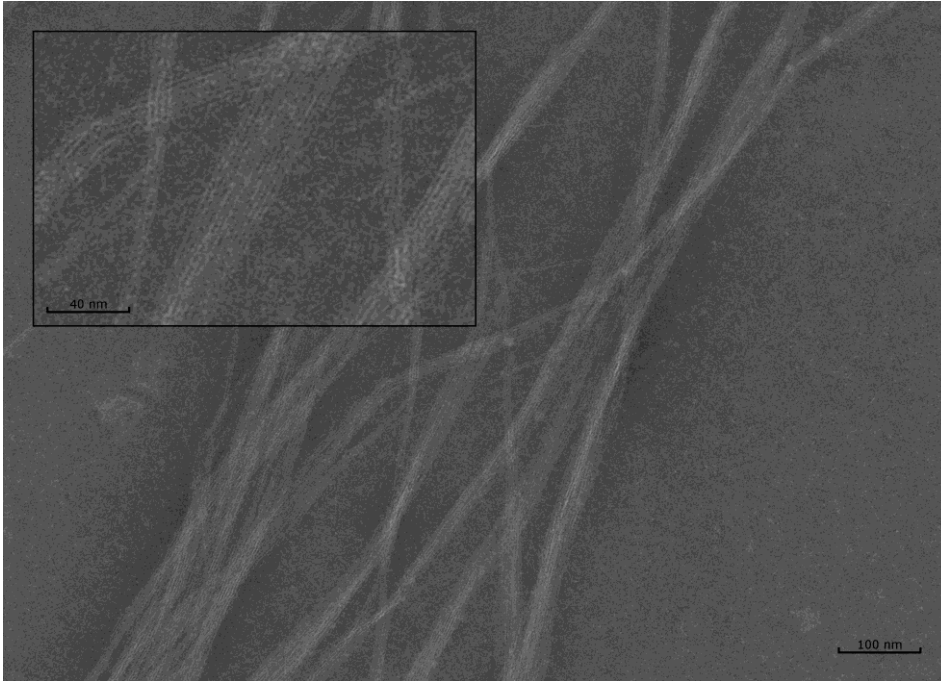
Aufnahmen angefertigt. Die Peptide wurden in 10 mM TRIS/HCl Puffer gelöst und auf eine finale Konzentration von 100  $\mu$ M verdünnt. Da Peptide, wegen der geringen Ordnungszahl der Atome aus denen sie aufgebaut sind, im Elektronenmikroskop nur einen sehr schwachen Kontrast liefern, wurde zusätzlich zu dem Peptid, welches auf einem Kupfer-Grid absorbiert wurde, eine wässrige 2%-ige Phosphorwolframsäure-Lösung als Kontrastmittel zugegeben. Auf Grund elektrostatischer Anziehungskräfte lagern sich die negativ geladenen Phosphorwolframat-Anionen an die positiv geladenen Aminosäuren des Peptids und sorgen so für die Erhöhung des Kontrasts.

Die TEM-Aufnahmen des Peptids R1A3 konnten die an Hand der DLS- und CD-Messungen getroffenen Vermutungen bestätigen (Abbildung 37). Das Peptid bildete bei pH 9 Peptidfasern von mehreren 100 nm in der Länge. Es konnten jedoch nur in Einzelfällen einzelne Peptidfasern beobachtet werden, da sich diese zu dicken Bündeln, bestehend aus mehreren Einzelfasern, zusammenlagern. Diese Bündel, aber auch die einzelne Peptidfaser, zeichneten sich durch eine hohe Starrheit aus, sodass geschwungene Faserstrukturen nicht zu beobachten waren. Zusätzlich ergab die Auswertung der TEM-Aufnahmen einen Durchmesser von etwa 2-3 nm für eine Peptidfaser. Da aus Kristallstrukturen anderer *coiled coil* Peptide bekannt war, dass der Durchmesser einer  $\alpha$ -Helix weniger als 1 nm beträgt,<sup>[224]</sup> war nahezu ausgeschlossen, dass sich eine Faser aus einer einzelnen  $\alpha$ -Helix zusammensetzte. Vielmehr war davon auszugehen, dass eine Peptidfaser aus mehreren *coiled coil* Peptiden aufgebaut ist.

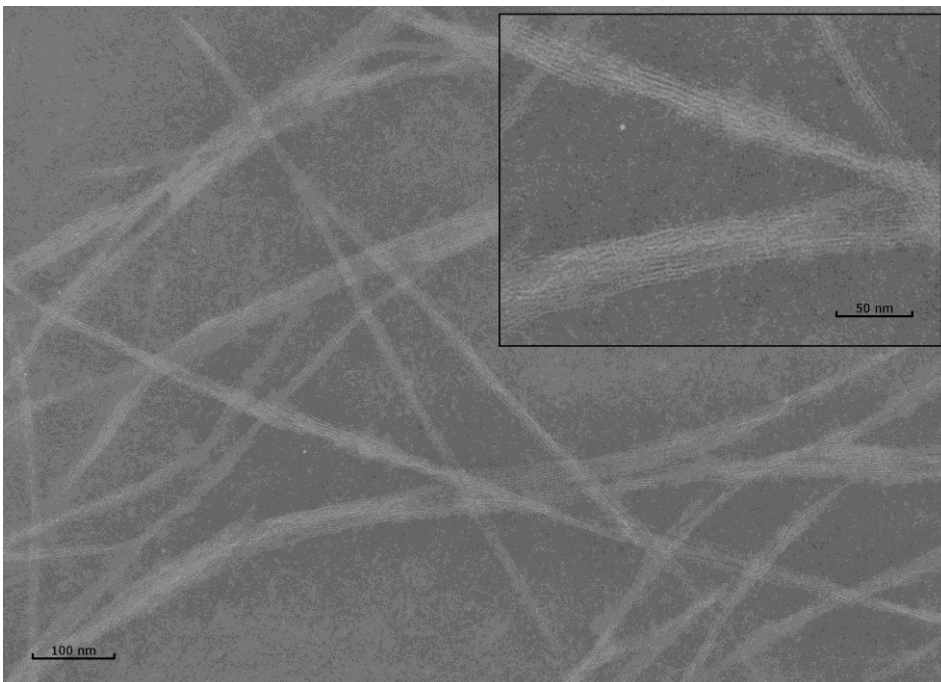
Die TEM-Aufnahmen des Peptids R2A2 ähneln denen des Peptids R1A3 sehr stark (Abbildung 38). In Analogie zu R1A3 wurden neben mehreren 100 nm langen Faserbündeln auch vereinzelt Peptidfasern beobachtet, die ebenfalls einen Durchmesser von 2-3 nm besaßen. Somit waren auch hier die einzelnen Fasern aus *coiled coil* Peptiden aufgebaut. Zusätzlich zu den TEM-Aufnahmen, bei denen der Einsatz eines Kontrastmittels notwendig ist, wurden auch von dem Peptid R2A2 auch Kryo-TEM-Aufnahmen gemacht (Abbildung 39). Dabei wurde deutlich, dass sich die Mehrheit der Peptide nicht in Faserbündeln zusammenlagerte, sondern als separate Peptidfasern vorlag. Womöglich resultierte die Trocknung der Probe während der Präparation in einer vermehrten Zusammenlagerung der Peptidfasern zu Bündeln. Des Weiteren kann auch das Kontrastierungsmittel negativen Einfluss auf die Faserstruktur genommen haben. Da der pH-Wert der wässrigen Phosphorwolframsäure-Lösung

lediglich 7.6 betrug, das Peptid jedoch bei pH 9 gelöst war und ein sinkender pH-Wert offensichtlich die Faserbildung förderte, kann das Kontrastmittel ebenfalls die Bildung von Faserbündeln induziert haben. Nachteilig war jedoch, dass nun die Feinstruktur der Faserbündel nicht aufgelöst werden konnte. Daher wurde für die Aufklärung der Peptidstruktur aller folgenden Peptide wieder auf die Zugabe eines Kontrastmittels zurückgegriffen.

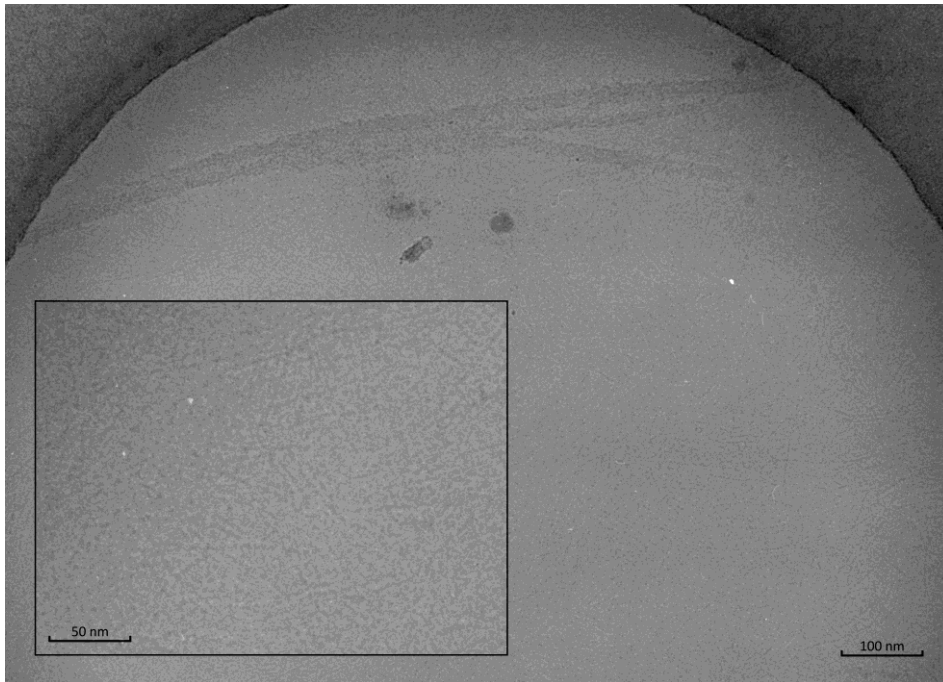
Auf den TEM-Aufnahmen des Peptids R2A3, das im Gegensatz zu den ersten beiden Peptiden über eine um sieben Aminosäuren längere Peptidsequenz verfügte, lieferte erste auffällige Unterschiede (Abbildung 40). Zwar waren auch hier lange Faserbündel zu beobachten, deren Durchmesser erneut zwischen 2 und 3 nm lag, jedoch waren auf den Aufnahmen zusätzlich auch kürzere, aus nur wenigen Peptidfasern bestehende Faserbündel und einzelne Peptidfasern in großer Zahl zu sehen, welche die beiden dominierenden Peptidspezies waren. Diese Veränderungen traten bei den Aufnahmen des Peptids R2A4 immer stärker zum Vorschein (Abbildung 41), welches erneut um sieben Aminosäuren verlängert worden war. So waren die bisherigen großen Faserbündel nicht mehr zu beobachten. Stattdessen dominierten kurze Peptidfasern sowie kleine, aus 2-3 Fasern bestehende Bündel das Bild. Darüber hinaus waren die gefundenen Strukturen nicht mehr starr und gerade, sondern sehr viel flexibler und geschwungen. Außerdem war zu erkennen, dass es zur Ausbildung eines feinen Netzwerks aus Peptidfasern kam. Trotz allem blieb der Durchmesser einer Faser aber unverändert bei 2-3 nm. Nach der erneuten Verlängerung des Peptids um sieben Aminosäuren (Peptid R2A5) konnten keinerlei Faserbündel mehr beobachtet werden (Abbildung 42). Dafür war ein extrem engmaschiges Netz aus Peptidfasern auf den Aufnahmen zu sehen, wodurch die einzelnen Fasern sich überlagern und teilweise nur noch schwer zu erkennen waren. Dies hatte auch zur Folge, dass der Faserdurchmesser nicht mit Sicherheit bestimmt werden konnte.



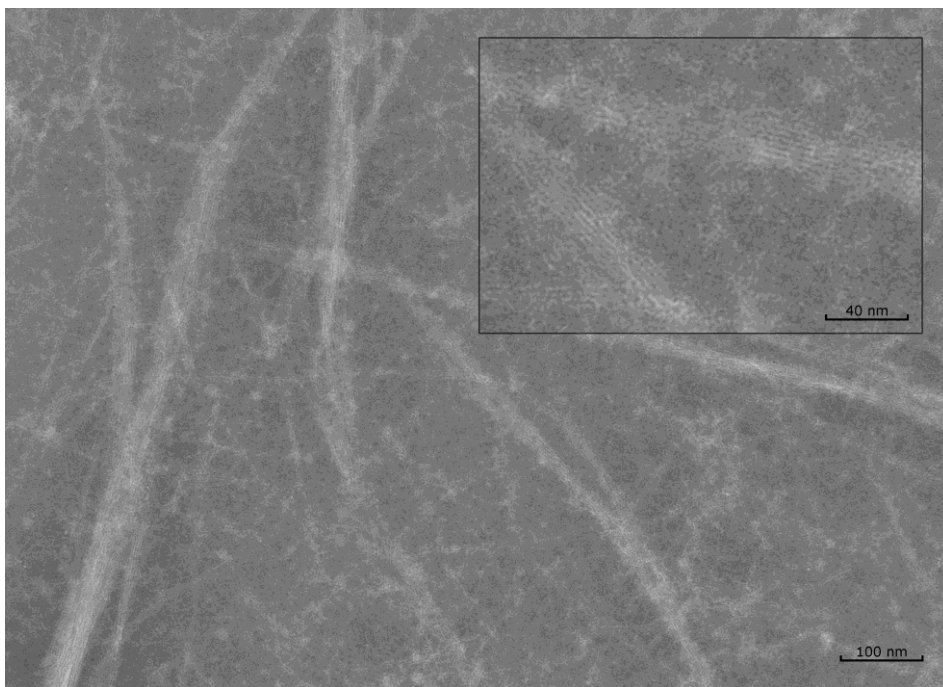
**Abbildung 37:** TEM-Aufnahme von R1A3 bei einer 60000-fachen Vergrößerung. Als Kontrastmittel wurde 2% PTA genutzt.



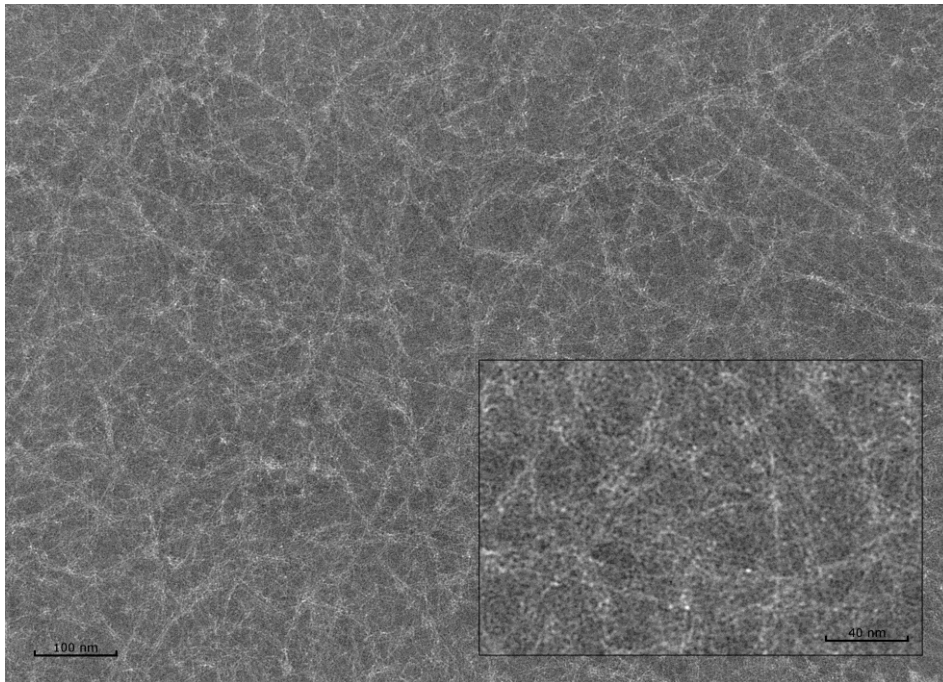
**Abbildung 38:** TEM-Aufnahme von R2A2 bei einer 60000-fachen Vergrößerung. Als Kontrastmittel wurde 2% PTA genutzt.



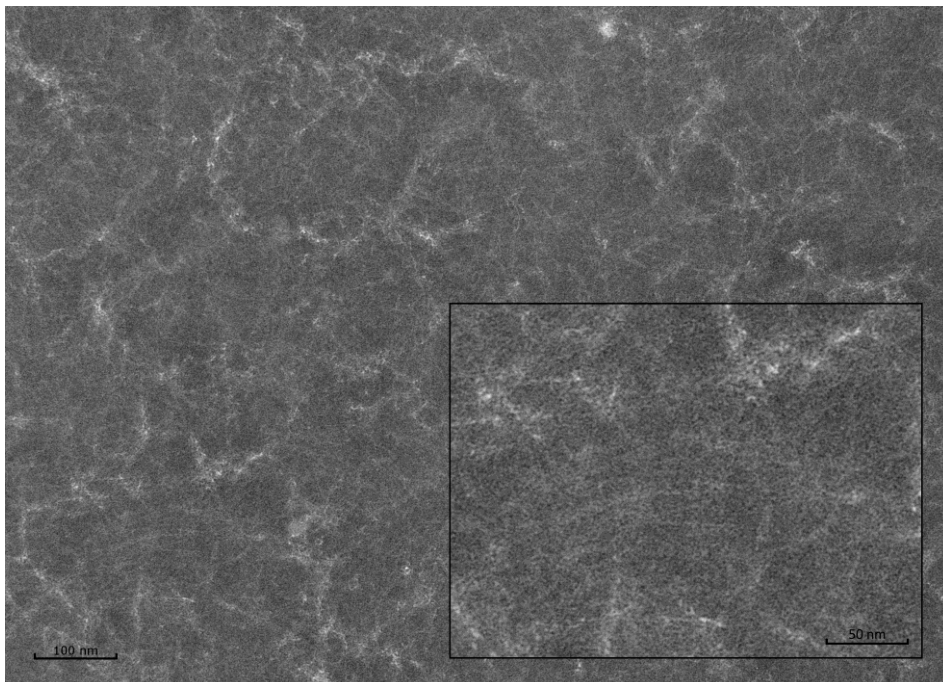
**Abbildung 39:** Kryo-TEM-Aufnahme von R2A2 bei einer 60000-fachen Vergrößerung.



**Abbildung 40:** TEM-Aufnahme von R2A3 bei einer 60000-fachen Vergrößerung. Als Kontrastmittel wurde 2% PTA genutzt.



**Abbildung 41:** TEM-Aufnahme von R2A4 bei einer 60000-fachen Vergrößerung. Als Kontrastmittel wurde 2% PTA genutzt.



**Abbildung 42:** TEM-Aufnahme von R2A5 bei einer 60000-fachen Vergrößerung. Als Kontrastmittel wurde 2% PTA genutzt.



#### 5.1.4. UV-Vis spektroskopische Untersuchung der Peptid-induzierten Nanopartikel-Aggregation

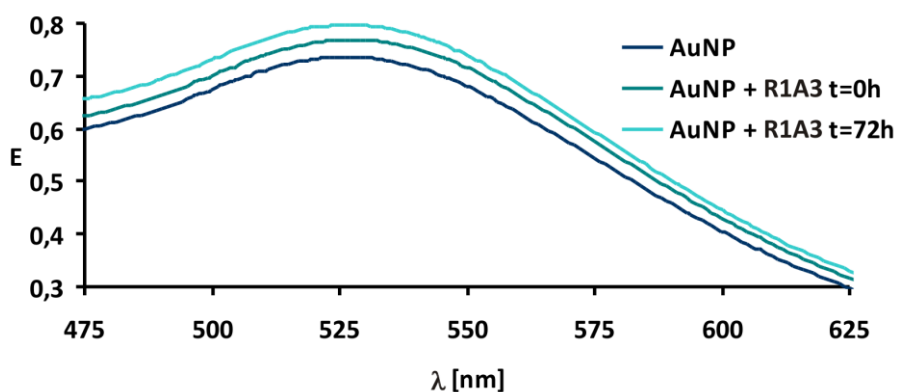
Die Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation kann auf verschiedene Arten verfolgt werden. Dabei wird unter anderem der Fakt ausgenutzt, dass die Lage der für Gold-Nanopartikel charakteristischen Oberflächenplasmonbande neben dem Lösungsmittel und stabilisierendem Liganden vor allem von der Partikelgröße abhängt. Deren Aggregation verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande. Diese Verschiebung resultiert aus der engen Zusammenlagerung der Nanopartikel und der damit einhergehenden Überlagerung der einzelnen Oberflächenplasmonen. Dadurch besitzen sie die Eigenschaften größerer Nanopartikel, welche ein rot-verschobenes Absorptionsmaximum aufweisen. Das Absorptionsmaximum der untersuchten MUDS-stabilisierten Gold-Nanopartikel lag bei einer Wellenlänge von etwa 527 nm, wohingegen das Absorptionsmaximum der sphärischen Amino-PEG-stabilisierten Nanopartikel bei 532 nm und das Maximum der kugelförmigen Amino-PEG-stabilisierten Nanopartikel bei 541 nm lag. Diese Unterschiede beruhen zum größten Teil auf den unterschiedlichen Durchmessern der Partikel, aber auch auf der Form und der veränderten chemischen Umgebung in Folge des veränderten Liganden.

Die Arginin-enhaltenen Peptide R1A3, R2A2, R2A3, R2A4 und R2A5 wurden für die Aggregation der negativ geladenen MUDS-stabilisierten Nanopartikel verwendet. Da sich die Peptide R1A3 sowie R2A2 im Vergleich zu VW05 lediglich in der Anzahl an Argininen unterschieden, wurde in beiden Fällen VW05 als Referenz für das Aggregationspotential der Peptide genutzt. Im Fall der Peptide R2A3, R2A4 und R2A5 wurde das R2A2 als Vergleichs-peptid gewählt, da diese durch eine Verlängerung der Peptidsequenz von R2A2 erhalten wurden. Für die Untersuchung der aggregations-induzierenden Eigenschaften der Peptide wurde frisch hergestellte und gefilterte Peptid- und Nanopartikel-Lösungen als Stammlösung hergestellt, entsprechend der jeweiligen Endkonzentration miteinander gemischt und mit TRIS/HCl Puffer auf 1 mL aufgefüllt. Während die Peptidkonzentration zwischen 5 und 30  $\mu\text{M}$  variiert, wurde eine konstante Nanopartikel-Konzentration von 0.05  $\mu\text{M}$  gewählt. Die Messung der Absorptionsmaxima erfolgte am CARY 50 Bio Spektrophotometer. Die erhobenen

Daten repräsentieren dabei Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messreihen.

Das Vergleichspeptid VW05 bewirkte bereits direkt nach der Zugabe einer geringen Menge von 5  $\mu\text{M}$  Peptid eine signifikante Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 7 nm. Bereits nach drei Stunden betrug die Verschiebung 10 nm. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf bis zu 30  $\mu\text{M}$  hatte eine signifikant größere Rotverschiebung des Absorptionsmaximums um bis zu 35 nm zur Folge. Neben der zu beobachtenden Farbveränderung der Lösung von rot zu violett, konnte die Aggregation auch an Hand der beginnenden Präzipitation der Nanopartikel-Peptid-Aggregate verfolgt werden.

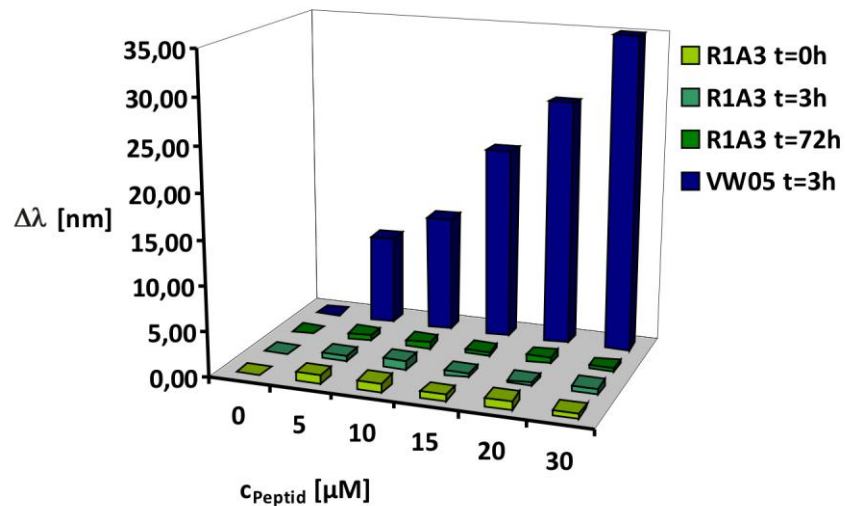
Demgegenüber konnte bei einer Reduzierung der präsentierten Ladungen, wie sie im Peptid R1A3 erfolgte, höchstens eine minimale Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei einer Peptidkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  gemessen werden (Abbildung 43 und 44). Im UV-Vis Spektrum war lediglich eine geringe Intensitätserhöhung zu beobachten. Dies konnte jedoch auf die veränderten Lösungsmitelegenschaften zurückgeführt werden. Eine Bandenverbreiterung, wie sie charakteristisch für eine Aggregation wäre, war ebenfalls nicht erkennbar.



**Abbildung 43:** UV-Vis Spektrum von Gold-Nanopartikeln in Gegenwart von 30  $\mu\text{M}$  R1A3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

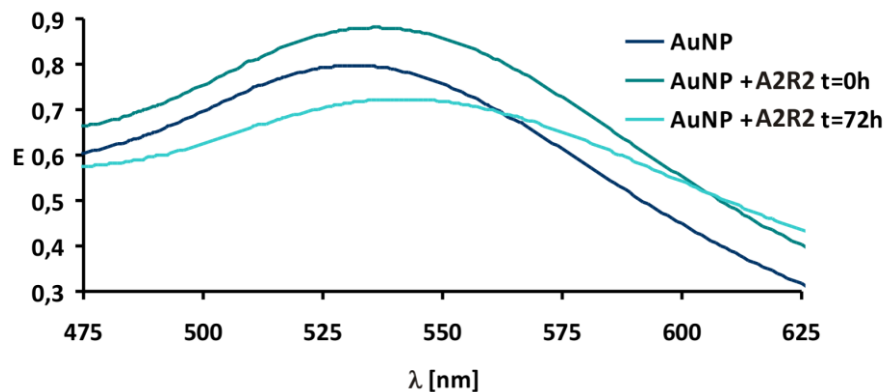
Dieses Ergebnis änderte sich auch nach einer Erhöhung der Peptidkonzentration auf bis zu 30  $\mu\text{M}$  oder eine längeren Inkubationszeit von bis zu drei Tagen nicht. Die gemessene Rotverschiebung betrug maximal 1 nm und war sehr wahrscheinlich nicht das Resultat einer Zusammenlagerung von Nanopartikeln, sondern lediglich den

veränderten Lösungsmittleigenschaften geschuldet, die durch das Lösen des Peptids hervorgerufen wurden. Ein weiteres Indiz, dass es nicht zu einer Aggregation der Nanopartikel kam, war, dass die Lösung auch nach drei Tagen keine Anzeichen einer beginnenden Präzipitation zeigte. Folglich war die Präsentation von nur einer Ladung nicht ausreichend um eine Zusammenlagerung der Nanopartikel zu induzieren.



**Abbildung 44:** R1A3-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande von Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Peptidkonzentration nach 0, 3 und 72 Stunden.

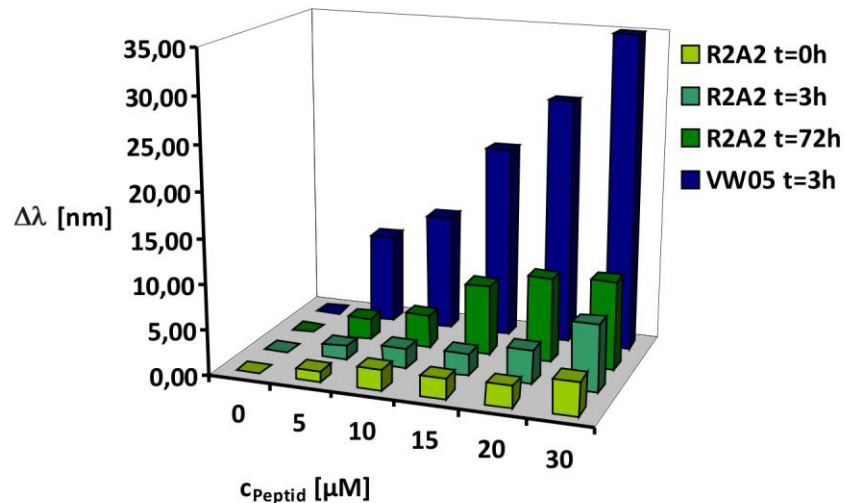
Die vorherigen Beobachtungen änderten sich grundlegend, als die Aggregationsstudien mit dem Peptid R2A2, welches zwei Arginine präsentierte, wiederholt wurden (Abbildung 45 und 46). Im Gegensatz zu den vorher gezeigten UV-Vis Spektren konnte hierbei sowohl eine Verschiebung als auch eine Verbreiterung der Absorptionsbande beobachtet werden. Die direkt nach Zugabe des Peptids zu beobachtende Intensitätserhöhung war eine Folge der Streuung des Lichts an den gebildeten Aggregaten. Dies führte im weiteren Verlauf zu einer Trübung der Lösung, die ebenfalls in einer Intensitätserhöhung resultierte. Im weiteren Verlauf war speziell bei höheren Peptidkonzentrationen ein Intensitätsverlust zu erkennen, der auf die einsetzende Niederschlagbildung und den damit einhergehenden Konzentrationsverlust zurückzuführen war. Beide Phänomene, sowohl die anfängliche Intensitätserhöhung als auch den späteren Intensitätsverlust, wurde bei allen Aggregat-bildenden Peptiden beobachtet.



**Abbildung 45:** UV-Vis Spektrum von Gold-Nanopartikeln in Gegenwart von 30  $\mu\text{M}$  R2A2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

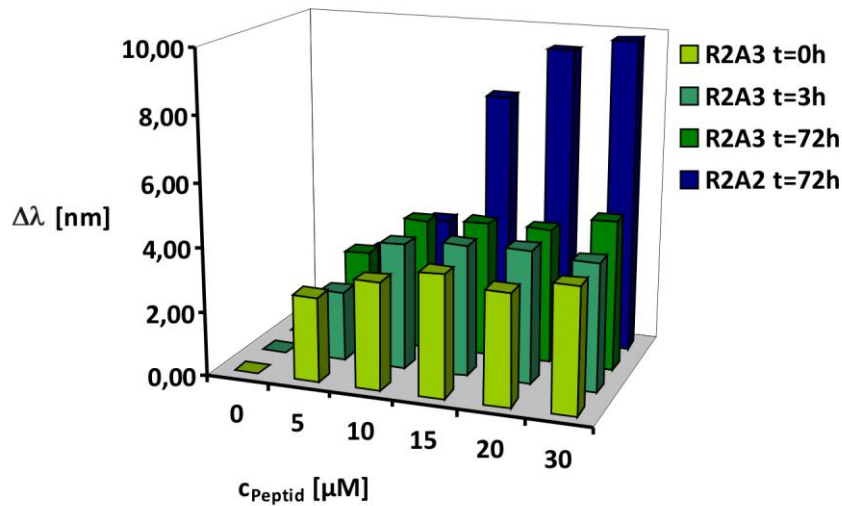
Dabei war direkt nach der Zugabe des Peptids eine leichte Verschiebung von bis zu 4 nm für die höchste eingesetzte Peptidkonzentration messbar. Mit steigender Inkubationszeit konnte für alle eingesetzten Peptidkonzentrationen eine stetig wachsende Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden. Der Vergleich mit dem Referenzpeptid VW05 zeigte jedoch eindeutig, dass die maximal erzielte Verschiebung von 10 nm nach drei Tagen mehr als dreimal so klein ist wie für VW05 nach nur drei Stunden. Scheinbar sind zwei präsentierte Arginine ausreichend, um eine Aggregation zu induzieren. Jedoch deutet die geringere Verschiebung darauf hin, dass die Wechselwirkungen insgesamt schwächer sind, sodass die gebildeten Aggregate nicht die Größe wie unter Verwendung von VW05 erreichen. Unabhängig davon waren auch hier die schon bei VW05 beobachteten, charakteristischen Merkmale der einsetzenden Aggregation wie der Farbumschlag und die Präzipitation zu beobachten. Letzteres viel jedoch schwächer und mit einer zeitlichen Verzögerung aus.

Da lediglich zwei Arginine in einem aus 26 Aminosäuren bestehenden Peptid für die Aggregation von Gold-Nanopartikeln ausreichend waren, sollte nun untersucht werden, ob die beobachteten Verschiebungen auch nach einer Sequenzverlängerung zu beobachten waren. Dementsprechend wäre dann die Größe des Peptids nicht entscheidend für die Interaktion mit Nanopartikeln sondern lediglich die Anzahl an Ladungen.

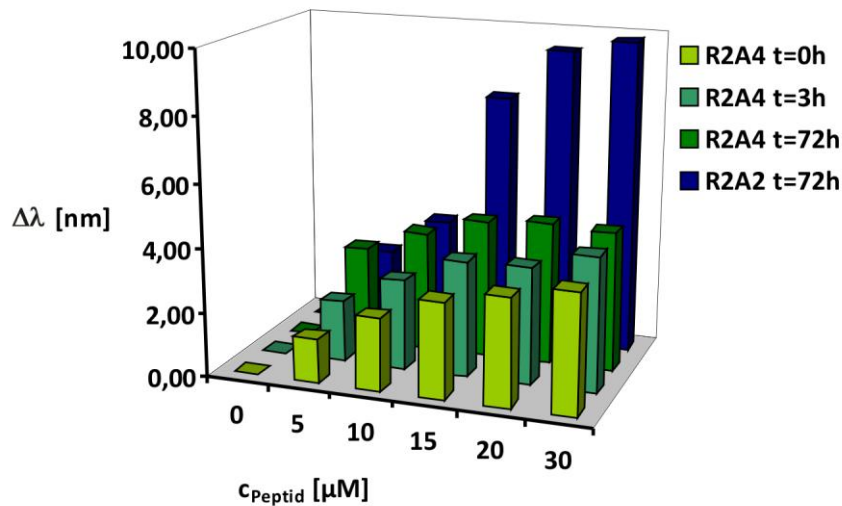


**Abbildung 46:** R2A2-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande von Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Peptidkonzentration nach 0, 3 und 72 Stunden.

