

**Synthese von  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure-Matrizen  
zur Herstellung von Implantatmaterialien  
für das Tissue Engineering**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**- Dr. rer. nat. -**

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Silke Berski

geboren am 05.04.1980 in Hannover

**2008**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2005 bis Juni 2008 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Hierdurch erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 23.06.2008

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. M. Boysen

Tag der Promotion: 16.06.2008

# Zusammenfassung

## Synthese von $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure-Matrizen zur Herstellung von Implantatmaterialien für das Tissue Engineering

Schlagwörter: Polysialinsäure - Hydrogel - Biomaterial

Eines der größten Probleme bei dem Verlust von Gewebe und Organen nach einer Erkrankung oder einem Unfall ist die begrenzte Verfügbarkeit von geeigneten Spenderorganen. Das interdisziplinäre Forschungsfeld Tissue Engineering konzentriert sich daher darauf, künstliche Organe und Gewebe herzustellen, die dann in den Patienten implantiert werden können und so zur Wiederherstellung der natürlichen Körperfunktionen beitragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von Matrizen basierend auf  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure. Gleichzeitig sollte die enzymatische Abbaubarkeit dieser Derivate gegenüber der Endosialidase EndoNF\* untersucht werden.

Die Herstellung dreidimensionaler Polysialinsäure-Hydrogele gelang mit dem Quervernetzer Diepoxyoktan in wässriger Lösung unter basischen Bedingungen und Zusatz von Natriumdodecylsulfat als Löslichkeitsvermittler. Auf diese Weise konnten Gele mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Stärke von 5 mm erhalten werden. Nach weiterer Optimierung waren diese Gele in Abhängigkeit von ihrem Diepoxyoktan-Gehalt zwischen 2 und 11 Tagen enzymatisch abbaubar. Die Analytik der Hydrogele, die nach 11 Tagen abgebaut wurden, zeigte einen Quervernetzungsgrad von 9%. Auf den zytokompatiblen Hydrogelen, deren Oberfläche durch adsorptive Wechselwirkung mit Proteinen modifiziert wurde, konnte eine Adhäsion und neuronale Differenzierung von PC12 Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten primäre Neuronen eine hohe Viabilität auf diesen Materialien. Polysialinsäure-Hydrogele weisen damit ein großes Potential für die Anwendung in der Nervenregeneration auf.

Eine Funktionalisierung der linearen Polysialinsäure-Kette zur anschließenden Verarbeitung in ein dreidimensionales Gerüstmaterial wurde durch die Einführung verschiedener *N*-Acyl-Substituenten an C-5 erzielt. Die schwache Reaktivität des Polymers, die durch geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln verursacht wurde, konnte durch Verwendung des Tetrabutylammonium-Salzes der  $\gamma$ -Polyaminosäure überwunden werden. Eine Reihe funktioneller Gruppen konnten so in einem variablen Derivatisierungsgrad eingeführt werden. Mit dieser Methode lässt sich auch die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse kontrolliert einstellen und je nach Verwendungszweck anpassen. Ein Beispiel dafür ist *N*-Pent-4-enoyl-polysialinsäure, die in Derivatisierungsgraden von 98% über 43% auf 6% funktionalisiert wurde. Während das native Polymer innerhalb von 2 Stunden enzymatisch abgebaut wird, führte eine 6%ige Derivatisierung zu einer erwünschten, längeren Hydrolyse innerhalb von drei Tagen.

Desweiteren konnten C-1-Ester und nicht abbaubare C-1-Amide der Polysialinsäure hergestellt werden. Letztere erwiesen sich als zytokompatibel und adhäsiv.

## Abstract

### Synthesis of $\alpha$ -2,8-polysialic acid matrices as scaffold materials for tissue engineering

Key words: polysialic acid – hydrogel - biomaterial

A major problem following accidents resulting in functional loss of organs and tissue is the limited availability of biological substitutes. Therefore, the interdisciplinary research field tissue engineering focuses on the construction of artificial organs and tissue. These substitutes can be implanted in a patient to enhance functional recovery. The aim of this study was the synthesis of matrices based on  $\alpha$ -2,8-polysialic acid. Preservation of the degradability by the endosialidase endoNF\* was an important objective of this work.

The synthesis of three-dimensional polysialic acid hydrogels was achieved in aqueous solution under basic conditions in the presence of the detergent sodiumdodecyl sulfate. Materials were obtained with a diameter of 4 cm and a thickness of 5 mm. After optimisation these hydrogels were enzymatically degradable within 2 to 11 days depending on the amount of crosslinker. Chemical analysis of a hydrogel, which was degradable within 11 days, revealed a crosslinking degree of 9%. Cultivation of PC12 cells on materials preincubated in different protein mixtures showed an improved adhesion and differentiation. Primary neurons also exhibited high viability on these materials.

Functionalisation of the linear polysialic acid chain was achieved by introduction of artificial amide-groups. Poor reactivity caused by the low solubility of the polymer in organic solvents was overcome by use of the tetrabutyl ammonium form of the  $\gamma$ -polyamino acid of polysialic acid. Double bond functionalised derivatives were synthesized with a degree of derivatisation of 98%, 43% and 6%. The latter was hydrolysed by endoNF\* within three days whereas the native polymer is degraded within 2 hours.

Additionally, C-1-esters and non-degradable C-1-amides of polysialic acid were synthesised. The latter proved to be cytocompatible and adhesive.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1	Tissue Engineering	1
1.2	Eigenschaften der Gerüstmaterialien	2
1.3	Matrizen aus synthetischen und natürlichen Makromolekülen	3
1.4	Polysaccharide als Biomaterialien	5
1.4.1	Alginate	6
1.4.2	Chitosane	9
1.4.3	Hyaluronsäure	11
1.5	Polysialinsäure als potentielles Biomaterial	14
1.5.1	Eigenschaften und Funktion	14
1.5.2	Enzymatischer Abbau durch Endosialidasen	15
1.5.3	Polysialinsäure Biosynthese in <i>E. coli</i> K1	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Synthese eines dreidimensionalen Gerüstmaterials und enzymatische Abbaubarkeit	26
3.2	Analytik des hergestellten Hydrogels	29
3.3	Biologische Bewertung	34
3.4	Modifikation der linearen Polysialinsäure-Kette	43
3.4.1	C-1-Modifizierung der Polysialinsäure	43
3.4.2	Substitutionen der OH-Gruppen der Polysialinsäure	49
3.4.3	N-Derivatisierung der Polysialinsäure	56
3.4.4	Polymerisierungsgrad der N-Derivate	67
3.5	Enzymatische Abbaubarkeit der N-Derivate	69
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>90</b>
5.1	Allgemeines	90
5.2	Derivatisierungen der Sialinsäure	94
5.3	Quervernetzung von Polysialinsäure	98
5.4	Abbau der Hydrogele durch EndoNF*	100

5.5	Derivatisierungen der Polysialinsäure	101
5.5.1	Experimente zur C-1-Modifizierung	101
5.5.2	Experimente der OH-Substitutionen	107
5.5.3	Experimente zur N-Derivatisierung	112
5.6	Thiobarbitursäure-Assay	128
5.6.1	Enzymatischer Abbau der Polysialinsäure-Derivate und Analyse mittels Thiobarbitursäure-Assay	130
5.6.2	Auswertung der Daten	132
5.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	142
5.8	Alcianblau-Silberfärbung	143
5.9	Biologische Evaluierung der Hydrogele	145
5.9.1	Kultivierung von PC12 Zellen	145
5.9.2	Kryokonservierung von PC12 Zellen	146
5.9.3	Differenzierung von PC12 Zellen	147
5.9.4	Kultivierung von PC12 Zellen auf den Polysialinsäure-Hydrogelen	147
5.9.5	Immunzytochemie	148
5.9.6	Mikroskopische Betrachtung	149
5.9.7	Assay zur Adhäsionsquantifizierung	149
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>151</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
abs.	absolut
Ac	Acetyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq	Äquivalente
BCP	Bromkresolpurpur
Bn	Benzyl
BPB	Bromphenolblau
Bz	Benzoyl
CMP	Cytidinmonophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad (engl. degree of polymerisation )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazellulärmatrix
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoN	Endo- <i>N</i> -acetylneuraminidase, Endosialidase
ESI	Electrospray-Ionisation
Et	Ethyl
G	Guluronsäure
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
H <sub>ax</sub>	axiales H-Atom
H <sub>eq</sub>	äquatoriales H-Atom
HG	Hydrogel
J	Kopplungskonstante
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LM	Lösungsmittel
M	Mannuronsäure
m/z	Masse/Ladungsverhältnis

ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNAc-6-P	<i>N</i> -Acetylmannosamin-6-Phosphat
Me	Methyl
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. nerve growth factor)
OD	Optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
Ph	Phenyl
Pi	Orthophosphat
PLL	Poly-L-lysin
polySia	Polysialinsäure
PPi	Pyrophosphat
Pyr	Pyruvat
q	Quartett
R	Rest
RF	ratio of fronts
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Triplett
TB	Trypanblau
TBA	Tetrabutylammonium
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Ts	<i>p</i> -Toluolsulfonyl, Tosyl
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylglucosamin
V	Volumen
XC	Xylolcyanol
δ	chemische Verschiebung

# 1 Einleitung und Grundlagen

## 1.1 Tissue Engineering

Die Transplantation von Zellen, Gewebe oder Organen ist eine medizinische Therapie um das Leben eines Patienten nach einem Unfall oder einer Erkrankung zu erleichtern oder sogar zu retten.<sup>1</sup> Diese Transplantate können zum einen autogenen Ursprungs sein, wie z.B. bei Verpflanzungen von Hautpartien, und zum anderen von Spendern der gleichen Spezies stammen, z.B. bei Gewebetransplantationen (Nerven, Sehnen und Knochen) oder Organverpflanzungen (Niere oder Leber). Die medizinischen Möglichkeiten bei der zuletzt genannten allogenen Transplantation sind zwar weit entwickelt, können aber durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderorganen nur sehr begrenzt zur Heilung eines Patienten eingesetzt werden. Bereits seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts gibt es daher Bemühungen künstliches Gewebe herzustellen und dieses anschließend zu implantieren. Erstmals gelang es 1934 Bisceglie Zellen auf einer Polymermembran *in vitro* zu kultivieren und dieses Implantat in die Bauchhöhle eines Meerschweins zu verpflanzen.<sup>2</sup> Die Zellen konnten ohne weiteren medizinischen Eingriff zwölf Tage auf der künstlichen Membran überleben, da sie mit Nährstoffen *in vivo* versorgt und Stoffwechselprodukte durch Diffusion durch die poröse Membran abgeführt werden konnten. Dieses Experiment stellt einen der ersten Versuche der Gewebezüchtung, des sogenannten Tissue Engineerings, dar. In den folgenden Jahrzehnten gewann das Tissue Engineering an immenser Bedeutung und stellt heute ein interdisziplinäres Forschungsfeld dar, in dem Biologen, Chemiker, Ingenieure und Mediziner zusammenarbeiten.

In den letzten Jahren wurden zwei Strategien entwickelt, um künstliche Organe im Labor zu synthetisieren. Die eine Möglichkeit besteht darin, passende Zellen aus dem spezifischen Gewebe des Patienten zu isolieren und zur Proliferation in Kultur zu nehmen. Die angereicherten und gereinigten Zellen können dann auf einer dreidimensionalen Polymermembran kultiviert werden, die die Extrazellulärmatrix des entsprechenden Gewebes oder Organs nachahmt. Nach dieser *in vitro* Herstellung des biologischen Ersatzes kann die Implantation in den Patienten erfolgen (Abbildung 1).<sup>3</sup> Im zweiten Ansatz wird die Polymermembran direkt in die verletzte Region eingesetzt und Zellen des umgebenden

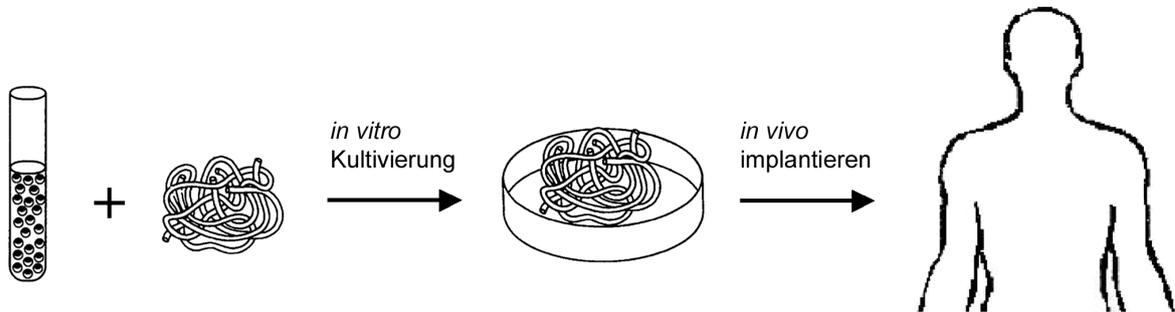
---

<sup>1</sup> Y. Tabata, in *Scaffolding in Tissue Engineering* (Hrs.: J. H. Elisseeff und P. X. Ma), CRS Press Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, **2006**, 45-60.

<sup>2</sup> V. Bisceglie, *J Cancer Res Clin*, **1934**, *40*, 141-158.

<sup>3</sup> R. Langer und J. P. Vacanti, *Science*, **1993**, *260*, 920-926.

Gewebe können *in vivo* in das polymere Gerüstmaterial wandern, dort proliferieren, differenzieren und zur Regeneration des Gewebes oder Organs führen.<sup>4</sup>



**Abbildung 1:** *In vitro* Strategie zur Wiederherstellung von Gewebe und Organen, bei der Zellen (Osteoblasten, Chondrozyten, Hepatozyten, Enterozyten, Urotheliale Zellen) auf einem geeigneten Gerüstmaterial kultiviert werden, um dann als Ersatz für Knochen, Knorpel, Leber, Darm oder Harnleiter zu dienen.

## 1.2 Eigenschaften der Gerüstmaterialien

Gesundes Gewebe besitzt eine komplexe dreidimensionale Struktur und Architektur, die wichtig für die mechanischen Eigenschaften und Funktionalität ist. Das künstliche Gerüstmaterial, auf dem die Zellen proliferieren und differenzieren, sollte daher die natürlichen Prozesse im Körper unterstützen und die Extrazellulärmatrix (ECM) des entsprechenden Gewebes imitieren. Die natürliche ECM stellt ein dichtes Protein-Netzwerk dar, das zwischen den Zellen liegt und von den Zellen selbst hergestellt wird. Die Proteine der ECM kontrollieren die dreidimensionale Organisation der Zellen im Gewebe, das Wachstum, die Wanderung sowie Form und Differenzierung dieser Zellen.<sup>5</sup>

Entscheidend ist, dass das künstliche Gerüstmaterial eine Vielzahl von Anforderungen erfüllt, um biologisch und funktionell aktiv zu sein. Die wichtigsten Punkte sind:

1. Die dreidimensionale Matrix sollte biokompatibel sein und das Zellwachstum fördern.
2. Das Gerüstmaterial sollte die Diffusion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen den Zellen und ihrer Umgebung erlauben.