Das Peptid R2A2 wurde daher um sieben Aminosäuren verlängert und die Aggregationsversuche wiederholt. Etwas überraschend war die gemessene Absorptionsverschiebung direkt nach der Zugabe des Peptids R2A3 etwas größer als für das Peptid R2A2. Selbst nach drei Stunden waren markante Unterschiede zwischen beiden Peptiden in der Rotverschiebung nur bei der höchsten verwendeten Peptidkonzentration ersichtlich, die zu diesem Zeitpunkt nur noch halb so groß war wie für das Peptid R2A2. Andererseits änderte sich die bereits anfänglich erzielte maximale Verschiebung von etwa 4-5 nm über die komplette Zeitspanne und auch innerhalb einer Konzentrationsreihe nicht mehr. Demzufolge waren gerade bei der letzten Messung nach drei Tagen signifikante Unterschiede zu dem Peptid R2A2 zu beobachten. So konnte mit dem Peptid R2A2 eine mehr als doppelt so große Rotverschiebung als mit dem Peptid R2A3 erzielt werden. Da sich die Veränderungen in der Wellenlänge nur noch auf wenige Nanometer beschränkten, waren Farbveränderungen nun nicht mehr mit dem Auge zu erkennen. Nichtsdestotrotz war eine sehr langsam einsetzende Präzipitation der Nanopartikel erkennbar.



**Abbildung 47:** R2A3-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande von Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Peptidkonzentration nach 0, 3 und 72 Stunden.



**Abbildung 48:** R2A4-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande von Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Peptidkonzentration nach 0, 3 und 72 Stunden.

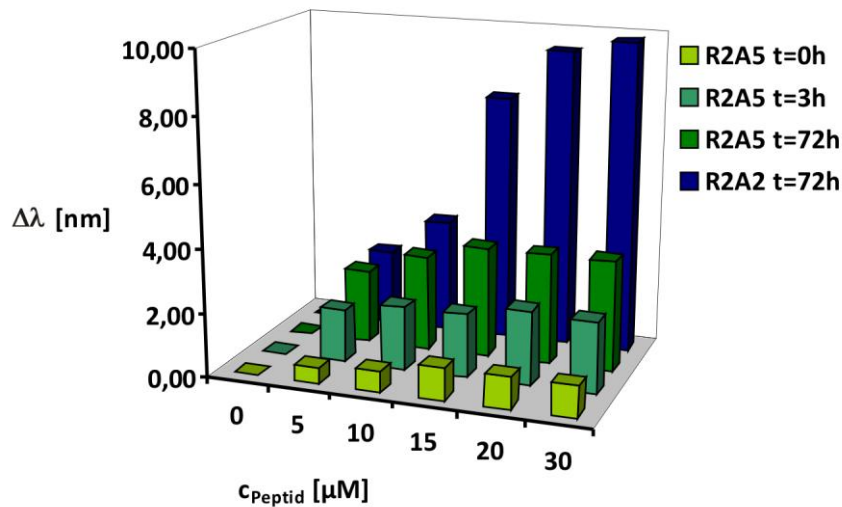
Die Verlängerung der Peptidsequenz um weitere sieben Aminosäuren (Peptid R2A4) hatte nur geringfügige Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Nanopartikel (Abbildung 48). Auch hier war eine maximale Verschiebung um 4-5 nm zu beobachten.

Anders als bei der R2A3-induzierten Aggregation war hier jedoch ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Verschiebung direkt nach Zugabe, aber auch nach drei Stunden sowie drei Tagen messbar. Darüber hinaus konnte auch innerhalb einer Konzentrationsreihe eine größer werdende Verschiebung des Absorptionsmaximums mit steigender Inkubationszeit gemessen werden. Im Vergleich zu dem Peptid R2A2 ist jedoch auch hier die maximal erzielte Verschiebung weniger als halb so groß. Da auch eine langsam einsetzende Präzipitation der Peptid-Nanopartikel-Aggregate zu beobachten war, sind die gemessenen Verschiebungen nicht einer veränderten Lösungsmittelzusammensetzung geschuldet.

Größere Unterschiede im Aggregationsverhalten machten sich erst nach der letzten Sequenzverlängerung (Peptid R2A5) bemerkbar (Abbildung 49). So konnte direkt nach der Zugabe des Peptids R2A5 nur eine minimale Veränderung der Bandenlage im Vergleich zu R2A3 und R2A4 gemessen werden. Die Verschiebung um maximal 1 nm war dabei vergleichbar mit dem Peptid R1A3. Im Gegensatz zu R1A3 war anschließend jedoch eine Rotverschiebung zu beobachten, die annähernd das Niveau der Peptide R2A3 und R2A4 erreichte. Dies war jedoch erst nach einer längeren Inkubationszeit von drei Tagen und einer Peptidkonzentration von mindestens 15  $\mu\text{M}$  der Fall. Die nur sehr langsam einsetzende Aggregation der Nanopartikel ließ sich mit der im Verhältnis zur Peptidlänge geringen Anzahl an ladungspräsentierenden Argininen erklären. Auf Grund dieser geringen Ladungsdichte waren die auftretenden Wechselwirkungen zwischen Peptid und Nanopartikel, verglichen mit allen vorherigen Peptiden, offensichtlich sehr schwach, sodass eine erkennbare Aggregation erst sehr verzögert möglich war. Nichtsdestotrotz konnte auch hier eine schwache Präzipitation nach drei Tagen beobachtet werden, welche ein weiterer Hinweis für die Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation war.

Davon unabhängig konnte in allen Fällen eine pH-abhängige Reversibilität der Aggregation beobachtet werden. Die Erhöhung des pH-Werts bewirkte eine Umkehr der Nettoladung der Peptide, wodurch sich die Peptide und Nanopartikel gegenseitig abstoßen. In Folge dessen wurde die Peptid-induzierte Aggregation unterbrochen. Dieser Vorgang konnte jedoch durch eine Änderung des pH-Werts auf den ursprünglichen Wert von 9 rückgängig gemacht werden. Demzufolge war eine

reversible An/Aus-Schaltung der Nanopartikel-Aggregation in Abhängigkeit des pH-Werts möglich.



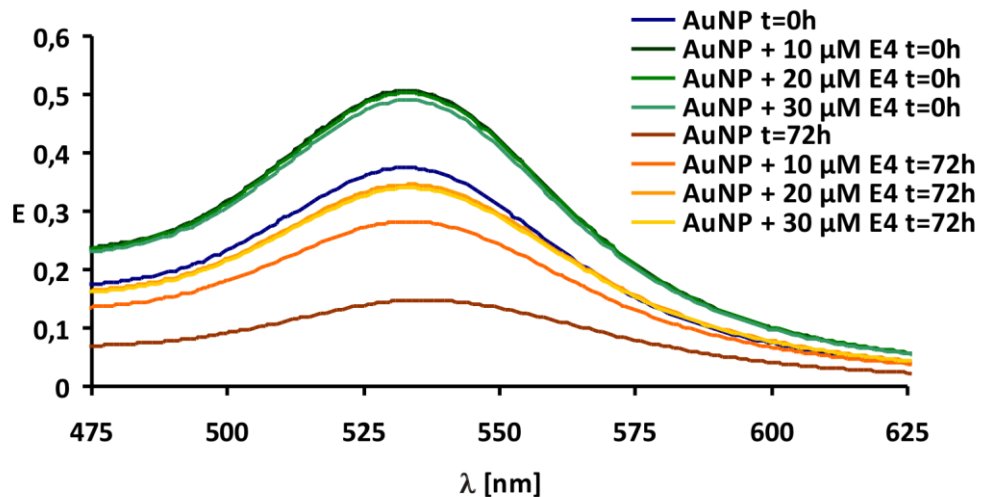
**Abbildung 49:** R2A5-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums der Oberflächenplasmonbande von Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Peptidkonzentration nach 0, 3 und 72 Stunden.

Peptid E4 präsentiert anstelle der positiv geladenen Arginine negativ geladene Glutaminsäuren und kann so für die Interaktion mit Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikeln eingesetzt werden. Die Aggregationsstudien wurden unter den vorherigen Bedingungen durchgeführt.

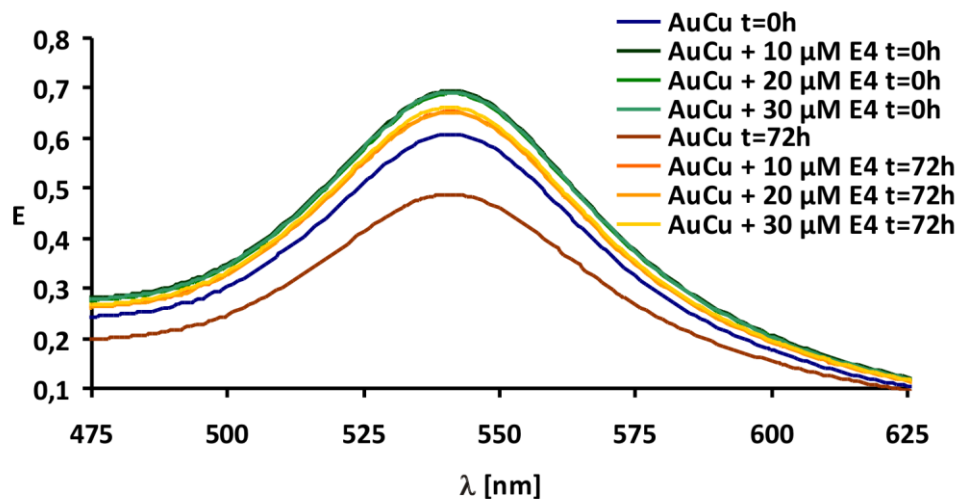
Die Analyse der UV-Vis Spektren ergab, dass das Peptid E4, welches vier geladene Aminosäuren präsentierte, nicht in der Lage war, eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlänge bei pH 8 zu induzieren. Dies galt sowohl für die 34 nm großen Nanokugeln als auch für die 45 nm großen Nanowürfel. Trotz eines großen Überschusses an Peptid konnte keine Veränderung der Bandenlage beobachtet werden. Anders als für das Peptid R1A3, welches ebenfalls keine Rotverschiebung der Oberflächenplasmonbande verursachen konnte, bewirkte die Gegenwart des Peptids aber eine markante Intensitätserhöhung der Absorptionsbande. Diese war unabhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration und konnte für beide Nanopartikel-Spezies in gleichem Maße beobachtet werden. Jedoch resultierte die Intensitätserhöhung nicht aus einer Streuung an größeren Nanopartikel-Aggregaten oder einer Trübung der Lösung. Es war eher wahrscheinlich, dass die durch das Peptid veränderten Lösungseigenschaften diese Effekte im



UV-Vis Spektrum hervorgerufen hatten. Dagegen waren die nach drei Tagen detektierten Intensitätsverluste der Oberflächenplasmonbande das Resultat der geringen Nanopartikel-Stabilität im gewählten TRIS/HCl pH 8 Puffer, die speziell bei den kubischen Nanopartikeln zum Tragen kam. Diese Annahme konnte auch optisch auf Grund der sichtbaren Ablagerung von Nanopartikeln bestätigt werden.



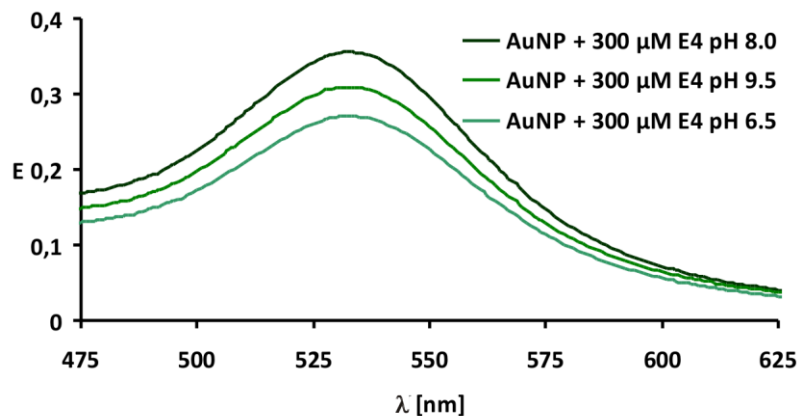
**Abbildung 50:** UV-Vis Spektren der sphärischen Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikel mit und ohne Peptid E4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.



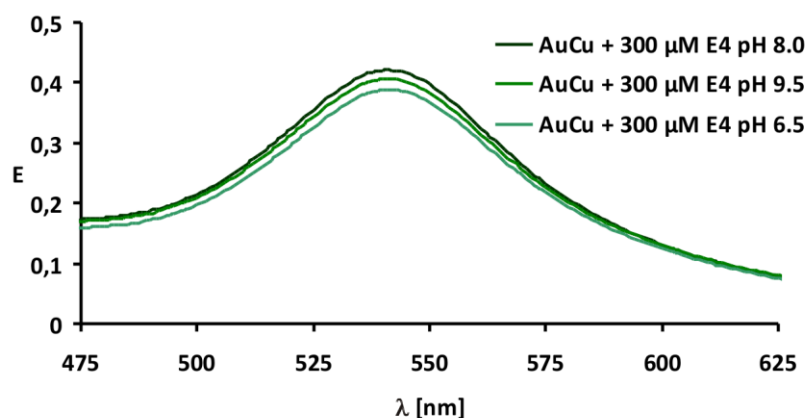
**Abbildung 51:** UV-Vis Spektren der kubischen Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikel mit und ohne Peptid E4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Um auszuschließen, dass der pH-Wert falsch gewählt wurde und somit eine Aggregation nicht möglich war, wurde die Messung bei einem höheren (pH 9.5) und niedrigerem (pH 6.5) pH-Wert wiederholt (Abbildung 52 und 53). Da die Nanopartikel im Vergleich zu den zuvor genutzten Nanopartikel um ein Vielfaches größer waren und es möglich sein könnte, dass der verwendete Konzentrationsbereich zu klein gewählt

wurde, wurde für diese Messungen eine relativ hohe Peptidkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  vorgegeben. Wie die UV-Vis Spektren belegen, hatten diese Modifizierungen keinerlei Auswirkungen auf die Nanopartikel-Aggregation. So verursachte weder die Konzentrationserhöhung noch die Änderungen des pH-Werts eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen. Die zu beobachtenden Intensitätsverluste resultierten einerseits aus der Probenverdünnung, da der pH-Wert einer Probe ausgehend von pH 8 erst auf pH 9.5 erhöht und anschließend auf pH 6.5 gesenkt wurde. Andererseits verringerten die pH-Wert Änderungen die Stabilität der Nanopartikel, die ebenfalls einen Intensitätsverlust bewirkten.



**Abbildung 52:** UV-Vis Spektren der sphärischen Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikel nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  Peptid E4 bei verschiedenen pH-Werten.

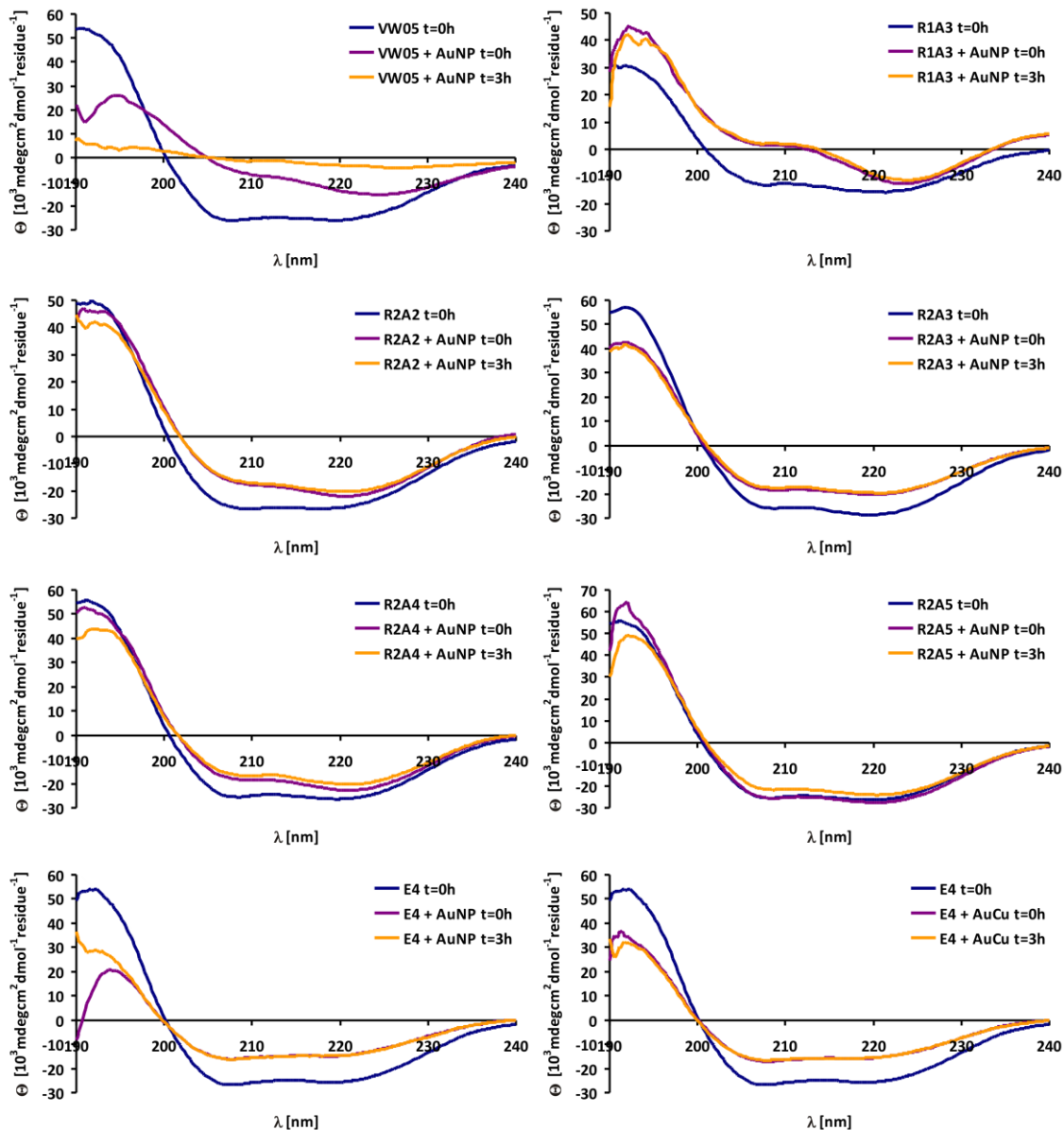


**Abbildung 53:** UV-Vis Spektren der kubischen Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikel nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  Peptid E4 bei verschiedenen pH-Werten.

### 5.1.5. CD-spektroskopische Untersuchungen der Peptid-Nanopartikel-Interaktion

Frühere Studien von Peptid-Nanopartikel Interaktionen hatten gezeigt, dass es in vielen Fällen zu Änderungen in der Sekundärstruktur der beteiligten Peptide kam. Unter anderem konnten KOKSCH *et al.* ausgehend von ungefalteten oder  $\alpha$ -helikalen Peptiden die Bildung von  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen in der Gegenwart von negativ geladenen Gold-Nanopartikeln beobachten.<sup>[225]</sup> Um zu überprüfen, ob es während der Peptid-induzierten Nanopartikel-Aggregation ebenfalls zu Umfaltungseffekten kam, wurden zeit- und konzentrationsabhängige CD-Messungen durchgeführt. Die MUDS- bzw. Amino-PEG-stabilisierten Gold-Nanopartikel erzeugten, auf Grund des Fehlens eines chiralen Zentrums, selber kein CD-Signal. Daher resultieren die erhaltenen CD-Spektren ausschließlich aus den untersuchten Peptiden. Alle Proben wurden unter den gleichen Bedingungen wie für die UV-Vis Studien präpariert.

Die Messungen des Referenzpeptids VW05 offenbarten die größten Veränderungen in den aufgenommenen CD-Spektren. Schon direkt nach der Zugabe der Nanopartikel erfolgte ein signifikanter Signalverlust. Dieser resultierte aus der Bindung der Peptide an die Nanopartikel, wodurch diese keinen Beitrag mehr zum CD-Signal leisten konnten. Dieser Intensitätsverlust betraf die beiden Minima bei 208 und 222 nm jedoch nicht in gleichem Maße. So fiel der Intensitätsverlust für das Minimum bei 222 nm sehr viel geringer aus.



**Abbildung 54:** CD-Spektren der Peptide VW05, R1A3, R2A2, R2A3, R2A4, R2A5 und E4 nach Zugabe der sphärischen bzw. kubischen Gold-Nanopartikel. Die Peptidkonzentration beträgt jeweils 15  $\mu\text{M}$ .

KOKSCH *et al.* konnten auf Kryo TEM Aufnahmen dieser Peptid-Nanopartikel-Aggregate außerdem die Bildung von Peptidfasern während der Aggregation nachweisen.<sup>[195]</sup> Daher wurde diese Intensitätsverschiebung sehr wahrscheinlich durch die Bildung  $\alpha$ -helikaler Peptidfasern verursacht, da dieser Kurvenverlauf charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Peptidfasern ist. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden war ein nahezu vollständiger Signalverlust zu erkennen. Offensichtlich waren zu diesem Zeitpunkt nur noch sehr geringe Mengen an Peptid gelöst. Folglich war der größere Teil des

eingesetzten Peptids an die Nanopartikel gebunden. Da die Peptide in einem 300-fachen Überschuss eingesetzt wurden, müssen sich die Peptide in mehreren Schichten um die Nanopartikel angelagert haben. Nichtsdestotrotz hatte sich die Sekundärstruktur, soweit erkennbar, nicht geändert.

Obwohl das Peptid R1A3 während der UV-Vis Studien keine aggregierenden Eigenschaften zeigte, bewirkte die Anwesenheit der Nanopartikel auch hier eine Veränderung des CD-Spektrums, auch wenn sich an der Sekundärstruktur grundsätzlich nichts änderte. So trat das Minimum bei 222 nm sehr viel stärker als vorher zum Vorschein. Außerdem verschob sich das komplette Spektrum in den Bereich der positiven Elliptizität. Diese Beobachtungen verstärkten sich jedoch nicht im Laufe der Zeit.

Auf die CD-Spektren der Peptide R2A2, R2A3, R2A4 und R2A5 hatte die Anwesenheit der Gold-Nanopartikel sehr ähnliche Einflüsse. In allen Fällen bewirkte die Anwesenheit der Nanopartikel einen Intensitätsverlust. Dieser fiel mit größer werdender Peptidsequenz jedoch immer geringer aus, sodass für das Peptid R2A5 direkt nach der Nanopartikel-Zugabe gar kein Intensitätsverlust zu bemerken war. Dies änderte sich erst nach einer Reaktionszeit von drei Stunden. Diese Beobachtung bestätigte die vorherigen UV-Vis Messungen, welche eine zeitversetzt einsetzende Aggregation für das Peptid R2A5 vorhersagte. Unabhängig davon änderte sich auch hier die Sekundärstruktur der Peptide nicht. Es war lediglich eine Intensivierung des Minimums bei 222 nm bei allen Peptiden erkennbar. Da die Peptide jedoch schon vor der Zugabe der Nanopartikel als  $\alpha$ -helikale Faser vorlagen, zeigten die CD-Spektren, dass sich deren Quartärstruktur auch nach Nanopartikel-Zugabe nicht geändert hatte.

Das gegensätzlich geladene Peptid E4 konnte ebenfalls seine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur beibehalten. Dies war erwartet worden, da die UV-Vis Messungen, ähnlich wie bei dem Peptid R1A3, keinerlei Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel nachweisen konnten. Jedoch war auch hier ein Intensitätsverlust im CD-Spektrum direkt nach der Zugabe der Nanopartikel zu beobachten. Dieser verstärkte sich zwar nicht im Laufe der Zeit jedoch kam diese Beobachtung überraschend, da erwartet wurde, dass sich ohne eine Wechselwirkung mit Nanopartikeln der Kurvenverlauf nicht ändern sollte.

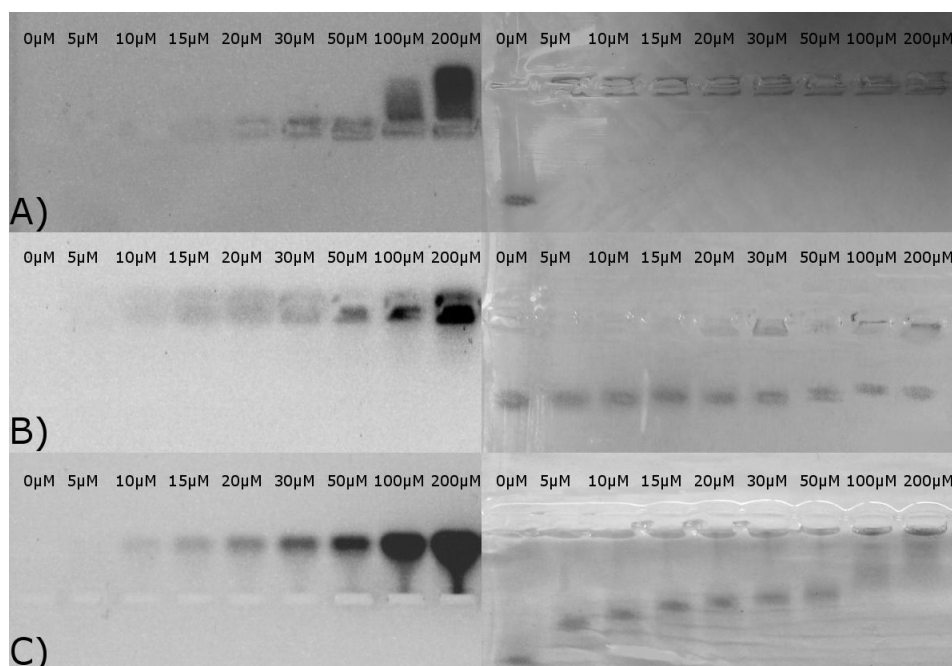
### 5.1.6. Gelelektrophoretische Untersuchung der Peptid-Nanopartikel-Aggregate

Die Peptid-induzierte Aggregation der MUDS-stabilisierten Gold-Nanopartikel wurde außerdem mittels Gelelektrophorese untersucht. Dafür wurden die, unter den gleichen Bedingungen wie für die UV-Vis Studien, hergestellten Proben auf ein 0.5 % Agarosegel, gelöst in 10 mM TRIS/HCl pH 9 Puffer, aufgetragen. Die Dokumentation der Banden erfolgte zum einen unter UV Strahlung, bei der die Peptidbanden auf dem Gel sichtbar gemacht wurden, sowie unter Weißlicht, um die Banden der gebildeten Peptid-Nanopartikel-Aggregate zu detektieren. Da das Peptid E4 keine Nanopartikel-aggregierenden Eigenschaften zeigte, wurde es im weiteren Verlauf nicht weiter untersucht.

Das Referenzpeptid VW05 zeigte mit zunehmender Peptidkonzentration ein stark verändertes Laufverhalten der Proben im Gel. Während sich die negativ geladenen MUDS-stabilisierten Nanopartikel in Abwesenheit des Peptids sehr weit in Richtung der Anode bewegten, bewirkte die Zugabe von nur 5  $\mu\text{M}$  Peptid, dass sich die Nanopartikel gar nicht mehr Richtung Anode bewegten. Dies war auf die Bildung der Peptid-Nanopartikel-Aggregate zurückzuführen, welche auf Grund ihrer Größe und der durch Ladungskompensation nach Anlagerung der Peptide an die Nanopartikel sinkenden Nettoladung in den Geltaschen liegen blieben. Ein weiteres Indiz für die Bildung dieser Peptid-Nanopartikel-Aggregate war das Fehlen einer Peptid-Bande bis zu einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ , welche in Abwesenheit der Nanopartikel sehr gut erkennbar war. Die Fluoreszenz des Peptids wurde vermutlich durch die Nähe zu den Gold-Nanopartikeln ausgelöscht. Ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  VW05, was einem 1000-fachen Überschuss an Peptid entsprach, wanderte stattdessen ein Teil des Peptids in Richtung der Kathode. Erwartungsgemäß nahm die Intensität dieser Bande mit steigender Peptidkonzentration zu.

Erwartungsgemäß änderten sich die Beobachtungen im Laufverhalten der Nanopartikel in Gegenwart des Peptids R1A3. In Abwesenheit des Peptids bewegten sich die Nanopartikel, wie bereits vorher beobachtet, in Richtung der Anode. Die Zugabe des Peptids hatte diesmal jedoch nahezu keine Auswirkungen auf das Laufverhalten. Selbst eine Peptidkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  verursachte keine Verringerung der Laufstrecke. Dies bestätigte die nach den UV-Vis und CD-Studien

getätigte Vermutung, dass R1A3 nicht in der Lage war eine Nanopartikel-Aggregation zu induzieren. Das demzufolge ungebundene Peptid blieb jedoch in den Geltaschen liegen und konnte nicht in Richtung der Kathode laufen. Dies resultierte aus der Faserbildung des Peptids, die offenbar zu groß waren, um in das Gel einzutreten. Das in den Geltaschen befindliche Peptid konnte jedoch erst ab einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  mit Sicherheit erkannt werden. Bei einer geringeren Konzentration war die Fluoreszenzaktivität vermutlich nicht ausreichend, um das Peptid im Gel sichtbar zu machen.



**Abbildung 55:** Gelelektrophorese der Peptid-Nanopartikel-Aggregate von VW05 (A), R1A3 (B) und R2A2 (C). Links: Agarosegel mit UV-Licht belichtet für die Visualisierung der Peptid-Banden. Rechts: Agarosegel mit Weißlicht belichtet für die Visualisierung der Nanopartikel- bzw. Peptid-Nanopartikel-Banden.

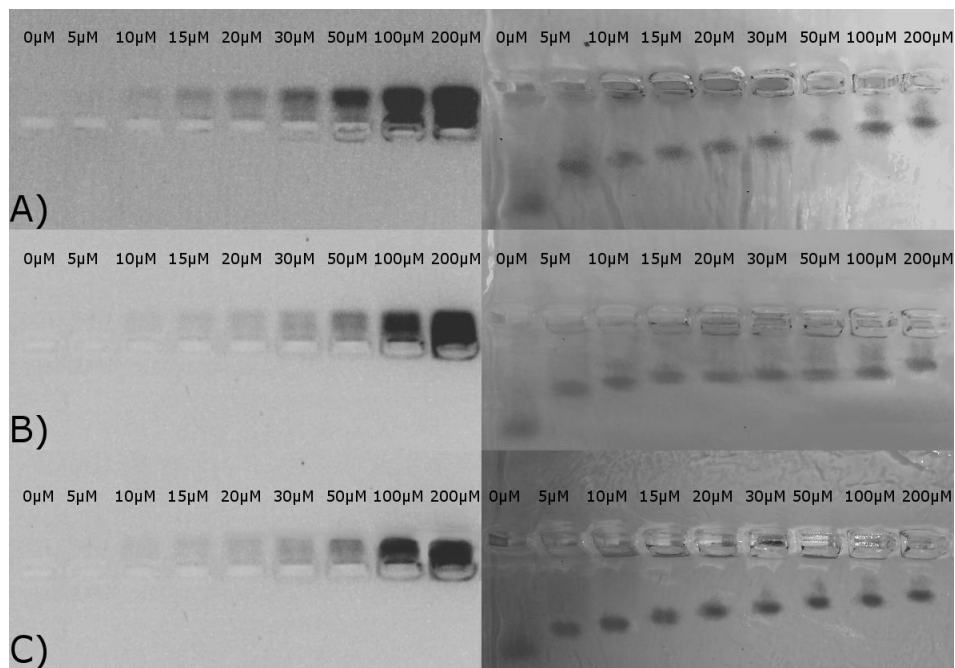
Die Zugabe des Peptids R2A2 bewirkte, dass die Laufstrecke der Nanopartikel kontinuierlich sank. Dies war der Bildung von Peptid-Nanopartikel-Aggregaten geschuldet, welche nach Wechselwirkung der Peptide mit den gegensätzlich geladenen Nanopartikeln deren Nettoladung senkte und somit die Laufstrecke verkürzten. Im Gegensatz zu VW05 konnte jedoch selbst ein großer Überschuss des Peptids R2A2 die Laufstrecke nicht so stark verringern, dass die gebildeten Aggregate vollständig in den Geltaschen liegen blieben. Es war jedoch ein langsames Verblässen der Peptid-

Nanopartikel-Bande sowie ein Schmierer der Bande ab einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Die Peptid-Nanopartikel-Aggregate schienen eine kritische Größe erreicht zu haben und konnten nur noch teilweise in das Gel laufen. Trotz allem war schon ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  eine Peptid-Bande sichtbar. Vermutlich waren die attraktiven elektrostatischen Anziehungskräfte nicht stark genug, um vollständig an die Nanopartikel zu binden, sodass ungebundene Peptide zurück blieben. Folglich konnte die Nettoladung der negativ geladenen Nanopartikel nicht kompensiert werden. Da der Laufweg der Peptid-Nanopartikel trotzdem kontinuierlich kürzer wurde und ab einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  die Bande langsam verblasste und sich erkennbare Mengen an Peptid-Nanopartikel-Aggregaten in der Geltasche zu erkennen waren, ist sehr wahrscheinlich den sehr hohen Peptidüberschüssen geschuldet. Dadurch konnten die schwächeren Wechselwirkungen kompensiert werden und entweder die gebildeten Aggregate weiter anwachsen, wodurch sie einen kürzeren Laufweg zurücklegen konnten, oder es erfolgte eine Ladungskompensation durch eine mehrfache Anlagerung der Peptide an die bis dato negativ geladenen Nanopartikel-Aggregate. Nichtsdestotrotz wurde die Peptid-Bande mit steigender Peptidkonzentration intensiver. Diese blieben jedoch nicht, wie noch bei dem Peptid R1A3 beobachtet, in den Geltaschen liegen, sondern bewegte sich in Richtung der Kathode.

Die drei auf dem Peptid R2A2 basierenden Peptide R2A3, R2A4 und R2A5 zeigten ein sehr ähnliches Laufverhalten. Die Zugabe der Peptide bewirkte jeweils eine kontinuierlich kürzer werdende Laufstrecke der Nanopartikel-Bande gegenüber den ungebundenen MUDS-stabilisierten Gold-Nanopartikeln. Folglich konnten alle drei Peptide erfolgreich die Aggregation der Gold-Nanopartikel auf Grund attraktiver elektrostatischer Wechselwirkungen induzieren. Jedoch war auch hier, ähnlich wie bei der R2A2-induzierten Nanopartikel-Aggregation, zu erkennen, dass selbst bei einem großen Peptidüberschuss von bis zu 200  $\mu\text{M}$  die gebildeten Aggregate nicht in den Geltaschen liegen blieben. Diese waren entweder nicht groß genug, was auch die UV-Vis Studien bestätigen würden, oder es wurde keine vollständige Ladungskompensation durch Anlagerung der positiv geladenen Peptide an die negativ geladenen Nanopartikel erreicht. Spätestens ab einer Peptidkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  konnten auf den UV Aufnahmen der Agarosegele Peptid-Banden beobachtet werden,



die mit wachsender Konzentration an Intensität zunahmen. Da die Peptidsequenzen schrittweise um jeweils sieben Aminosäuren verlängert wurden, die Zahl an geladenen Aminosäuren jedoch konstant blieb, veränderte sich das Größe-zu-Ladungs-Verhältnis bei jeder Peptidverlängerung, was in einer kürzer werdenden Laufstrecke der Peptid-Banden resultierte. Auf Grund der parallel zur Peptid-Nanopartikel-Bande auftretenden Peptid-Bande im UV Licht, waren auch hier die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Nanopartikel nicht stark genug um alle Peptide an die Nanopartikel zu binden. Dieser Nachteil konnte, wie schon bei dem Peptid R2A2, erneut nur durch einen Überschuss an Peptid kompensiert werden.



**Abbildung 56:** Gelelektrophorese der Peptid-Nanopartikel-Aggregate von R2A3 (A), R2A4 (B) und R2A5 (C). Links: Agarosegel mit UV-Licht belichtet für die Visualisierung der Peptid-Banden. Rechts: Agarosegel mit Weißlicht belichtet für die Visualisierung der Nanopartikel- bzw. Peptid-Nanopartikel-Banden.

### 5.1.7. Isotherme Titrationskalorimetrie

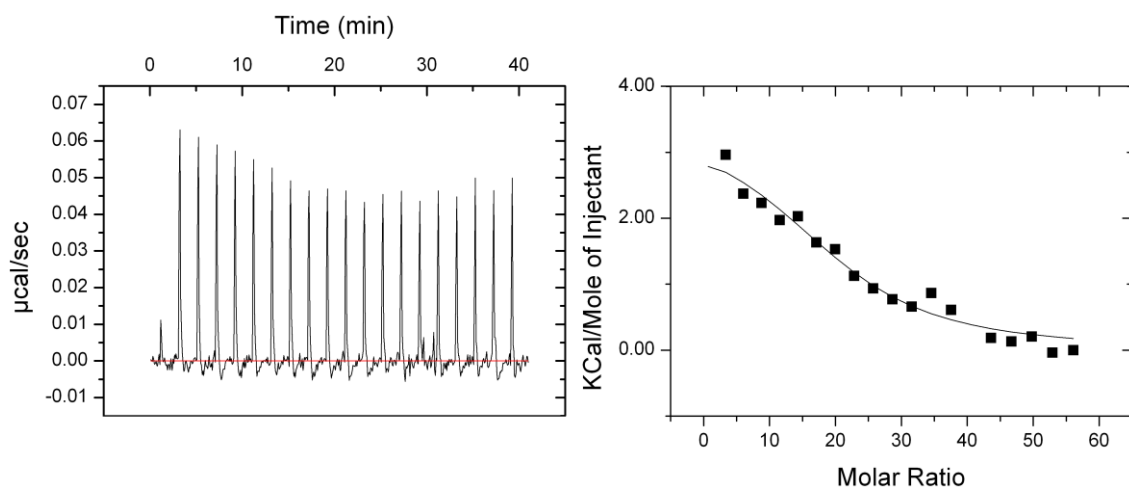
Die bisherigen Untersuchungsmethoden gaben Aufschluss, ob die verwendeten Peptide in der Lage waren eine Nanopartikel-Aggregation zu induzieren. Die Interaktion zwischen zwei Molekülen kann darüber hinaus auch mit thermodynamischen Parametern klassifiziert und charakterisiert werden. Auf Grund der geringen Probenvolumina und damit Probenmenge, die für die Untersuchung benötigt werden, eignet sich speziell die isotherme Titrationskalorimetrie für die Gewinnung thermodynamischer Parameter von Peptid-Peptid-, Peptid-Ligand- aber auch Peptid-Nanopartikel-Interaktionen. Der Versuchsaufbau wurde dabei so gewählt, dass die Nanopartikel in der Probenkammer vorgelegt wurden und das Peptid über die Spritze zutitriert wurde. Ein inverser Aufbau, bei dem das Peptid in der Probenzelle vorgelegt worden wäre, konnte nicht realisiert werden, da die Probenkonzentration in der Spritze etwa 1000 mal höher sein muss und es nicht möglich war, eine entsprechend hohe Nanopartikel-Konzentration zu erhalten. Mittels ITC konnten verschiedene thermodynamische Parameter bestimmt werden. Dazu zählten die molare Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ), die Bindungskonstante ( $K_B$ ), die freie Enthalpie ( $\Delta G$ ) sowie die Entropie ( $S$ ). Da für das Peptid R1A3 keine aggregations-induzierenden Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, wurde von diesem Peptid keine ITC Messung durchgeführt.

Die ITC Messung für das Referenzpeptid VW05 wurde bei einer Nanopartikel-Konzentration von 0.4  $\mu\text{M}$  und einer Peptidkonzentration von 106.25  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Auf dem ITC Diagramm konnten nach jedem Titrationsschritt positive Peaks von maximal 0.06  $\mu\text{cal/s}$  beobachtet werden, die durch eine Aufwendung von Wärme für die Aufrechterhaltung der Temperatur in der Probenzelle hervorgerufen wurden (Abbildung 57). Folglich wurde durch die Injektion des Peptids in die Probenlösung Wärme verbraucht, was auf eine endotherme Reaktion zwischen Peptid und Nanopartikel hindeutete. Mit steigender Anzahl an Injektionen verringerte sich die Peakhöhe kontinuierlich, bis sie nach etwa 12 Injektionen eine annähernd konstante Höhe erreichten. Die danach beobachtbare endotherme Reaktion resultierte vermutlich nicht mehr aus der Peptid-Nanopartikel-Interaktion, sondern war vielmehr der Verdünnung des Peptids nach der Injektion in die Probenzelle geschuldet. Für die

Bestimmung der thermodynamischen Parameter wurde die Fläche unter den Peaks integriert und gegen das molare Verhältnis von Peptid zu Nanopartikel aufgetragen. Durch Anpassung der integrierten Daten an einen idealisierten Kurvenverlauf wurde eine Bindungsisotherme erhalten, welche den gewünschten sigmoidalen Verlauf aufwies. Aus deren Verlauf konnten anschließend die gesuchten Parameter abgelesen bzw. berechnet werden, die in Tabelle 2 aufgeführt sind:

**Tabelle 2:** Thermodynamische Parameter der VW05-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

	$N$	$K_B [10^5 M^{-1}]$	$\Delta H [kcal mol^{-1}]$	$\Delta S [cal deg mol^{-1}]$
<b>VW05</b>	<b><math>20.2 \pm 1.6</math></b>	<b><math>5.3 \pm 1.7</math></b>	<b><math>3.5 \pm 0.4</math></b>	<b>38</b>



**Abbildung 57:** Grafische Darstellung der ITC Daten (links) sowie nach Integration (rechts) der VW05-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

Wie bereits am Verlauf der Isotherme zu erkennen war, handelte es sich mit einer molaren Bindungsenthalpie von  $3.5 kcal mol^{-1}$  um eine endotherme Reaktion, wobei es zur Interaktion von 20.2 Peptiden pro Nanopartikel kam. Darüber hinaus konnte für die Interaktion der Gold-Nanopartikel mit dem *coiled coil* Peptid VW05 eine Geschwindigkeitskonstante von  $5.3 \cdot 10^5 M^{-1}$  bestimmt werden. Nach Gleichung 1 konnte anschließend aus diesen Größen die Entropie berechnet werden, welche einen Wert von  $38 cal deg mol^{-1}$  hatte. Folglich ist diese Reaktion entropisch begünstigt.

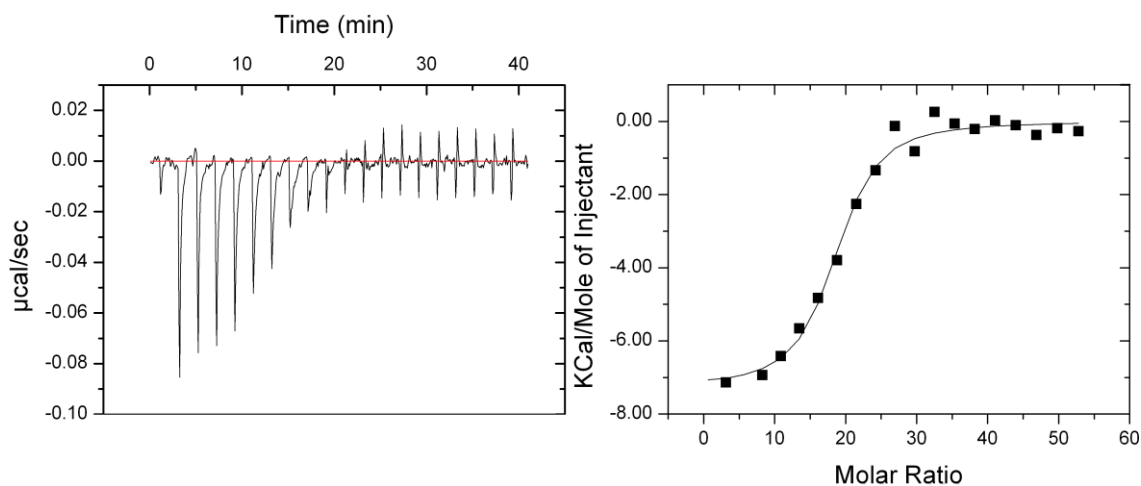
Die ITC Messung für das Peptid R2A2 wurde bei einer Nanopartikel-Konzentration von  $0.4 \mu M$  sowie einer Peptidkonzentration von  $100 \mu M$  durchgeführt. Im Gegensatz zu

VW05 verursachte die Injektion von R2A2 negative Peaks, welche sehr viel intensiver waren. Somit musste nach jedem Titrationsschritt weniger Energie aufgewendet werden, um die Temperatur in der Probenzelle konstant zu halten. Daraus resultierend handelte es sich bei dieser Reaktion, im Gegensatz zu der Reaktion mit VW05, um eine exotherme Reaktion. In Analogie zu der vorherigen Titration war auch hier nach der zwöften Injektion das Gleichgewicht erreicht. Jedoch waren anschließend kleine gegensätzliche Doppelpeaks zu beobachten, die einerseits aus der Verdünnung der konzentrierten Peptid-Lösung und andererseits vermutlich aus dem Auflösen größerer Faserbündel in Folge der Verdünnung resultierten. Nach Integration der Peaks wurde eine sigmoidale Bindungsisotherme erhalten, deren abgelesenen bzw. daraus berechneten Werte in Tabelle 3 aufgeführt sind:

**Tabelle 3:** Thermodynamische Parameter der VW05- und R2A2-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

	$N$	$K_B [10^5 \text{ M}^{-1}]$	$\Delta H [\text{kcal mol}^{-1}]$	$\Delta S [\text{cal deg mol}^{-1}]$
VW05	$20.2 \pm 1.6$	$5.3 \pm 1.7$	$3.5 \pm 0.4$	38
<b>R2A2</b>	<b><math>17.9 \pm 0.4</math></b>	<b><math>18.2 \pm 5.3</math></b>	<b><math>-7.3 \pm 0.2</math></b>	<b>5.8</b>

Obwohl das Peptid R2A2 über nur zwei Arginine in f-Position verfügte, die für eine Interaktion mit Gold-Nanopartikeln genutzt werden konnten, war die Bindungskonstante  $K_B$  mit einem Wert von  $18.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  mehr als dreimal so groß wie für das Peptid VW05. Dem Kurvenverlauf der Bindungsisotherme entsprechend handelte es sich dabei um eine exotherme Reaktion, bei der statistisch gesehen 17.9 Peptide pro Nanopartikel binden konnten. Dieser Wert war insofern überraschend, da die Untersuchungen mittels Agarosegelelektrophorese eher suggerierten, dass sehr viel mehr VW05 als R2A2 pro Nanopartikel binden könnten. Dagegen lag die daraus berechnete Entropie mit einem Wert von nur 5.8 deutlich unter dem für VW05 erhaltenen Wert. Nichtsdestotrotz war auch diese Reaktion entropisch begünstigt.

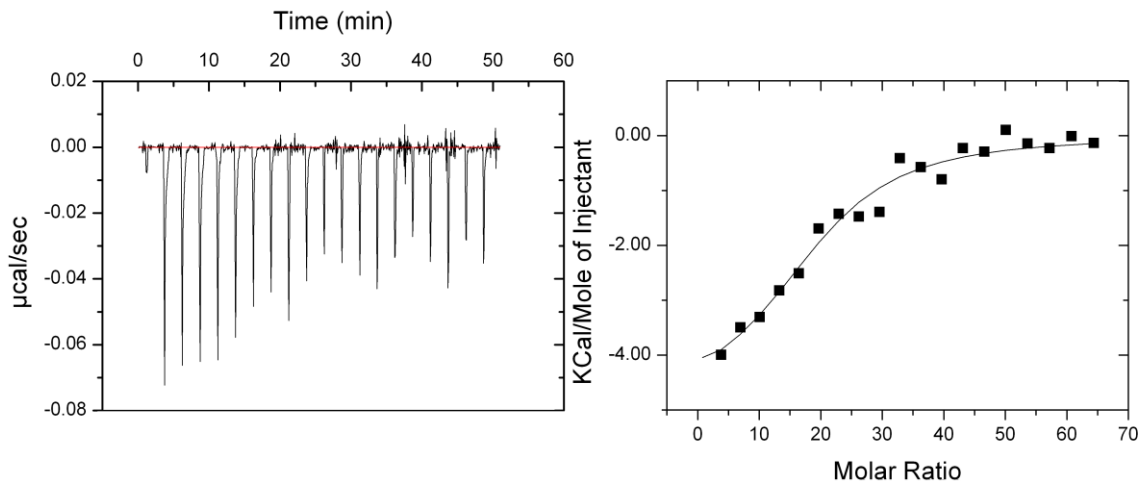


**Abbildung 58:** Grafische Darstellung der ITC Daten (links) sowie nach Integration (rechts) der R2A2-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

Die ITC Messung für das Peptid R2A3 wurde bei einer Nanopartikel-Konzentration von  $0.4 \mu\text{M}$  sowie einer Peptidkonzentration von  $122 \mu\text{M}$  durchgeführt. Wie bereits bei der Titration des Peptids R2A2 beobachtet, führten die Injektionen des Peptids R2A3 ebenfalls zu negativen Peaks in einem ähnlichen Intensitätsbereich, welche auf eine exotherme Reaktion hindeutete. Das Gleichgewicht war, obwohl die Peptidkonzentration merklich erhöht werden musste, erst nach 13 Injektionen erreicht. Dies deutete erneut darauf hin, dass die Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel schwächer sein müssten als für die beiden vorher untersuchten Peptide. Die danach auftretenden Peaks resultierten vermutlich erneut aus der freiwerdenden Wärme in Folge der Verdünnung der konzentrierten Peptid-Lösung. Da die eingesetzte Peptid-Lösung konzentrierter als vorher war, waren auch die daraus resultierenden Peaks etwas intensiver. Nach Integration der Peaks wurde eine sigmoide Bindungsisotherme erhalten, deren abgelesenen bzw. daraus berechneten Werte in Tabelle 4 aufgeführt sind:

**Tabelle 4:** Thermodynamische Parameter der VW05-, R2A2- und R2A3-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

	$N$	$K_B [10^5 \text{ M}^{-1}]$	$\Delta H [\text{kcal mol}^{-1}]$	$\Delta S [\text{cal deg mol}^{-1}]$
VW05	$20.2 \pm 1.6$	$5.3 \pm 1.7$	$3.5 \pm 0.4$	38
R2A2	$17.9 \pm 0.4$	$18.2 \pm 5.3$	$-7.3 \pm 0.2$	5.8
<b>R2A3</b>	<b><math>18.8 \pm 1.4</math></b>	<b><math>6.3 \pm 1.8</math></b>	<b><math>-4.9 \pm 0.5</math></b>	<b>9.7</b>



**Abbildung 59:** Grafische Darstellung der ITC Daten (links) sowie nach Integration (rechts) der R2A3-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

Während die Zahl an bindenden Peptiden pro Nanopartikel mit einem Wert von 18.8 in einer vergleichbaren Größenordnung lag, verringerte sich die Bindungskonstante auf etwa ein Drittel der Bindungskonstante von R2A2. Dies war eine direkte Folge der Peptidverlängerung um sieben Aminosäuren. Der Wert liegt jedoch immer noch leicht über dem für VW05 gemessenen Wert. Dem Kurvenverlauf der Bindungsisotherme entsprechend handelte es sich mit einer molaren Bindungsenthalpie von  $-4.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  erneut um eine exotherme Reaktion, wobei sich die berechnete Entropie im Vergleich zu R2A2 nahezu verdoppelte.

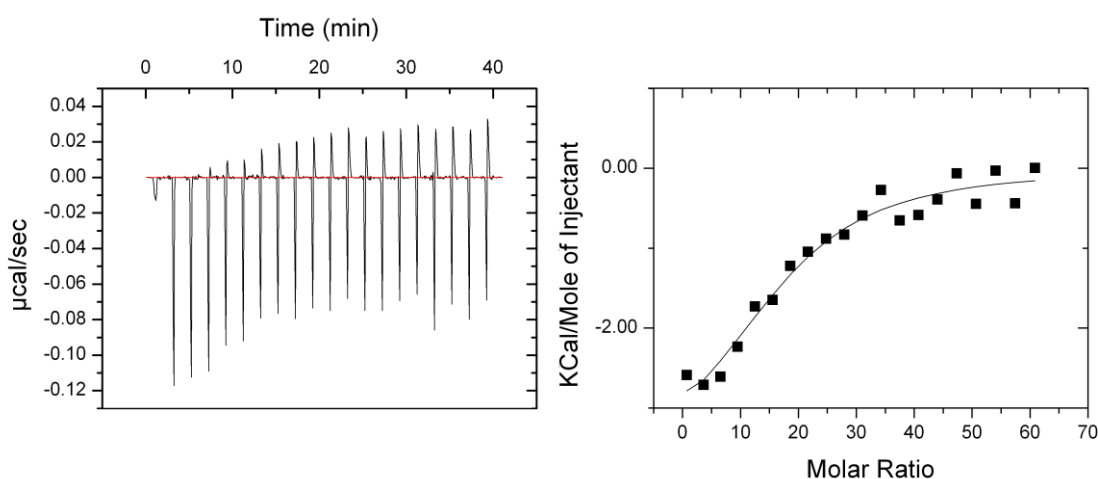
Die ITC Messung für das Peptid R2A4 wurde bei einer Nanopartikel-Konzentration von  $0.6 \mu\text{M}$  sowie einer Peptidkonzentration von  $173.5 \mu\text{M}$  durchgeführt. Wie nicht anders zu erwarten war, verursachten die Injektionen des Peptids R2A4 auch hier negative Peaks im ITC Diagramm, die sogar etwas intensiver als zuvor waren. Das Gleichgewicht war jedoch erst am Ende der Titration erreicht, was wiederum auf eine schwächer werdende Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel hindeutete. Die Auswertung der nach Peakintegration erhaltenen Bindungsisotherme ergab folgende thermodynamische Parameter, die in Tabelle 5 dargestellt sind:

**Tabelle 5:** Thermodynamische Parameter der VW05-, R2A2, R2A3 und R2A4-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

	$N$	$K_B [10^5 M^{-1}]$	$\Delta H [kcal mol^{-1}]$	$\Delta S [cal deg mol^{-1}]$
VW05	$20.2 \pm 1.6$	$5.3 \pm 1.7$	$3.5 \pm 0.4$	38
R2A2	$17.9 \pm 0.4$	$18.2 \pm 5.3$	$-7.3 \pm 0.2$	5.8
R2A3	$18.8 \pm 1.4$	$6.3 \pm 1.8$	$-4.9 \pm 0.5$	9.7
<b>R2A4</b>	<b><math>17.3 \pm 1.8</math></b>	<b><math>2.5 \pm 0.8</math></b>	<b><math>-3.9 \pm 0.5</math></b>	<b>11.5</b>

Die Bindungskonstante war mit einem Wert von  $2.5 \cdot 10^5 M^{-1}$  nun erstmals kleiner als für das Referenzpeptid VW05. Alle anderen Parameter variierten dagegen nur minimal. So war die molare Bindungsenthalpie zwar etwas kleiner als für das Peptid R2A3, dafür war die Entropie wiederum leicht höher. Auch die Anzahl an wechselwirkenden Peptiden pro Nanopartikel war mit 17.3 nahezu unverändert.

Die ITC-Messung für das Peptid R2A5 ergab keine auswertbaren Ergebnisse. Dies war sehr wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass die Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel, wie bereits mittels UV-Vis Spektroskopie beobachtet wurde, nur sehr langsam und zeitverzögert einsetzte. Daher wurden nur kleine, negative Peaks gleicher Intensität erhalten, die vermutlich das Resultat der Peptidverdünnung waren.



**Abbildung 60:** Grafische Darstellung der ITC Daten (links) sowie nach Integration (rechts) der R2A4-induzierten Gold-Nanopartikel-Aggregation.

### 5.1.8. Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Peptid-Nanopartikel-Aggregate

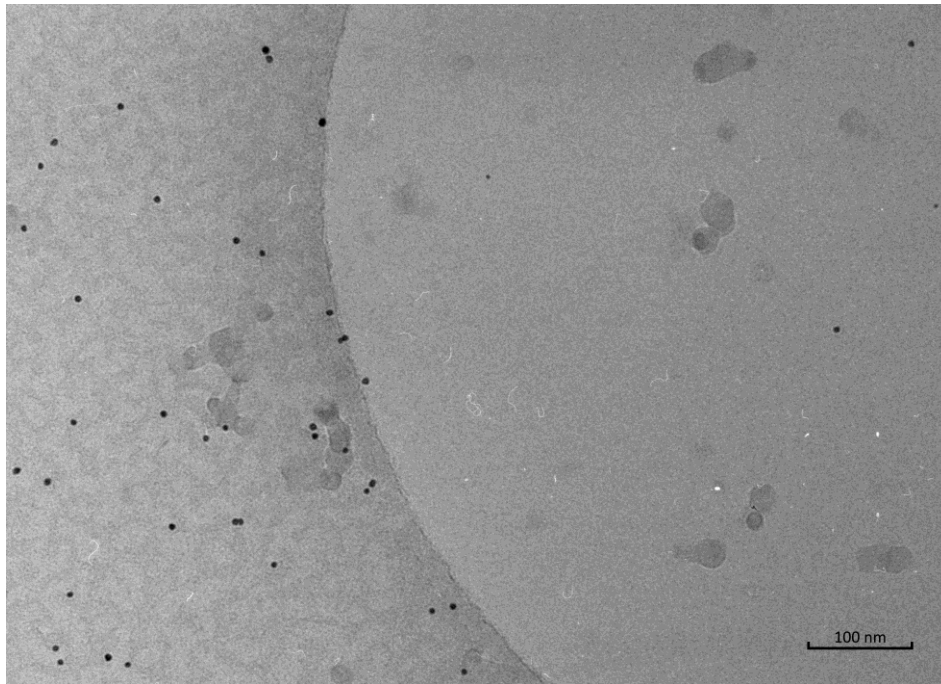
Die bisher dargestellten Ergebnisse konnten zwar klären, ob eine Nanopartikel-Aggregation durch *coiled coil* bzw. Faser-bildende Peptide induziert werden konnte, jedoch gaben sie keinen Rückschluss auf deren Struktur. Eine der bekanntesten und wichtigsten Methoden zur Visualisierung der gebildeten Aggregate ist die Transmissions-Elektronen Mikroskopie. Unter Standardbedingungen kommt es dabei zu einer Eintrocknung der Probe während der Präparation. Der Nachteil dieser Präparationsmethode liegt in den teilweise auftretenden Aggregationseffekten, welche in Lösung womöglich nicht auftreten würden. Daher würden Proben, die auf diese Weise präpariert wurden, nur begrenzt Rückschlüsse auf die Struktur der gebildeten Aggregate zulassen. Das Entfernen des Lösungsmittels kann jedoch gravierende Folgen haben, die bis zum Einsturz der Struktur reichen, sofern, wie bei manchen DNA-Nanopartikel-Aggregaten,<sup>[226]</sup> ein hoher Prozentteil der Struktur von Lösungsmittelmolekülen belegt ist. Folglich muss die Struktur der Peptid-Nanopartikel-Aggregate in Lösung nicht zwingend mit den Aufnahmen von herkömmlich präparierten TEM-Proben übereinstimmen. Um veränderte Strukturen, auf Grund von Eintrocknungsphänomenen, zu verhindern, wurden von allen untersuchten Proben Kryo-TEM-Aufnahmen angefertigt. Dabei wird ein dünner Flüssigkeitsfilm der Probe auf dem Probenträger eingefroren. Dies gewährleistet, dass bei der mikroskopischen Untersuchung die native Struktur der Probe abgebildet wird.

Da bereits in früheren Arbeiten Kryo-TEM-Aufnahmen von Peptid-Nanopartikel-Aggregaten des Peptids VW05 angefertigt wurden, wurde auf eine Wiederholung der Messung verzichtet. Die Aufnahmen wurden jedoch als Vergleich für die hier präsentierten Kryo-TEM-Aufnahmen herangezogen.

Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel ohne Peptid eine definierte Struktur in Lösung einnehmen, wurden zuerst Kryo-TEM-Aufnahmen der reinen Nanopartikel, gelöst in 10 mM TRIS/HCl pH9 Puffer, angefertigt. Wie in Abbildung 61 zu erkennen ist, besaßen die MUDS-stabilisierten Gold-Nanopartikel keinerlei Struktur. Die meisten Nanopartikel lagen vereinzelt mit teilweise großen Abständen untereinander auf dem



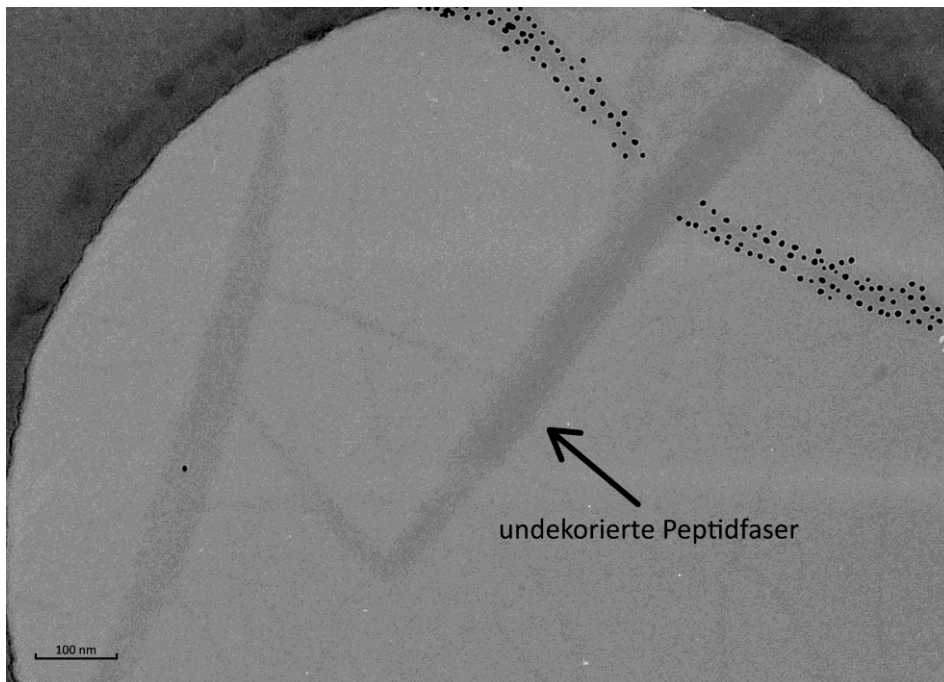
Grid vor. Lediglich vereinzelt waren zwei enger zusammenliegende Nanopartikel zu beobachten.



**Abbildung 61:** Kryo-TEM-Aufnahme der reinen Nanopartikel-Lösung bei pH 9.

Die Kryo-TEM-Aufnahmen des Faser-bildenden Peptids R2A2 konnten die an Hand der vorherigen Untersuchungen aufgestellte Vermutung bestätigen, dass es sich hierbei um ein Aggregations-induzierendes Peptid handelte. Anders als das *coiled coil* Peptid VW05, das eine unstrukturierte Nanopartikel-Aggregation bewirkte, verursachte das Peptid R2A2 eine hochgradig geordnete Aggregation der Nanopartikel. Ursächlich für diese Beobachtung war die Bildung von Peptidfasern sowie Faserbündeln. Dies hatte zur Folge, dass sich weniger das Peptid um die Nanopartikel sondern vielmehr die Nanopartikel an die Oberfläche der Peptidfasern anlagerte. Dabei musste jedoch zwischen den einzelnen Peptidfasern und den dickeren Faserbündeln unterschieden werden, da sich die Nanopartikel ausnahmslos an der Oberfläche der aus mehreren Peptidfasern bestehenden Faserbündel anlagerten (Abbildung 62). Vermutlich bevorzugten die Nanopartikel diese Faserbündel auf Grund der höheren Ladungsdichte, die aus der höheren Zahl an präsentierten Argininen resultierte. Es wäre jedoch auch möglich, dass sich zuerst Gold-Nanopartikel an einzelne Peptidfasern anlagerten, woraufhin diese die Bildung von Faserbündeln einleiteten. Nichtsdestotrotz konnten auch weiterhin einzelne Peptidfasern nachgewiesen werden.

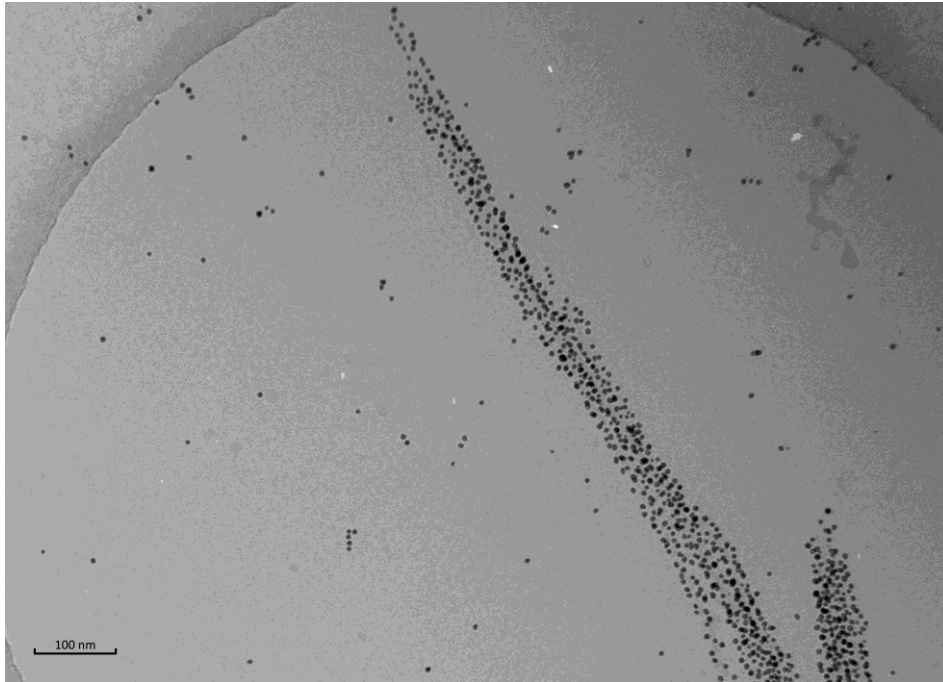
Darüber hinaus ist auf Abbildung 62 zu erkennen, dass sich die Nanopartikel, bei einem Überschuss an Peptid, nicht gleichmäßig auf alle Faserbündel verteilen. Vielmehr waren sowohl vollständig mit Gold-Nanopartikeln dekorierte Faserbündel zu erkennen als auch Faserbündel, an denen nicht ein einziger Gold-Nanopartikel gebunden hatte.



**Abbildung 62:** Kryo-TEM-Aufnahme der R2A2-induzierten Nanopartikel-Aggregation bei einem Überschuss an Peptid.

Erst bei einem Überschuss an Gold-Nanopartikeln konnte eine vollständige Dekoration aller Faserbündel erzielt werden (Abbildung 63). Das ein Überschuss an Nanopartikeln realisiert wurde, war eindeutig an den ungebundenen Nanopartikeln zu sehen. Als direkte Folge des Überschuss konnte eine sehr hohe Beladungsdichte der Faseroberfläche mit Gold-Nanopartikeln beobachtet werden. Da auch ungebundene Nanopartikel vorhanden waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die Beladungsdichte noch weiter erhöht werden konnte. Vermutlich würde eine engere Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Faseroberfläche zu einer Abstoßung zwischen den negativ geladenen Gold-Nanopartikeln führen. Die Anwesenheit einzelner, undekoriertes Peptidfasern konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Zwar wurde bei diesen Aufnahmen ein Defokus von -1800 nm genutzt, bei dem im Allgemeinen auch Peptide sichtbar werden, jedoch waren auch die Faserbündel nur ansatzweise zu erkennen. Auf Grund des generell nur sehr schwachen Kontrasts der

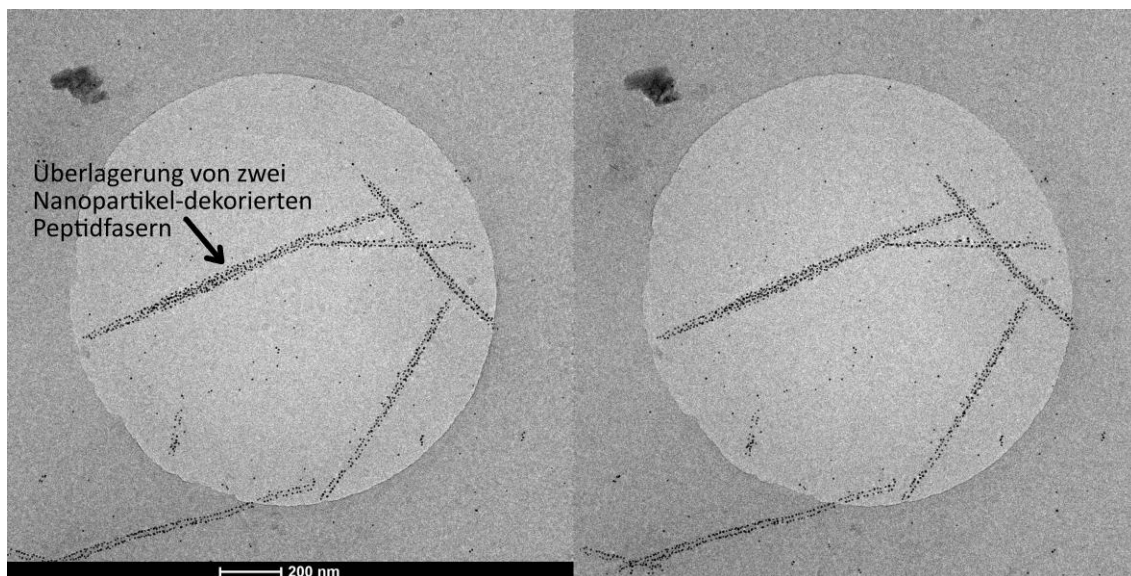
Peptide und der hohen Konzentration an Gold-Nanopartikeln, die einen hohen Kontrast liefern, wurde der Kontrast der Peptidfaserbündel verschluckt. Folglich konnte nicht mit endgültiger Sicherheit die Anwesenheit freier Peptidfasern ausgeschlossen werden.



**Abbildung 63:** Kryo-TEM-Aufnahme der R2A2-induzierten Nanopartikel-Aggregation bei einem Überschuss an Nanopartikeln.

Bei den bisherigen Kryo-TEM-Aufnahmen wurde eine dreidimensionale Struktur in ein zweidimensionales Bild übertragen. Daher konnte nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden, wie sich die Nanopartikel im dreidimensionalen Raum anordnen. Um diese Fragestellung zu klären, wurden Stereo-Kryo-TEM-Aufnahmen dieser Probe angefertigt. Dabei wurde im Vergleich zu den vorherigen Aufnahmen eine deutlich kleinere Vergrößerung gewählt. Dies wurde notwendig, weil bei einer 60000-fachen Vergrößerung der gefrorene Flüssigkeitsfilm durch den Elektronenstrahl geschmolzen wird. Bei Stereo-Kryo-TEM-Aufnahmen müssen jedoch von einer Stelle auf dem Grid zwei Aufnahmen unter Drehung des Grids gemacht werden. Daher darf der Eisfilm nicht nach der ersten Aufnahme geschmolzen sein. Um dies zu realisieren, wird ein Elektronenstrahl mit niedrigerer Energie gewählt, der jedoch nur eine 25000-fache Vergrößerung der Probe ermöglichte.