---

<sup>4</sup> I. V. Yannas, *ChemBioChem*, **2004**, 5, 26-39.

<sup>5</sup> G. Plopper, in *Cells* (Hrs.: B. Lewin, L. Cassimeris, V. R. Lingappa und G. Plopper), Jones and Barlett Publishers, Boston, **2006**, 646.

3. Die Substanzen sollten abbaubar sein, um eine gleichzeitige Neubildung von Komponenten der Extrazellulärmatrix zu ermöglichen und das Wachstum von neuem Gewebe nicht zu behindern. Die Abbauprodukte dieses Materials sollten nicht toxisch sein.<sup>6</sup>

Der unter Punkt 1 genannte Begriff der Biokompatibilität wurde 1987 von Williams definiert und beinhaltet die Fähigkeit eines Materials je nach spezifischer Anwendung eine angemessene Reaktion des Trägers hervorzurufen.<sup>7</sup> Angemessene Reaktionen des Körpers sind z.B. das Verhindern von Blutgerinnung, Widerstand gegen Bakterienbesiedlung und normale Heilung ohne Komplikationen.<sup>8</sup> Anwendung finden Materialien u.a. als Hämodialyse-Membranen, Harnweg-Katheter oder Hüftgelenkprothesen.

### 1.3 Matrizen aus synthetischen und natürlichen Makromolekülen

Gerüstmaterialien können sowohl aus synthetischen als auch natürlichen Polymeren hergestellt werden. Beispiele für synthetische Polymere sind z. B. die Polyester Polymilchsäure, Polyglykolsäure und ein Copolymer, das aus beiden Materialien besteht. Anwendungen finden diese in der Regeneration von Knorpeln und Knochen.<sup>9</sup> Sie besitzen hervorragende mechanische Eigenschaften und sind abbaubar, da ihre Esterbindungen hydrolytisch gespalten werden können. Von großem Nachteil ist allerdings, dass die freigesetzten Säurefunktionen eine Immunantwort im Körper hervorrufen.<sup>10</sup>

Ein weiteres synthetisches Material, das vor allem zur Regeneration von Nervengewebe verwendet wird, ist Silikon.<sup>11,12</sup> Silikone bestehen allgemein aus einem Si-O-Rückgrat, an das organische Reste über Si-C-Bindungen angehängt werden können. Bei dem dargestellten Herstellungsprozess (Abbildung 2) wird aus Dichlordimethylsilan (**1**) durch Hydrolyse das Siloxans **2** hergestellt. Neben den linearen Polymerketten, die selbst bei sehr großer

---

<sup>6</sup> S. Varghese und J. H. Elisseeff, *Adv Polym Sci*, **2006**, *203*, 95-144.

<sup>7</sup> A. Remes und D. F. Williams, *Biomaterials*, **1992**, *13*, 731-743.

<sup>8</sup> B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen und J. E. Lemons, in *Biomaterials Science* (Hrs.: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen und J. E. Lemons), Elsevier Academic Press, New York, London, **2004**, 1-9.

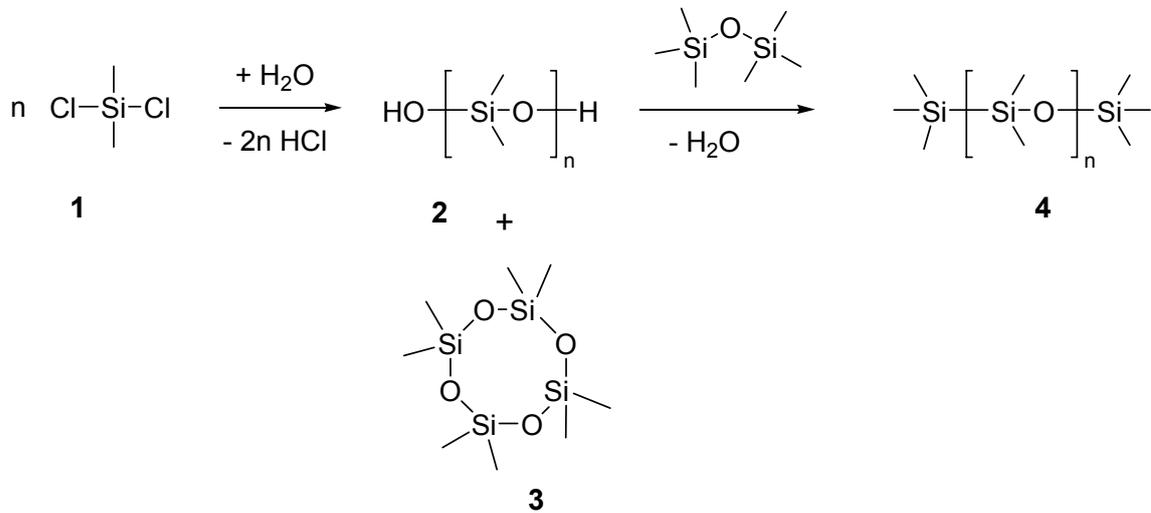
<sup>9</sup> J. P. Vacanti und R. Langer, *Lancet*, **1999**, *354 Suppl 1*, S132-34.

<sup>10</sup> O. Bostman, E. Hirvensalo, J. Makinen und P. Rokkanen, *J Bone Joint Surg Br*, **1990**, *72*, 592-596.

<sup>11</sup> C. A. Heath und G. E. Rutkowski, *Trends Biotechnol*, **1998**, *16*, 163-168.

<sup>12</sup> M. Timmer, S. Robben, F. Müller-Ostermeyer, G. Nikkhah und C. Grothe, *Cell Transplant*, **2003**, *12*, 265-277.

Kettenlänge Flüssigkeiten darstellen, entstehen auch cyclische Silikone, deren Ringe drei, vier oder fünf Si-O-Einheiten enthalten.<sup>13,14</sup>



**Abbildung 2:** Beispiel für die Polymerisation eines Silikons durch Chlorsilanhydrolyse. Es entstehen sowohl lineare als auch cyclische Silikone. Bei der Zugabe von  $\text{O}(\text{Si}(\text{CH}_3))_2$  werden die endständigen OH-Gruppen der linearen Kette blockiert. Auf diese Weise kann die Länge der Polymere gesteuert werden.

Durch weitere Kondensation unter Säure- oder Base-Katalyse können die cyclischen Silikone geöffnet werden und mit weiteren Ketten kondensieren. Der Anteil an cyclischen Silikonen hängt von der Säure-/Base-Konzentration, der Temperatur und dem Lösungsmittel ab. Diese Silikon-Polymere lassen sich leicht durch weitere Quervernetzung in Silikon-Elastomere überführen. Als funktionelle Gruppen können beispielsweise Vinylsilane während der Polymerisationsreaktion eingebaut werden, die dann durch organische Peroxide in Radikale überführt werden. Diese Radikale können sowohl  $\text{CH}_3$ -Reste aus den Si- $\text{CH}_3$ -Gruppen (Abbildung 2) als auch weitere Doppelbindungen der  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ -Si-Einheiten angreifen, so dass ein dreidimensionales Netzwerk aufgebaut wird. Aufgrund ihrer enormen Stabilität und Elastizität, einer geringen Oberflächenspannung und ihrer geringen Toxizität finden sie breite Anwendung im Tissue Engineering. Insbesondere in der Nervenregeneration sind Silikon-Elastomere seit langer Zeit die am häufigsten verwendeten Materialien. In diesem Bereich werden sie zu Silikonschläuchen von 1-2 mm Durchmesser verarbeitet.<sup>15</sup> Bei der Durchtrennung eines Nerven nach einem Unfall ist in vielen Fällen der

<sup>13</sup> A. Colas und J. Curtis, in *Biomaterials Science* (Hrs.: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen und J. E. Lemons), Elsevier Academic Press, New York, London, **2004**, 80-86.

<sup>14</sup> J. E. Puskas und Y. Chen, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1141-1154.

<sup>15</sup> L. A. Pfister, M. Papaloizos, H. P. Merkle und B. Gander, *J Peripher Nerv Syst*, **2007**, 12, 65-82.

Verlust von Nervengewebe so stark, dass die Nervenstümpfe nicht miteinander vernäht werden können. Silikonschläuche von mehreren Millimetern Länge können hier eingesetzt werden und beim Zusammenwachsen der beiden Nervenenden als Führungskanal dienen. Diese Nervenführungen werden mit Komponenten der Extrazellulärmatrix und/oder physiologisch oder genetisch modifizierten Schwann-Zellen besiedelt, die das Fortschreiten des Wachstums unterstützen.<sup>16,17</sup> Trotz der vielen Erfolge, die die Silikonmaterialien erzielt haben, und ihrem enormen Wert zur Untersuchung der komplexen Zusammenhänge bei der Nervenregeneration, besitzen sie den Nachteil, dass sie nicht abbaubar sind.

Als natürliche Polymere werden vor allem Komponenten der natürlichen Extrazellulärmatrix (ECM) verwendet. Eine Hauptkomponente der ECM stellt das Protein Kollagen dar, das sich in eine Vielzahl von unterschiedlichen äußeren Formen, wie Schwämmen, Schäumen, Fasern und Gelen verarbeiten lässt. Das Material kann daher in einem sehr breiten Anwendungsfeld, wie zur Regeneration von Haut, Leber, Knochen, Knorpeln und Blutgefäßen eingesetzt werden.<sup>6</sup>

Matrigel ist ein weiteres Material, das als dreidimensionales Gerüstmaterial in Silikonschläuchen zur Nervenregeneration verwendet wird.<sup>18</sup> Es wird durch Extraktion aus der Extrazellulärmatrix eines Tumors aus der Maus gewonnen. Seine Hauptkomponenten sind Kollagen IV, Laminin, Proteoglykane des Heparansulfats, Entactin und Nidogen. Bei 4 °C stellt es eine viskose Flüssigkeit dar, die bei physiologischen Temperaturen geliert.<sup>19,20</sup>

### 1.4 Polysaccharide als Biomaterialien

Eine der Klassen natürlicher Verbindungen, die in neuerer Zeit stark an Bedeutung gewonnen hat, ist die der Polysaccharide. Diese Verbindungen besitzen den großen Vorteil, dass sie und ihre Abbauprodukte atoxisch sind oder nur eine geringe Toxizität aufweisen. Darüber hinaus verfügen sie über eine Vielzahl chemischer Funktionen, die zur Einstellung der Löslichkeit, mechanischen Eigenschaften, Abbaubarkeit und biologischen Aktivität gezielt derivatisiert werden können. Eines ihrer wichtigsten Eigenschaften ist ihre generelle Fähigkeit Hydrogele auszubilden. Hydrogele sind dreidimensionale Netzwerke hydrophiler Polymere, die eine sehr große Menge an Wasser und biologischen Flüssigkeiten aufnehmen

---

<sup>16</sup> V. Guénard, N. Kleitman, T. K. Morrissey, R. P. Bunge und P. Aebischer, *J Neurosci*, **1992**, *12*, 3310-3320.

<sup>17</sup> K. Haastert, E. Lipokatic, M. Fischer, M. Timmer und C. Grothe, *Neurobiol Dis*, **2006**, *21*, 138-153.

<sup>18</sup> M. I. Hobson, C. J. Green und G. Terenghi, *J Anat*, **2000**, *197 Pt 4*, 591-605.

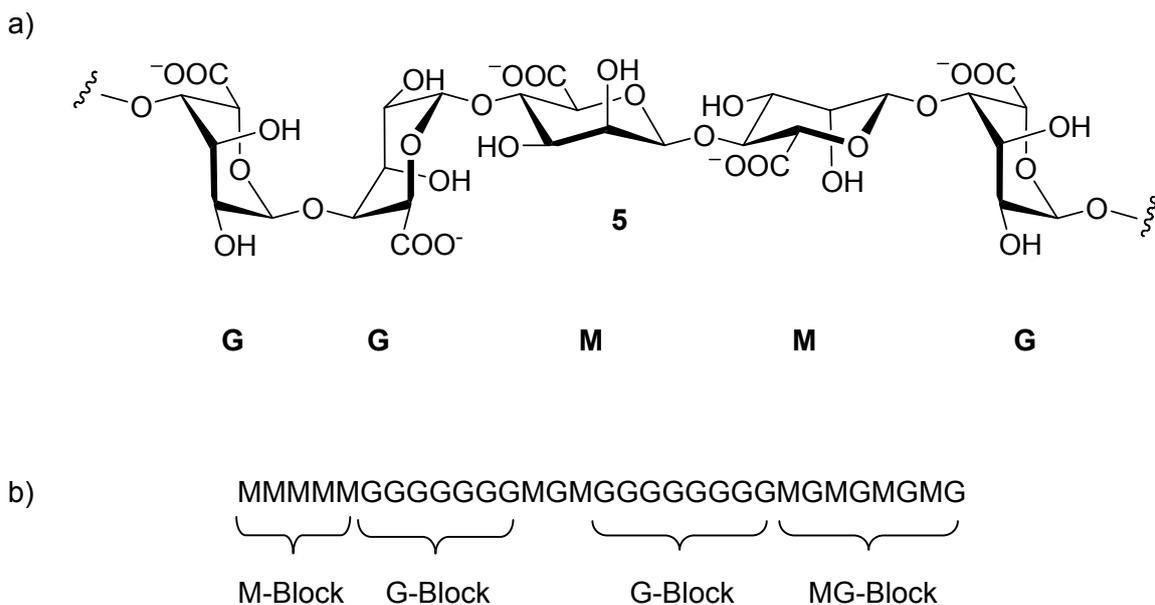
<sup>19</sup> D. J. Carey, M. S. Todd und C. M. Rafferty, *J Cell Biol*, **1986**, *102*, 2254-2263.