Die Auswertung der Stereo-Kryo-TEM-Aufnahmen ergab eine dreidimensionale Nanopartikel-Anordnung um einen zylindrischen Hohlraum, bei dem es sich um die Faserbündel handelte, die bei diesem Defokus keinen ausreichenden Kontrast lieferten, um sichtbar zu werden. Jedoch konnte kein regelmäßiger Abstand zwischen den Nanopartikeln bestimmt werden.

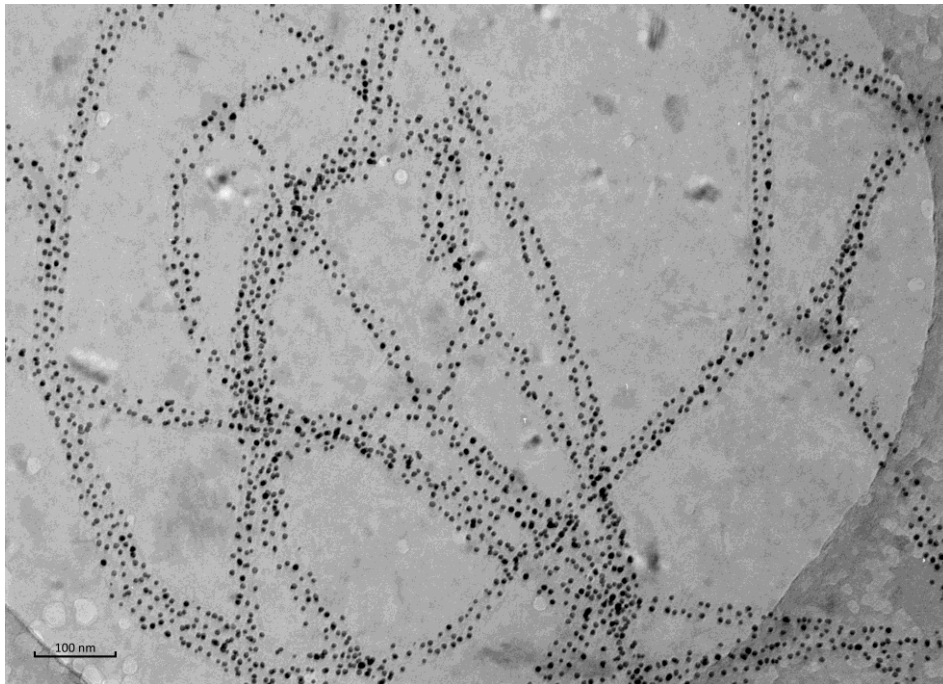


**Abbildung 64:** Stereo-Kryo-TEM-Aufnahme der R2A2-induzierten Nanopartikel-Aggregation bei einem Überschuss an Nanopartikeln.

Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnten zusätzlich die teilweise beobachteten höheren Nanopartikel-Dichten in manchen Bereichen der Faserbündel erklärt werden, die u.a. auch in der Mitte von Abbildung 64 zu beobachten waren. Dieses Phänomen resultierte aus der Überlagerung zweier mit Nanopartikeln dekorierte Faserbündel, die durch die Umwandlung des dreidimensionalen Raums in eine zweidimensionale Aufnahme hervorgerufen wurde. In der Realität lagen beide Fasern ausreichend weit voneinander entfernt.

Die Kryo-TEM-Aufnahmen des Peptids R2A3 unterschieden sich nur geringfügig von denen des Peptids R2A2. So konnte die Vermutung bestätigt werden, dass das Peptid R2A3 eine Aggregation der Nanopartikel auslösen konnte. In Analogie zu dem Peptid R2A2 war auch hier der Auslöser für die Aggregation die Anlagerung der Nanopartikel an die Peptide und weniger die Bindung der Peptide an die Nanopartikel, wie es bei dem Peptid VW05 beobachtet werden konnte. Folglich wurden auch hier ausschließlich Faserbündel mit Gold-Nanopartikeln dekoriert, sodass Interaktionen

zwischen einzelnen Peptidfasern und Nanopartikeln erneut nicht beobachtet werden konnten.

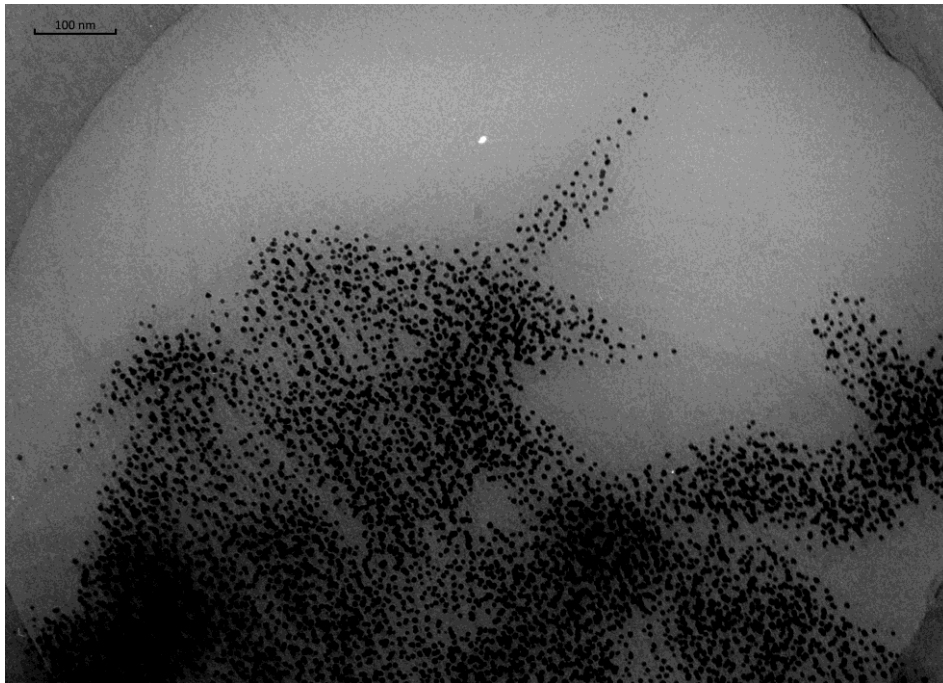


**Abbildung 65:** Kryo-TEM-Aufnahme der R2A3-induzierten Nanopartikel-Aggregation.

Während jedoch die mit Nanopartikeln dekorierten Faserbündel des Peptids R2A2 starr und gerade waren, offenbarten die Nanopartikel-dekorierten Faserbündel des Peptids R2A3 eine größere strukturelle Flexibilität, welche sich durch kurvige und geschwungene Strukturen bemerkbar machte. Dies war eine direkte Folge der schon auf den TEM-Bildern von R2A3 beobachteten Flexibilität der Faserbündel.

Die Kryo-TEM-Aufnahmen der R2A4-induzierten Nanopartikel-Aggregation offenbarten erste signifikante Unterschiede in der Struktur der erhaltenen Nanopartikel-Aggregate (Abbildung 66). Zwar konnte auch für dieses Peptid die Existenz von Peptidfasern nachgewiesen werden, jedoch erzeugten diese nicht die vorher beobachteten Nanopartikel-Strukturen. Die erhaltenen Strukturen waren sehr viel ungeordneter, auch wenn hier noch in Ansätzen Nanopartikel-dekorierte Faserbündel zu erkennen waren. Diese Strukturveränderung der Nanopartikel-Peptid-Aggregate wurde sehr wahrscheinlich durch das Fehlen der markanten Faserbündel für das Peptid R2A4 verursacht, was bereits in den TEM-Aufnahmen des reinen Peptids zu erkennen war. Stattdessen war vornehmlich die Ausbildung eines Netzwerks aus einzelnen Peptidfasern beobachtet worden, welches für die nun erhaltenen Nanopartikel-

Strukturen verantwortlich war. Da die Peptide in diesem Netzwerk keine geordnete Struktur aufwiesen, konnten sich die Gold-Nanopartikel anschließend auch in keiner definierten Struktur anlagern.

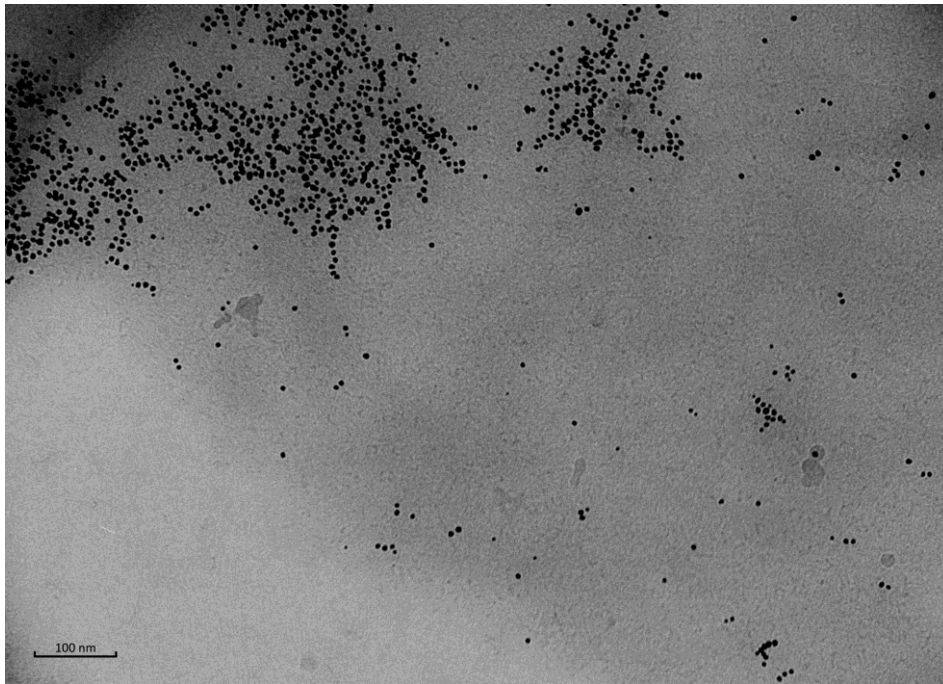


**Abbildung 66:** Kryo-TEM-Aufnahme der R2A4-induzierten Nanopartikel-Aggregation.

Jedoch formten diese Netzwerke teilweise übergeordnete Strukturen. Dazu zählten u.a. breite Streifen, die ungeordnet mit Nanopartikeln besetzt waren. Durch die Überlagerung dieser Strukturen entstanden Bereiche sehr hoher Ladungsdichte, sodass an diesen Stellen die einzelnen Nanopartikel kaum noch erkannt werden konnten.

Die Kryo-TEM-Aufnahmen der R2A5-induzierten Nanopartikel-Aggregation konnten die vorherigen Beobachtungen weiter untermauern. Da dieses Peptid keinerlei Tendenz zur Bildung von Faserbündeln zeigte, sondern ein feines Netzwerk aus Peptidfasern formte, ähnelten die gebildeten Nanopartikel-Aggregate in ihrer Form sehr stark denen des Peptids R2A4. Auch hier konnte eine definierte Fernordnung der Nanopartikel, wie sie noch bei den ersten beiden Peptiden durch die Anlagerung an die Faserbündel zu sehen war, nicht beobachtet werden. Stattdessen dominierte eine unstrukturierte Aggregation der Nanopartikel das Bild. Zudem war speziell auf Abbildung 67 das engmaschige Peptidnetzwerk als grauer Schatten hinter den Nanopartikeln zu erkennen. Die aggregierten Nanopartikel lagerten sich ausschließlich an diesem Peptidnetzwerk an. Damit ähnelten die erhaltenen Strukturen grundsätzlich

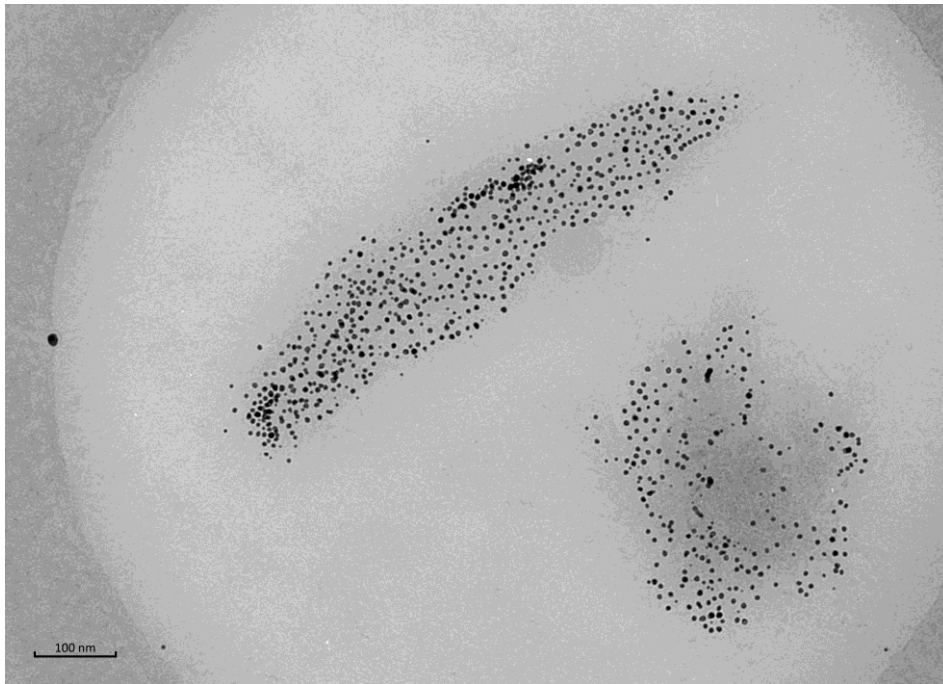
denen, die bereits bei der VW05-induzierten Nanopartikel-Aggregation erhalten wurden. Während jedoch die Verwendung eines *coiled coil* Peptids, wie bei VW05, eine dreidimensionale Anordnung der Nanopartikel möglich machte, schien mit Hilfe der Fasernetzwerke von Peptid R2A4 und R2A5 lediglich eine zweidimensionale Anordnung der Nanopartikel möglich.



**Abbildung 67:** Kryo-TEM-Aufnahme der R2A5-induzierten Nanopartikel-Aggregation.

Die Nanopartikel-Struktur, die durch die Interaktion mit den Peptiden R2A2 und R2A3 erzeugt wurde, war im Besonderen von der Ausbildung der Faserbündel abhängig. Eine Erhöhung des pH-Werts hatte dementsprechend zwei Auswirkungen. Zum einen konnte bei pH 11 weder für R2A2 noch für R2A3 Peptidfasern nachgewiesen werden. Zum anderen konnte die Nanopartikel-Aggregation durch Erhöhung des pH-Werts auf 11 inhibiert werden. Beide Prozesse waren reversibel und konnten durch eine anschließende Senkung des pH-Werts umgekehrt werden. Jedoch war die Frage, ob die vorher erhaltene Struktur der aggregierten Nanopartikel nach einer reversiblen Schaltung der Aggregation erneut beobachtet werden konnte. Durch eine Erhöhung des pH-Werts mit darauffolgender Erniedrigung auf den ursprünglichen Wert wurde diese Reversibilität der Aggregation für das Peptid R2A2 simuliert, um anschließend erneut Kryo-TEM-Aufnahmen der Nanopartikel-Aggregate anzufertigen. Diese

Aufnahmen offenbarten gravierende Unterschiede in der Struktur der aggregierten Nanopartikel.



**Abbildung 68:** Kryo TEM Aufnahme der R2A2-induzierten Nanopartikel-Aggregation nach einer pH-basierten Schaltung der Aggregation.

Während vor der pH-Änderung ausschließlich Nanopartikel-dekorierte Faserbündel beobachtet wurden, waren diese Strukturen danach gar nicht mehr vorhanden. Die Analyse der Aufnahmen lieferte stattdessen neuartige Nanopartikel-Strukturen. So wurden zum einen völlig ungeordnete Strukturen sichtbar, die in ihrem Aussehen sehr stark den VW05-induzierten Nanopartikel-Aggregaten ähnelten. Zum anderen waren auch Strukturen erkennbar, die nur in Ansätzen durch Faserbündel erzeugt wurden. Diese Strukturen wurden aber von bedeutend kürzeren und gleichzeitig breiteren Faserbündeln erzeugt. Dadurch wurde zwar eine Tendenz für die Anordnung der Nanopartikel vorgegeben, bei einer genaueren Betrachtung viel jedoch auf, dass die Nanopartikel sehr viel ungeordneter auf diesen Faserbündeln angeordnet waren als dies vorher der Fall war. Womöglich handelte es sich dabei auch gar nicht um Faserbündel, sondern vielmehr um die vorher beschriebenen Fasernetzwerke, die vergleichbare Nanopartikel-Anordnungen lieferten. Somit hat die Schaltung der Aggregation bedeutsame Auswirkungen auf die Struktur der Nanopartikel-Peptid-



Aggregate, die auch bei der Präparation bereits berücksichtigt werden müssen. Entscheidend für den Erhalt der dekorierten Faserbündel war daher, dass vor der Zugabe der Nanopartikel bereits Faserbündel existierten und anschließend keine Veränderung in der Quartärstruktur der Peptide durch Änderung des pH-Werts erfolgte.



## 5.2. Untersuchung der Bindungseigenschaften von divalenten *coiled coil* Peptiden an die Tandem SH2-Domäne von *Syk* und *ZAP70*

Die SH2-Domäne, welche sich aus etwa 100 Aminosäuren zusammensetzt, spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Voraussetzung für eine Signalübertragung ist die Phosphorylierung eines Tyrosylrestes durch entsprechende Kinasen, welcher hoch spezifisch an die SH2-Domäne binden kann. In einigen Proteinen sind die SH2-Domänen als Tandem-Konstrukte zusammengesetzt. Zu den Proteinen, die eine solche Anordnung aufweisen, zählen u.a. die *spleen tyrosin kinase* (*Syk*), die Proteintyrosinphosphatase (*SHP2*) sowie die *zeta-chain-associated protein kinase 70* (*ZAP70*). Dadurch wird jedoch für eine hochaffine Bindung an die SH2-Domäne eine definierte räumliche Ausrichtung und Abstand der phosphorylierten Tyrosylreste zueinander notwendig, wodurch die Spezifität der Bindung nochmals erhöht wird.

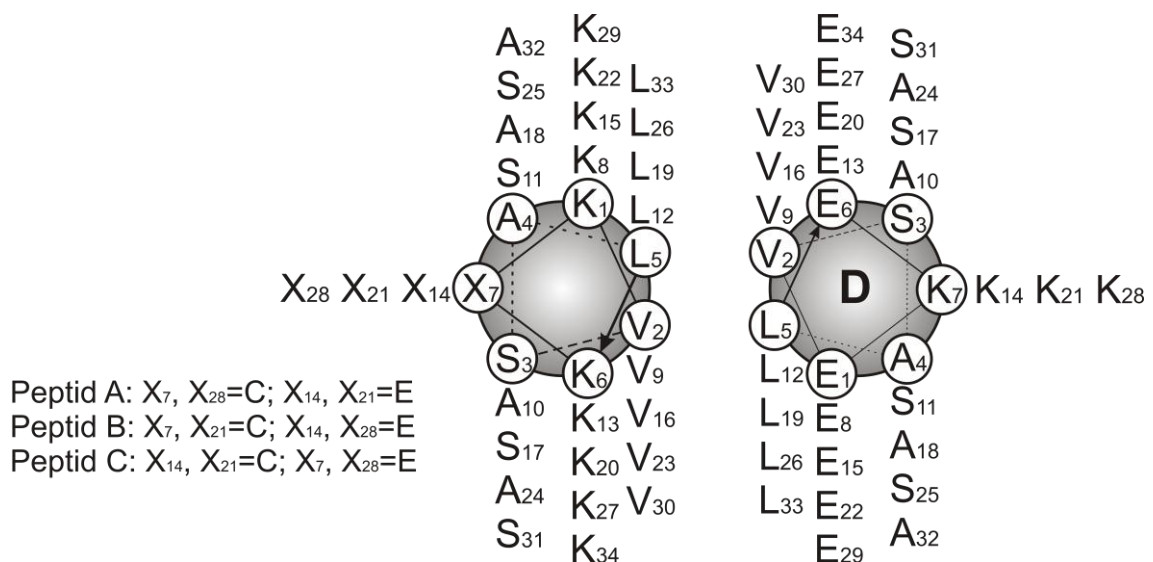
Die in dieser Arbeit untersuchten *Syk* und *ZAP70* Tandem SH2-Domänen unterscheiden sich jedoch stark in ihrem Bindungsverhalten. Während die *Syk* SH2-Domäne eine sehr flexible Struktur besitzt, die eine große Bandbreite an Abständen und räumlichen Ausrichtungen der phosphorylierten Tyrosylreste toleriert, ist die *ZAP70* SH2-Domäne in ihrer Akzeptanz gegenüber unterschiedlichen Abständen und räumlichen Ausrichtungen der Tyrosylreste sehr eingeschränkt, was aus ihrer geringen Flexibilität resultiert. Diesen Unterschieden Rechnung tragend, sollten mit Hilfe von *coiled coil* Peptiden, die als Gerüststruktur für die divalente Präsentation des peptidischen Liganden dienen, die Bindungseigenschaften beider Tandem SH2-Domänen durch Variation der Ligandenabstände untersucht und verglichen werden. Dadurch sollte eine Aussage über den Abstand der zwei SH2-Domänen zueinander ermöglicht werden. In Anlogie zu den von SEITZ *et al.* durchgeführten Untersuchungen, die jedoch kurze DNA-Abschnitte als multivalente Gerüststruktur nutzten, wurde das Bindungsverhalten mittels Anisotropiemessungen bestimmt. Diese wurden als Kooperationsprojekt von der AG Seitz durchgeführt.

### 5.2.1. Peptiddesign

Bei der Wahl des passenden *coiled coil* Peptids mussten folgende Restriktionen berücksichtigt werden. So sollte die durch das Peptidrückgrat verursachte sterische Hinderung minimiert und eine Vergleichbarkeit mit den von SEITZ *et al.* publizierten Daten ermöglicht werden. Die Präsentation der zwei peptidischen Liganden sollte daher an einem *coiled coil* Dimer erfolgen. Da bei der Wahl eines homomeren *coiled coil* Dimers jedoch vier anstatt von nur zwei Liganden für eine Bindung an die Tandem SH2-Domäne zur Verfügung stehen würden, fiel die Wahl auf ein heteromeres *coiled coil* Dimer. Dies hatte den Vorteil, dass für die Variation der Ligandenabstände, lediglich eines der beiden Peptide synthetisiert werden musste und es erst in Gegenwart des zweiten Peptids zur Ausbildung des *coiled coils* kam. Die Wahl fiel daher auf die bereits in der AG Koksch etablierten VPE/VPK Modellpeptide.<sup>[227]</sup>

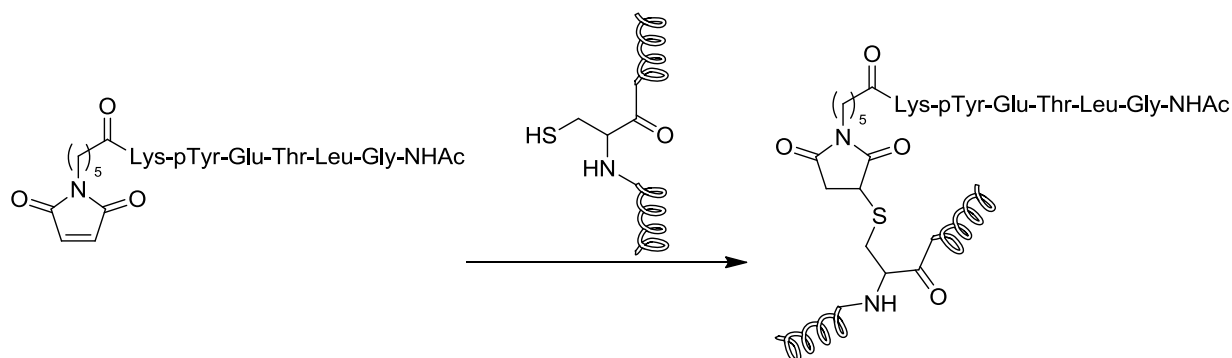
Der hydrophobe Kern des *coiled coil* Dimers wurde, in Anlehnung an den ausführlich charakterisierten Transkriptionsfaktor GCN4,<sup>[228]</sup> mit den Aminosäuren Leucin in d-Position und Valin in a-Position besetzt. Diese Anordnung der Aminosäuren bewirkte die parallele Orientierung beider Peptide im *coiled coil*. Für die Ausbildung eines heteromeren *coiled coils* war jedoch die Besetzung der e- und g-Positionen von entscheidender Bedeutung. Dies wurde durch den Einbau der positiv geladenen Aminosäure Lysin in e- und g-Position sowie den Einbau der negativ geladenen Aminosäure Glutaminsäure in e'- und g'-Position erzielt. Auf Grund dieser Aminosäure Anordnung wurde die Bildung von Homodimeren verhindert, da in diesem Fall unvorteilhafte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den e/g-Positionen auftreten würden. Die benachbarten, solventexponierten b- und c-Positionen wurden alternierend mit den Aminosäuren Alanin und Serin besetzt. Dadurch wurde einerseits die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur und andererseits die Löslichkeit des Peptids gefördert. Durch eine Modifizierung der ursprünglichen Sequenz in der solventexponierten f-Position des *coiled coils* wurde der Einbau der Liganden ermöglicht. Dafür wurde das Peptid VPK ausgewählt, da einerseits die übrigen f-Positionen mit der Aminosäure Glutaminsäure, die im Vergleich zu Lysin über eine kürzere Seitenkette verfügte, besetzt waren. Andererseits sollte so eine mehrfache Ligation der f-Position verhindert werden, da bei der Bindung des Liganden an das

Peptid auch die Aminofunktion der Lysin Seitenketten in einer Nebenreaktion mit dem Liganden reagieren konnte. In Abhängigkeit vom gewünschten Ligandenabstand wurden deshalb zwei Glutaminsäuren in einem Abstand von 7, 14 oder 21 Aminosäuren durch Cystein ersetzt. Über die Thiofunktion in der Seitenkette konnte nach der Entschützung und Abspaltung vom Harz der Ligand an das Peptid legiert werden. Zusätzlich wurden, um eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften an die SH2-Domäne durch den N- bzw. C-Terminus zu minimieren, beide Enden des Peptids als Essigester bzw. Amid geschützt. Letzteres wurde dabei durch die Verwendung eines Amid-Harzes realisiert.



**Abbildung 69:** *helical wheel* Darstellung der Peptidsequenzen des dimeren *coiled coil* Peptids.

Der Peptidligand, welchen bereits SEITZ *et al.* für ihre Untersuchungen verwendet hatten, setzte sich aus sechs Aminosäuren zusammen.<sup>[133]</sup> Diese Sequenz entsprach dabei einem Abschnitt des C-terminalen Endes des Referenzpeptids, welches für die Bestimmung der Bindungskonstante verwendet wurde. Das für die Bindung an die SH2-Domäne notwendige phosphorylierte Tyrosin befand sich in direkter Nachbarschaft zum C-terminalen Lysin. Über dessen Seitenkette wurde das für die Ligation benötigte Maleimidester eingefügt. Bei der Ligation handelte es sich chemisch gesehen um die Addition eines Thiols an eine Doppelbindung und ist folglich irreversibel.



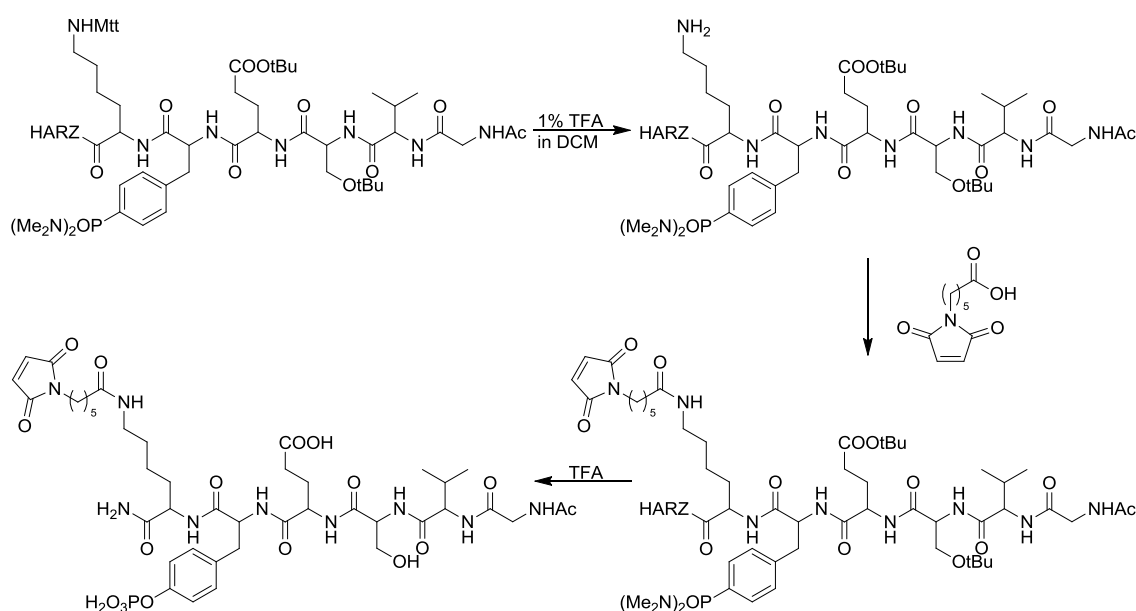
**Abbildung 70:** Ligationsreaktion für die Bindung des Peptidliganden.

### 5.2.2. Peptidsynthese und Charakterisierung

Alle Peptide wurden nach der Standard-Fmoc-Methode an der festen Phase von Hand gekuppelt, deren allgemeiner Ablauf in Abbildung 32 dargestellt ist.

Da die ligandenpräsentierenden Peptide A, B, C sowie das für die *coiled coil* Bildung verantwortliche Peptid D an ihrem C-terminalen Ende nach der Abspaltung vom Harz als Amid geschützt werden sollten, wurde für die Synthese ein Rink-Amid Harz verwendet. Dies war jedoch nicht mit der ersten Aminosäure beladen. Daher wurde nach der Kopplung der ersten Aminosäure eine Beladungsbestimmung durchgeführt, um die benötigte Menge an Polymerharz zu bestimmen. Die Kopplungen der Aminosäuren wurden ausnahmslos mit einem vierfachen Überschuss der Kopplungsreagenzien Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) sowie der entsprechenden Aminosäure durchgeführt. Die Reaktionszeit für eine Kopplungsreaktion belief sich auf zwei Stunden, wobei nach einer Stunde die Kopplungsreagenzien ausgetauscht und erneuert wurden. Da die Peptide A, B und C jeweils zwei Cysteine beinhalten, musste bei der Entschützung und Vollabspaltung vom Harz neben Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilan (TIPS) zusätzlich Phenol, Ethandithiol (EDT) und Thioanisol zugegeben werden. Letztere verhinderten eine Oxidation der freiwerdenden Thiole und die damit einhergehende Disulfidbildung. Nach säulenchromatographischer Reinigung erfolgte die Identifizierung der Peptide anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie. Da sich die Peptide A, B und C jedoch nur in der Reihenfolge der Aminosäuren voneinander unterschieden, waren die ermittelten Werte dieser Peptide identisch.

Die Synthese des Peptidliganden erfolgte ebenfalls an einem Rink-Amid Harz. Da die Lysinseitenkette für die Kupplung des Maleimids selektiv entschützt werden musste, wurde in diesem Fall eine 4-Methyltrityl-Schutzgruppe (Mtt) verwendet. Diese konnte schon unter schwach sauren Bedingungen (1 % TFA in DCM) abgespalten werden, während die übrigen Schutzgruppen sowie die Abspaltung vom Harz erst unter stark sauren Bedingungen erfolgte (Abbildung 71). Vor der Kupplung des Maleimids musste jedoch die terminale Aminofunktion acetyliert werden, da bei einer nachträglichen Acetylierung in einer Nebenreaktion eine Ringöffnung am Maleimid beobachtet wurde.



**Abbildung 71:** Reaktionsschema der selektiven Entschützung der Lysin-Seitenkette mit anschließender Kupplung des Maleimids und Vollabspaltung vom Harz.

Für die Ligation wurden die mit Cystein modifizierten Peptide mit 2.2 Äquivalenten des peptidischen Liganden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 gelöst. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde die Reaktion abgebrochen, um eine mögliche Reaktion mit Aminofunktionen benachbarter Lysine zu unterbinden. Die Lösung wurde anschließend lyophilisiert, säulenchromatographisch gereinigt und die Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B und pL<sub>2</sub>C mittels Massenspektrometrie identifiziert.

**Tabelle 6:** Übersicht über die berechneten und gemessenen Massen der synthetisierten Peptide.

Peptid	Peak	berechnet [m/z]	gemessen [m/z]
<b>A</b>	+2	1828.6069	1828.6118
	+3	1219.4072	1219.4023
<b>B</b>	+2	1828.6069	1828.6012
	+3	1219.4072	1219.4020
<b>C</b>	+2	1828.6069	1828.6107
	+3	1219.4072	1219.4135
<b>D</b>	+2	1857.4832	1857.4786
	+3	1238.6581	1238.6642
<b>Ligand pL</b>	+1	1024.3990	1024.3914
	+2	512.7034	512.6987
<b>pL<sub>2</sub>A</b>	+4	1426.8074	1426.8136
	+5	1141.6474	1141.6399
<b>pL<sub>2</sub>B</b>	+4	1426.8074	1426.8029
	+5	1141.6474	1141.6523
<b>pL<sub>2</sub>C</b>	+4	1426.8074	1426.8033
	+5	1141.6474	1141.6417

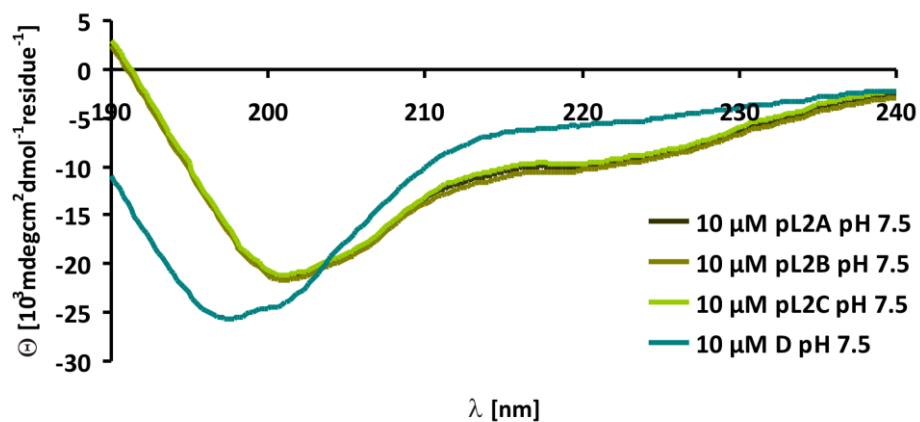
Die Charakterisierung der Peptide erfolgte mittels CD-Spektroskopie. Dafür wurden zuerst die CD-Spektren der Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B, pL<sub>2</sub>C und D einzeln aufgenommen und anschließend mit 1:1 Gemischen der Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B, pL<sub>2</sub>C mit Peptid D verglichen. Da für die von der AG Seitz durchgeführten Anisotropiemessungen nur eine geringe Peptidkonzentration notwendig war, wurde für die CD-Messungen die Peptidkonzentration so gewählt, dass trotz einer niedrigen Konzentration noch ein auswertbares Spektrum erhalten wird. Daher wurden alle CD-Spektren bei einer Konzentration von 10 µM Peptid aufgenommen.

Die CD-Spektren der einzelnen Peptide zeigten den, für ungefaltete Peptide, charakteristischen Kurvenverlauf mit einem markanten Minimum bei 197 nm für das Peptid D sowie, leicht verschoben, bei 200 nm für die ligandenpräsentierenden Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B und pL<sub>2</sub>C. Die CD-Spektren dieser Peptide variierten

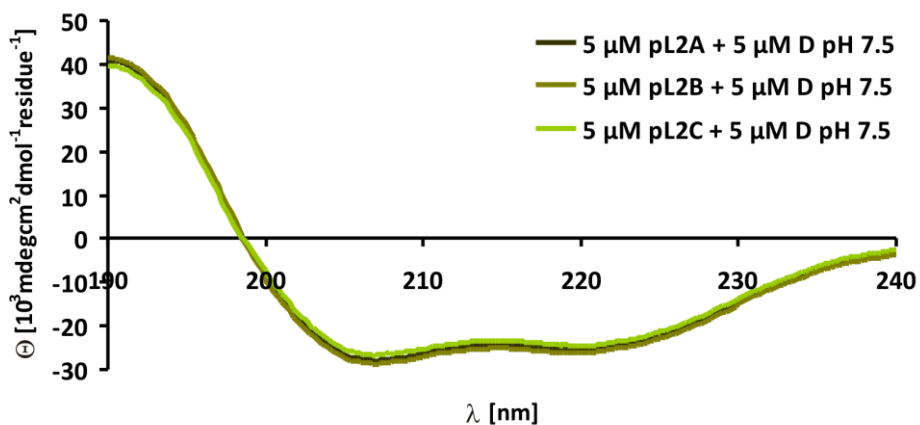


erwartungsgemäß nur geringfügig, da sie sich lediglich in der Lage des Peptidliganden unterschieden.

Demgegenüber bewirkte die äquimolare Zugabe des Peptids D zu diesen Peptiden eine deutliche Veränderung im Kurvenverlauf der CD-Spektren. Diese besaßen zwei Minima bei 207 sowie 220 nm und ein Maximum bei 190 nm. Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Peptide. Damit induzierte die Zugabe des Peptids D eine Faltung der Peptide. Da nur in Anwesenheit beider Peptide eine Sekundärstruktur ausgebildet werden konnte, war davon auszugehen, dass diese Beobachtung aus der Bildung eines *coiled coil* Peptids resultierte.



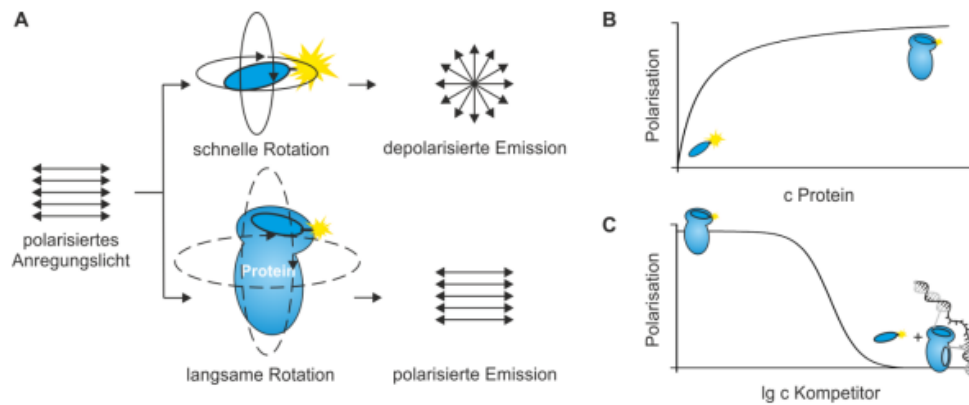
**Abbildung 72:** CD-Spektren der Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B, pL<sub>2</sub>C und D gelöst in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.5. Die Peptidkonzentration betrug jeweils 10 µM.



**Abbildung 73:** CD-Spektren der äquimolaren Peptidgemische aus pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B, pL<sub>2</sub>C mit D gelöst in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.5. Die Peptidkonzentration betrug jeweils 10 µM.

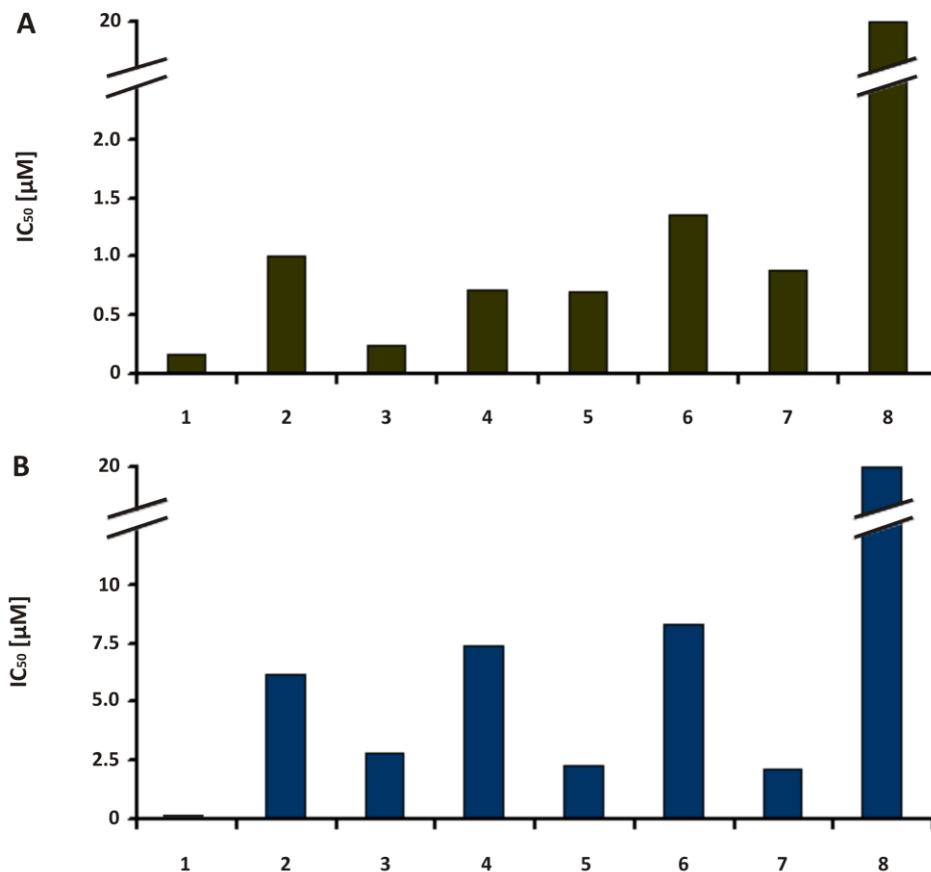
### 5.2.3. Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration mittels Fluoreszenzanisotropie

Bei der Fluoreszenzanisotropie handelt es sich um eine indirekte Methode zur Bestimmung der Bindungskonstante. Dabei wird ausgenutzt, dass die meisten Fluorophore nach Anregung mit polarisiertem Licht auch polarisiertes Licht emittieren. Dieses Phänomen beruht auf dem Vorhandensein von Übergangsmomenten für die Absorption und Emission, die in spezifischen Richtungen innerhalb der Fluorophorstruktur liegen (Abbildung 74 a). In homogener Lösung sind die Fluorophore zufällig orientiert. Wird eine Probe mit zufälliger Orientierung der Fluorophore mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, werden nur diejenigen Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment eine Komponente in Richtung des elektrischen Feldvektors des Anregungsstrahls besitzen. Die Folge ist eine polarisierte Emission. Dieses Verhalten von Fluorophoren wurde für die Bestimmung der Bindungskonstanten ausgenutzt. Der Fluorophor befand sich hierbei jedoch an einem Referenzpeptid, von dem bereits bekannt war, dass es eine sehr hohe Affinität zu den untersuchten Tandem SH2-Domänen besitzt. Durch die Bindung an die SH2-Domänen wurde die freie Rotation des Farbstoffs stark eingeschränkt, was an Hand der ansteigenden Emission von polarisiertem Licht beobachtet werden konnte (Abbildung 74 b). Nachdem die Emission ein Intensitätsplateau erreicht hatte wurde das zu untersuchende *coiled coil* Peptid zugegeben. In Folge dessen kam es zur Verdrängung des Referenzpeptids aus der Bindungstasche der SH2-Domäne wodurch die durch das Protein vorgegebene Orientierung des Fluorophors verloren ging. Auf Grund dessen sank die Intensität der polarisierten Emission wieder (Abbildung 74 c). Aus diesem Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität kann daher die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) der untersuchten *coiled coil* Peptide bestimmt werden.



**Abbildung 74:** Schematische Darstellung der Messung der Fluoreszenzanisotropie.

Die Bestimmung der Bindungskonstante für die Bindung der Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B, pL<sub>2</sub>C und D sowie deren *coiled coil* Peptide an die SH2-Domänen erfolgte in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.5. Dabei konnten für die beiden untersuchten SH2-Domänen große Unterschiede beobachtet werden. So konnte für die Bindung des *coiled coil* Peptids pL<sub>2</sub>A/D an die Syk SH2-Domäne ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0.24 µM bestimmt werden, welcher damit nur geringfügig höher als für das Referenzpeptid (0.16 µM) ausfiel. Der Abstand der zwei Liganden betrug in diesem Fall 21 Aminosäuren, was einer Distanz von etwa 3.2 nm entspricht. Mit kleiner werdendem Abstand der Liganden erhöhte sich jedoch sukzessiv der IC<sub>50</sub>-Wert. Während für einen Ligandenabstand von 14 Aminosäuren (2.1 nm) im Peptid pL<sub>2</sub>B/D noch ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0.70 µM bestimmt werden konnte, stieg dieser Wert auf 0.88 µM bei einer erneuten Verkürzung des Ligandenabstands auf 7 Aminosäuren (1 nm) im Peptid pL<sub>2</sub>C/D. Wie wichtig die rigide *coiled coil* Struktur mit ihrem definierten Ligandenabstand für die Bindung an die SH2-Domäne war, konnte an Hand der ungefalteten Peptide verdeutlicht werden. So war der gemessene IC<sub>50</sub>-Wert für alle drei Peptide höher als für das entsprechende *coiled coil* Peptid. Jedoch gab es auch hier Unterschiede zwischen den Peptiden. Während die IC<sub>50</sub>-Werte für die Peptide pL<sub>2</sub>A (1.0 µM) und pL<sub>2</sub>C (1.36 µM) signifikant anstiegen, war für das Peptid pL<sub>2</sub>B (0.72 µM) nur ein geringfügiger Anstieg zu beobachten.



**Abbildung 75:** IC<sub>50</sub>-Werte für die Bindung des Referenzpeptids (1) und der Peptide pL<sub>2</sub>A (2), pL<sub>2</sub>A/D (3), pL<sub>2</sub>B (4), pL<sub>2</sub>B/D (5), pL<sub>2</sub>A (6), pL<sub>2</sub>C/D (7), D(8) an die SH2-Domäne von Syk (A) sowie die SH2-Domäne von ZAP70 (B).

Demgegenüber wurde für die Bindung an die ZAP70 SH2-Domäne der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert (2.1 µM) für das *coiled coil* Peptid pL<sub>2</sub>C/D bestimmt, welches den kürzesten Ligandenabstand besaß. Da mit steigendem Ligandenabstand der IC<sub>50</sub>-Wert kontinuierlich anstieg, konnte, verglichen mit der Syk SH2-Domäne, ein gegenteiliger Trend beobachtet werden. So wurde für das *coiled coil* Peptid pL<sub>2</sub>B/D ein IC<sub>50</sub>-Wert von 2.3 µM und für das *coiled coil* Peptid pL<sub>2</sub>A/D ein Wert von 2.8 µM bestimmt. Neben den Unterschieden der relativen Werte zeigte auch der Vergleich mit dem Referenzpeptid (0.04 µM), dass die *coiled coil* Peptide deutlich schlechter an die ZAP70 SH2-Domäne banden als an die Syk SH2-Domäne. Sehr viel eindrucksvoller als bei der Syk SH2-Domäne konnte hier die Bedeutung der rigiden *coiled coil* Struktur nachgewiesen werden. Alle ungefalteten Peptide besaßen einen IC<sub>50</sub>-Wert, der um den Faktor 2-4 höher war als für das entsprechende *coiled coil* Peptid.

Darüber hinaus konnte eine unspezifische Bindung der Peptide an die SH2-Domänen jeweils ausgeschlossen werden, da das Peptid D, welches nicht über ein für die Bindung notwendiges phosphoryliertes Tyrosin verfügte, einen  $IC_{50}$ -Wert von über 20  $\mu$ M besaß, der damit außerhalb des Messbereichs lag.



## 6. Diskussion

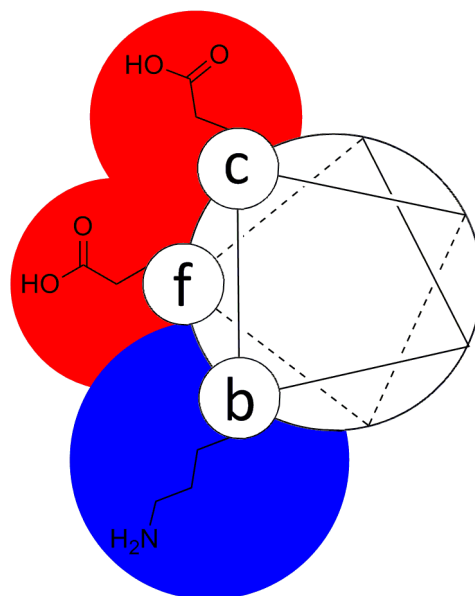
### 6.1. Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation

Die hier dargestellten Untersuchungen zur induzierten Nanopartikel-Aggregation mit Hilfe von Arginin-präsentierenden Peptiden konnten beweisen, dass sich in Abhängigkeit von der Anzahl an Argininen und der Peptidlänge das Aggregationsverhalten radikal änderte. So konnte gezeigt werden, dass die Präsentation von nur einem Arginin in einem aus 26 Aminosäuren bestehenden Peptid nicht ausreichte, um eine Aggregation der verwendeten negativ geladenen Gold-Nanopartikel zu bewirken, obwohl die Nettoladung des Peptids bei pH 9, der für die Nanopartikel-Aggregation genutzt wurde, positiv war und damit attraktive elektrostatische Wechselwirkungen auftreten könnten. Erst ab einer Präsentation von zwei Argininen konnte eine Nanopartikel-Aggregation nachgewiesen werden, was sich u.a. an Hand einer signifikanten Verschiebung des Absorptionsmaximums sowie einer Niederschlagbildung zeigte. Dieses Maximum und damit auch die Aggregatbildung verringerten sich jedoch kontinuierlich, nachdem das Peptid um sieben, 14 oder 21 Aminosäuren verlängert wurde. Bei letzterem konnte sogar erst zeitverzögert eine Aggregation der Nanopartikel festgestellt werden, welche auch nach einer Reaktionszeit von drei Tagen nur eine geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums hervorrief. Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass ein bestimmtes Verhältnis aus Peptidlänge bzw. Zahl an Aminosäuren zur Anzahl an präsentierten Ladungen notwendig ist, um eine Aggregation der Gold-Nanopartikel zu induzieren. Bis zu einem Aminosäure zu Arginin Verhältnis von 23.5 ist demnach eine Peptid-induzierte Aggregation von Gold-Nanopartikeln möglich, wohingegen bei einem Verhältnis von 26 Aminosäuren pro Arginin eine Aggregation nicht mehr auftritt. Der Umschlagpunkt, also das höchst mögliche Verhältnis, bei dem eine Aggregation induziert werden kann, liegt demnach zwischen beiden Werten.

**Tabelle 7:** Übersicht der Aminosäure/Arginin Verhältnisse der verwendeten Peptide.

	Aminosäuren	Arginine	Verhältnis Aminosäuren/Arginin
VW05	26	4	6.5
R1A3	26	1	26
R2A2	26	2	13
R2A3	33	2	16.5
R2A4	40	2	20
R2A5	47	2	23.5

Das Glutamat-präsentierende Peptid E4 konnte dagegen keine Aggregation positiv geladener Gold-Nanopartikel induzieren. Dies war umso überraschender, da in diesem Fall vier Glutaminsäuren präsentiert wurden. Dieser Befund kann durch mehrere Faktoren erklärt werden (Abbildung 76). Zum einen ist die Glutamatseitenkette bedeutend kürzer als die Argininseitenkette. Dies kann zur Folge gehabt haben, dass das benachbarte Lysin, dessen Seitenkette ebenfalls länger ist, die Glutamatseitenkette sterisch abschirmt und damit eine elektrostatische Interaktion zwischen Peptid und Nanopartikel verhinderte.

**Abbildung 76:** Raumannspruch der Aminosäureseitenketten des Peptids E4.



Zum anderen veränderte sich das Größenverhältnis zwischen Peptid und Nanopartikel gravierend. Während im Falle der Arginin-präsentierenden Peptide sowohl Peptid als auch Nanopartikel annähernd gleich groß waren (Länge des Peptids mindestens 4 nm, Nanopartikel 6.2 nm), waren die hier verwendeten Nanopartikel bedeutend größer. Daher wurden viel mehr Peptide für eine vollständige Bedeckung der Nanopartikel-Oberfläche benötigt, um eine Abstoßung zwischen den einzelnen Nanopartikeln zu verhindern. Unter Berücksichtigung der sterischen Hinderung durch die Lysinseitenkette war diese vollständige Bedeckung der Nanopartikel vermutlich nicht realisierbar. Daraus resultierend konnte eine Peptid-induzierte Aggregation der Nanopartikel nicht beobachtet werden. Folglich kann das Aminosäure/Arginin Verhältnis als entscheidendes Kriterium für eine Aggregation nicht beliebig übertragen werden. Vielmehr muss neben diesem Verhältnis auch die Zugänglichkeit der Liganden sowie das Größenverhältnis Peptid zu Nanopartikel berücksichtigt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Quartärstruktur der Peptide ein entscheidender Faktor ist, der maßgeblichen Einfluss auf die Nanopartikel-Aggregation im Allgemeinen und die Struktur der gebildeten Aggregate im Speziellen hat. Dabei wurde anfänglich nicht erwartet, dass sich durch die Substitution der Arginine in der solventexponierten f-Position des *coiled coils* die Quartärstruktur so gravierend ändert, zumal die f-Position den geringsten Einfluss auf die Struktureigenschaften eines *coiled coils* besitzt. Nichtsdestotrotz bewirkte der Austausch von mindestens zwei Argininen durch Alanine die Ausbildung von Peptidfasern. Dieser Vorgang konnte jedoch durch eine Erhöhung des pH-Werts auf 11 rückgängig gemacht werden. In Folge dessen konnte bei diesem pH-Wert die Existenz von *coiled coil* Peptiden nachgewiesen werden. Offensichtlich ist dieser Wechsel in der Quartärstruktur das Resultat der veränderten Nettoladung der Peptide. So besitzt beispielsweise das Peptid R2A2 bei pH 9 eine Nettoladung von +1.62, während diese bei pH 11 auf -4.35 sinkt (Tabelle 8). Da die Peptide bei pH 9 nahezu ungeladen sind und somit einen größeren hydrophoben Charakter besitzen, war die Bildung von Peptidfasern und Faserbündeln bevorzugt, um die Kontaktfläche mit dem polaren Lösungsmittel zu minimieren. Demgegenüber führte die verhältnismäßig hohe negative Nettoladung bei pH 11 zu einer Abstoßung der Peptide untereinander, was das Auflösen der Fasern bewirkte. Des Weiteren hatte die Variation der Sequenzlängen der Peptide weitreichende Folgen

für die erhaltenen Peptidstrukturen. Auf Grund des Durchmessers der einzelnen Fasern war davon auszugehen, dass diese aus *coiled coil* Peptiden aufgebaut waren. Je länger die Sequenzen dieser Peptide waren, desto flexibler wurden die gebildeten *coiled coils*. Dies hatte wiederum zur Folge, dass die daraus aufgebauten Fasern eine größere Flexibilität besaßen, was sich in der geringer werdenden Tendenz zur Bildung von Faserbündeln widerspiegelte. Daher konnten lediglich für die kürzeren Peptide, die aus 26 bzw. 33 Aminosäuren aufgebaut waren, Faserbündel beobachtet werden.

**Tabelle 8:** Übersicht über die Peptid-Nettoladung bei pH 9 und pH11.

	Nettoladung pH 9	Nettoladung pH 11
R1A3	0.62	-5.31
R2A2	1.62	-4.35
R2A3	1.55	-5.87
R2A4	1.49	-7.39
R2A5	1.43	-8.91

Die Faserbildung sowie die Bildung von Faserbündeln hatten weitreichende Folgen für die Struktur der beobachteten Peptid-Nanopartikel-Aggregate. Während das *coiled coil* Peptid VW05 eine ungeordnete Aggregation der Nanopartikel bewirkte, führte die Anwesenheit von Faserbündeln zu einer definierten Anordnung an ihrer Oberfläche. Eine solche, durch attraktive elektrostatische Wechselwirkungen erzeugte, Anlagerung an Peptidfasern ist bisher einzigartig. Lediglich WOOLFSON *et al.* konnten auf ähnliche Weise Peptidfasern mit Nanopartikeln dekorieren.<sup>[193]</sup> Dabei wurde jedoch die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin ausgenutzt, um die Interaktion zwischen Peptidfaser und Nanopartikeln zu ermöglichen. Verglichen mit den hier beschriebenen Nanopartikel-dekorierten Peptidfasern, war der Grad der Dekoration mit Nanopartikeln auf der Faseroberfläche deutlich geringer. Darüber hinaus erfolgte die Dekoration einer Peptidfaser sehr wahllos, da es Bereiche hoher Nanopartikel-Dichte gab und wiederum Regionen, die gar nicht mit Nanopartikeln bedeckt waren. Dies war bei den hier präsentierten Ergebnissen nicht der Fall. Allerdings konnten, bei einer entsprechend geringen Nanopartikel-Konzentration, auch komplett undekorierte Faserbündel beobachtet werden. Warum in diesem Fall keine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel auf alle Faserbündel statt fand, kann nicht mit letzter Sicherheit

geklärt werden. Vermutlich förderte die Anlagerung einiger weniger Nanopartikel an einem Faserbündel die weitere Aggregation der Nanopartikel. Wie entscheidend dabei die Sequenzlänge für die geordnete Aggregation der Nanopartikel war, konnte ebenfalls eindrucksvoll demonstriert werden. Insbesondere die Peptide, die sich aus 40 bzw. 47 Aminosäuren zusammensetzten, waren auf Grund ihrer Länge und der daraus resultierenden Flexibilität nicht in der Lage, Faserbündel zu bilden. Da diese aber benötigt wurden, um eine geordnete Zusammenlagerung der Nanopartikel zu ermöglichen, veränderten sich mit steigender Sequenzlänge auch die beobachteten Peptid-Nanopartikel-Strukturen. Die geordneten Nanopartikel-Strukturen gingen nahezu komplett verloren und wurden durch ungeordnete Strukturen ersetzt. Stattdessen waren nun scheinbar flächige Gebilde zu erkennen, die vermutlich aus der der Bildung von netzwerkartigen Faserstrukturen resultierten. Trotzdem war, je nach Ausrichtung der Fasern im Netzwerk, noch in Ansätzen die von Faserbündeln induzierte Nanopartikel-Anordnung zu erkennen, auch wenn diese Strukturen sehr viel breiter ausfielen.

Neben den Unterschieden in der Peptid-Nanopartikel-Struktur hatten die Bildung von Peptidfasern auch entscheidenden Einfluss auf die erhaltenen thermodynamischen Parameter der Peptid-induzierten Nanopartikel-Aggregation wie die Bindungskonstante  $K_B$ , die Bindungsenthalpie  $\Delta H$  und die Stöchiometrie  $n$ . So wurde grundsätzlich erwartet, dass die Bindungskonstante und damit die Affinität mit steigender Zahl an präsentierten Ladungen ebenfalls ansteigt. Ein Vergleich der mittels ITC erhaltenen Bindungskonstanten zeigte jedoch, dass das vier Ladungen präsentierende VW05 mit einer Bindungskonstante von  $5.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  lediglich den dritthöchsten gemessenen Wert besaß. Mit einer Bindungskonstante von  $18.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  besaß das Peptid R2A2 die mit Abstand höchste Affinität zu den verwendeten Gold-Nanopartikeln. Darüber hinaus besaß auch das Peptid R2A3 mit einer Bindungskonstante von  $6.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  eine höhere Affinität als VW05, obwohl beide Peptide nur zwei Arginine in ihrer Sequenz aufwiesen. Allerdings formten die Peptide R2A2, R2A3 und R2A4  $\alpha$ -helikale Peptidfasern, während VW05 als *coiled coil* Peptid vorlag. Folglich bewirkten die Peptidfasern eine signifikante Erhöhung der Bindungskonstante. Dies kann damit erklärt werden, dass die Peptidfasern eine größere strukturelle Ordnung aufweisen und eine hohe Lokalisierung bei gleichzeitiger

Erhöhung der Dichte der präsentierten Ladungen besitzen. Beide Faktoren erleichterten die Interaktion mit den Nanopartikeln, was sich in einer höheren Bindungsaffinität manifestierte, zumal eine Strukturänderung der Peptide während der Interaktion nicht einsetzte. Erst die mehrfache Verlängerung der Sequenz und der daraus resultierenden Verringerung der Ladungsdichte des Peptids bewirkte ein Absinken der Bindungskonstante unter das Niveau des *coiled coil* Peptids VW05. Bei diesem konnten TEM-Aufnahmen und CD-Spektren belegen, dass es während der Interaktion von VW05 mit Gold-Nanopartikeln zu Veränderungen in der Quartärstruktur des Peptids kam. So begann VW05 erst in Gegenwart der Nanopartikel Peptidfasern auszubilden. Demzufolge fanden während der Interaktion mit den Nanopartikeln zwei Reaktionen statt: einerseits die Peptid-induzierte Aggregation der Nanopartikel, mit einer Bindungskonstante  $K_1$ , und andererseits die Nanopartikel-induzierte Änderung der Quartärstruktur, mit einer Bindungskonstante  $K_2$ . Auf Grund der Tatsache, dass beide Reaktionen simultan stattfinden, wird während der ITC Messung die Bindungskonstante als Produkt der Reaktionskonstanten der Einzelreaktionen ausgegeben. Vermutlich bewirkte die hohe lokale Konzentration an Peptiden auf der Nanopartikel-Oberfläche, welche ebenfalls die Aggregation der Nanopartikel bewirkte, die Ausbildung von Peptidfasern. Dieses Verhalten resultierte in einer niedrigeren Bindungskonstante, da für die Faserbildung eine Umorganisation der Peptidoligomere notwendig war, was die Aggregation der Nanopartikel verlangsamte. Folglich ist die Ausbildung höher geordneter Peptidstrukturen entscheidend für eine hohe Affinität zwischen Peptid und Nanopartikel, wohingegen eine hohe Zahl an präsentierten Ladungen nicht zwingend in einer höheren Bindungskonstante resultierte.

Die Unterschiede in der Quartärstruktur hatten aber nicht nur Auswirkungen auf die Bindungskonstante, sondern auch auf die molare Bindungsenthalpie. Während es sich bei der durch Peptidfasern induzierten Nanopartikel-Aggregation um eine exotherme Reaktion handelte, wurde bei der *coiled coil* induzierten Aggregation Energie verbraucht. Da die durch Peptidfasern induzierte Aggregation ohne erkennbare Nebenreaktionen verlief, kann mit Sicherheit angenommen werden, dass es sich bei der Nanopartikel-Aggregation grundsätzlich um eine exotherme Reaktion handelt. Die Unterschiede in der Bindungsenthalpie bei der *coiled coil* induzierten Aggregation

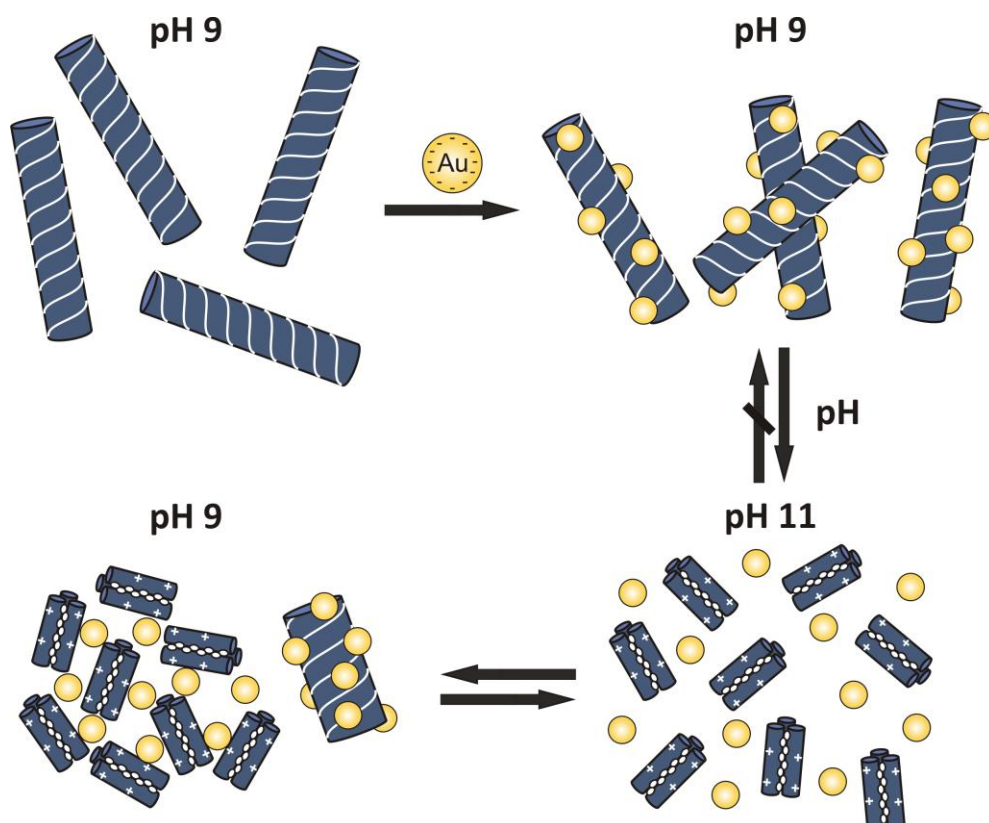
resultierten demnach aus dem Zusammenspiel der zwei oben erwähnten Teilreaktionen: der Peptid-induzierten Aggregation einerseits und der Änderung in der Quartärstruktur andererseits. Da die Aggregation exotherm verläuft, muss die Strukturänderung endotherm verlaufen, um in der Summe eine endotherme Gesamtreaktion zu erhalten. Diese Annahme ist durchaus schlüssig, da für die Strukturänderung ein Aufbrechen der *coiled coil* Struktur und die Bildung von ungefalteten Peptiden notwendig sind. Auf Grund des amphiphilen Charakters der Peptide ist dieser Vorgang energetisch höchst ungünstig und kann daher nur unter Aufwendung von Energie erfolgen. Die darauf folgende Faserbildung wird mit Sicherheit exotherm verlaufen, da die erhaltene Faserstruktur energetisch günstiger ist, jedoch scheint dies den vorherigen Energieverbrauch nicht zu kompensieren. Somit setzt sich die Bindungsenthalpie der Gesamtreaktion aus einem negativen Enthalpiebeitrag, resultierend aus der Aggregation, sowie einem positiven Enthalpiebeitrag zusammen. Letzterer ist jedoch höher, wodurch die Gesamtreaktion einen endothermen Charakter bekommt.

Während die Bindungsenthalpie und -konstante nur mittels ITC bestimmt werden konnte, lieferte bereits die Gelelektrophorese erste Tendenzen hinsichtlich der Bindungsstöchiometrie. Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden ergab jedoch gravierende Unterschiede. So konnte für die Faser-bildenden Peptide R2A2 bis R2A5 bereits bei einer Peptidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein Überschuss an Peptid mittels Gelelektrophorese ermittelt werden. Demgegenüber wurde für das Peptid VW05 erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ungebundenes Peptid nachgewiesen. Folglich sollte sich die Bindungsstöchiometrie zwischen Faser-bildenden und *coiled coil* Peptiden signifikant unterscheiden. Die Auswertung der ITC Daten lieferte jedoch annähernd gleiche Werte für die Bindungsstöchiometrie. So konnten laut ITC durchschnittlich 20 Moleküle des Peptids VW05 an ein Nanopartikel binden, wohingegen für alle weiteren Peptide ein Wert zwischen 17-18 erhalten wurde. Auch wenn die TEM-Aufnahmen zeigten, dass die Nanopartikel nur eine geringe Kontaktfläche mit der Peptidfaser aufwiesen, die aus maximal zwei bis drei Peptiden bestand, machen diese Werte durchaus Sinn. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass neben den, mit den Nanopartikeln interagierenden, Peptiden auch Peptide benötigt wurden, um die Peptidfaser aufzubauen. Diese standen demzufolge

nicht in direktem Kontakt mit den Nanopartikeln, müssen jedoch auf Grund ihrer Rolle im Aufbau der Faserstruktur trotzdem bei der Stöchiometrie berücksichtigt werden. Im Vergleich dazu war das *coiled coil* Peptid VW05 auf Grund seiner Struktur in der Lage mehrfach an einen einzelnen Nanopartikel zu binden, wobei auch eine Peptidanlagerung in mehreren Schichten im Bereich des Möglichen war. Daher war die Zahl von 20 bindenden Peptidmolekülen pro Nanopartikel durchaus realistisch. In Folge dessen war die ermittelte Bindungsstöchiometrie für alle Peptide annähernd gleich. Jedoch besteht eine große Diskrepanz zwischen diesem Befund und den Ergebnissen der Gelelektrophorese. Dieser Unterschied lässt sich jedoch damit erklären, dass die Bindung des *coiled coil* Peptids VW05 an Gold-Nanopartikel ein fortwährender Prozess war. Als direkte Folge kam es, auf Grund der hohen Konzentration an Peptid um die Nanopartikel, außerdem zu Bildung von  $\alpha$ -helikalen Fasern. Dadurch wurde noch ungebundenes Peptid verbraucht, was auch durch die CD-Spektren deutlich belegt werden kann. Dieses Phänomen konnte bei Faser-bildenden Peptiden nicht beobachtet werden. So waren in den TEM-Aufnahmen eindeutig auch undekorierte Faserstränge zu beobachten, wenn die Nanopartikel-Konzentration nicht hoch genug war. Zusätzlich belegten auch hier die CD-Spektren die Anwesenheit größerer Mengen Peptid in Lösung. Da die Gelelektrophorese jedoch erst nach einer Reaktionszeit von einer Stunde durchgeführt wurde, konnten folglich große Mengen des *coiled coil* Peptids an die Nanopartikel binden bzw.  $\alpha$ -helikale Fasern bilden, was für die Faser-bildenden Peptide nicht möglich war. Dadurch war erst ab einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  ungebundenes VW05 zu beobachten, während dies für alle weiteren Peptide bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  der Fall war.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Vororganisation der Peptide zu Fasern bzw. Faserbündeln von entscheidender Bedeutung für die Nanopartikel-Organisation ist. So unterschieden sich die Peptid-Nanopartikel-Strukturen, die nach einer Vororganisation der Peptide erhalten wurden, grundlegend von denen, die ohne eine Vororganisation erhalten wurden, was durch eine Erhöhung und anschließende Senkung des pH-Werts auf den Ursprungswert einer Peptid-Nanopartikel-Lösung erreicht wurde. An Hand der CD-Spektren aber vor allem mit Hilfe der DLS Messungen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des pH-Werts auf pH 11 ein Auflösen der Faserstruktur und die Bildung von *coiled coil* Peptiden bewirkte. Durch die pH-

Werterhöhung ging folglich die Struktur der Peptidfasern verloren. Da die Nanopartikel bereits vor dem erneuten Senken des pH-Werts auf den ursprünglichen Wert in der Lösung vorhanden waren, war eine Vororganisation der Peptide nicht mehr möglich. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass dieser Prozess an die Umkehrung der Peptidnettoladung geknüpft ist. An diesem Punkt setzte jedoch auch die Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation ein. An Hand der erhaltenen Strukturen ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Prozesse, die Faserbildung und die Aggregation, ungefähr gleich schnell verlaufen, da einerseits vollkommen ungeordnete Strukturen entstanden, andererseits aber auch Strukturen beobachtet wurden, die durch kurze Faserfragmente entstanden sein müssen. Demzufolge ist die Aggregation der Nanopartikel als solche zwar schaltbar, jedoch geht nach einer Schaltung die einzigartige Peptid-Nanopartikel-Aggregat-Struktur unwiederbringlich verloren.