<sup>20</sup> H. K. Kleinman, M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie und G. R. Martin, *Biochemistry*, **1986**, *25*, 312-318.

können. Die Dreidimensionalität kann zum einen durch chemisches Quervernetzen (kovalent oder ionisch) und zum anderen durch physikalische Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen) erzeugt werden. Hier spielt der chemische Derivatisierungsgrad eine wichtige Rolle, da die Konsistenz und Elastizität des Hydrogels von der Dichte der Quervernetzung und von der weiteren chemischen Zusammensetzung abhängt. Diese künstlichen Hydrogele sind dem Gewebe von Säugetieren, welches hauptsächlich aus gelartigen Protein- und Polysaccharidnetzwerken aufgebaut ist, sehr ähnlich.<sup>6</sup> Polymere, aus denen Hydrogele hergestellt werden können, sind z. B. Alginat, Chitosan und Hyaluronsäure, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

### 1.4.1 Alginate

Alginat sind anionische Polysaccharide, die zum kommerziellen Gebrauch aus Braunalgen isoliert werden und aus 1,4-verknüpfter  $\beta$ -D-Mannuronsäure (M) und  $\alpha$ -L-Guluronsäure (G) bestehen (Abbildung 3).<sup>21</sup>



**Abbildung 3:** a) Alginatkette mit einer Abfolge von Guluronsäure (G) und Mannuronsäure (M).  
b) Schematische Darstellung einer Kettensequenz.

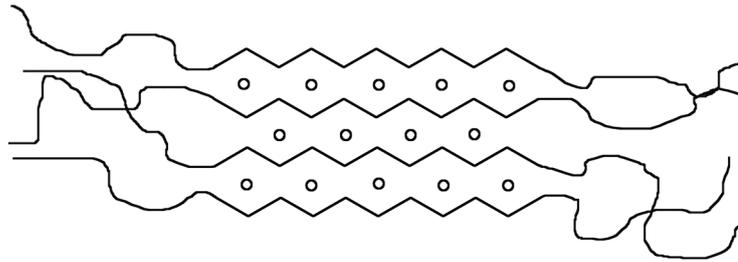
Die Sequenz der Monomere entlang der Polymerkette ist je nach bakterieller oder pflanzlicher Herkunft des Alginats unterschiedlich.<sup>22</sup> Durch diese Variation in der

<sup>21</sup> K. I. Draget, G. Skjak-Braek und O. Smidsrod, *Int J Biol Macromol*, **1997**, 21, 47-55.

<sup>22</sup> A. D. Augst, H. J. Kong und D. J. Mooney, *Macromol Biosci*, **2006**, 6, 623-633.

Zusammensetzung entstehen Verbindungen, die zwar zu einer Polymerfamilie gehören jedoch starke Unterschiede in der Gelierfähigkeit, den mechanischen Eigenschaften und anderen physikalischen Charakteristiken aufweisen.<sup>23</sup>

Unter physiologischen Bedingungen können Alginat in Anwesenheit geringer Konzentrationen an bivalenten Kationen, wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  Hydrogele ausbilden. Die Carboxylate des Polymergerüsts werden dabei von den Kationen komplexiert. Die Gelierfähigkeit des Polysaccharids wird hauptsächlich durch die Guluronsäure-(G)-Einheiten bestimmt. In Anwesenheit der Kationen können sich bei genügend hoher Zahl aufeinanderfolgender G-Monomere mehrere Polymerketten aneinanderlagern und auf molekularer Ebene Hohlräume ausbilden, in deren Mitte sich die Kationen befinden. Dieses Modell wird auch als „egg-box“-Modell (Abbildung 4) bezeichnet.<sup>24</sup> Die „egg-box“-Struktur erklärt auch die mechanische Stabilität der Gele: Je länger der Block aus G-Monomeren ist, desto stärker sind auch die ionischen Bindungen in den Hohlraumstrukturen und damit auch die mechanische Stärke des Hydrogels.<sup>25</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des „egg-box“-Modells. Mehrere Alginat-Polymerketten lagern sich zusammen und bilden Hohlräume, in deren Mitte sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen befinden.

Ein Nachteil dieser mit  $\text{Ca}^{2+}$  quervernetzten Alginat ist jedoch ihr unkontrollierter Abbau, da ihre Struktur durch Anionen wie Phosphat und Citrat aber auch durch  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aufgelöst wird. Der genaue Hydrolyseprozess lässt sich damit *in vivo* nicht vorhersagen.<sup>26</sup> Alginat werden daher z. B. durch Oxidation chemisch modifiziert, um ihre Hydrolyse zu verlangsamen, oder mit anderen Monomeren kovalent quervernetzt.<sup>27</sup>

---

<sup>23</sup> C. K. Kuo und P. X. Ma, *Biomaterials*, **2001**, 22, 511-521.

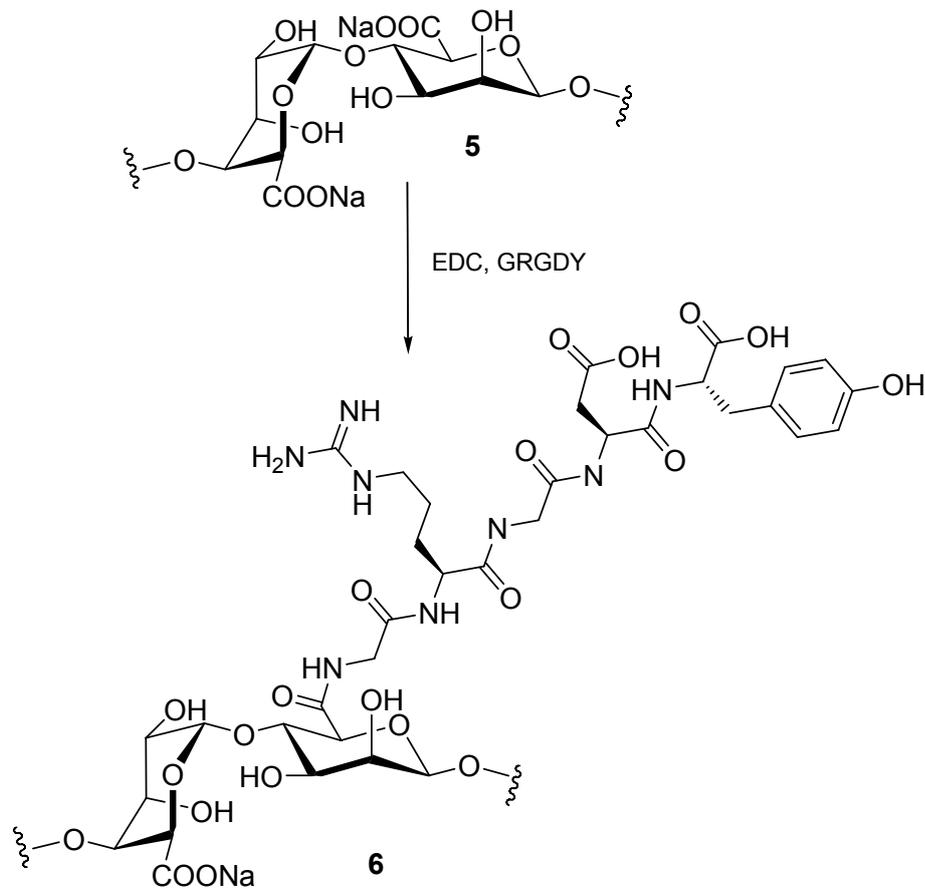
<sup>24</sup> G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith und D. Thom, *FEBS Letters*, **1973**, 32, 195-198.

<sup>25</sup> O. Smidsrod und G. Skjak-Braek, *Trends Biotechnol*, **1990**, 8, 71-78.

<sup>26</sup> T. Boonthekul, H. J. Kong und D. J. Mooney, *Biomaterials*, **2005**, 26, 2455-2465.

<sup>27</sup> J. L. Drury und D. J. Mooney, *Biomaterials*, **2003**, 24, 4337-4351.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Alginat-Hydrogelen sind die anti-adhäsiven Eigenschaften des Polymers. Ohne weitere Modifizierung sind nur wenige Zellen in der Lage auf der Oberfläche der Alginat-Hydrogele zu adhären.<sup>28</sup> Durch kovalente Bindung eines Zell-Adhäsionsliganden (Abbildung 5) bestehend aus den Aminosäure-Resten Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD-Sequenz) konnte die Adhäsion von skelettalen Myoblasten deutlich erhöht werden. Zusätzlich konnten Proliferation und frühe Differenzierung beobachtet werden.<sup>29</sup> Anwendung finden Alginate in der Wundheilung und als Gerüstsubstanz für das muskuloskeletale Tissue Engineering.<sup>30</sup>



**Abbildung 5:** Modifizierung des Alginats **5** mit einer Peptidsequenz GRGDY (Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Tyrosin).

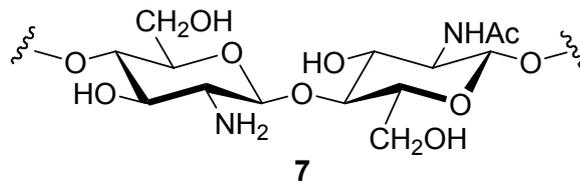
<sup>28</sup> K. Y. Lee und D. J. Mooney, *Chem Rev*, **2001**, *101*, 1869-1879.

<sup>29</sup> J. A. Rowley, G. Madlambayan und D. J. Mooney, *Biomaterials*, **1999**, *20*, 45-53.

<sup>30</sup> W. J. Marijnissen, G. J. van Osch, J. Aigner, S. W. van der Veen, A. P. Hollander, H. L. Verwoerd-Verhoef und J. A. Verhaar, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 1511-1517.

### 1.4.2 Chitosane

Ein weiteres Polysaccharid das im Tissue Engineering verwendet wird, ist Chitosan (Abbildung 6), das ein vollständig oder teilweise deacetyliertes Derivat des Chitins darstellt. Es besteht aus 1,4-verknüpftem D-Glucosamin sowie aus zufällig entlang der Kette verteilten *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten und ist unter alkalischen und neutralen Bedingungen unlöslich in Wasser. Bei niedrigeren pH-Werten ( $\sim$  pH 5) werden die  $\text{NH}_2$ -Gruppen protoniert und das Polymer kann durch die resultierende positive Ladung in Lösung gehen.<sup>31</sup>

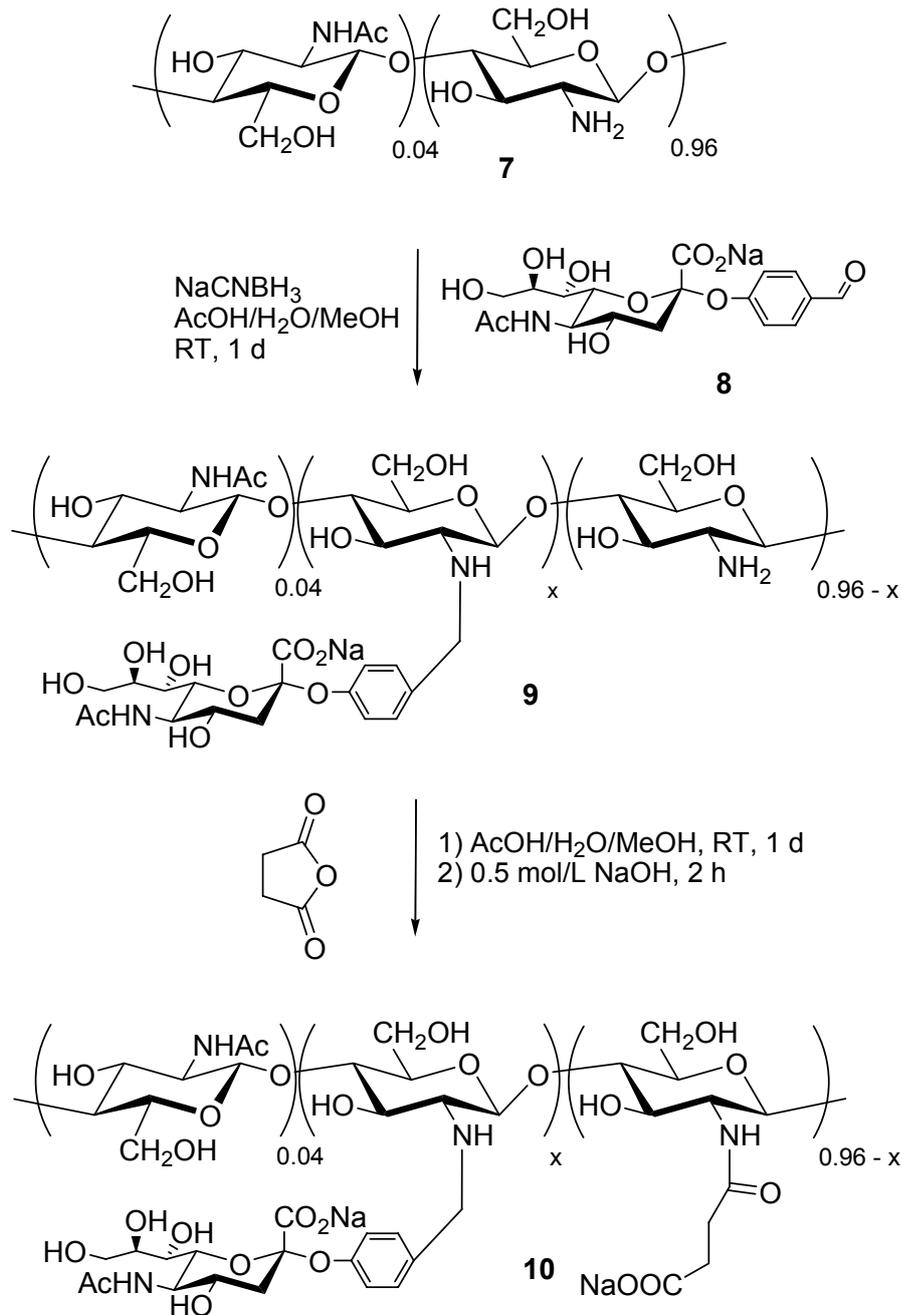


**Abbildung 6:** Struktur des Chitosans (7) bestehend aus 1,4-verknüpften D-Glucosamin-Einheiten.

Die Anzahl der freien, deacetylierten  $\text{NH}_2$ -Gruppen bestimmt damit auch die Löslichkeit des Polymers. Durch chemische Derivatisierung werden unter milden Reaktionsbedingungen Seitenketten an die Amino-Gruppen gebunden, die zu neuen biologischen Eigenschaften und veränderter Löslichkeit führen. So wurde das Polymer beispielsweise zur Herstellung eines potentiellen Inhibitors des Influenza Virus mit dem Sialinsäure-Monomeren modifiziert. Verwendet wurde dazu ein *p*-Formylphenyl- $\alpha$ -sialosid (8), das durch reduktive Aminierung an Chitosan (7) gebunden wurde. Durch *N*-Succinylierung wird eine weitere Carbonsäure eingeführt und das Derivat 10 wird wasserlöslich (Abbildung 7).<sup>32</sup>

<sup>31</sup> J. K. Suh und H. W. Matthew, *Biomaterials*, **2000**, 21, 2589-2598.

<sup>32</sup> I. Y. Kim, S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim und C. S. Cho, *Biotechnol Adv*, **2007**, 1-21.