**Abbildung 77:** Schematische Darstellung der reversiblen pH-schaltbaren Peptid-Nanopartikel-Aggregation.





## 6.2. Untersuchung der Bindungseigenschaften von divalenten coiled-coil Peptiden an Tandem SH2-Domänen

Die Bestimmung der Bindungseigenschaften der Tandem SH2-Domänen ergab für die zwei untersuchten SH2-Domänen, die *ZAP70* sowie die *Syk* SH2-Domäne, höchst unterschiedliche Ergebnisse. So waren durchweg alle gemessenen  $IC_{50}$ -Werte für die *Syk* SH2-Domäne deutlich geringer als für die *ZAP70* SH2-Domäne. Dieser Umstand kann an Hand der Unterschiede im Bezug auf die strukturelle Flexibilität beider SH2-Domänen erklärt werden. Während die *Syk* SH2-Domäne einen hohen Grad an Flexibilität aufweist und damit ein größeres Spektrum an Abständen zwischen den beiden phosphorylierten Peptidliganden toleriert, zeichnet sich die *ZAP70* SH2-Domäne durch eine hohe Rigidität aus. Dies hat zur Folge, dass nur bestimmte Abstände der Peptidliganden für eine Bindung in Frage kommen. Für eine effektive Bindung an diese SH2-Domäne müssen die Ligandenabstände daher perfekt auf die Anforderungen der SH2-Domäne abgestimmt sein.

Neben den deutlichen Unterschieden der  $IC_{50}$ -Werte zeigten beide SH2-Domänen auch gegensätzliche Trends in Bezug auf den idealen Abstand der phosphorylierten Peptidliganden. So besaß das *coiled coil* Peptid  $pL_2A/D$ , das mit einer Distanz von 21 Aminosäuren bzw. 3.2 nm über den größten Abstand zwischen den beiden Liganden verfügte, mit 0.24  $\mu M$  den niedrigsten  $IC_{50}$ -Wert für die Bindung an die *Syk* SH2-Domäne. Mit sinkendem Abstand der Liganden stieg in Folge dessen der  $IC_{50}$ -Wert kontinuierlich auf 0.70  $\mu M$  für einen Abstand von 14 Aminosäuren ( $pL_2B/D$ ) sowie auf 0.88  $\mu M$  bei einem Abstand von 7 Aminosäuren ( $pL_2C/D$ ). Offenbar besitzt die *Syk* SH2-Domäne trotz ihrer höheren Toleranz gegenüber unterschiedlichen Ligandenabständen eine Präferenz für einen größeren Abstand zwischen beiden Liganden. Damit konnten die Beobachtungen von SEITZ *et al.* bestätigt werden, die ebenfalls ein Maximum an Bindungsaffinität bei einem Ligandenabstand von 3.7 nm mit Hilfe von ligandenpräsentierenden Doppelstrang-DNA erhalten hatten.<sup>[133]</sup> Zusätzlich konnten sie einen Bereich niedriger Affinität nachweisen, welcher Ligandenabstände zwischen 1 und 3.2 nm umfasste. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mit Hilfe der *coiled coil* Peptide  $pL_2B/D$  und  $pL_2C/D$  verifiziert werden, die Ligandenabstände in einer vergleichbaren Größenordnung besaßen und eine geringere Bindungsaffinität zeigten. Demgegenüber

besaß das *coiled coil* Peptid pL<sub>2</sub>C/D mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2.1 µM die höchste Affinität für die Bindung an die ZAP70 SH2-Domäne. Dieser Wert stieg kontinuierlich auf bis zu 2.8 µM mit dem Abstand der beiden Liganden zueinander an. Folglich bevorzugt die ZAP70 SH2-Domäne eine kurze Distanz zwischen den Peptidliganden, da dieser Abstand scheinbar am besten mit dem Abstand der Bindungstaschen übereinstimmt. Auch dieses Ergebnis konnte durch Untersuchungen von SEITZ *et al.* an vergleichbaren DNA-Gerüsten bestätigt werden, die die höchste Affinität für die SH2-Domäne bei einer Distanz von 0.6 bis 1 nm zwischen den Liganden besaßen.

Überraschend war jedoch, dass die ungefalteten Peptide pL<sub>2</sub>A, pL<sub>2</sub>B und pL<sub>2</sub>C durchweg höhere IC<sub>50</sub>-Werte lieferten als ihre *coiled coil* Äquivalenten, obwohl für äquivalente Einzelstrang-DNA Gerüste immer kleinere IC<sub>50</sub>-Werte gemessen wurden als für ihre Doppelstrang-DNA Gegenstücke. Vermutlich ist der Verlust an Konformationsentropie, welcher auftritt, wenn das Peptidrückgrat wie im Fall der ungefalteten Peptide zu viele konformelle Freiheitsgrade besitzt, größer als der Verlust an Bindungsenergie, der aus einem zu starren Peptidrückgrat resultiert, wie es bei einem *coiled coil* Peptid der Fall wäre. Dieser Unterschied trat insbesondere bei der ZAP70 SH2-Domäne zum Vorschein, die auf Grund ihrer Struktur ein hohes Maß an Starrheit des Peptidgerüsts erfordert um einen definierten Abstand der Liganden zu gewährleisten. Lediglich bei der Bindung der Peptide pL<sub>2</sub>B/D sowie pL<sub>2</sub>B an die Syk SH2-Domäne scheinen sich der Entropieverlust und der Verlust an Bindungsenergie auszugleichen, weshalb in diesem Fall die IC<sub>50</sub>-Werte nahezu identisch waren.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die multivalente Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen ist ein Schlüsselprinzip in der Natur. Multivalente Interaktionen erlauben, im Gegensatz zu schwächeren monovalenten Wechselwirkungen, die mehrfache und dadurch verstärkte Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern. Dies ermöglicht eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin vor allem aber im Bereich der Materialwissenschaften. Das Augenmerk liegt dabei in der Kombination multivalenter Bausteine, um Materialien mit neuartigen optischen, elektronischen oder katalytischen Eigenschaften zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden *coiled coil* Peptide unterschiedlicher Länge für die Präsentation von geladenen Aminosäuren einerseits und eines peptidischen Liganden andererseits synthetisiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation untersucht werden. Dafür wurden *coiled coil* Peptide unterschiedlicher Länge synthetisiert, welche in ihrer solventexponierten f-Position eine variable Zahl an Argininen präsentierten. Zusätzlich dazu wurde ein Glutaminsäure-präsentierendes Peptid synthetisiert. Über die Aminosäuren in f-Position sollte die Interaktion mit gegensätzlich geladenen Gold-Nanopartikeln erfolgen, die sich sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Form voneinander unterschieden. Während der Charakterisierung dieser Peptide stellte sich jedoch heraus, dass die Arginin-präsentierenden Peptide, anders als erwartet, bei dem gewählten pH-Wert  $\alpha$ -helikale Peptidfasern ausbilden. Dies konnte zum einen mittels dynamischer Lichtstreuung, vor allem aber mittels TEM-Aufnahmen nachgewiesen werden. Dabei war außerdem auffällig, dass insbesondere die kürzeren Peptide bis zu einer Länge von 33 Aminosäuren zur Bildung von Faserbündeln neigten. Die Peptid-induzierte Nanopartikel-Aggregation wurde mit Hilfe verschiedener Methoden verfolgt. Dazu gehörte auch die UV-Vis Spektroskopie, bei der die einsetzende Rotverschiebung des Absorptionsmaximums der Nanopartikel in Folge der Zusammenlagerung ausgenutzt wurde. Glutaminsäure-präsentierende *coiled coil* Peptide waren nicht in der Lage eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und damit Aggregation von 30-40 nm großen Nanokugeln und -würfeln einzuleiten. Dies wurde auf eine sterische Hinderung der Wechselwirkung zwischen Peptid und

Nanopartikel auf Grund von Lysinseitenketten, die sich in Nachbarschaft zu den Glutaminsäuren befanden, zurückgeführt. Im Gegensatz dazu konnte mittels der einsetzenden Rotverschiebung gezeigt werden, dass ab einer bestimmten Anzahl an Argininen-Resten in f-Position eine Nanopartikel-Aggregation ausgelöst werden kann. Diese Zahl lag bei zwei Argininen in einem aus 26 Aminosäuren bestehenden Peptid. An Hand der durchgeführten UV-Vis Untersuchungen ließ sich ein kritisches Verhältnis zwischen der Anzahl an Argininen und der Peptidlänge bestimmen, bis zu dem eine Aggregation der Nanopartikel induziert werden konnte. Anschließend durchgeführte CD-Untersuchungen belegten, dass es in Folge der Nanopartikel-Aggregation nicht zu Strukturveränderungen am Peptid kam. Dies war jedoch der Tatsache geschuldet, dass die verwendeten Peptide bereits vor der Aggregation als thermodynamisch stabile Peptidfasern vorlagen. Diese Peptidfasern hatten speziell im Bezug auf die Struktur der gebildeten Peptid-Nanopartikel-Aggregate weitreichende Folgen. Sofern sich die Peptidfasern zu Faserbündeln zusammen lagern konnten, wurde ausschließlich eine Dekoration der Oberfläche dieser Faserbündel mit Nanopartikeln beobachtet, wodurch eine definierte Fernordnung der Nanopartikel auf der Faseroberfläche erreicht wurde. Obwohl in Lösung ebenfalls vereinzelte Peptidfasern vorhanden waren, konnte für diese keine Interaktion mit Nanopartikeln nachgewiesen werden, was vermutlich an der erhöhten Ladungsdichte innerhalb der Faserbündel lag. Während die Nanopartikel-Aggregation insgesamt zwar reversibel war, konnte anschließend gezeigt werden, dass die Nanopartikel-dekorierten Faserbündel nach einer reversiblen Schaltung der Aggregation verloren gingen. Stattdessen waren nun unstrukturierte Nanopartikel-Anordnungen zu beobachten. Sobald das Peptid nicht in der Lage war, Faserbündel zu bilden, ging ebenfalls die definierte Nanopartikel-Anordnung verloren. Dies war bei Peptiden ab einer Länge von 40 Aminosäuren der Fall. Stattdessen waren die Nanopartikel eher unstrukturiert auf einem Netzwerk aus Peptidfasern angeordnet. Die Bildung von Peptidfasern hatte jedoch auch unerwarteten Einfluss auf die Bindungskonstante und die Bindungsenthalpie. So zeigte sich an Hand der Bindungskonstanten, dass die Affinität der Nanopartikel für die Bindung an eine Peptidfaser deutlich höher ist als an ein *coiled coil* Peptid, obwohl dieses über wesentlich mehr Bindungsstellen verfügte. Als nachteilig erwies sich dabei die *coiled coil* Quartärstruktur, da diese in Gegenwart der Nanopartikel zur Umfaltung und

Bildung von  $\alpha$ -helikalen Fasern tendiert, was die Affinität drastisch verringerte. Zusätzlich hatte die *coiled coil* Struktur eine positive Bindungsenthalpie zur Folge, während die Peptidfaser-induzierte Nanopartikel-Aggregation über einen exothermen Reaktionsweg verlief. Diese Unterschiede ließen sich jedoch mit der während der Nanopartikel-Aggregation einsetzenden Umfaltung der *coiled coil* Peptide erklären. Da der Energieaufwand für die Umfaltung höher war, als der Energiegewinn in Folge der Aggregation, war die resultierende Bindungsenthalpie positiv.

Darauf aufbauend sollte in zukünftigen Arbeiten die Reversibilität der Peptidfaser-induzierten Nanopartikel-Aggregation dahingehend verbessert werden, dass die erhaltenen Peptid-Nanopartikel Strukturen auch nach einer Schaltung der Nanopartikel-Aggregation erneut erhalten werden. Dafür müsste ein Peptid synthetisiert werden, das sowohl bei pH 9 als auch bei pH 11  $\alpha$ -helikale Fasern bildet, dabei jedoch die Nettoladung des Peptids umkehrt. Damit wäre eine echte Reversibilität der Aggregation unter Erhalt der Struktur möglich. Darüber hinaus sollte versucht werden die Beladung der Faseroberfläche mit Nanopartikeln zu maximieren, indem die Zahl an geladenen Aminosäuren erhöht wird ohne die Faserstruktur zu verlieren. Dafür könnten beispielsweise eine Modifizierung der e- und g-Positionen des Peptids VW05 durchgeführt werden, um sich überlappende Enden im *coiled coil* zu generieren, da diese überlappenden Enden (*sticky ends*) die Bildung von Peptidfasern fördern würden. Zusätzlich müsste überprüft werden, ob die beschriebenen Nanopartikel-aggregierenden Eigenschaften der Aminosäure Arginin universell auf andere ladungspräsentierende Aminosäuren übertragen werden können. Beispielsweise müsste nach einem Austausch der Arginine durch Lysin vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Außerdem konnte in dieser Arbeit eine Nanopartikel-aggregierende Wirkung für negativ geladene Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht nachgewiesen werden. Sofern eine sterische Hinderung der Interaktion durch benachbarte Aminosäuren vorliegt, sollte hier auf nicht natürliche Glutaminsäure Analoga zurückgegriffen werden, um die Länge der Seitenkette zu vergrößern. Darüber hinaus sollte versucht werden gegensätzlich geladene Nanopartikel an Peptidfasern über die f-Position zu präsentieren. Damit könnten heterogene Peptid-Nanopartikel-Strukturen erzeugt werden, bei denen sich die Nanopartikel einerseits in ihrer Form oder andererseits in dem Metall, aus dem sie

aufgebaut sind, voneinander unterscheiden würden. Des Weiteren könnte in zukünftigen Arbeiten der Versuch unternommen werden neben Faser-bildenden Peptiden auch Peptide zu verwenden, die eine andere Struktur ausbilden, wie zum Beispiel Mizellen. Dadurch wäre womöglich eine kugelförmige Anordnung der Nanopartikel verfügbar. Neben Peptiden könnten aber auch größere Proteine verwendet werden. Beispielsweise könnte versucht werden, ein katalytisch aktives Protein durch gezielte Bindung von Nanopartikeln in ihrer katalytischen Aktivität und Selektivität zu verbessern bzw. die Katalyseaktivität durch Bindung von Nanopartikeln reversibel zu unterbrechen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Verwendung von dimeren *coiled coil* Peptiden für die divalente Präsentation eines phosphorylierten Peptidliganden zur Bindung an Tandem SH2-Domänen gezeigt werden. Dafür wurden heterodimere *coiled coil* Peptide synthetisiert, die in drei verschiedenen, definierten Abständen zwei Liganden präsentierten. Mittels CD-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass beide Peptide für sich ungefaltet in Lösung vorlagen und erst in Gegenwart des jeweils anderen Peptids eine Sekundärstruktur ausbildeten. Anschließend wurde mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropiemessungen die Konzentration bestimmt, bei der eine halbmaximale Bindungsinhibition beobachtet wurde. Wie sich herausstellte, präferierten die beiden untersuchten Tandem SH2-Domänen *ZAP70* und *Syk* jeweils unterschiedliche Abstände zwischen den beiden Liganden. So bevorzugte die *ZAP70* SH2-Domäne einen kurzen Abstand von 7 Aminosäuren zwischen den Liganden, während *Syk* den niedrigsten  $IC_{50}$ -Wert für einen Bindungsabstand von 21 Aminosäuren lieferte. Zusätzlich war zu beobachten, dass die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte bei einer gerichtete Ligandenpräsentation in einem *coiled coil* Peptid wesentlich geringer waren als für die Einzelstrangpeptide. Dieser Unterschied ließ sich mit dem höheren Gewinn an Bindungsenergie, der aus der gerichteten Ligandenpräsentation in Folge der *coiled coil* Bildung resultierte, gegenüber dem durch die Starrheit des entstehenden Ligandensystems erzeugten Entropieverlust erklären. Darüber hinaus bewirkte die größere strukturelle Flexibilität der *Syk* SH2-Domäne, dass alle  $IC_{50}$ -Werte grundsätzlich kleiner ausfielen als für die *ZAP70* SH2-Domäne, die einen genauen Abstand zwischen den Liganden für eine Interaktion benötigt.

In zukünftigen Arbeiten sollten zwei Strategien verfolgt werden. Zum einen sollte, das bisherige Peptiddesign weiterführend, auf Basis der bisherigen Ergebnisse der Abstand der beiden Peptidliganden weiter optimiert werden. Da die f-Positionen einen konstanten Abstand von 7, 14, 21 etc. Aminosäuren besitzen, sollten dafür auch die b- und c-Positionen verwendet werden. Dadurch wären beispielsweise auch Abstände von drei oder vier Aminosäuren möglich, die unter Umständen günstiger für die Interaktion mit der ZAP 70 SH2-Domäne sind. Außerdem sollte das von SEITZ *et al.* präsentierte Konzept der induzierten Multivalenz auch auf *coiled coil* Peptide übertragen werden. Dafür wird der ligandenpräsentierende Peptidstrang so in zwei Teile geteilt, dass beide Abschnitte einen der beiden Liganden besitzen. Erst in Gegenwart des *coiled coil* bildenden Templatpeptids kommen beide Abschnitte in direkte Nähe und bilden ein divalentes Ligandensystem. Der große Vorteil dieser Methode liegt einerseits in dem geringeren synthetischen Aufwand und andererseits in der hohen Zahl an möglichen Abständen zwischen den Liganden, die durch Kombination von nur wenigen Peptidfragmenten erzielt werden können.





## 8. Experimentalteil

### 8.1. Synthese der Gold-Nanopartikel

In einer 10 mL Gewindeflasche wurde Dodecanthiol (22  $\mu$ L; 3.75 mmol) und Chloro(triphenylphosphin)gold (20 mg; 0.04 mmol) in Benzol (3.2 mL) gelöst. Nach der Zugabe von Boran-tert-butylamin (35 mg; 0.40 mmol) wurde die Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde Methanol (10 mL) zugegeben und der entstehende Niederschlag mittels Zentrifugation vom Lösungsmittelüberstand getrennt. Anschließend wurde der schwarze Niederschlag drei Mal mit Methanol (15 mL) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die synthetisierten Gold-Nanopartikel wurden ohne weitere Charakterisierung verwendet.

### 8.2. Ligandenaustausch an Gold-Nanopartikeln

Die in Kapitel 8.1 synthetisierten Gold-Nanopartikel wurden in Chloroform (1.5 mL) gelöst und langsam in eine Lösung aus Mercaptoundecansäure (200 mg; 0.92 mmol) in THF (5 mL) zugetropft. Nach zwei Tagen Rühren wurde der entstandene schwarze Niederschlag mittels Zentrifugation vom Lösungsmittelüberstand getrennt. Überschüssige Mercaptoundecansäure wurde durch mehrmaliges Waschen mit THF entfernt. Anschließend wurde der schwarze Niederschlag bei vermindertem Druck getrocknet und in 10 mM TRIS/HCl Puffer (5 mL; pH 11) gelöst. Die Nanopartikel-Lösung wurde zusätzlich noch mittels Dialyse gegen 10 mM TRIS/HCl Puffer gereinigt. Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte sowohl mittels DLS als auch mittels TEM.

### 8.3. Peptidsynthese und Reinigung

Die Synthese der Peptide erfolgte nach der Fmoc-Strategie vom C- zum N-Terminus des Peptids ausschließlich von Hand. Dafür wurde das Polymerharz (beladen oder unbeladen) in einem Spritzenreaktor mit Fritte vorgelegt und für 30 min in DMF (6 mL) quellen gelassen und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Die Abspaltung der

Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch dreimalige Zugabe der Abspalllösung 1 (3 mL) bei einer Reaktionszeit von je 10 min. Um Rückstände der Abspalllösung 1 zu entfernen wurde das Harz mehrmals mit DMF gewaschen. Für die Kupplung der Aminosäuren wurde die folgende Aminosäure (6 äq.) in der Kupplungslösung (2.5 mL) gelöst, für 10 min voraktiviert und auf das Polymerharz gegeben. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde. Um eine möglichst vollständige Kupplung zu gewährleisten, wurde die Kupplungsreaktion einer Aminosäure doppelt durchgeführt. Nach der Kupplung der Aminosäure wurde das Harz mehrmals mit DMF gewaschen und der Syntheszyklus mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erneut begonnen.

Vor der Vollabspaltung des Peptids vom Polymerharz wurde das Harz mehrmals mit DCM gewaschen. Die Abspaltung erfolgte durch Zugabe der Abspalllösung 2 oder 3 (3 mL). Nach einer Reaktionszeit von mindestens 6 Stunden wurde der Überstand in einem Rundkolben aufgefangen und das Harz mehrmals mit DCM und TFA gewaschen. Die Lösungen wurden vereint, unter einem Argonstrom eingeengt und mit einem Überschuss an eisgekühltem Diethylether versetzt. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde vom Lösungsmittelüberstand mittels Zentrifugation abgetrennt und getrocknet.

Das erhaltene Rohpeptid wurde in den HPLC-Lösungsmitteln 1 und 2 gelöst und mittels präparativer RP-HPLC der Firma Knauer gereinigt. Zur Elution der Peptide wurde ein Lösungsmittelgradient aus Wasser und Acetonitril, welches jeweils mit 0.1 % TFA versetzt war, bei einer Flussrate von 20 mL/min genutzt. Als Chromatographiesäule wurde eine Phenomenex® Gemini-NX C18-Säule (10 µM; 250 x 21.20 mm) genutzt. Die Fraktionen wurden entsprechend der UV-Absorption, gemessen auf einem Perkin Elmer 56 Analog-Schreiber, gefangen und mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft und mittels ESI-TOF charakterisiert.

Die reinen Peptidfraktionen wurden mittels eines Christ Alpha 1-2 LD gefriergetrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

**Abspalllösung 1:**

1 % Piperidin, 1 % DBU in DMF

**Abspalllösung 2:**

2.5 % TIPS, 2.5 % Wasser in TFA

**Abspalllösung 3:**

5 % Phenol, 2.5 % TIPS, 2.5 % EDT, 5 % Thioanisol in TFA

**Kupplungslösung:**

6 äq. HOAt, 6 äq. DIC in DMF

**HPLC-Lösungsmittel 1:**

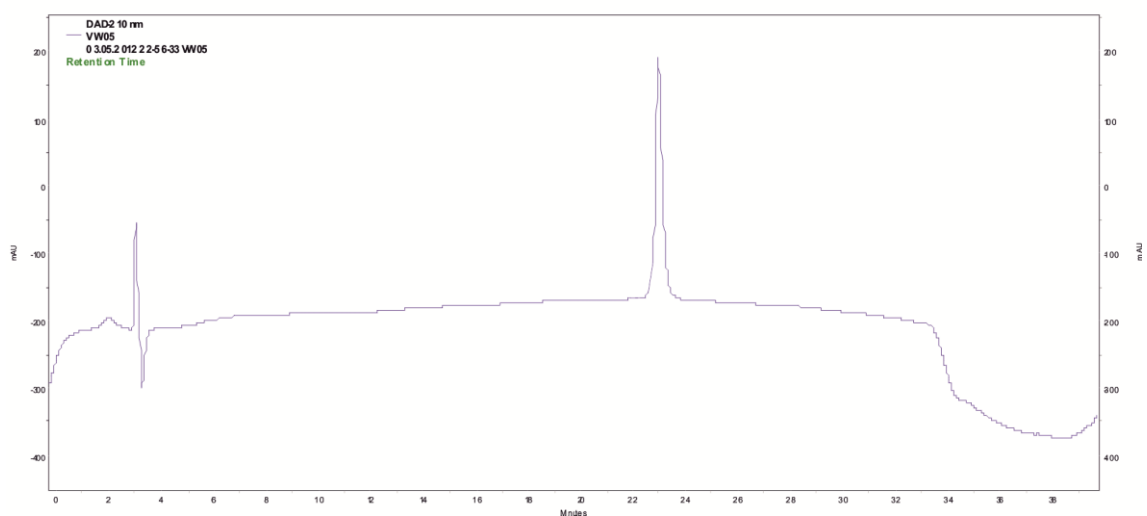
0.1 % TFA in Wasser

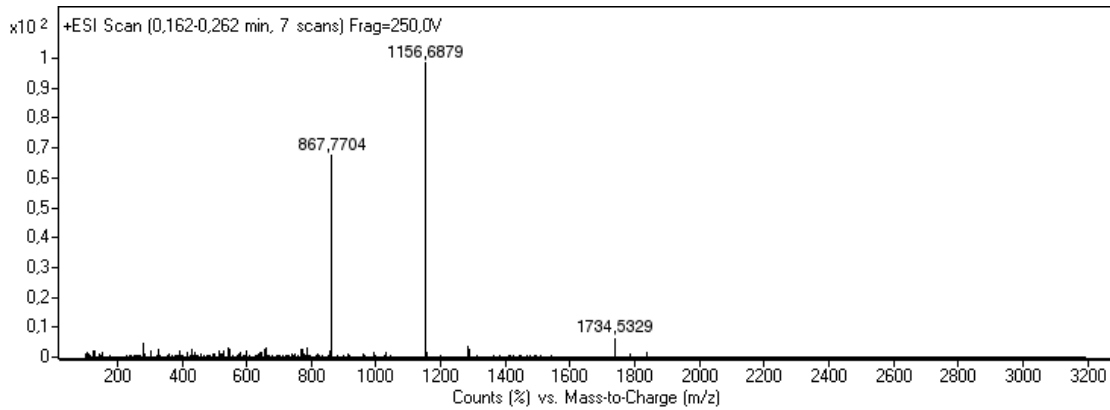
**HPLC-Lösungsmittel 2:**

0.1 % TFA in Acetonitril

**8.3.1. VW05 (H<sub>2</sub>N-Abz-LERKLEKLERKLEKLERKLEKLERKL-COOH)**

Das Peptid VW05 wurde an einem Fmoc-Leucin Wang Harz (0.46 mmol/g Beladung) in einem 0.05 mmol Ansatz synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde zusätzlich der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspalllösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 35.8 mg.

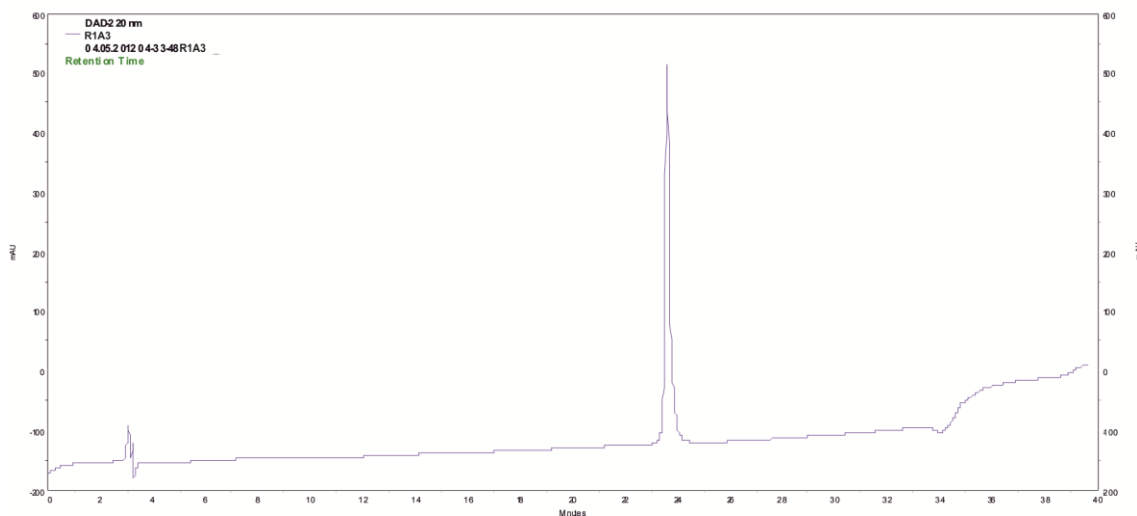
**Abbildung 78:** HPLC Chromatogramm des Peptids VW05.



**Abbildung 79:** ESI-TOF Spektrum des Peptids VW05.

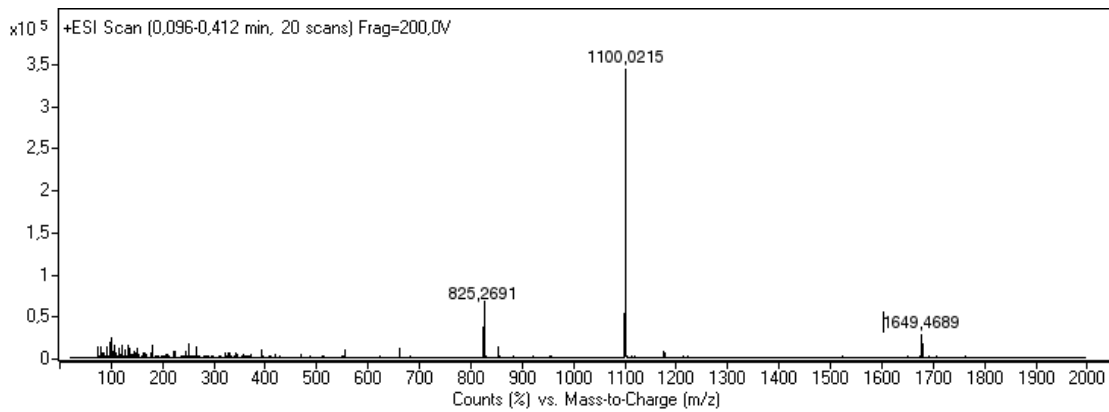
### 8.3.2. R1A3 (H<sub>2</sub>N-Abz-LEAKLKELEKLEAKLKELEAKL-COOH)

Das Peptid R1A3 wurde an einem Fmoc-Leucin Wang Harz (0.46 mmol/g Beladung) in einem 0.05 mmol Ansatz synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde zusätzlich der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspalllösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 39.1 mg.



**Abbildung 80:** HPLC Chromatogramm des Peptids R1A3.

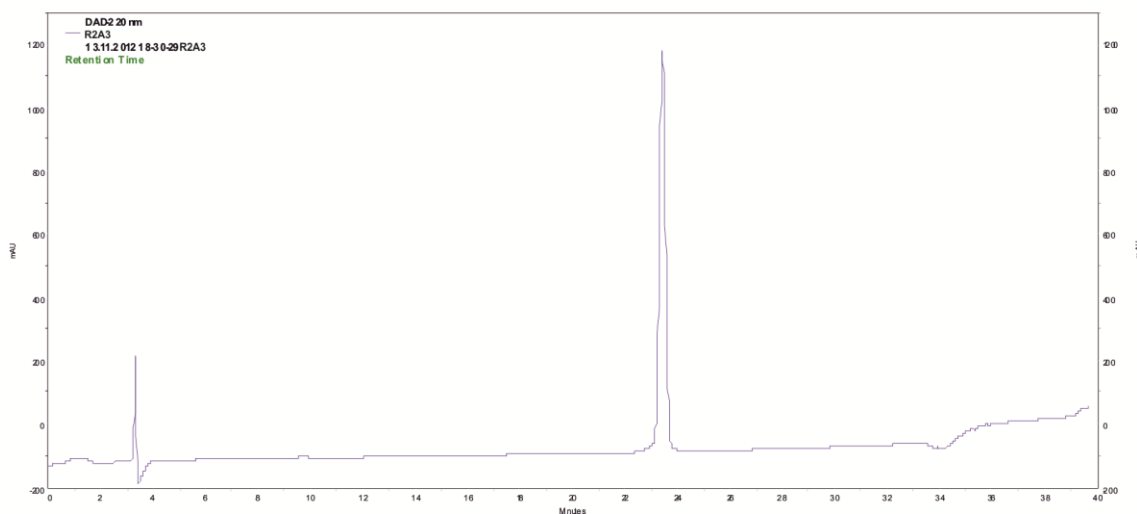




**Abbildung 83:** Massenspektrum des Peptids R2A2.

### 8.3.4. R2A3 (H<sub>2</sub>N-Abz-LEAKLKELERKLKELEAKLKELERKLKELEAKL-COOH)

Das Peptid R2A3 wurde an einem Fmoc-Leucin Wang Harz (0.46 mmol/g Beladung) in einem 0.05 mmol Ansatz synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde etwa die Hälfte des Harzes abgetrennt und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspatlösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 20.9 mg.



**Abbildung 84:** HPLC Chromatogramm des Peptids R2A3.

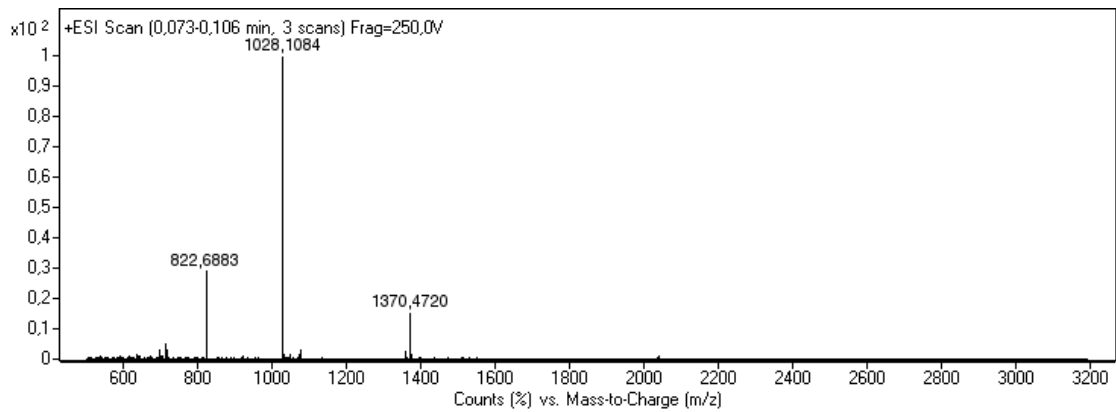


Abbildung 85: Massenspektrum des Peptids R2A3.

### 8.3.5. R2A4 (H<sub>2</sub>N-Abz-LEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKL-COOH)

Das Peptid R2A4 wurde mit dem restlichen Harz aus der Synthese des Peptids R2A3 (Kapitel 8.3.4) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde etwa die Hälfte des Harzes abgetrennt und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspatlösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 16.2 mg.

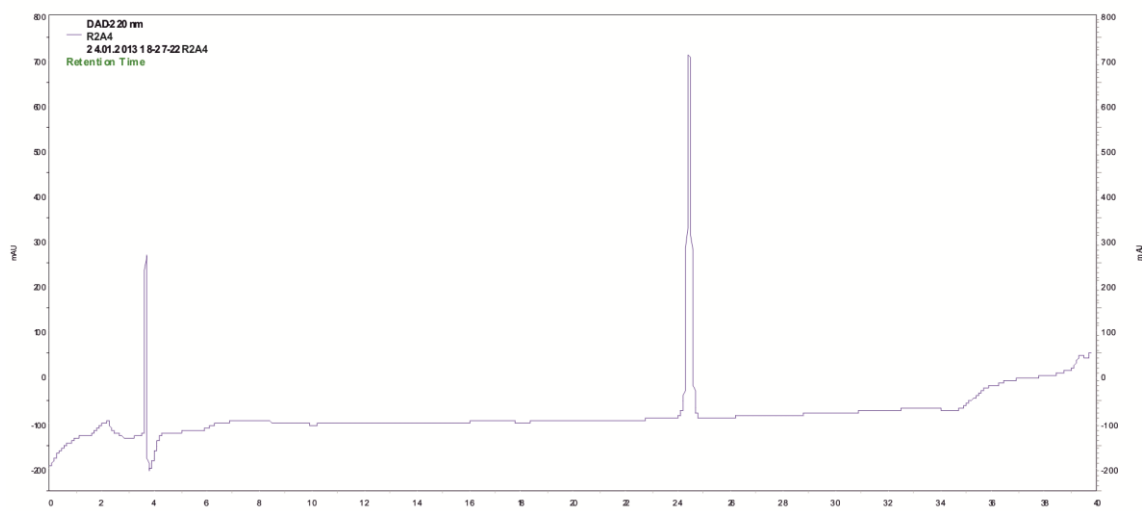
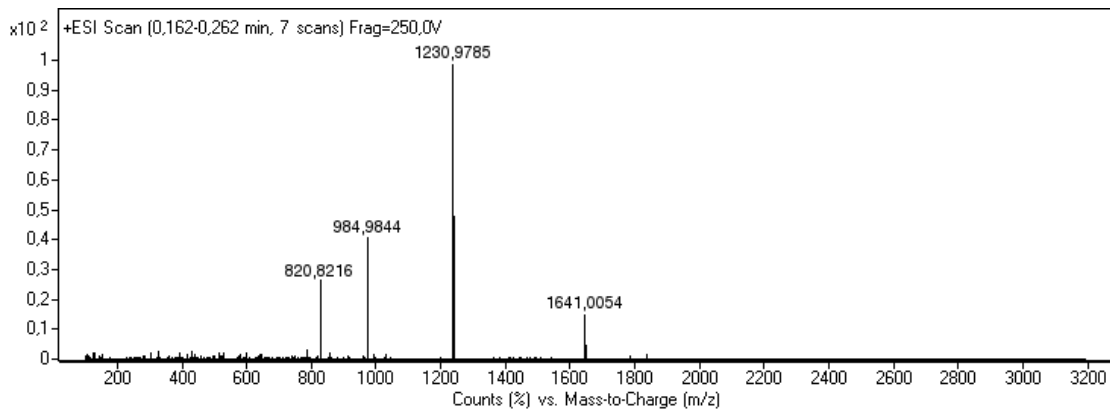


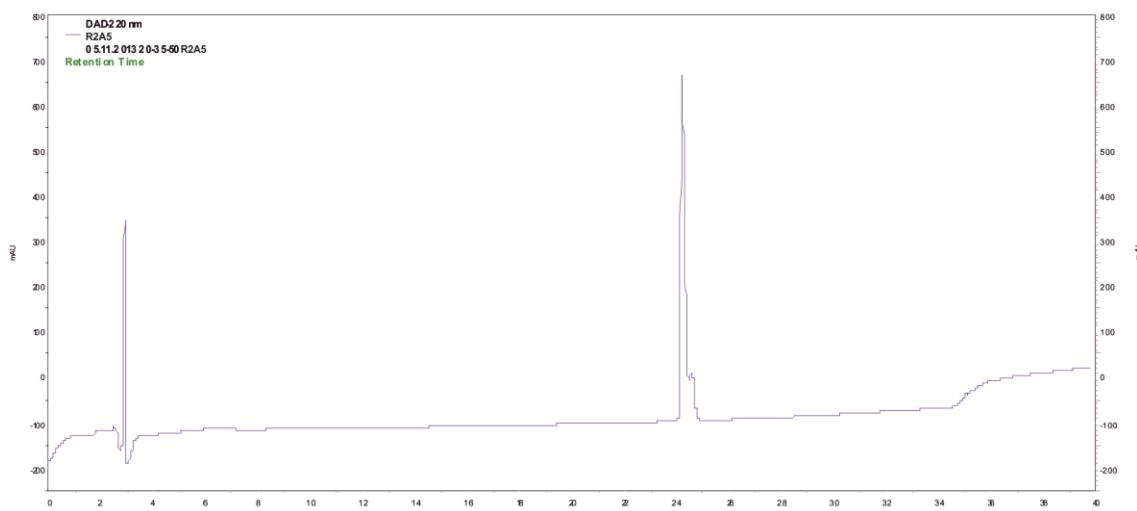
Abbildung 86: HPLC Chromatogramm des Peptids R2A4.



**Abbildung 87:** Massenspektrum des Peptids R2A3.

### 8.3.6. R2A5 (H<sub>2</sub>N-Abz-LEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLKELEAKLCOOH)

Das Peptid R2A5 wurde mit dem restlichen Harz aus der Synthese des Peptids R2A4 (Kapitel 8.3.5) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde zusätzlich der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspatlösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 9.9 mg.



**Abbildung 88:** HPLC Chromatogramm des Peptids R2A5.



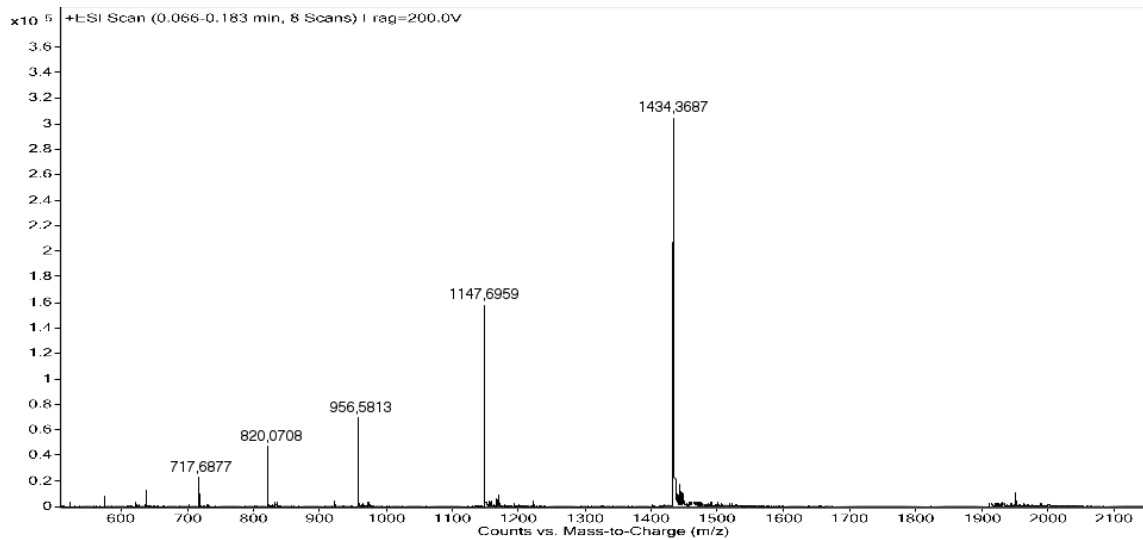


Abbildung 89: Massenspektrum des Peptids R2A5.

### 8.3.7. E4 (H<sub>2</sub>N-Abz-LEEKLKELEEKLEAKLKELEAKL-COOH)

Das Peptid E4 wurde an einem Fmoc-Leucin Wang Harz (0.46 mmol/g Beladung) in einem 0.05 mmol Ansatz synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde zusätzlich der UV-Maker Aminobenzoesäure an das Peptid gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspalllösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 34.4 mg.

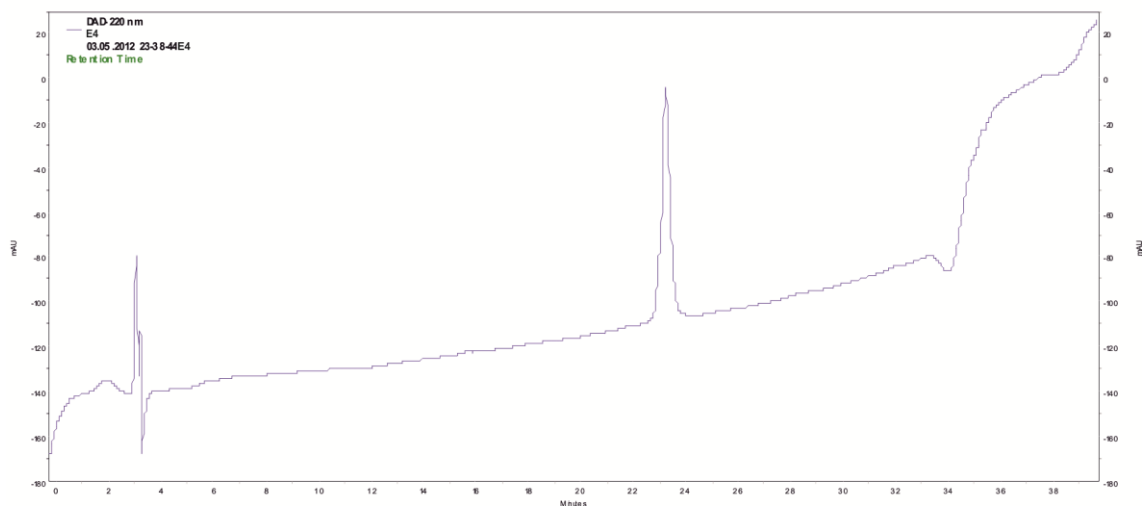
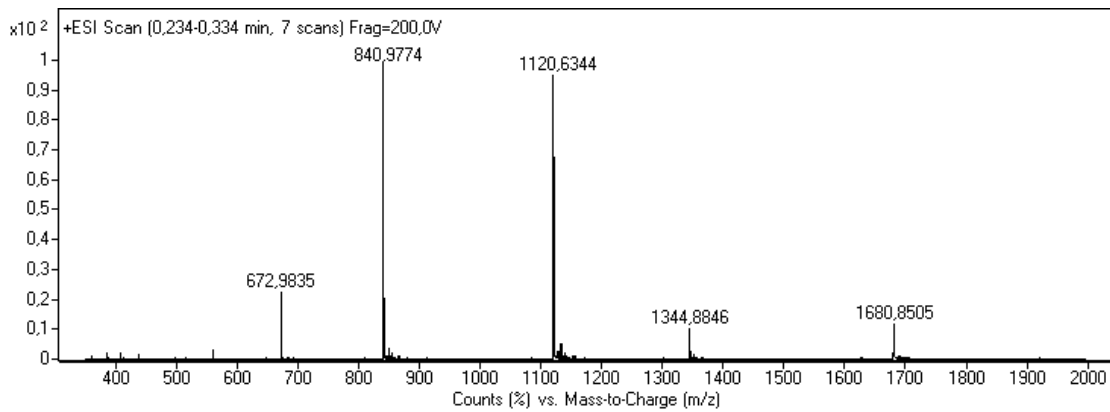


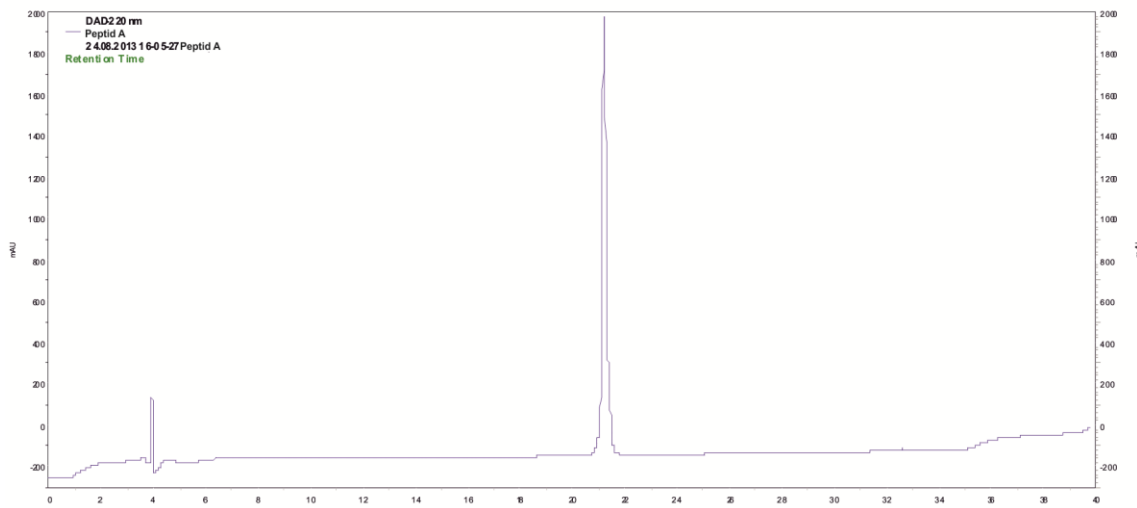
Abbildung 90: HPLC Chromatogramm des Peptids E4.



**Abbildung 91:** Massenspektrum des Peptids E4.

### 8.3.8. Peptid A (AcO-NH-KVSALKCKVASLKEKVSALKEKVASLCKKVSALK-CONH<sub>2</sub>)

Das Peptid A wurde an einem Rink Amid Harz (unbeladen) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der N-Terminus durch dreimalige Zugabe von Acetanhydrid (10 % in DMF) für 10 min acetyliert. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspatlösung 3. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 28.7 mg.



**Abbildung 92:** HPLC Chromatogramm des Peptids A.

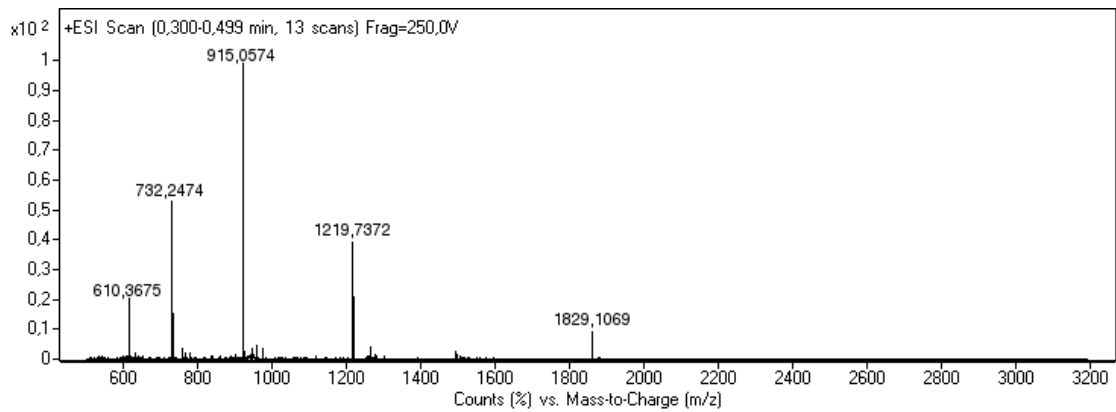


Abbildung 93: Massenspektrum des Peptids A.

### 8.3.9. Peptid B (AcO-NH-KVSALKCKVASLKEKVSALKCKVASLKEKVSALK-CONH<sub>2</sub>)

Das Peptid B wurde an einem Rink Amid Harz (unbeladen) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der N-Terminus durch dreimalige Zugabe von Acetanhydrid (10 % in DMF) für 10 min acetyliert. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspaltlösung 3. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 26.5 mg.

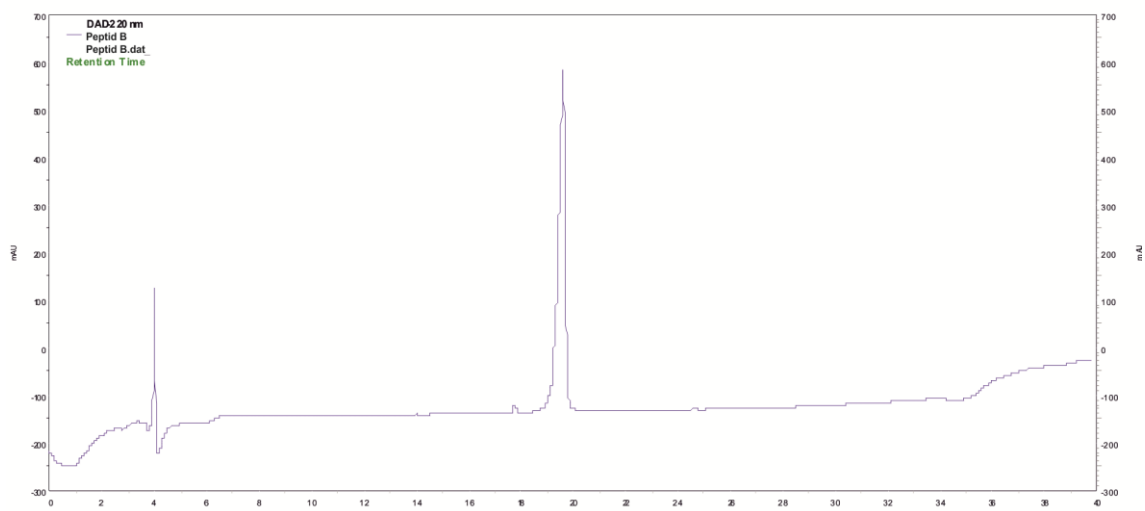
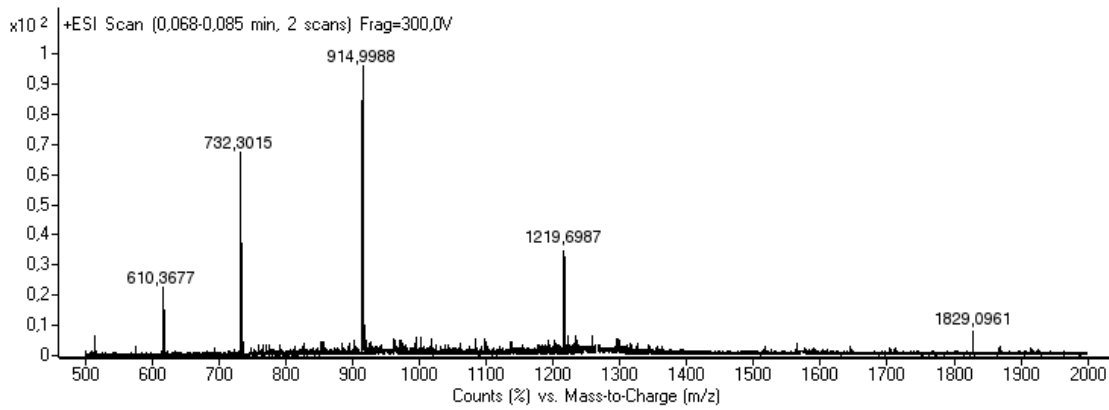


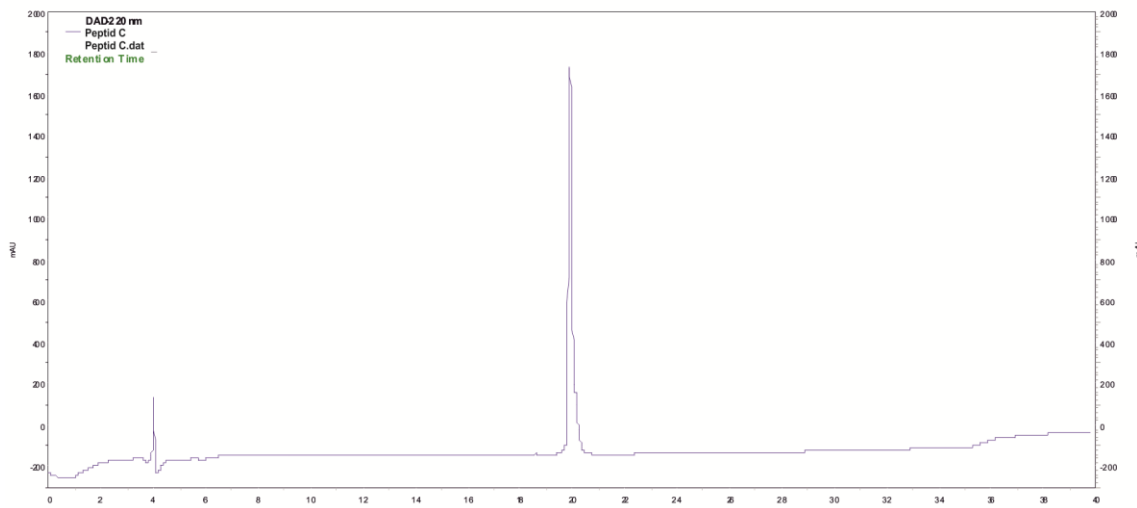
Abbildung 94: HPLC Chromatogramm des Peptids B.



**Abbildung 95:** Massenspektrum des Peptids B.

### 8.3.10. Peptid C (AcO-NH-KVSALKEKVASLKCKVSAKCKVASLKEKVSALK-CONH<sub>2</sub>)

Das Peptid C wurde an einem Rink Amid Harz (unbeladen) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der N-Terminus durch dreimalige Zugabe von Acetanhydrid (10 % in DMF) für 10 min acetyliert. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspatlösung 3. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 29.2 mg.



**Abbildung 96:** HPLC Chromatogramm des Peptids C.

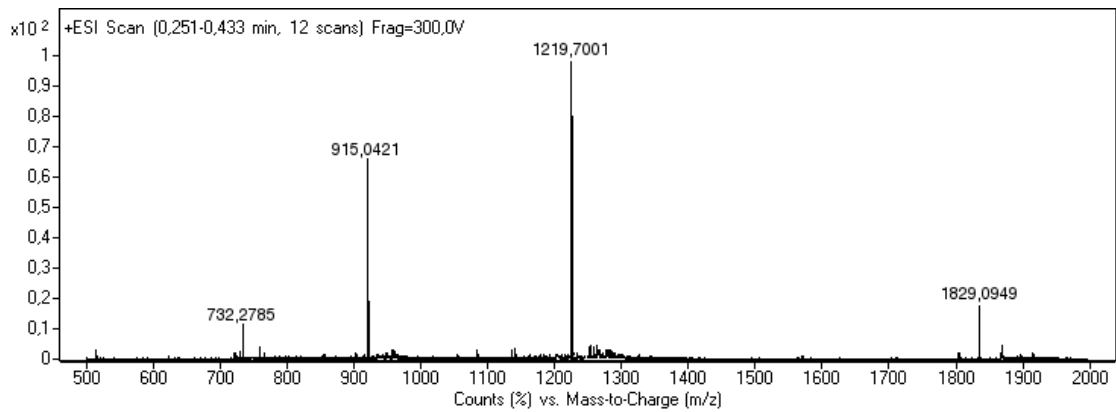


Abbildung 97: Massenspektrum des Peptids C.

### 8.3.11. Peptid D (AcO-NH-EVSALEKEVASLEKEVSALEKEVASLEKEVSALE-CONH<sub>2</sub>)

Das Peptid C wurde an einem Rink Amid Harz (unbeladen) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der N-Terminus durch dreimalige Zugabe von Acetanhydrid (10 % in DMF) für 10 min acetyliert. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspaltlösung 2. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 31.1 mg.

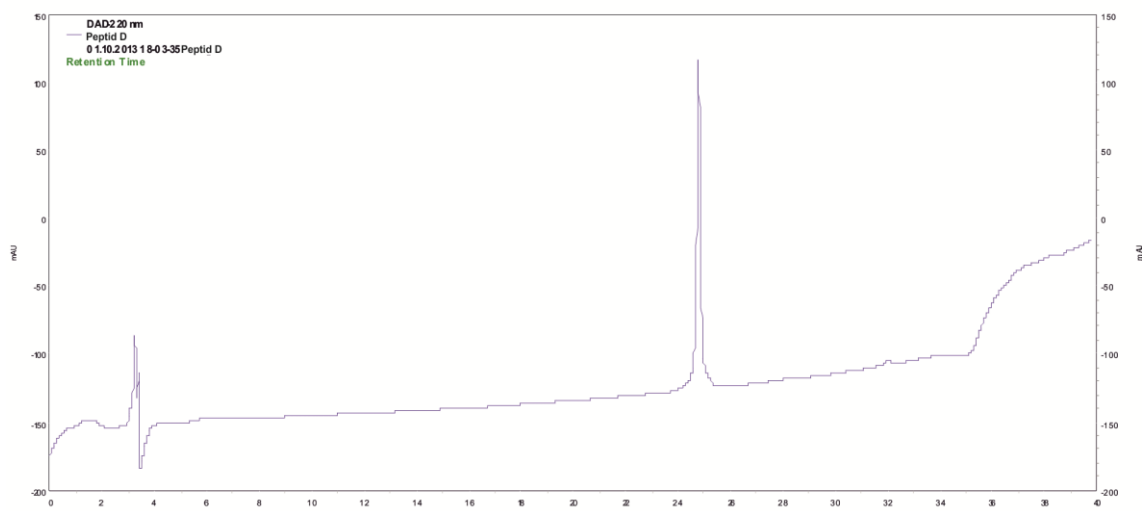
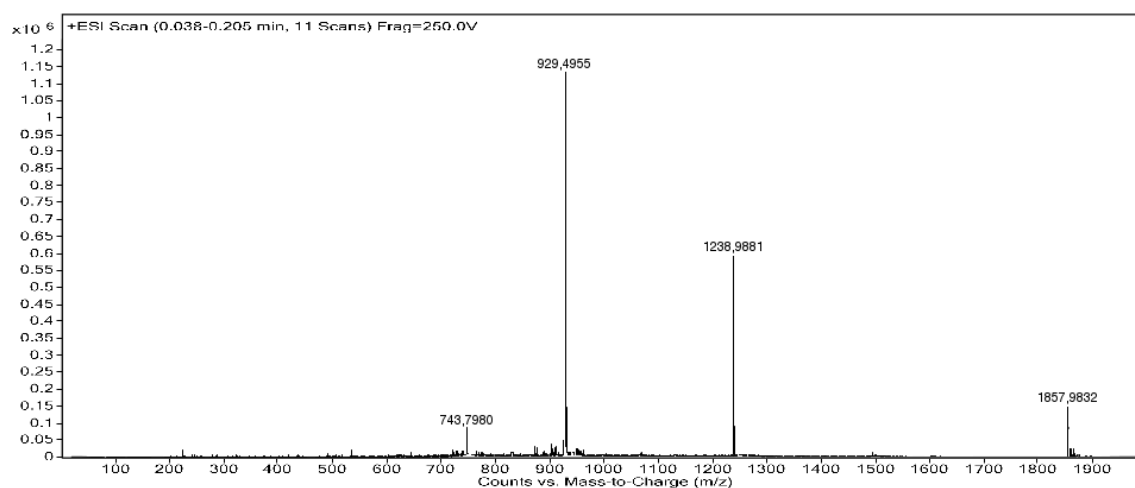


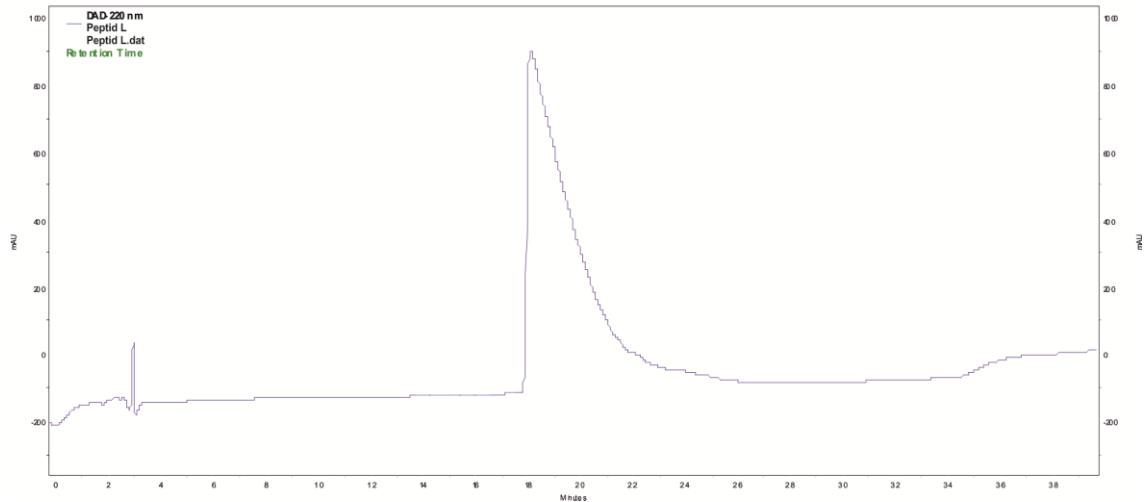
Abbildung 98: HPLC Chromatogramm des Peptids D.



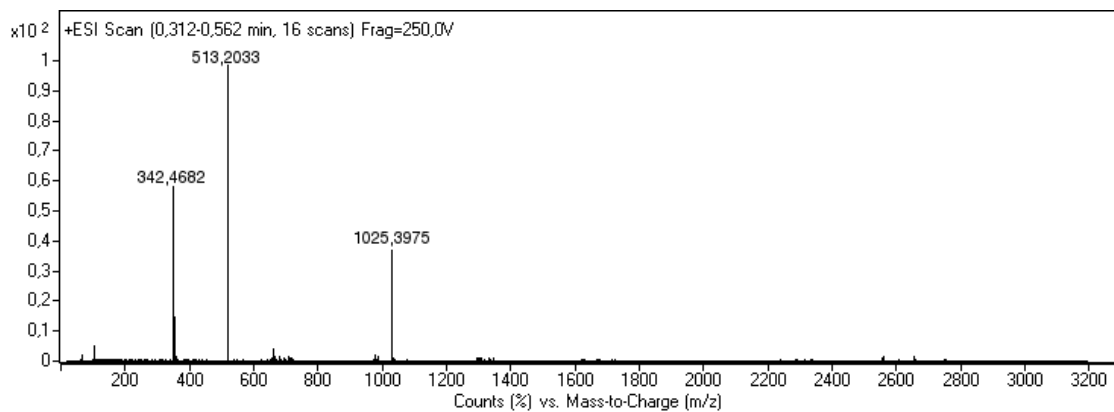
**Abbildung 99:** Massenspektrum des Peptids D.

### 8.3.12. Peptid pL (AcO-NH-GLTEpYK(MIC)-CONH<sub>2</sub>)

Das Peptid pL wurde an einem Rink Amid Harz (unbeladen) synthetisiert. Die Synthese des Peptids erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 8.3. Die Kupplung des phosphorylierten Tyrosins erfolgte durch zweimalige Zugabe von 1 äq. der Aminosäure, voraktiviert mit 1 äq. HATU und 1 äq. DIPEA in DMF, für 24 Stunden. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde der N-Terminus durch dreimalige Zugabe von Acetanhydrid (10 % in DMF) für 10 min acetyliert. Anschließend wurde die Mtt-Schutzgruppe der Lysinseitenkette durch mehrmalige Zugabe von 1 % TFA in DCM selektiv entschützt. Sobald sie Abspaltung farblos blieb, war die Entschützung vollständig. Anschließend wurde der MIC-Linker unter den in Kapitel 8.3 gekuppelt. Die Vollabspaltung erfolgte unter Verwendung der Abspaltungslösung 3. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 11.9 mg.



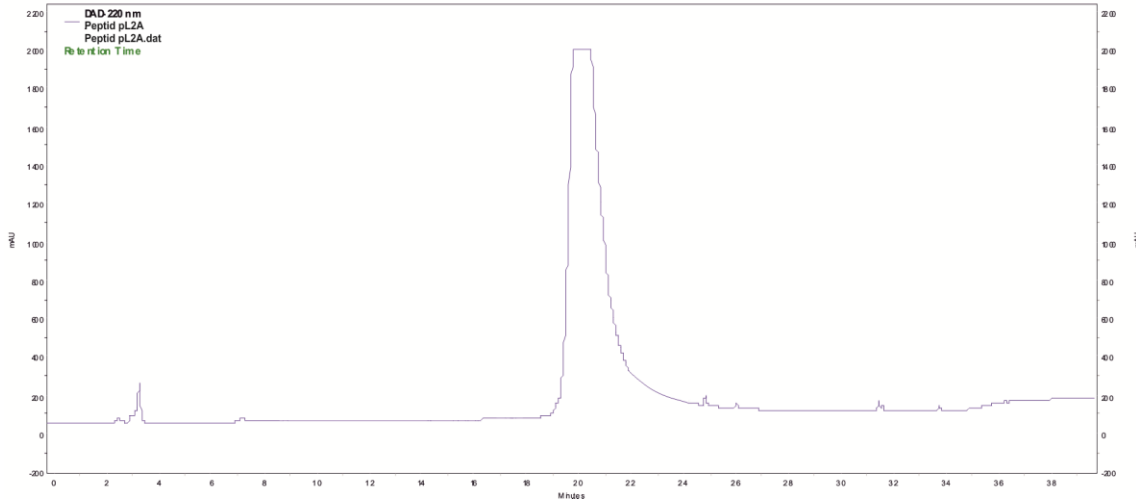
**Abbildung 100:** HPLC Chromatogramm des Peptids L.