**Abbildung 7:** Einführung des Sialinsäurerestes durch reduktive Aminierung und weitere Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid. Erst im letzten Schritt wird das Polymer wasserlöslich.

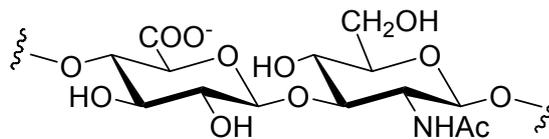
Enzymatisch hydrolysiert wird Chitosan *in vivo* primär durch Lysozyme. Auch die Bioabbaubarkeit des Chitosans kann hier mittels chemischer Modifizierung in hohem Maße kontrolliert werden.<sup>33</sup> Durch chemische Einstellung des Acetyl-Substitutionsgrades am Stickstoff zwischen 0.5% und 99.2% und Abbau dieser Derivate unter physiologischen

<sup>33</sup> a) K. Tomihata und Y. Ikada, *Biomaterials*, **1997**, *18*, 567-575. b) K. M. Varum, M. M. Myhr, R. J. Hjerde und O. Smidsrod, *Carbohydr Res*, **1997**, *299*, 99-101.

Bedingungen des pH-Wertes und der Enzymkonzentration konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Abbaugeschwindigkeit mit steigender Anzahl von Acetylresten zunimmt.<sup>34</sup> Das Enzym benötigt zur Bindung des Substrats eine Sequenz von sechs Saccharid-Einheiten, die mindestens drei bis vier acetylierte Glucosamine enthalten müssen.<sup>35</sup> Gering substituierte Verbindungen besitzen nur eine geringe Anzahl dieser notwendigen Einheiten. Der enzymatische Abbau wird damit gestört oder vollständig inhibiert.

### 1.4.3 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA, hyaluronic acid) besteht aus alternierenden Glucuronsäure- und *N*-Acetylglucosamin-Einheiten und gehört neben Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat, Heparansulfat und Heparin zu der Gruppe der Glycosaminglykane (GAG). GAG sind Polysaccharide, die allgemein aus wechselnden Einheiten einer Uronsäure und eines Aminozuckers bestehen und Bestandteile der natürlichen Extrazellulärmatrix sind. Ihre biologische Aktivität besteht in der Wechselwirkung mit ECM-Proteinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen.<sup>36</sup>



11

**Abbildung 8:** Struktur der Hyaluronsäure (11) bestehend aus Glucuronsäure und *N*-Acetylglucosamin.

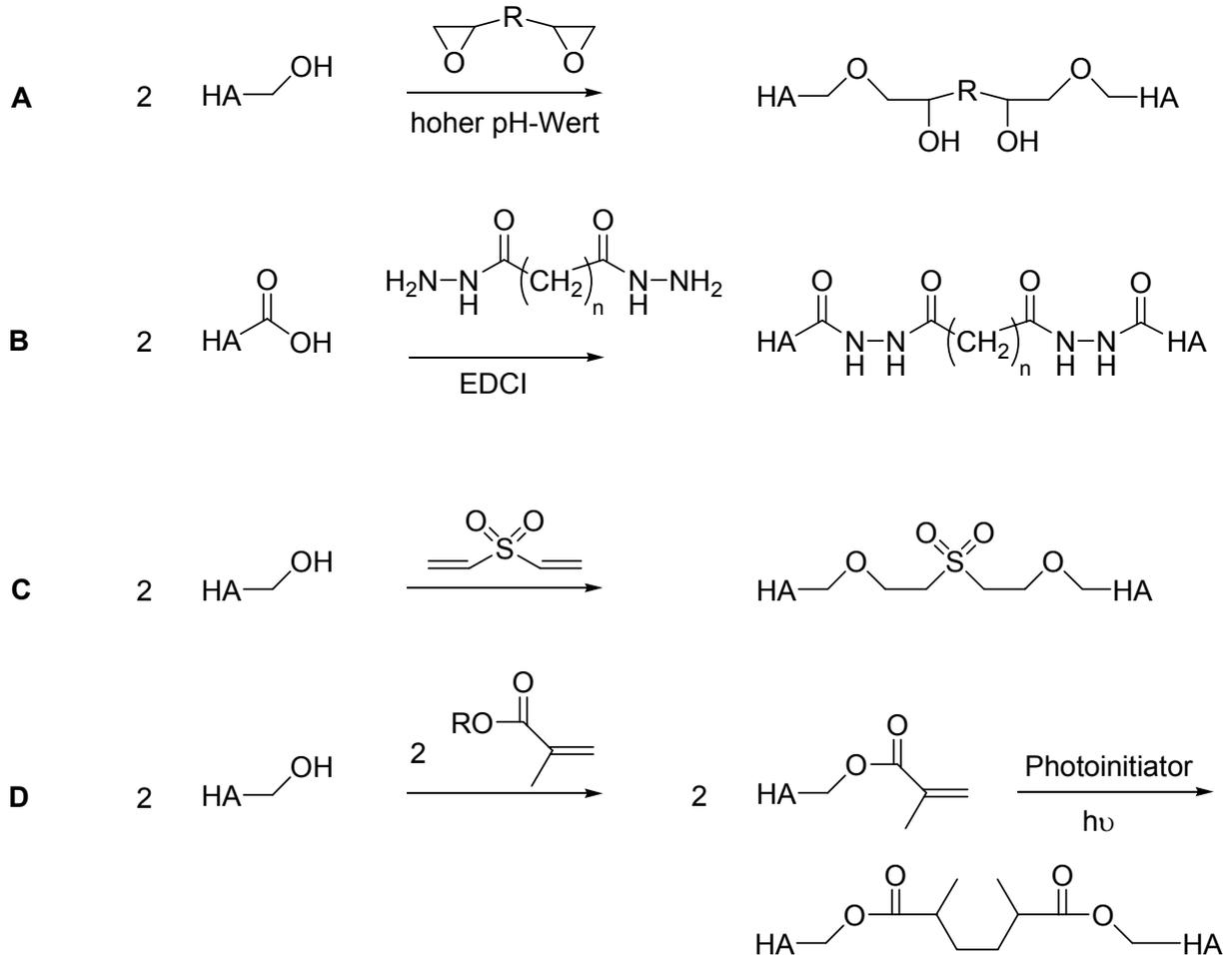
Durch die hohe negative Ladung ist das Polymer stark wasserlöslich, wird im Gewebe schnell resorbiert und besitzt somit nur eine geringe Verweilzeit. Zur Herstellung eines dreidimensionalen Netzwerkes muss das Polymer chemisch modifiziert werden. Dazu

<sup>34</sup> T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian und M. S. Shoichet, *Biomaterials*, **2005**, 26, 5872-5878.

<sup>35</sup> R. J. Nordtveit, K. M. Vårum und O. Smidsrød, *Carbohydr Polym*, **1994**, 23, 253-260.

<sup>36</sup> T. Ehrenfreund-Kleinman, J. Golenser und A. J. Domb, in *Scaffolding in tissue engineering* (Hrs.: J. H. Elisseeff und P. X. Ma), CRS Press, Taylor & Francis, **2006**, 27-44.

wurden verschiedene Quervernetzer, wie z.B. Diepoxide,<sup>37</sup> Dihydrazide,<sup>38</sup> Divinylsulfone<sup>39</sup> und Methacrylat mit nachfolgender UV-Aktivierung<sup>40</sup> verwendet.



**Abbildung 9:** Quervernetze Hyaluronsäure (HA). HA wurde in verschiedener Weise derivatisiert, z.B. durch A) Diepoxid-Quervernetzung, B) Dihydrazid-Vernetzung, C) Quervernetzung unter Verwendung eines Divinylsulfons und D) Einführung einer Methacrylat-Gruppe und Aktivierung durch Licht. Abgebildet sind jeweils nur die reaktiven Gruppen entlang der Kette.

<sup>37</sup> a) X. B. Zhao, J. E. Fraser, C. Alexander, C. Lockett und B. J. White, *J Mater Sci Mater Med*, **2002**, 13, 11-16. b) T. C. Laurent, K. Helsing und B. Gelotte, *Acta Chem Scand*, **1964**, 18, 274-275.

<sup>38</sup> P. Bulpitt und D. Aeschlimann, *J Biomed Mater Res*, **1999**, 47, 152-169.

<sup>39</sup> J. Baier Leach und C. E. Schmidt, in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (Hrs.: G. E. Wnek und G. L. Bowlin), Marcel Dekker, New York, **2004**, 779-789.

<sup>40</sup> J. Baier Leach, K. A. Bivens, C. W. Patrick, Jr. und C. E. Schmidt, *Biotechnol Bioeng*, **2003**, 82, 578-589.

Zur Veränderung der Löslichkeit und um den raschen Abbau herabzusetzen, wurden weitere Derivate, wie Ethylester und Benzylester der Hyaluronsäure mit unterschiedlichen Veresterungsgraden hergestellt. Dieser Grad der Derivatisierung hatte einen entscheidenden Einfluss auf die biologischen Eigenschaften der Materialien. Bei einer 50%igen Veresterung der Carboxylat-Gruppen mit Benzylalkohol waren L929 Zellen, einer Zelllinie aus der Maus, nicht in der Lage, auf dem Material zu adhären. Je weiter der Derivatisierungsgrad erhöht wurde, desto stärker war auch die Adhäsion der Zellen. Bei einer Veresterung von 100% konnte eine Zellmorphologie und Adhäsion beobachtet werden, die vollkommen den Merkmalen unter optimalen Kultur-Bedingungen auf Polystyrol Platten entsprach.<sup>41</sup>

Durch Implantieren der Materialien in die Ratte konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Gaze des Ethylesters nach 90 Tagen fast vollständig resorbiert wurden, die aus dem Benzylester hergestellten Filme jedoch noch intakt waren. Alle Derivate zeigten eine gute Biokompatibilität und ließen sich in eine Reihe äußerer Formen wie Membranen und Schwämme verarbeiten. Die aus einem Ester der Hyaluronsäure hergestellten Mikrosphären und Membranen, die zu 25% den Hydrokortison- und zu 75% den Ethylester der Hyaluronsäure enthielten, ließen *in vitro* die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes zu.<sup>42,43</sup>

In Säugetieren besitzt HA im Blut und in den Geweben nur eine geringe Halbwertszeit. Wird es intravenös injiziert so nimmt die Polymerkonzentration in der Blutzirkulation mit einer Halbwertszeit weniger Minuten ab. Der größte Teil wird von der Leber aufgenommen und metabolisiert.<sup>44</sup> Drei Gruppen von Enzymen, die sowohl intrazellulär als auch im Serum auftreten, bauen Hyaluronsäure ab: Hyaluronidasen,  $\beta$ -D-Glucuronidasen und  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidasen. Hyaluronidasen bauen hochmolekulare Hyaluronsäure in kleinere Oligosaccharide ab, während  $\beta$ -D-Glucuronidase und  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase diese Fragmente durch Abbau der terminalen Enden weiter hydrolysieren. Durch Hyaluronidase, die im menschlichen Körper in Organen und Körperflüssigkeiten vorhanden ist, werden die internen glycosidischen Bindungen der N-Acetylglucosamin-Reste gespalten, d.h. die (1  $\rightarrow$  4) nicht aber die (1  $\rightarrow$  3)-Verknüpfung wird abgebaut.<sup>45,46</sup> Die testikuläre

---

<sup>41</sup> D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo und D. F. Williams, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 2101-2127.

<sup>42</sup> L. M. Benedetti, E. M. Topp und V. J. Stella, *Journal of Controlled Release*, **1990**, *13*, 33-41.

<sup>43</sup> H. N. Joshi, V. J. Stella und E. M. Topp, *Journal of Controlled Release*, **1992**, *20*, 109-121.

<sup>44</sup> T. C. Laurent und J. R. Fraser, *Faseb J*, **1992**, *6*, 2397-2404.

<sup>45</sup> K. Takagaki, H. Munakata, W. Nakamura, H. Matsuya, M. Majima und M. Endo, *Glycobiology*, **1998**, *8*, 719-724.

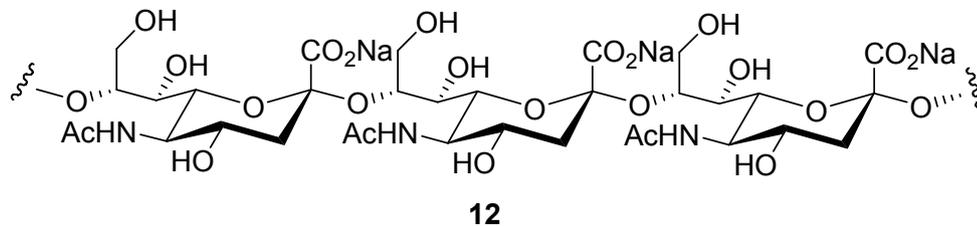
<sup>46</sup> E. J. Menzel und C. Farr, *Cancer Lett*, **1998**, *131*, 3-11.

Hyaluronidase katalysiert umgekehrt auch die Transglycosylierung, die für den Aufbau weiterer Glycosaminglykane genutzt werden konnte.<sup>47</sup>

## 1.5 Polysialinsäure als potentielles Biomaterial

### 1.5.1 Eigenschaften und Funktion

Polysialinsäure (PolySia, Abbildung 10) ist ein negativ geladenes Polysaccharid, das aus  $\alpha$ -2,8-verknüpften Sialinsäure-Einheiten besteht. In Vertebraten liegt das Polymer als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmolekül vor und wird besonders stark in embryonalem Gewebe exprimiert.<sup>48</sup> Die Kettenlänge der Polysialinsäure, die an NCAM gebunden ist, variiert und kann bis zu 50 Sialinsäure-Einheiten betragen.



**Abbildung 10:** Struktur der  $\alpha$ -2,8-verknüpften Polysialinsäure (**12**, PolySia).

Durch die hohe negative Ladung besitzt das Polymer eine große Hydrathülle, die den hydrodynamischen Radius des Zelladhäsionsproteins verdoppelt.<sup>49</sup> Das Polymer nimmt damit ein großes Volumen ein und erzeugt eine hohe sterische Hinderung. Diese Eigenschaft bestimmt die Abstände zwischen Zellen und besitzt einen entscheidenden Einfluß auf eine Reihe zellulärer Mechanismen bei der Entwicklung des Nervensystems von Wirbeltieren.<sup>50</sup> So unterstützt Polysialinsäure u.a. die Wanderung von Vorläuferzellen während der Neurogenese und die Innervierung von Organen. Bei der zuletzt genannten Ansteuerung von Zielstrukturen sind Axone in Anwesenheit von Polysialinsäure in der Lage auf eine Reihe von Signalen u.a. von Rezeptoren zu reagieren und ihr Ziel korrekt zu erreichen.<sup>51</sup> Bei der Innervierung von Gliedmaßen wird in Motoneuronen Polysialinsäure

<sup>47</sup> a) H. Saitoh, K. Takagaki, M. Majima, T. Nakamura, A. Matsuki, M. Kasai, H. Narita und M. Endo, *J Biol Chem*, **1995**, 270, 3741-3747. b) K. Takagaki, T. Nakamura, J. Izumi, H. Saitoh, M. Endo, K. Kojima, I. Kato und M. Majima, *Biochemistry*, **1994**, 33, 6503-6507.

<sup>48</sup> G. M. Edelman, *Biochemistry*, **1988**, 27, 3533-3543.

<sup>49</sup> H. Hildebrandt, M. Mühlenhoff, B. Weinhold und R. Gerardy-Schahn, *J Neurochem*, **2007**, 103 Suppl 1, 56-64.

<sup>50</sup> U. Rutishauser, *Nat Rev Neurosci*, **2008**, 9, 26-35.

<sup>51</sup> L. Bonfanti, *Prog Neurobiol*, **2006**, 80, 129-164.

hochreguliert, um die in Nervenfasern gebündelten Axone voneinander zu trennen, weite Verzweigungen zu bilden und die Muskeln anzusteuern.<sup>52</sup> Eine entscheidende Rolle spielt Polysialinsäure auch bei der synaptischen Plastizität, d.h. der differenzierten Stärkung und Schwächung synaptischer Verbindungen, und ist damit auch an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt.<sup>53</sup>

Die essenzielle Bedeutung von Polysialinsäure in der Entwicklung des Nervensystems offenbart sich bei der Ausschaltung der beiden Polysialyltransferasen in Mäusen, die spezifisch Polysialinsäure auf NCAM übertragen. Fehlt Polysialinsäure auf dem Zelladhäsionsprotein so zeigen Mäuse einen lethalen Phänotyp: Weniger als 20% der Mäuse überleben länger als vier Wochen.<sup>54</sup> Ein großer Vorteil von Polysialinsäure als Biomaterial ist, dass die Überexpression von PolySia in verletztem Gewebe regenerative Prozesse des Zentralen Nervensystems stark begünstigt und Abbauprodukte nicht toxisch sind.<sup>55,56</sup>

Eine weitere Eigenschaft von Polysialinsäure besteht darin, dass das Polymer eine hohe Halbwertszeit während der Blutzirkulation besitzt.<sup>57</sup> Eine enzymatische Hydrolyse des polymeren Zuckers, wie z.B. bei Hyaluronsäure (Abschnitt 1.4.3), konnte im Falle von Polysialinsäure endogen nicht beobachtet werden. Dennoch ist ein hochspezifischer Abbau durch exogene Zugabe von Endosialidasen (Endo-*N*-acetylneuraminidasen, EndoN) möglich.<sup>58</sup> Die Injektion hoher Dosen endoN in Mäuse konnte darüber hinaus zeigen, dass keine toxische Wirkung von dem Enzym ausgeht.<sup>59</sup>

## 1.5.2 Enzymatischer Abbau durch Endosialidasen

Endosialidasen stammen ursprünglich aus Bakteriophagen, die diese Enzyme verwenden, um die Polysialinsäure-Kapsel bestimmter pathogener Bakterien zu durchdringen und sie zu infizieren. Im Gegensatz zu Exosialidasen, die Sialinsäure-Reste auf Glycokonjugaten

---

<sup>52</sup> J. L. Bruses und U. Rutishauser, *Biochimie*, **2001**, 83, 635-643.

<sup>53</sup> U. Rutishauser und L. Landmesser, *Trends Neurosci*, **1996**, 19, 422-427.

<sup>54</sup> B. Weinhold, R. Seidenfaden, I. Rockle, M. Mühlenhoff, F. Schertzinger, S. Conzelmann, J. D. Marth, R. Gerardy-Schahn und H. Hildebrandt, *J Biol Chem*, **2005**, 280, 42971-42977.

<sup>55</sup> a) A. El Maarouf, Y. Kolesnikov, G. Pasternak und U. Rutishauser, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**, 102, 11516-11520. b) A. El Maarouf, A. K. Petridis und U. Rutishauser, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**, 103, 16989-16994.

<sup>56</sup> Y. Haile, K. Haastert, K. Cesnulevicius, K. Stummeyer, M. Timmer, S. Berski, G. Dräger, R. Gerardy-Schahn und C. Grothe, *Biomaterials*, **2007**, 28, 1163-1173.

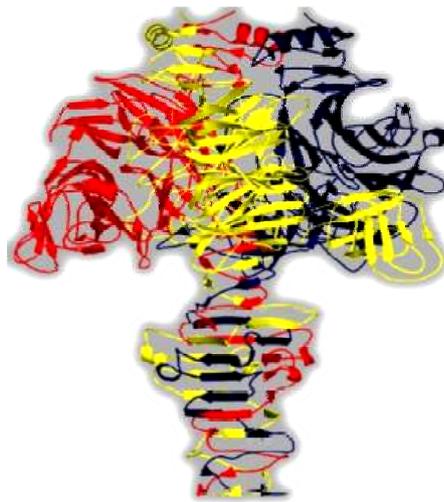
<sup>57</sup> G. Gregoriadis, A. Fernandes, M. Mital und B. McCormack, *Cell Mol Life Sci*, **2000**, 57, 1964-1969.

<sup>58</sup> a) J. Finne und P. H. Makela, *J Biol Chem*, **1985**, 260, 1265-1270. b) P. C. Hallenbeck, E. R. Vimr, F. Yu, B. Bassler und F. A. Troy, *J Biol Chem*, **1987**, 262, 3553-3561.

<sup>59</sup> L. Daniel, P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon und D. Figarella-Branger, *Oncogene*, **2001**, 20, 997-1004.

terminal (exo) hydrolysieren,<sup>60</sup> sind Endosialidasen ausschließlich in der Lage die glycosidische Bindung  $\alpha$ -2,8-verknüpfter Sialinsäure-Reste innerhalb (endo) der Polymerkette zu spalten. Sie benötigen dazu ein Substrat mit einer minimalen Anzahl von Resten zwischen fünf und acht Sialinsäureeinheiten.

Die Struktur des Enzyms EndoNF aus dem Phagen K1F, der das Bakterium *Escherichia coli* K1 infiziert, wurde 2005 durch Kristallstrukturanalyse entschlüsselt (Abbildung 11).<sup>61</sup> Das Enzym besteht aus einem SDS-(Natriumdodecylsulfat)-stabilen Homotrimer. Eine monomere Kette besteht aus 1064 Aminosäure-Resten. Während der Reifung wird der C-Terminus (Aminosäure-Reste 912-1064) proteolytisch gespalten. Für die Kristallstrukturanalyse wurde die N-terminale Kapsid-Bindedomäne (Aminosäure-Reste 1-245) entfernt. Dies hatte keinen Einfluss auf die Trimerisierung des Enzyms und seine Aktivität.



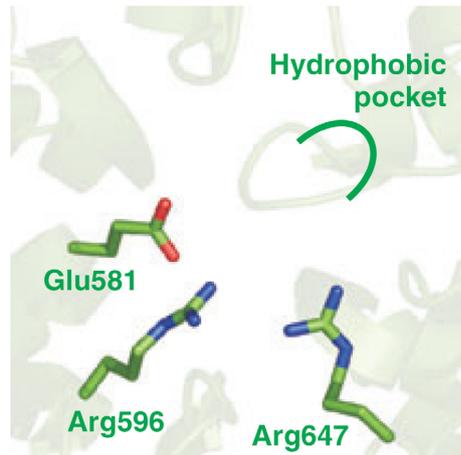
**Abbildung 11:** Struktur der Endosialdase EndoNF mit den Aminosäure-Resten 245 bis 911 (Abbildung aus Stummeyer et al., 2005). Die einzelnen Monomere sind in Rot, Gelb und Blau dargestellt.

Die wichtigsten Aminosäuren des aktiven Zentrum, denen eine Schlüsselrolle bei der Hydrolyse des Substrats zukommt, sind zwei Arginin-Reste (Arg596 und Arg647, Abbildung 12) und ein Glutamin-Rest (Glu581).

---

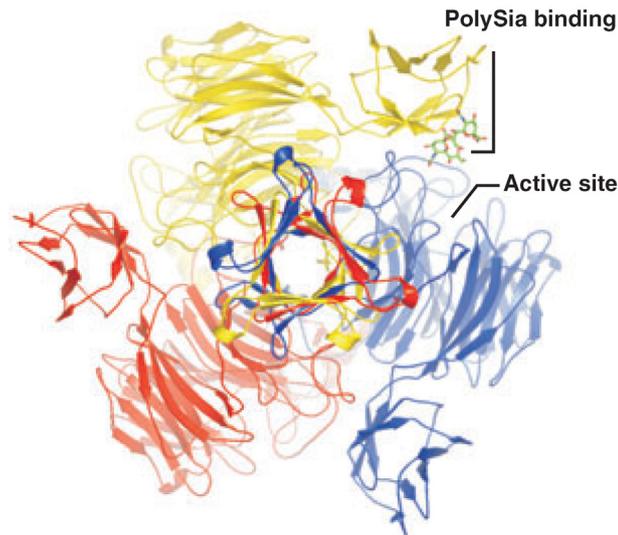
<sup>60</sup> M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzi, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers und P. M. Alzari, *Structure*, **2004**, 12, 775-784.

<sup>61</sup> K. Stummeyer, A. Dickmanns, M. Mühlenhoff, R. Gerardy-Schahn und R. Ficner, *Nat Struct Mol Biol*, **2005**, 12, 90-96.



**Abbildung 12:** Aktives Zentrum mit den drei wichtigsten Aminosäuren und der identifizierten hydrophoben Tasche (Abbildung aus Stummeyer et al., 2005).

Durch Untersuchung des Enzymkristalls nach Zugabe von Sialinsäure-Pentameren konnte in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum eine Bindungsstelle identifiziert werden. In dieser Bindungsstelle befand sich statt des ursprünglichen Pentamers nur das Dimer, das durch physikalische Wechselwirkungen an die Aminosäuren des Proteins gebunden wurde. Die wichtigsten Wechselwirkungen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Aminosäure Serin (Ser468) und dem Sauerstoff der Säurefunktion am nichtreduzierenden Ende des Sialinsäurerestes, zu dem Sauerstoff der glycosidischen Bindung und dem C-7-Hydroxyl-Sauerstoff am reduzierenden Ende. Weitere Wechselwirkungen bestehen zwischen dem Stickstoff des Glycin (Gly466) und dem Amid-Sauerstoff des reduzierenden Endes, und zwischen Serin (Ser460) und dem Stickstoff in Position 5 am nichtreduzierenden Ende des Sialinsäurerestes. Hydrophobe Kontakte bestehen zwischen Threonin (Thr728) und Tyrosin (Tyr729) der zweiten monomeren Protein-Kette und der *N*-Acetylgruppe. Da anstatt des ursprünglich verwendeten Pentamers nur das Dimer beobachtet wurde, vermuten die Autoren, dass das Pentamer von der Bindungsstelle aus in das aktive Zentrum hineinreicht und während des Kristallisationsprozesses hydrolysiert wird. Aktives Zentrum und Bindungstasche befinden sich in einem Abstand von 22 Å (Abbildung 13).



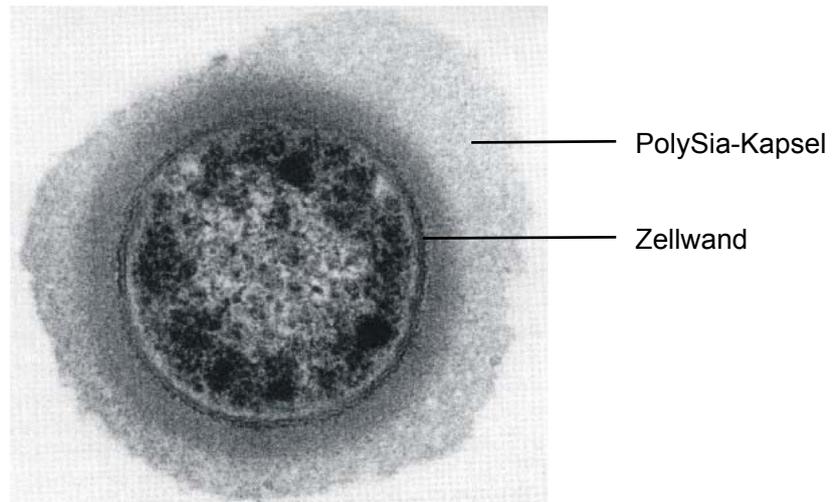
**Abbildung 13:** Querschnitt durch das Enzym (Abbildung aus Stummeyer et al., 2005). Polysialinsäure Bindungsstelle und aktives Zentrum befinden sich in einer Entfernung von 22 Å.

### 1.5.3 Polysialinsäure Biosynthese in *E. coli* K1

Polysialinsäure ist nicht nur Teil körpereigener Strukturen des Menschen, sondern stellt auch die äussere Kapsel pathogener Bakterien, wie *Neisseria meningitidis* Serotyp B und *Escherichia coli* K1, dar. Sie nutzen das Polymer ihrer Hülle, um das Immunsystems ihres Wirts zu überwinden und können auf diese Weise eine Entzündung der Hirn- und Rückenmarkshäute (Meningitis) oder Blutvergiftung (Sepsis) verursachen. Die Kapsel von *Escherichia coli* K1 ist eines der am intensivst untersuchten, bakteriellen Kapsel-Polysaccharide (Abbildung 14).<sup>62</sup>

---

<sup>62</sup> E. R. Vimr und S. M. Steenbergen, *Mol Microbiol*, **2006**, *60*, 828-837.