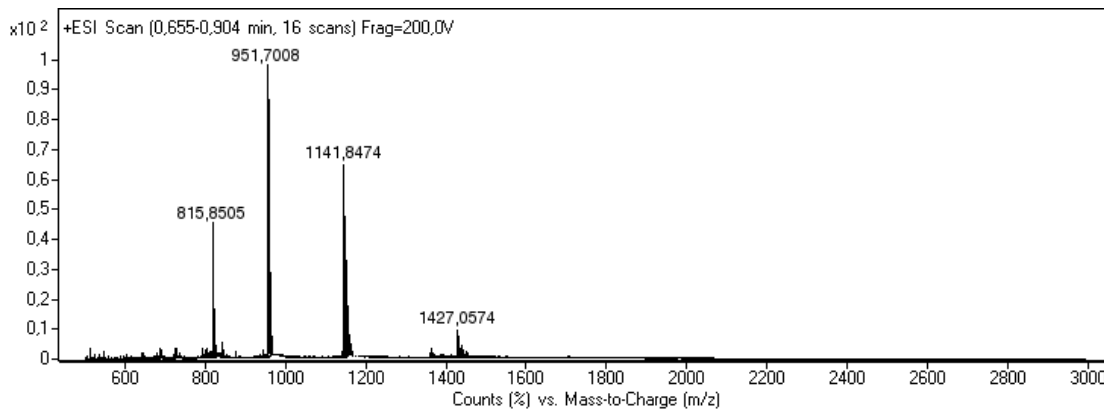
**Abbildung 101:** Massenspektrum des Peptids L.

### 8.3.13. Peptid pL<sub>2</sub>A

Die Synthese des Peptids pL<sub>2</sub>A erfolgte durch Ligation des Peptids A mit 2.2 äq. des Peptids L. Dafür wurde das Peptid A in Phosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) gelöst und anschließend unter Rühren das Peptid pL zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung abgebrochen. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg.



**Abbildung 102:** HPLC Chromatogramm des Peptids pL<sub>2</sub>A.

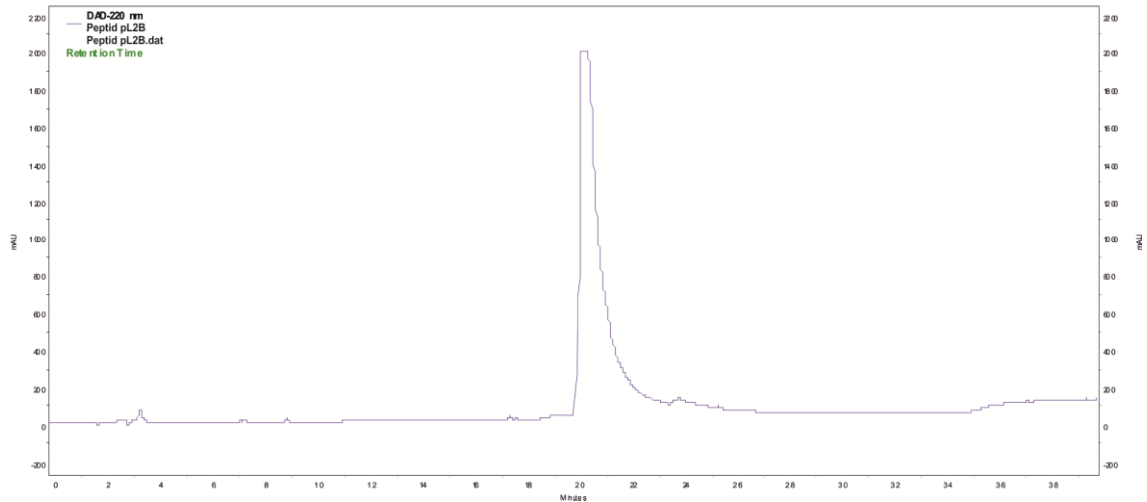


**Abbildung 103:** Massenspektrum des Peptids pL<sub>2</sub>A.

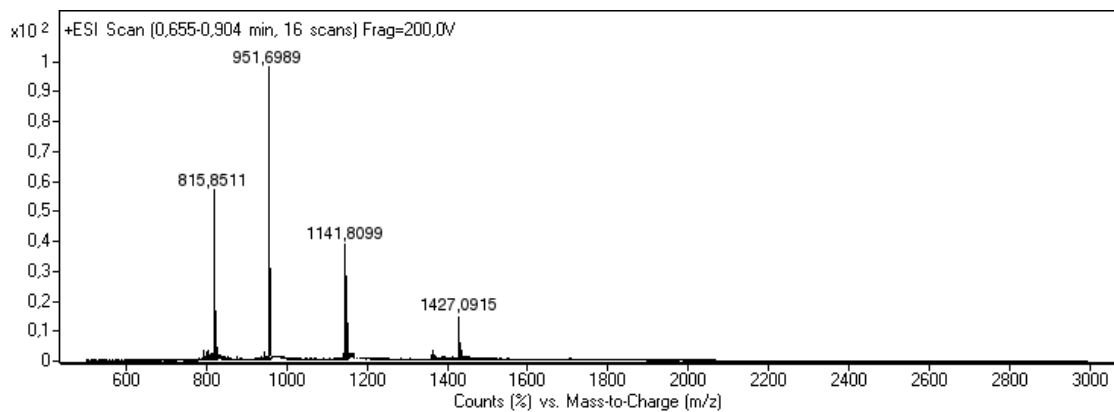
### 8.3.14. Peptid pL<sub>2</sub>B

Die Synthese des Peptids pL<sub>2</sub>B erfolgte durch Ligation des Peptids A mit 2.2 äq. des Peptids L. Dafür wurde das Peptid B in Phosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) gelöst und anschließend unter Rühren das Peptid pL zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung abgebrochen. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg.





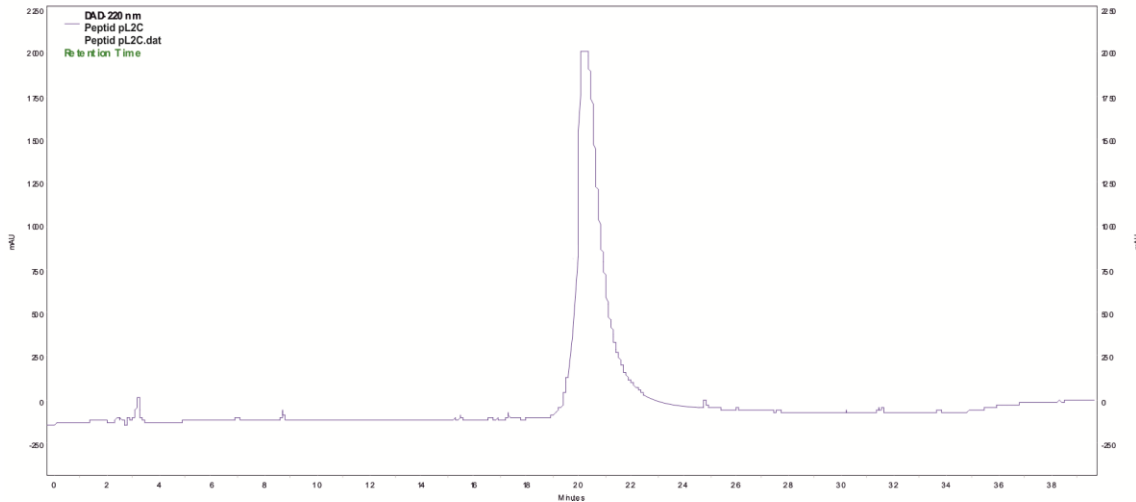
**Abbildung 104:** HPLC Chromatogramm des Peptids pL<sub>2</sub>B.



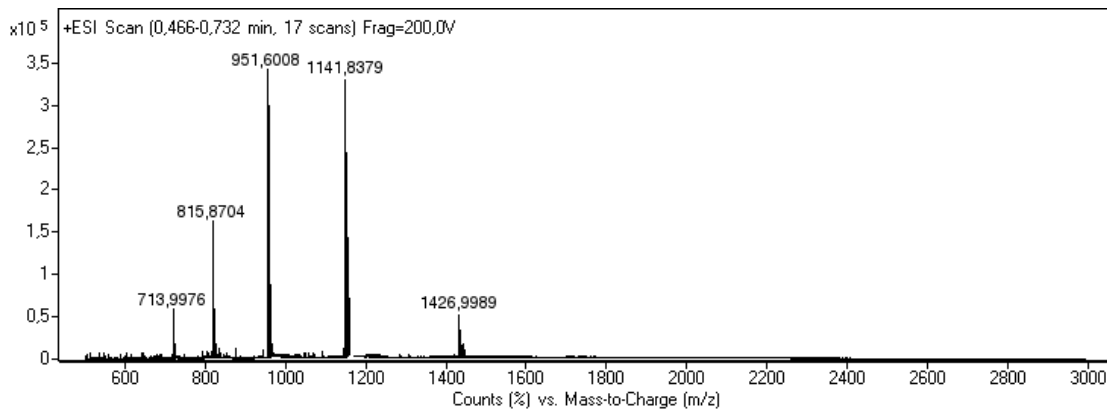
**Abbildung 105:** Massenspektrum des Peptids pL<sub>2</sub>B.

### 8.3.15. Peptid pL<sub>2</sub>C

Die Synthese des Peptids pL<sub>2</sub>C erfolgte durch Ligation des Peptids A mit 2.2 äq. des Peptids L. Dafür wurde das Peptid C in Phosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) gelöst und anschließend unter Rühren das Peptid pL zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung abgebrochen. Das Peptid wurde mittels HPLC mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt, bei dem innerhalb von 30 min der Acetonitril-Anteil von 5 % auf 70 % Acetonitril in Wasser anstieg.



**Abbildung 106:** HPLC Chromatogramm des Peptids pL<sub>2</sub>C.



**Abbildung 107:** Massenspektrum des Peptids pL<sub>2</sub>C.

#### 8.4. Probenvorbereitung

Die Peptide wurden in frisch gefiltertem TRIS/HCl Puffer (10 mM; pH 9) bzw. Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7.5) gelöst und über einen Spritzenfilter filtriert. Die exakte Konzentration wurde mittels UV-Vis Spektroskopie bestimmt, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 314 nm gemessen wurde. Für die Berechnung der Konzentration wurde eine Kalibrierkurve von Aminobenzoesäure-funktionalisiertem Glycin im gleichen Puffer aufgenommen.

### 8.5. UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektren der Nanopartikel-Peptid-Aggregate wurden auf einem CARY 50 Bio Spektrophotometer der Firma Varian aufgenommen. Die Konzentration der in 10 mM TRIS/HCl pH 9 gelösten Nanopartikel wurde auf Grundlage der gemessenen Absorption bei  $\lambda=506$  nm berechnet. Die Nanopartikel wurden mit 10 mM TRIS/HCl Puffer verdünnt, sodass nach Zugabe des Peptids eine Endkonzentration von 50 nM erreicht wurde. Erst direkt vor der Messung der UV-Vis Spektren wurde das Peptid mit einer Endkonzentration zwischen 5 und 30  $\mu$ M zu der Nanopartikel-Lösung gegeben. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur in semi-mikro Einwegküvetten der Firma Brand GmbH. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge zwischen 450 und 750 nm in 0.25 nm Schritten aufgenommen. Vor der Messung der Spektren wurde eine Basislinienkorrektur durch Messung der reinen Pufferlösung durchgeführt.

### 8.6. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden auf einem J-810 Spektrophotometer der Firma Jasco GmbH unter Verwendung von 2 mm Quartzküvetten aufgenommen. Dabei erfolgte die Präparation der Proben in Analogie zu der Probenpräparation für die Messung der UV-Vis Spektren. Alle Spektren wurden bei einer Wellenlänge zwischen 190 und 240 nm bei 20 °C aufgenommen und als Mittelwert aus drei einzelnen Messungen ausgegeben. Vor der Messung der Spektren wurde eine Basislinienkorrektur durch Messung der reinen Pufferlösung durchgeführt.

### 8.7. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Ein Tropfen der Peptid- bzw. Nanopartikel-Lösung (5  $\mu$ L; 100  $\mu$ M Peptid bzw. 15  $\mu$ M Nanopartikel) wurde auf ein hydrophilisiertes Kupfergrid aufgetragen, welches mit einem Kohlefilm beschichtet war. Nach einer Minute wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Während die mit Nanopartikeln beladenen Kupfergrids an der Luft getrocknet wurden, wurden auf die mit Peptid beladenen

Kupfergrids 5  $\mu\text{L}$  einer 2 %igen PTA Lösung (pH 7.4) aufgetragen und den Überstand nach einer Minute erneut mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurden auch diese Kupfergrids an der Luft getrocknet. Die Kupfergrids wurden über einen Probenhalter in das Philips CM12 Transmissions-Elektronen-Mikroskop eingeführt. Dabei wurde eine Beschleunigungsspannung von 100 kV verwendet. Die Proben wurden um den Faktor 60000 vergrößert dargestellt, wobei ein Defokus von -500 nm (Peptid) bzw. -300 nm (Nanopartikel) genutzt wurde.

### 8.8. KryoTEM

Ein Tropfen der Peptid- bzw. Peptid-Nanopartikel-Lösung (5  $\mu\text{L}$ ; 100  $\mu\text{M}$  Peptid bzw. 100  $\mu\text{M}$  Peptid und 0.05  $\mu\text{M}$  Nanopartikel) wurde auf ein hydrophilisiertes Kupfergrid aufgetragen, welches mit einer Kohle-Loch-Folie beschichtet war. Nach einer Minute wurde der flüssige Überstand mit einem Filterpapier so entfernt, dass noch ein hauchdünner Flüssigkeitsfilm übrig blieb. Daraufhin wurde die Probe vitrifiziert, in dem sie mit einer Guillotine-artigen Vorrichtung in verflüssigtes Ethan eingetaucht wurde. Anschließend wurden die Grids in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Für die Messung wurde das Kupfergrid unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Kryohalters in das Philips CM12 Transmissions-Elektronen-Mikroskop eingeführt. Dabei wurde eine Beschleunigungsspannung von 100 kV verwendet. Die Proben wurden um den Faktor 60000 vergrößert dargestellt, wobei ein Defokus von -1200 nm bzw. -1800 nm genutzt wurde.

### 8.9. Dynamische Lichtstreuung

Die Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS analyzer<sup>TM</sup> mit einem integrierten Helium-Neon-Laser durchgeführt. Die Peptide (15  $\mu\text{M}$ ) und Nanopartikel (0.05  $\mu\text{M}$ ) wurden in 10 mM TRIS/HCl Puffer (pH 9 und pH 11) gelöst. Die Messung erfolgte in semi-mikro Einwegküvetten der Firma Brand GmbH bei Raumtemperatur, wobei eine Messung aus der 15-fachen Wiederholung einer 15 sekundigen Messung bestand.

### 8.10. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde bei Raumtemperatur in einem Gel XL Ultra V-2 Elektrophorese System unter Verwendung eines 0.5 %igen Agarosegels in 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 9 durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte in Analogie zu dem in Kapitel 8.5 beschriebenen Verfahren, wobei die Proben erst nach einer Reaktionszeit von einer Stunde auf das Gel aufgetragen wurden. Zur Beschwerung der Proben wurde der Probenpuffer zusätzlich mit Saccharose (100 mM) versetzt. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

Es wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Probenlösung in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde nach spätestens 30 min abgebrochen, sobald eine Bandenverbreiterung beobachtet wurde. Die Dokumentation der Banden erfolgte mittels Belichtung bei einer Wellenlänge von 254 nm sowie mit Weißlicht.

### 8.11. Isotherme Titrationskalorimetrie

Die ITC Messungen wurden an einem VP-ITC MicroCal durchgeführt. Dafür wurde die Probenzelle mit 200  $\mu\text{L}$  der Nanopartikel-Lösung (verschiedene Konzentration in 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 9) und die Spritze mit 2  $\mu\text{L}$  der Peptid-Lösung (verschiedene Konzentration in 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 9) befüllt. Die Titration des Peptids erfolgte in 20 Schritten innerhalb von jeweils 5 Sekunden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C, wobei zwischen zwei Titrationsen eine Zeit von 150 Sekunden lag, die zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts genutzt wurde.



## 9. Inhaltsverzeichnis

---

- [1] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [3] A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409-3424.
- [4] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732.
- [5] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368.
- [6] W. J. Lees, A. Spaltenstein, W. J. E. Kingery, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419-3433.
- [7] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179-4190.
- [8] Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165-393.
- [9] R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310.
- [10] R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *Chem. Commun.* **1993**, 1869-1872.
- [11] J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, J. P. Praly, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolot, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2515-2521.
- [12] P. Niederhafner, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 2-43.
- [13] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710-713.
- [14] Y. M. Chabre, R. Roy, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1237-1285.
- [15] N. Jayaraman, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3463-3483.
- [16] M. A. Kostianinen, J. G. Hardy, D. K. Smith, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2556-2559.
- [17] G. M. Pavan, A. Danani, S. Pricl, D. K. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9686-9694.
- [18] S. Jones, G. M. Pavan, A. Danani, S. Pricl, D. K. Smith, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4519-4532.
- [19] A. Joshi, D. Vance, P. Rai, A. Thiyagarajan, R. S. Kane, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7738-7747.
- [20] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [21] D. Page, R. Roy, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714-723.
- [22] E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820-8826.
- [23] P. M. Levine, T. P. Carberry, J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 493-509.
- [24] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789-3800.
- [25] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111.
- [26] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368.
- [27] K. Wu, J. Liu, R. N. Johnson, J. Yang, J. Kopeček, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1451-1455.
- [28] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.
- [29] G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.
- [30] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.
- [31] C. C. Lee, E. R. Gillies, M. E. Fox, S. J. Guillaudeu, J. M. J. Fréchet, E. E. Dy, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16649-16654.

- 
- [32] I. Deguise, D. Lagnoux, R. Roy, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321-1331.
- [33] T. R. Branson, W. B. Turnbull, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4613-4622.
- [34] M. Blanzat, C. O. Turrin, A. M. Aubertin, C. Couturier-Vidal, A. M. Caminade, J. P. Majoral, I. Rico-Lattes, A. Lattes, *ChemBioChem.* **2005**, *6*, 2207-2213.
- [35] J. M. Harouse, S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, F. Gonzalez-Scarano, *Science* **1991**, *253*, 320-323.
- [36] J. Fantini, D. Hammache, O. Delezay, N. Yahy, C. Andre-Barres, I. Rico-Lattes, A. Lattes, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7245-7252.
- [37] C. R. Bertozzi, D. G. Cook, W. R. Kobertz, F. Gonzales-Scarano, M. D. Bernardski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10639-10641.
- [38] I. Rico-Lattes, J. C. Garrigues, E. Perez, C. André-Barrès, C. Madelaine-Dupuich, A. Lattes, M. D. Linas, A. M. Aubertin, *New J. Chem.* **1995**, *19*, 341-344.
- [39] A.-M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.-O. Turrin, J.-P. Majoral, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3890-3899.
- [40] W. B. Turbull, J. F. Stoddart, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 231-255.
- [41] P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 556-587.
- [42] P. Niederhafner, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 44-65.
- [43] R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310.
- [44] G. Thoma, M. B. Streiff, A. G. Katopodis, R. O. Duthaler, N. H. Voelcker, C. Ehrhardt, C. Masson, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 99-117.
- [45] D. Astruc, E. Boisselier, C. Ornelas, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857-1959.
- [46] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- [47] J. J. Garcia-Vallejo, N. Koning, M. Ambrosini, H. Kalay, I. Vuist, R. Sarrami-Forooshani, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Int. Immun.* **2013**, *25*, 221-234.
- [48] T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, Y. van Kooyk, *Cell* **2000**, *100*, 587-597.
- [49] D. McDonald, L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, T. J. Hope, *Science* **2003**, *300*, 1295-1297.
- [50] L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 367-371.
- [51] S.-K. Wang, P.-H. Liang, R. D. Astronomo, T.-L. Hsu, S.-L. Hsieh, D. R. Burton, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3690-3695.
- [52] N. V. Bovin, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 431-446.
- [53] J. J. Landers, Z. Y. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki, J. R. Baker, *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222-1230.
- [54] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622-10650.
-



- 
- [55] P. Zhao, N. Li, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 638-665.
- [56] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, C. J. O'Connor, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893-3946.
- [57] K. P. Rice, A. E. Saunders, M. P. Stoykovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6669-6676.
- [58] S. E. Lohse, C. J. Murphy, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1250-1261.
- [59] B.-S. Choi, Y. W. Lee, S. W. Kang, J. W. Hong, J. Kim, I. Park, S. W. Han, *Nano* **2012**, *6*, 5659-5667.
- [60] T. Shimizu, T. Teranishi, S. Hasegawa, M. Miyake, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 2719-2724.
- [61] T. K. Sau, C. J. Murphy, *Langmuir* **2004**, *20*, 6414-6420.
- [62] J. Zhang, M. R. Langille, M. L. Personick, K. Zhang, S. Li, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14012-14014.
- [63] W. Niu, S. Zheng, D. Wang, X. Liu, H. Li, S. Han, J. Chen, Z. Tang, G. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 697-703.
- [64] T. Ming, W. Feng, Q. Tang, F. Wang, L. Sun, J. Wang, C. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16350-16351.
- [65] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
- [66] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.
- [67] N. Zheng, J. Fan, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6550-6551.
- [68] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042-6108.
- [69] J. J. Storhoff, A. Lazarides, R. Mucic, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640-4650.
- [70] P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [71] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62-69.
- [72] U. Jeong, X. W. Teng, Y. Wang, H. Yang, Y. N. Xia, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 33-60.
- [73] C. D. Donega, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1512-1546.
- [74] A. C. Templeton, M. J. Hostetler, C. T. Kraft, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1906-1911.
- [75] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739-2779.
- [76] S. Perumal, A. Hofmann, N. Scholz, E. Rühl, C. Graf, *Langmuir* **2011**, *27*, 4456-4464.
- [77] G. Schneider, G. Decher, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1833-1839.
- [78] C. K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z.-J. Zhu, S. Menichetti, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1360-1361.
- [79] J. D. Gibson, B. P. Khanal, E. R. Zubarev, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11653-11661.
- [80] E. Oh, K. Susumu, J. B. Blanco-Canosa, I. L. Medintz, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *Small* **2010**, *6*, 1273-1278.
- [81] R. Ojeda, J. L. de Paz, A. G. Barrientos, M. Martín-Lomas, S. Penadés, *Carb. Res.* **2007**, *342*, 448-459.
- [82] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656-2672.
- [83] O. Martínez-Ávila, K. Hijazi, M. Marradi, C. Clavel, C. Campion, C. Kelly, S. Penadés, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9874-9888.
- [84] O. Martínez-Ávila, L. M. Bedoya, M. Marradi, C. Clavel, J. Alcamí, S. Penadés, *ChemBioChem.* **2009**, *10*, 1806-1809.
- [85] S. Raha, T. Paunesku, G. Woloschak, *Nanomed. Nanobiotechnol.* **2011**, *3*, 269-281.
-

- 
- [86] Y.-J. Li, A. L. Perkins, Y. Su, Y. Ma, L. Colson, D. A. Horne, Y. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4092-4097.
- [87] S. P. Jackson, D. Durocher, *Mol. Cell* **2013**, *49*, 795-807.
- [88] M. H. Tatham, M.-C. Geoffroy, L. Shen, A. Plechanovova, N. Hattersley, E. G. Jaffray, J. J. Palvimo, R. T. Hay, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 538-546.
- [89] A. S. Arbab, L. B. Wilson, P. Ashari, E. K. Jordan, B. K. Lewis, J. A. Frank, *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 383-389.
- [90] G. Huang, C. Zhang, S. Li, C. Khemtong, S.-G. Yang, R. Tian, J. D. Minna, K. C. Brown, J. Gao, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6367-6372.
- [91] H. Guan, M. J. McGuire, S. Li, K. C. Brown, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1813-1821.
- [92] A. N. Elayadi, K. N. Samli, L. Prudkin, Y.-H. Liu, A. Bian, X.-J. Xie, I. I. Wistuba, J. A. Roth, M. J. McGuire, K. C. Brown, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5889-5895.
- [93] A. Laromaine, L. Koh, M. Murugesan, R. V. Ulijn, M. M. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4156-4157.
- [94] R. de laRica, R. M. Fratila, A. Szarpak, J. Huskens, A. H. Velders, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 5704-5707.
- [95] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959-1964.
- [96] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Högemann, R. Weissleder, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*, 816-820.
- [97] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547-1562.
- [98] C. M. Niemeyer, *Science* **2002**, *297*, 62-63.
- [99] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607-609.
- [100] J.-W. Kim, J.-H. Kim, R. Deaton, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 9185-9190.
- [101] Y. Wen, L. Chen, W. Wang, L. Xu, H. Du, Z. Zhang, X. Zhang, Y. Song, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3963-3965.
- [102] M. G. Ryadnov, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9388-9394.
- [103] M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, R. Langer, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 915-918.
- [104] D. Aili, K. Enander, J. Rydberg, I. Nesterenko, F. Björefors, L. Baltzer, B. Liedberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5780-5788.
- [105] D. Aili, P. Gryko, B. Sepulveda, J. A. G. Dick, N. Kirby, R. Heenan, L. Baltzer, B. Liedberg, M. P. Ryan, M. M. Stevens, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5564-5573.
- [106] O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1979**, 297-326.
- [107] L. Röglin, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3881-3887.
- [108] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [109] Y. J. Lu, B. Weers, N. C. Stellwagen, *Biopolymers* **2001**, *61*, 261-275.
- [110] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645-650.
-

- 
- [111] J. T. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 668-698.
- [112] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856-1876.
- [113] J. H. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631-633.
- [114] C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.
- [115] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487-491.
- [116] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [117] F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5789-5801.
- [118] D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu, H. Yan, *Science* **2011**, *332*, 342-346.
- [119] J. D'Onofrio, L. Petraccone, L. Martino, G. Fabio, A. Iadonisi, J. Balzarini, C. Giancola, D. Montesarchio, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 607-616.
- [120] J. C. Chaput, C. Switzer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10614-10619.
- [121] B. A. Rosenzweig, N. T. Ross, D. M. Tagore, J. Jayawickramarajah, I. Saraogi, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5020-5021.
- [122] D. Thompson, M. B. Pepys, S. P. Wood, *Structure* **1999**, *7*, 169-177.
- [123] M. Matsui, Y. Ebara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6139-6143.
- [124] N. Spinelli, E. Defrancq, F. Morvan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4557-4573.
- [125] C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Dervede, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770-775.
- [126] K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 357-358.
- [127] K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359.
- [128] K. Gorska, K.-T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695-7700.
- [129] E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nature Commun.* **2012**, *3*, 614.
- [130] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, *Cell Tissue Res.* **2010**, *339*, 269-280.
- [131] L. Auzzas, F. Zanardi, L. Battistini, P. Burreddu, P. Carta, G. Rassu, C. Curti, G. Casiraghi, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1255-1299.
- [132] B. Felding-Habermann, D. A. Cheresch, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 864-868.
- [133] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146-4150.
- [134] T. Pawson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 432-437.
- [135] Z. Songyang, S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, B. G. Neel, R. B. Birge, J. E. Fajardo, M. M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, L. C. Cantley, *Cell* **1993**, *72*, 767-778.
- [136] S. R. Hubbard, J. H. Till, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373-398.
- [137] M. Turner, E. Schweighoffer, F. Colucci, J. P. Di Santo, V. L. Tybulewicz, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 148-154.
- [138] S. Rinker, Y. Ke, Y. Liu, R. Chhabra, H. Yan, *Nature Nanotech.* **2008**, *3*, 418-422.
- [139] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
-

- 
- [140] N. J. Royle, D. M. Irwin, M. L. Koschinsky, R. T. MacGillivray, J. L. Hamerton, *Somat. Cell Mol. Genet.* **1987**, *13*, 285-292.
- [141] J. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry* (6. Edition), W. H. Freeman, San Francisco, **2006**.
- [142] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [143] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-778.
- [144] F. Waygand, U. Ragnarsson, *Naturforschg.* **1966**, *21b*, 1141-1144.
- [145] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [146] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 205-211.
- [147] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 251-256.
- [148] E. Wolf, P. S. Kim, B. Berger, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1179-1189.
- [149] J. Liu, Q. Zheng, Y. Deng, C.-S. Cheng, N. R. Kallenbach, M. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15457-15462.
- [150] W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science.* **1988**, *240*, 1759-1764.
- [151] A. Lupas, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 375-382.
- [152] J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 170-176.
- [153] S. Y. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13253-13261.
- [154] F. C. H. Crick, *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 689-697.
- [155] D. N. Woolfson, *Adv. Prot. Sci.* **2005**, *70*, 79-112.
- [156] T. J. Graddis, D. G. Myszyka, I. M. Chaiken, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12664-12671.
- [157] L. Szilák, J. Moitra, C. Vinson, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1273-1283.
- [158] W. Lianga, H. M. Warrick, J. A. Spudich, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 1039-1048.
- [159] C.S. Farah, F.C. Reinach, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10543-10551.
- [160] Z. Zhang, J. Liu, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7737-7740.
- [161] R. Zhang, D. Scott, M. Westbrook, S. Nance, B. Spangler, G. Shipley, E. Westbrook, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 563-573.
- [162] E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958-1965.
- [163] M. Galibert, L. Sancey, O. Renaudet, J.-L. Coll, P. Dumy, D. Boturyn, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5133-5138.
- [164] K. Sadler, J. P. Tam, *J. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- [165] L. Crespo, G. Sanclimens, M. Pons, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1663-1681.
- [166] P. Niederhafner, J. Sebestik and J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 757-788.
- [167] P. Sommer, V. S. Fluxa, T. Darbre, J. L. Reymond, *ChemBioChem.* **2009**, *10*, 1527-1536.
- [168] J.-L. Reymond, M. Bergmann, T. Darbre, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4814-4822.
- [169] N. Gilboa-Garber, *Methods Enzymol.* **1982**, *83*, 378-385.
- [170] A. Imberty, M. Wimmerova, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 222-229.
- [171] A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686-687.
-

- 
- [172] K. Totani, T. Kubota, T. Kuroda, T. Murata, K. I.-P. J. Hidari, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, H. Ashida, K. Yamamoto, T. Usui, *Glycobiology* **2003**, *13*, 315-326.
- [173] Y. Suzuki, *Prog. Lipid Res.* **1994**, *33*, 429-457.
- [174] Y. Suzuki, T. Ito, T. Suzuki, R. E. Jr. Holland, T. M. Chambers, M. Kiso, H. Ishida, Y. Kawaoka, *J. Virol.* **2000**, *74*, 11825-11831.
- [175] B. D. Polizzotti, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 483-490.
- [176] J. H. Collier, J. S. Rudra, J. Z. Gasiorowski, J. P. Jung, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3413-3424.
- [177] J. S. Rudra, Y. F. Tian, J. P. Jung, J. H. Collier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 622-627.
- [178] K. M. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's Immunobiology* (7.Edition), Garland Science, New York, **2007**.
- [179] S. Debaisieux, F. Rayne, H. Yezid, B. Beaumelle, *Traffic* **2012**, *13*, 355-363.
- [180] Y.-b. Lim, E. Lee, M. Lee, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 3475-3478.
- [181] N. Sharma, A. Top, K. L. Kiick, D. J. Pochan, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7078-7082.
- [182] S. Lui, K. L. Kiick, *Macromolecules* **2008**, *41*, 764-772.
- [183] S. Lui, K. L. Kiick, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1513-1522.
- [184] J. J. Grailer, M. Kodera, D. A. Steeber, *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *56*, 141-147.
- [185] T. H. Rainer, *Resuscitation* **2002**, *52*, 127-141.
- [186] D. M. Smalley, K. Ley, *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 255-266.
- [187] P. Michaely, D. R. Tomchick, M. Machius, R. G.W. Anderson, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6387-6396.
- [188] G. L. Blatch, M. Lässle, *BioEssays* **1999**, *21*, 932-939.
- [189] A. H. Huber, W. J. Nelson, W. I. Weis, *Cell* **1997**, *90*, 871-882.
- [190] M. A. Andrade, C. Perez-Iratxeta, C. P. Ponting, *J. Struct. Biol.* **2001**, *134*, 117-131.
- [191] J. J. Hollenbeck, D. J. Danner, R. M. Landgren, T. K. Rainbolt, D. S. Roberts, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1996-2002.
- [192] A. V. Terskikh, J.-M. Le Doussal, R. Crameri, I. Fisch, J.-P. Mach, A. V. Kajava, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1663-1668.
- [193] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7454-7455.
- [194] H. M. Said, *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 179-180.
- [195] S. C. Wagner, M. Roskamp, H. Cölfen, C. Böttcher, S. Schlecht, B. Koksich, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 46-51.
- [196] E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 950-959.
- [197] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie* (5. Auflage), Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [198] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Meth. Cell Biol.* **2008**, *84*, 79-113.
- [199] W. B. Turnbull, A. H. Daranas, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859-14866.
- [200] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131-137.
- [201] H. F. Fisher, N. Singh, *Methods Enzymol.* **1995**, *259*, 194-221.
- [202] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-429.
- [203] L. Reimer, *Transmission Electron microscopy* (2nd Edition), Springer-Verlag, Berlin, **1989**.
-

- 
- [204] D. Williams, *Transmission Electron Microscopy*, Springer-Verlag, Berlin, **2005**.
- [205] J. Buckingham, *Brit. J. Appl. Phys.* **1965**, *16*, 1821.
- [206] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski, U. Dahmen, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 096101.
- [207] J. R. Harris, D. Bhella, M. Adrian, *Microscopy and Analysis* **2006**, 17-21.
- [208] R. Henderson, *Q. Rev. Biophys.* **2004**, *37*, 3-13.
- [209] R.A. Steinbrecht, K. Zierold, *Kryotechniques in biological electron microscopy*, Springer-Verlag, Berlin, **1987**.
- [210] K. Nakanishi, N. Berova, R. Woody, *Circular dichroism: principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **1994**.
- [211] W. C. Johnson Jr., *Proteins* **1990**, *7*, 205-214.
- [212] G. D. Fasman, *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York, **1996**.
- [213] B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Dover Publications, New York, **2000**.
- [214] R. Pecora, *J. Nano. Res.* **2000**, *2*, 123-131.
- [215] W. I. Goldberg, *Am. J. Phys.* **1999**, *67*, 1152-1160.
- [216] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (7. Auflage)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [217] A. N. Shipway, E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem.* **2000**, *1*, 18-52.
- [218] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668-677.
- [219] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215-4221.
- [220] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, Q. Huo, *Coll. Surf. B* **2007**, *58*, 3-7.
- [221] N. Zheng, J. Fan, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6550-6551.
- [222] K. L. Morrison, G. A. Weiss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302-307.
- [223] C. N. Pace, J. M. Scholtz, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 422-427.
- [224] P. B. Harbury, P. S. Kim, T. Alber, *Nature* **1994**, *371*, 80-83.
- [225] S. C. Wagner, M. Roskamp, M. Pallerla, R. R. Araghi, S. Schlecht, B. Kocsch, *Small* **2010**, *6*, 1321-1328.
- [226] D. Nykpanchuk, M. M. Maye, D. van der Lelie, O. Gang, *Nature* **2008**, *451*, 549-552.
- [227] M. Salwiczek, S. Samsonov, T. Vagt, E. Nyakatura, E. Fleige, H. Cölfen, M. T. Pisabarro, B. Kocsch, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7628-7636.
- [228] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1991**, *254*, 539-544.