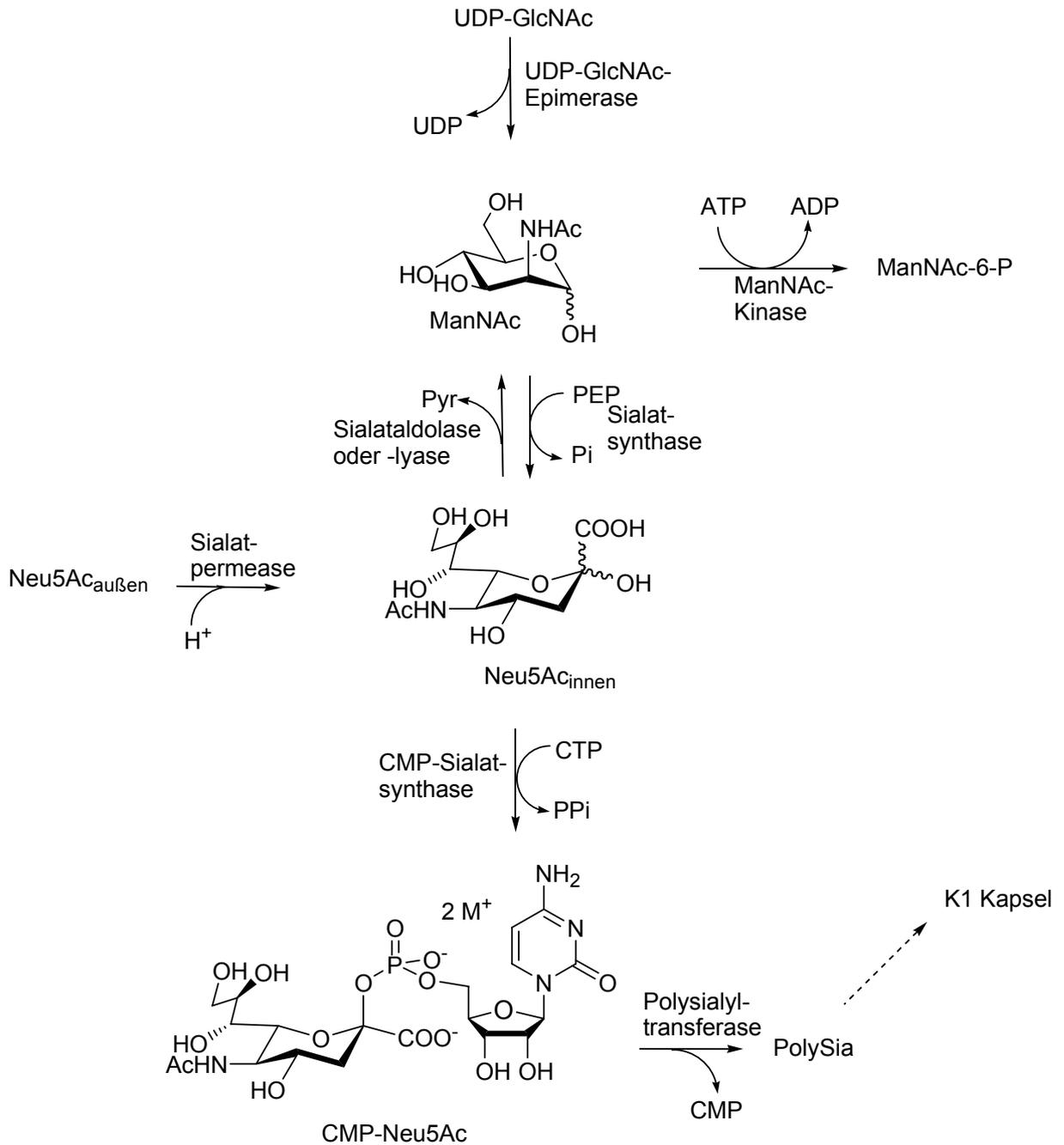
**Abbildung 14:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *E. coli* K1 Bakteriums, das von einer dicken Polysialinsäure-Schicht umgeben wird.<sup>63</sup> Die Polysialinsäure-Kapsel kann von Bakteriophagen mit Hilfe ihrer Endosialidasen durchdrungen werden.

Der von Ringenberg et al. vorgeschlagene Weg der Biosynthese von  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure ist in Abbildung 15 dargestellt. Im ersten Schritt wird *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) aus Uridindiphosphat-*N*-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) hergestellt, um dann durch Kondensation von ManNAc mit Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Katalyse durch die Sialat-synthase Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac) freizusetzen. Anschließend wird Neu5Ac mit Cytidintriphosphat (CTP) zu Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) aktiviert. Es folgt die Übertragung des Neu5Ac-Restes aus CMP-Neu5Ac auf Undecaprenylphosphat.<sup>64</sup> Diese Verbindung dient als Akzeptor, auf den in Position 8 weitere Sialinsäurereste übertragen werden und so das  $\alpha$ -2,8-verknüpfte Polymer gebildet wird.

---

<sup>63</sup> J. Roth, C. Zuber, P. Komminoth, P. Scheidegger, M. J. Warhol, D. Bitter-Suermann und P. U. Heitz, (Hrs.: J. Roth, U. Rutishauser und F. A. Troy), Birkhäuser, Basel., **1993**

<sup>64</sup> F. A. Troy, I. K. Vijay, M. A. McCloskey und T. E. Rohr, *Methods Enzymol*, **1982**, 83, 540-548.

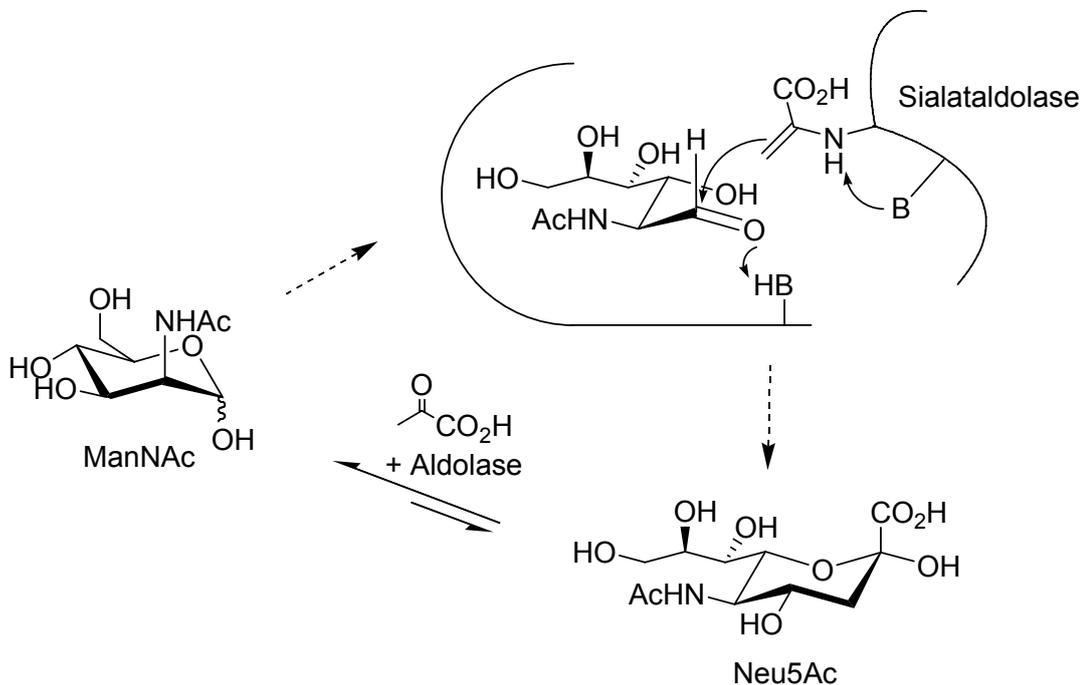


**Abbildung 15:** Vorgeschlagener Pfad der Sialinsäure-Synthese in *E. coli* K1.<sup>65</sup> Der tiefgestellte Index bei Neu5Ac weist darauf hin, dass Sialinsäure sich außerhalb bzw. innerhalb der Zelle befindet.

Die reversible Kondensation des *N*-Acetylmannosamins mit Phosphoenolpyruvat zur Sialinsäure kann auch zu synthetischen Zwecken genutzt werden. Unter Katalyse durch die Sialataldolase liegt das Gleichgewicht der Reaktion zwar stark auf der Seite des ManNAc,

<sup>65</sup> M. A. Ringenberg, S. M. Steenbergen und E. R. Vimr, *Mol Microbiol*, **2003**, 50, 961-975.

lässt sich aber durch Zugabe erhöhter Mengen Pyruvats zugunsten der Neu5Ac verschieben. Der Mechanismus der Kondensation ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Mechanismus der Umsetzung von *N*-Acetylmannosamin zu Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac) unter Katalyse durch die Sialataldolase. Der Stickstoff der Enamin-Spezies stammt aus einem Lysin-Rest des Enzyms.<sup>66</sup>

Neben *E. coli* K1 zählen auch die Bakterien *Neisseria meningitidis* Serogruppe B, die ebenfalls aus  $\alpha$ -2,8-verknüpften Sialyl-Resten besteht, zu den Haupterregern der bakteriellen Meningitis. Während gegen die Erreger *N. meningitidis* Serogruppe C, deren Kapsel aus einer  $\alpha$ -2,9-Verknüpfung besteht,<sup>67</sup> weltweit Impfstoffe lizenziert wurden, befinden sich die Impfstoffe gegen *N. meningitidis* Serogruppe B noch in der Entwicklung.<sup>68</sup> Das natürliche Polysaccharid ihrer Kapsel zeigte als körpereigene Struktur nach Konjugation an ein Trägerprotein (Tetanus-Toxin) nur eine geringe Immunogenität.<sup>69</sup> Durch die Deacetylierung und Einführung von Propionyl-Resten konnten Antikörper gewonnen werden, die überwiegend die bakterielle Polysialinsäure banden.<sup>70</sup> Folgende Arbeiten zeigten, dass durch

<sup>66</sup> G.-J. Boons und A. V. Demchenko, in *Carbohydrate-based drug discovery* (Hrs.: C.-H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, 55-102.

<sup>67</sup> F. A. Troy, *Glycobiology*, **1992**, 2, 5-23.

<sup>68</sup> L. Jodar, I. M. Feavers, D. Salisbury und D. M. Granoff, *Lancet*, **2002**, 359, 1499-1508.

<sup>69</sup> H. J. Jennings, R. Roy und A. Gamian, *J Immunol*, **1986**, 137, 1708-1713.

<sup>70</sup> H. J. Jennings, A. Gamian und F. E. Ashton, *J Exp Med*, **1987**, 165, 1207-1211.

die Derivatisierung und Selektion, spezifische Antikörper gegen die bakterielle Kapsel gewonnen werden konnten, die nur eine sehr geringe Affinität für körpereigene, Polysialinsäure-tragende Strukturen aufwiesen.<sup>71</sup> Die nähere Charakterisierung eines auf diese Art und Weise gewonnen Antikörpers (SEAM 3) zeigte jedoch, dass die spezifische Antikörperbindung dabei *N*-Propionyl-unabhängig erfolgen kann und wahrscheinlich auf eine unvollständige Derivatisierung nach Deacetylierung zurückzuführen war. Die Erkennungssequenz des Antikörpers bindet nicht *N*-Propionyl-Polysialinsäure, sondern eine Diasaccharid-Einheit der Polysialinsäure, bei der aufgrund der unvollständigen Derivatisierung ein Sialyl-Rest deacetyliert vorliegt. Da dieses Epitop offensichtlich auch in der bakteriellen Polysaccharid-Kapsel von *N. meningitidis* B auftritt, aber im humanen Gewebe fehlt, zeigt der Antikörper eine hohe Spezifität für die Meningokokken.<sup>72</sup> Die Gewinnung von Antikörpern für therapeutische Zwecke spiegelt nicht die Situation einer *in vivo* Anwendung wieder. Welchen Einfluss, die in dieser Arbeit beschriebene Modifizierung der  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure auf die Immunogenität der jeweiligen Derivate hat, lässt sich daher ohne weitere Experimente nicht abschätzen.

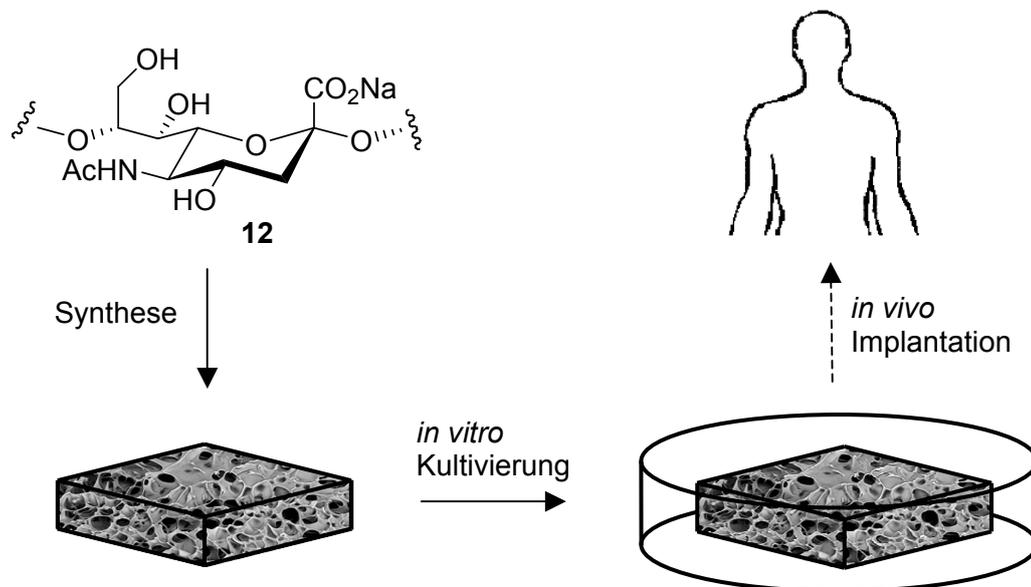
---

<sup>71</sup> D. M. Granoff, A. Bartoloni, S. Ricci, E. Gallo, D. Rosa, N. Ravenscroft, V. Guarnieri, R. C. Seid, A. Shan, W. R. Usinger, S. Tan, Y. E. McHugh und G. R. Moe, *J Immunol*, **1998**, *160*, 5028-5036.

<sup>72</sup> G. R. Moe, A. Dave und D. M. Granoff, *Infect Immun*, **2005**, *73*, 2123-2128.

## 2 Zielsetzung

Eines der größten Probleme bei dem Verlust von Gewebe und Organen nach einer Erkrankung oder einem Unfall ist die begrenzte Verfügbarkeit von geeigneten Spenderorganen. Das Tissue Engineering konzentriert sich daher darauf, künstliche Organe und Gewebe herzustellen, die dann in den Patienten implantiert werden können und so zur Wiederherstellung der natürlichen Körperfunktionen dienen (Abschnitt 1.1). Ein wichtiger Teil ist die Synthese eines passenden Gerüstmaterials auf dem Zellen adhären, proliferieren und differenzieren können. Dieses Grundmaterial muss die Extrazellulärmatrix des natürlichen Gewebes imitieren und eine hohe biologische Aktivität aufweisen.  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure (**12**) erfüllt zwei der drei wesentlichen Punkte (Abschnitt 1.2): es ist in seiner nativen Form als Bestandteil des neuralen Zelladhäsionsmoleküls biokompatibel und durch Endosialidasen abbaubar. Darüber hinaus ist die Abbaubarkeit von außen induzierbar, da kein spezifischer Mechanismus zur enzymatischen Spaltung von Polysialinsäure im Menschen bekannt ist. Anders als bei Biopolymeren wie Chitosan und Hyaluronsäure besteht die Möglichkeit die Stärke des Abbaus eines späteren Materials in hohem Maße zu kontrollieren. Das native Polymer ist stark negativ geladen und lässt sich in dieser Form nicht in das stabile, dreidimensionale Gerüst eines Biomaterials verarbeiten. Seine Löslichkeit muss durch chemische Derivatisierung angepasst werden.



**Abbildung 17:** Derivatisierung von Polysialinsäure zur Herstellung dreidimensionaler, poröser Matrizen für das Tissue Engineering. Das Gerüstmaterial sollte biokompatibel und kontrolliert abbaubar sein.

Die Derivatisierung des Polymers kann auf zwei Wegen erfolgen: Das erste Konzept umfasst die Synthese derivatisierter Sialinsäuren und Übertragung aktivierter Sialinsäureester auf einen Akzeptor.<sup>73,74</sup> Anschließend könnte der Aufbau stufenweise zum  $\alpha$ -2,8-verknüpften modifizierten Polymer durch eine Polysialyltransferase als Katalysator erfolgen. Ein chemoenzymatischer Zugang zu monomeren Bausteinen mit Aktivierung zum Cytidylmonophosphat-(CMP)-Ester konnte kürzlich anhand eines synthetisch schwer zugänglichen C-7-Fluor-Derivats der CMP-Sialinsäure erfolgreich erarbeitet werden.<sup>75</sup> Weitere synthetische Derivate der Sialinsäure, wie verschiedene Ester, C-9-Modifizierungen (9-Iod-, 9-Thio-Neu5Ac) und C-5 Derivate (5-N-Fluoracetyl-, 5-N-Thioacetyl-Neu5Ac) wurden von Säugetierzellen aufgenommen und bis zu 95% auf die Zelloberfläche übertragen.<sup>76</sup> Ebenso wurde Sialinsäure über das C-9 Tosylat in ein Azid und in verschiedene Thio-Analoga der Neu5Ac überführt.<sup>77</sup>

Die alternative Strategie soll das Ziel dieser Arbeit sein und besteht darin, Polysialinsäure direkt zu derivatisieren. Zur Anpassung der Löslichkeit sollen hydrophobe Gruppen am Stickstoff eingeführt werden. Solche Substituenten könnten zum einen Alkyl- aber auch Acylgruppen, wie z.B. Benzoyl, Myristoyl oder Propionyl, sein. Weitere geplante Modifikationen, die die hohe negative Ladung des Polymers herabsetzen könnten, sind Amid- und Ester-Derivate (Abbildung 18).

Ein wichtiger Teil stellt auch die Synthese dreidimensionaler Matrizen dar. Hierbei kann die Eigenschaft polymerer Kohlenhydrate genutzt werden, durch Quervernetzung funktioneller Gruppen dreidimensionale Hydrogele auszubilden. Ein literaturbekanntes Beispiel ist Hyaluronsäure (Abschnitt 1.4.3), die der Polysialinsäure bezüglich ihrer Funktionalität stark ähnelt. Durch Umsetzung mit lipophilen Diepoxiden ließe sich die Molmasse der Polysialinsäure stark vergrößern. Diese Bildung hochmolekularer Ketten sollte zur Ausbildung von Hydrogelen führen, die dann gegebenenfalls nach biologischer Evaluation weiter angepasst werden könnten. Sowohl bei der Herstellung dreidimensionaler Hydrogele als auch bei der Veränderung der linearen Polymerkette soll der Derivatisierungsgrad des Polymers analysiert werden. Auf die Verwendung der literaturbekannten Schutzgruppen für Kohlenhydrate muss bei der Derivatisierung verzichtet werden, da sie nach Einführung

---

<sup>73</sup> H. Yu, S. Huang, H. Chokhawala, M. Sun, H. Zheng und X. Chen, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, *45*, 3938-3944.

<sup>74</sup> H. Yu und X. Chen, *Org Lett*, **2006**, *8*, 2393-2396.

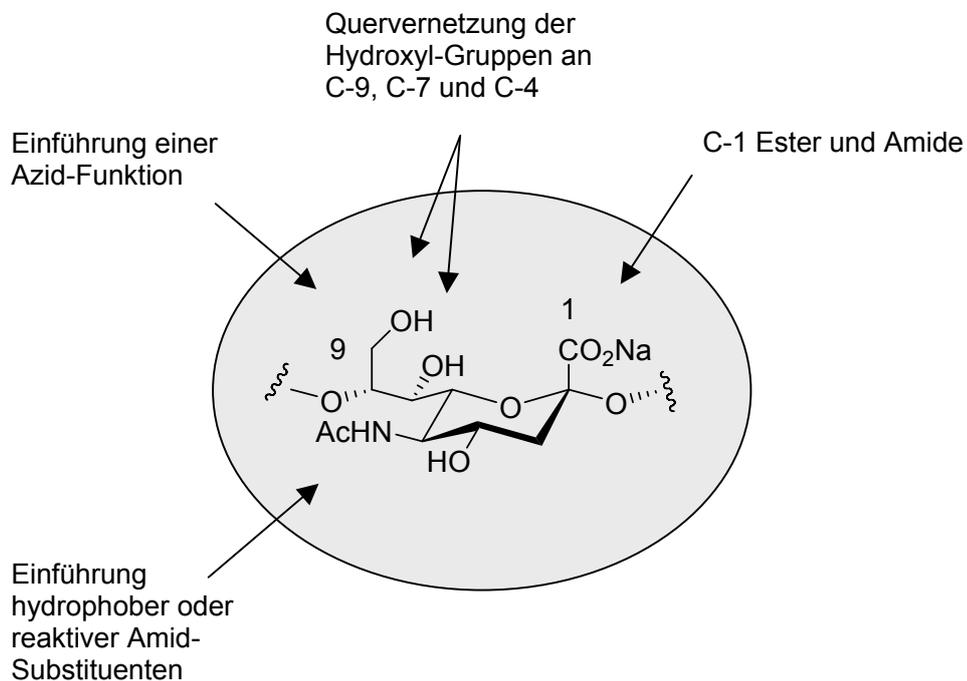
<sup>75</sup> S. Hartlieb, *Chemoenzymatische Zugänge zu CMP-aktivierten Sialinsäure-Derivaten (Dissertation)*, **2007**, Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover.

<sup>76</sup> C. Oetke, R. Brossmer, L. R. Mantey, S. Hinderlich, R. Isecke, W. Reutter, O. T. Keppler und M. Pawlita, *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 6688-6695.

<sup>77</sup> R. Isecke und R. Brossmer, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 7445-7460.

entlang der Polymer-Kette nicht vollständig wieder abgespalten werden können. Dies würde zu inhomogenen Produkten führen.

Als weitere essenzielle Eigenschaft eines zukünftigen Biomaterials muss auch die Abbaubarkeit der Derivate überprüft werden. Eingesetzt werden soll die Endosialidase endoNF\*, die im Arbeitskreis Gerardy-Schahn (Institut für Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) in *E. coli* expremiert werden konnte. Das erhaltene Enzym endoNF\* (Aminosäure-Reste 246-911) stellt den katalytisch aktiven Teil des nativen endoNFs nach proteolytischer Spaltung dar.<sup>78</sup>



**Abbildung 18:** Plan zur Derivatisierung von  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure. Die funktionellen Gruppen der PolySia sollen modifiziert werden, um ein dreidimensionales Gerüstmaterial herzustellen und die hohe Wasserlöslichkeit herabzusetzen.

<sup>78</sup> D. Schwarzer, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn und M. Mühlhoff, *J Biol Chem*, **2007**, *282*, 2821-2831.

### 3 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

#### 3.1 Synthese eines dreidimensionalen Gerüstmaterials und enzymatische Abbaubarkeit

Die Herstellung poröser Matrizen stellt die Grundlage jeder potentiellen biomedizinischen Anwendung im Bereich des Tissue Engineerings dar. Sie ist daher auch ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit.

Für die Größenbestimmung der Polymer-Chargen, die laut Herstellerangaben (Nacalai Tesque) eine Molmasse von 31000 g/mol (100 Monomer-Einheiten) aufweisen sollten, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Alcianblau-Silberfärbung nach Pelkonen et al. verwendet.<sup>79</sup> Diese biochemische Technik beruht auf der Trennung von Teilchen im elektrischen Feld und ist eine spezielle Methode, um geladene Polysaccharide ohne Zusatz von SDS zu analysieren.<sup>80</sup> Mit jeder hinzukommenden Monomer-Einheit steigt auch die negative Ladung um eine Einheit, so dass der Quotient aus Molmasse und Ladung konstant ist. Somit werden die Polysialinsäureketten durch das Polyacrylamid-Netzwerk in Abhängigkeit von dem Grad der Polymerisierung (DP) zurückgehalten. Kleinere Teilchen wandern schneller durch das Netz als größere Teilchen.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, variiert der DP der in der Arbeit eingesetzten Polysialinsäure-Chargen. Die Materialien besitzen einen DP von ca. 50 Einheiten (Molmasse = 16000 g/mol).

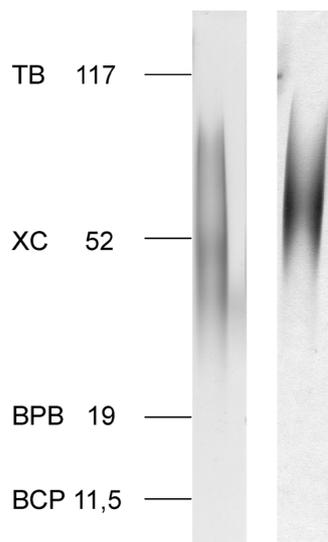
Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente nicht nur zur Bestimmung der Größe des verwendeten Polymers, sondern wurde auch als Reaktionskontrolle verwendet. Mit Hilfe dieser Technik konnten bereits während der Diplomarbeit erste Polysialinsäure-Hydrogele erhalten werden. Als Quervernetzer wurde Diepoxyoctan verwendet, das die Hydrophilie des Materials herabsetzen und die Molmasse deutlich erhöhen konnte.<sup>81</sup>

---

<sup>79</sup> S. Pelkonen, J. Hayrinen und J. Finne, *J Bacteriol*, **1988**, 170, 2646-2653.

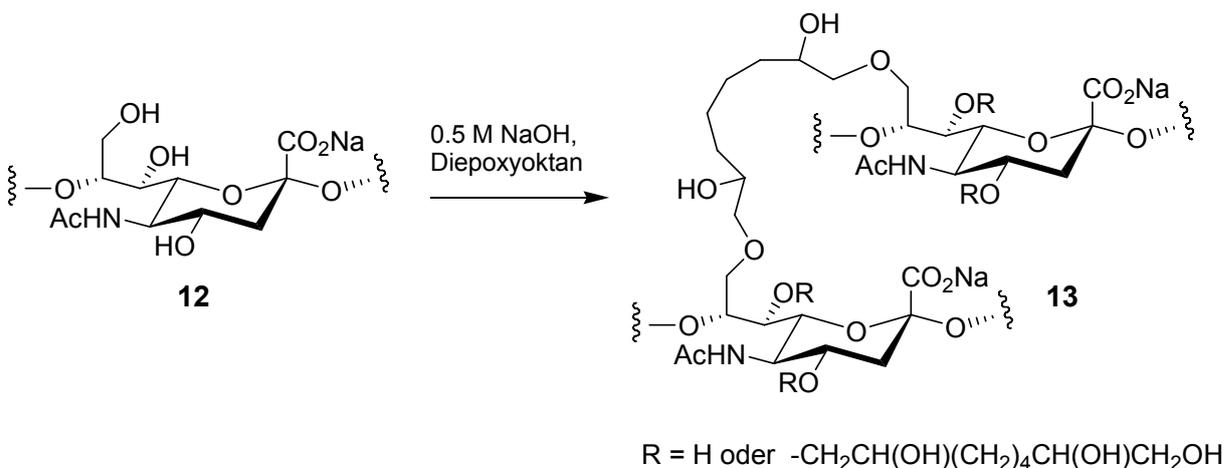
<sup>80</sup> S. Pelkonen und J. Finne, *Methods Enzymol*, **1989**, 179, 104-110.

<sup>81</sup> S. Berski, *Diplomarbeit*, **2005**, Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover.



**Abbildung 19:** Polyacrylamid-Gele nach Alcianblau-Silberfärbung verschiedener Chargen Polysialinsäure. Die Abkürzungen stehen für die mitgelaufenen Polysaccharid-Marker: TB = Trypanblau, XC = Xylolcyanol, BPB = Bromphenolbau, BCP = Bromkresolpurpur. Ihr Wanderungspunkt lässt sich dem Polymerisationsgrad (neben dem Gel vermerkt) der Polysialinsäure zuordnen.

Die Hydrogele (**13**) wurden mit einer maximalen Konzentration an Polysialinsäure (**12**) in NaOH-Lösung mit 3 Äquivalenten Diepoxyoktan erhalten (Abbildung 20). Nach Abschluss der Diplom-Arbeit konnten diese Materialien jedoch nur in einem geringen 20-mg-Maßstab hergestellt werden, da der Quervernetzer keine homogene Lösung mit der NaOH-Lösung bildete.



**Abbildung 20:** Quervernetzung von Polysialinsäure (**12**) in Natronlauge mit einem Diepoxid.

Aus diesem Grund wurde die weiterführende Optimierung während dieser Arbeit vorgenommen. Dazu wurden verschiedene Detergenzien, u.a. Tetrabutylammoniumchlorid (TBACl) zugesetzt und die Reaktion zunächst im 20-mg-Maßstab durchgeführt. Die Zugabe von SDS führte zu einer homogenen Reaktionslösung (Tabelle 1) und zur Bildung eines klaren, unlöslichen Hydrogels im 200-mg-Maßstab, das zu Entfernung des SDS intensiv dialysiert wurde.

Maßstab [mg]	Diepoxyoktan [Äq]	Detergenz	Beobachtung
20	3	-	Hydrogel
20	1	TBACl	Flüssigkeit
20	2	TBACl	Flüssigkeit
20	3	TBACl	Flüssigkeit
20, 100, 200	3	SDS	Hydrogel

**Tabelle 1:** Herstellung eines Hydrogel im 200-mg-Maßstab.

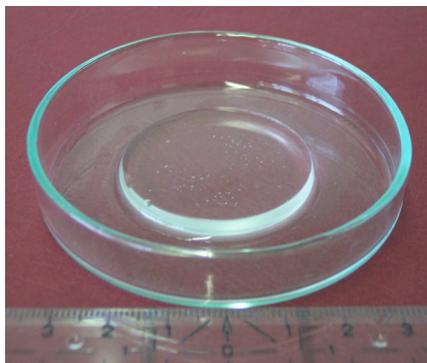
Die Konsistenz der Hydrogele wurde stark durch die Chargen-Unterschiede der Polysialinsäure (Abbildung 19) beeinflusst. Je größer der Anteil von Polymerketten mit geringerem Polymerisationsgrad war, desto weniger reproduzierbar war das Ergebnis. Das Edukt wurde daher in einer Membran dialysiert, deren Ausschlussgrenze bei 14000 g/mol liegt.

Das Hydrogel mit einem Gehalt von drei Äquivalenten Diepoxyoktan wurde anschließend auf seine Abbaubarkeit gegenüber der Endo-*N*-acetylneuraminidase EndoNF\* getestet. Jedoch konnte über einen langen Versuchszeitraum von vier Wochen und hohen Enzymkonzentrationen keine Verflüssigung des Hydrogels beobachtet werden. Als Antwort auf dieses biochemische Ergebnis wurde die Stoffmenge des Quervernetzers auf 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 und 0.1 Äquivalente herabgesetzt. Bei Verwendung von 1.0 bis 0.6 Äquivalenten Diepoxyoktan konnte innerhalb von 2 bis 3 Tagen die Entstehung unlöslicher Hydrogele beobachtet werden. Unterhalb der Grenze von 0.6 Äquivalenten an Quervernetzer entstanden lediglich viskose Flüssigkeiten.

Der erneute Zusatz der EndoNF\* unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, 37 °C) zu den Hydrogelen zeigte eine vollständige Verflüssigung innerhalb von 2 bis 11 Tagen in Abhängigkeit von dem Diepoxyoktan-Gehalt (Tabelle 2). Die Hydrogele konnten reproduzierbar im 200-mg-Maß hergestellt werden (Abbildung 21).

Hydrogele	HG <sup>3.0</sup>	HG <sup>2.0</sup>	HG <sup>1.0</sup>	HG <sup>0.8</sup>	HG <sup>0.6</sup>
Diepoxyoktan [Äq]	3.0	2.0	1.0	0.8	0.6
Abbau durch EndoNF*	Kein Abbau	Kein Abbau	Verflüssigung in 11 d	Verflüssigung in 2 d	Verflüssigung in 2 d

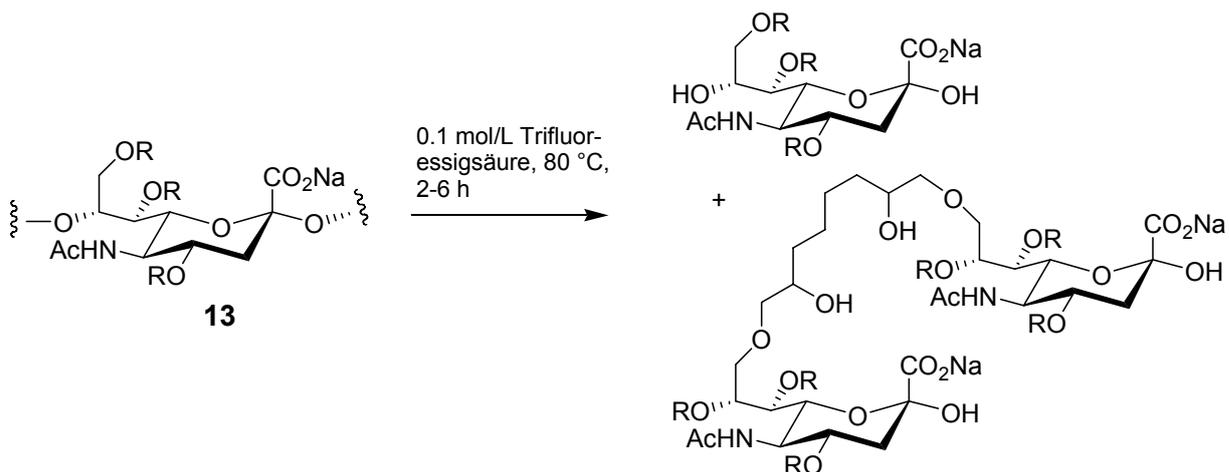
**Tabelle 2:** Abbau der verschiedenen Hydrogele durch die Endosialidase EndoNF\*.



**Abbildung 21:** HG<sup>1.0</sup> Material im 200-mg-Maßstab mit einem Durchmesser von ca. 4 cm.

### 3.2 Analytik des hergestellten Hydrogels

Für alle weiteren Versuche wurden Hydrogele verwendet, die mit einem Äquivalent Diepoxyoktan (bezeichnet als HG<sup>1.0</sup>) quervernetzt worden waren. Die weitere Analyse der Zusammensetzung und Produktverteilung entlang der Polymerkette erfolgte durch saure Hydrolyse der glycosidischen Bindungen in 0.1 mol/L Trifluoressigsäure (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Saure Hydrolyse des Hydrogels (**13**) mit einem Gehalt von 1 Äq Diepoxyoktan ( $R = H$  oder  $CH_2CH(OH)(CH_2)_4CH(OH)CH_2OH$ ).

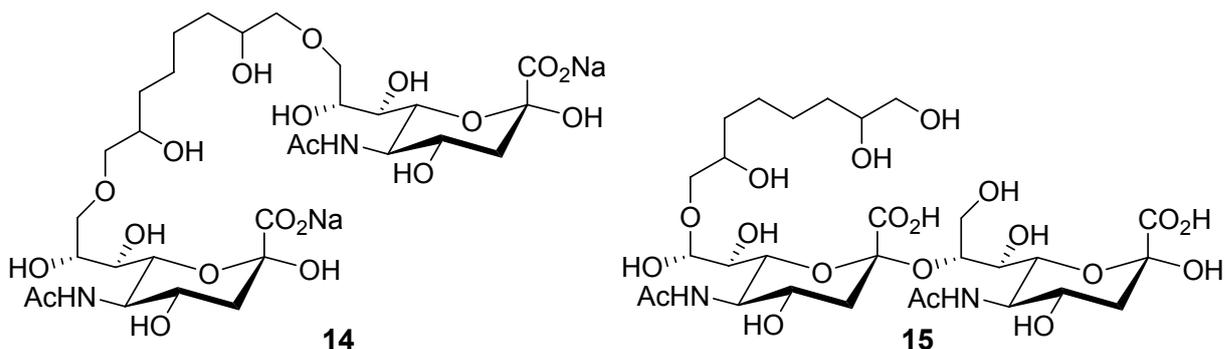
Die Abbau-Produkte der chemischen Hydrolyse nach 2, 4 und 6 h wurden anschließend durch LC-MS Analyse untersucht. Erst nach 6 h war die Hydrolyse laut ESI-MS vollständig. Eine Übersicht über die Produktverteilung gibt Tabelle 3.

Molekül	Massenpeak	Intensität	Produktverteilung
$[M-H^+]$	308.0992	3.9	41%
$(M+1*S)-H^+$	468.2114	2	21%
$(M+2*S)-H^+$	628.3231	1.8	19%
$(M+3*S)-H^+$	788.4295	1	10%
$(2*M+1*S)-H^+$	759.2983	0.8	9%

**Tabelle 3:** Produktverteilung des Hydrogels mit einem Gehalt von 1 Äq Diepoxyoktan unter der Annahme, dass die Verbindungen die gleiche Ionisierbarkeit aufweisen ( $M = \text{Sialinsäure}$ ,  $S = \text{Diepoxyoktan-Substituent}$ ).

Das Hydrogel enthält somit einen hohen Anteil von 41% an Sialyl-Einheiten die nicht durch Diepoxyoktan derivatisiert wurden. Insgesamt 50% aller Sialyl-Reste enthalten 1, 2 oder 3 Diepoxyoktan-Substituenten ohne eine effektive Quervernetzung. Mit einem prozentualen Anteil von 9% konnten jedoch auch Sialinsäure-Dimere beobachtet werden, die lediglich einen Diepoxyoktan-Substituenten enthalten ( $m/z = 759.30$ ). Prinzipiell kann dieses

m/z-Verhältnis von zwei Verbindungen stammen: Zum einen kann es zwei Sialinsäure-Reste darstellen, die durch ein Diepoxyoktan-Molekül verbrückt sind (Verbindung **14**, Abbildung 23). Diese Verbindung wäre verantwortlich für die Molmassen-Erhöhung und damit Bildung eines Hydrogels. Zum anderen könnte dieser Peak auch von zwei Sialinsäure-Molekülen stammen, die durch glycosidische Bindung verknüpft sind und an deren C-4-, C-7- oder C-9-Hydroxylgruppe ein hydrolysiertes Diepoxyoktan-Molekül hängt (Verbindung **15**).

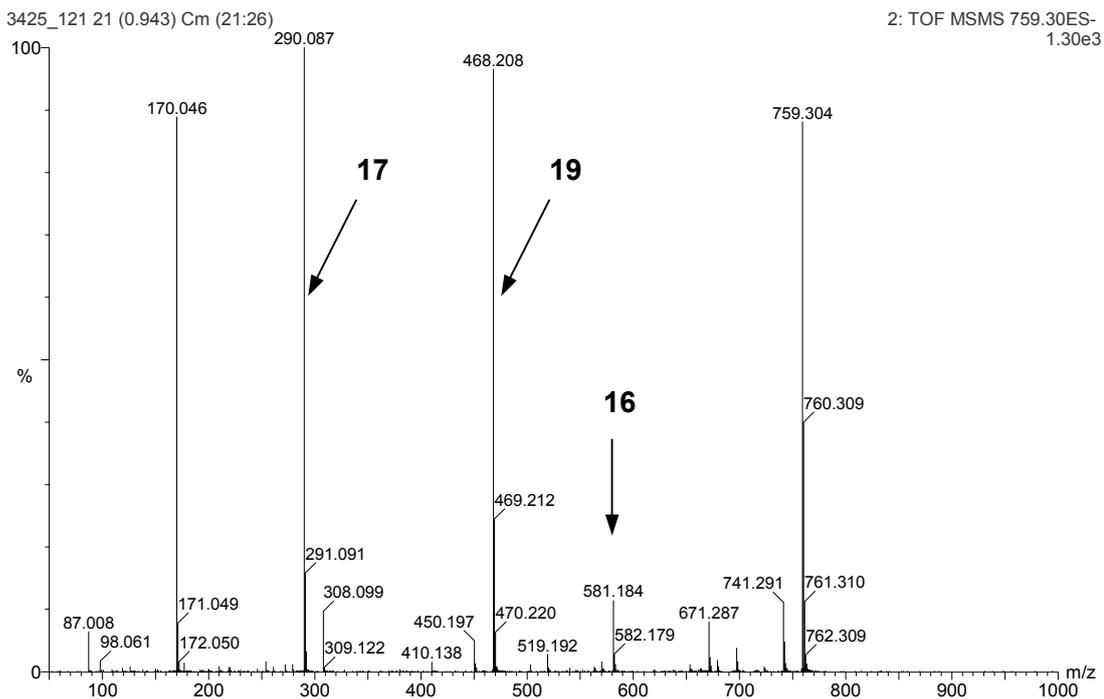


**Abbildung 23:** Strukturen der bei der Hydrolyse eines Hydrogels entstandenen möglichen Verbindungen mit dem gleichen Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z = 759.30$ ). Bei Verbindung **14** werden zwei Sialyleinheiten über den Linker miteinander verknüpft. Verbindung **15** dagegen wäre das Produkt einer unvollständigen Hydrolyse des Polymers.

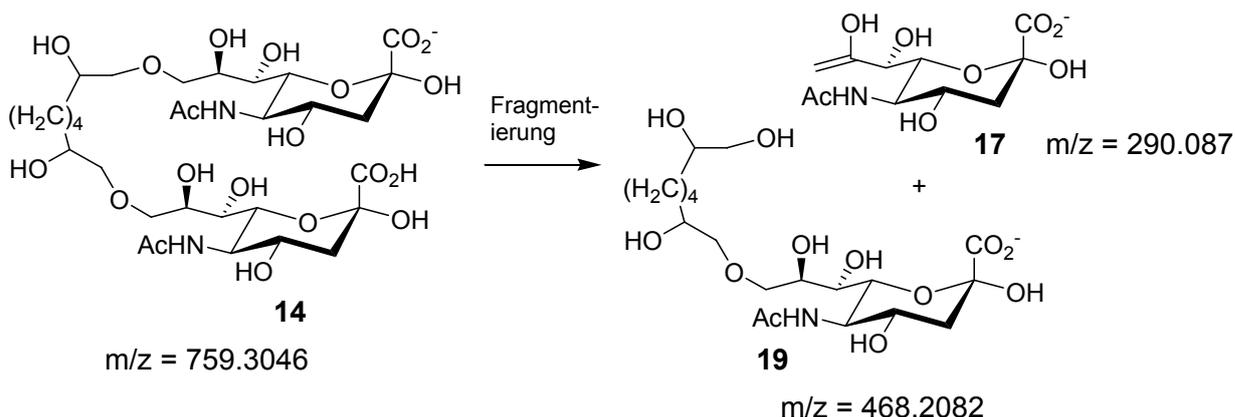
Um festzustellen, welche der beiden Verbindungen entstanden war, wurde eine LC-MS/MS Untersuchung vorgenommen. Dazu wurden die Moleküle mit  $m/z = 759.30$  nach einer Hydrolyse von 4 h und 6 h fragmentiert. Das Fragmentierungsspektrum (Abbildung 24) nach einer unvollständigen Hydrolyse von 4 h zeigt das Tochter-Ion **16** mit  $m/z = 581.1819$ . Dieses Fragment kann nur aus einer Verbindung zweier Sialinsäure-Moleküle stammen, die glycosidisch miteinander verknüpft sind und eine Linker-Einheit enthalten (Abbildung 25).



Während die Hydrolyse der glycosidischen Bindungen von 4 h nach 6 h weiter fortschreitet, verändert sich auch das Fragmentierungsmuster des Mutterions  $m/z = 759.30$  gravierend (Abbildung 26). Die Intensität des Fragments **16** mit  $m/z = 581.184$  sinkt deutlich und die der Fragmente **17** mit  $m/z = 290.087$  (dehydratisierte Sialinsäure) und **19** mit  $m/z = 468.208$  (Sialinsäure mit einer Linker-Einheit) steigt um das zwei- bis dreifache an. Diese starke Veränderung der Intensitäten zeigt, dass hier nun die Fragmentierung des für eine effektive Quervernetzung verantwortlichen Moleküls zu sehen ist: Die Verbindung aus zwei Sialinsäuren, die durch den Linker verbrückt werden (Abbildung 27).



**Abbildung 26:** LC-MS/MS Spektrum des Ions mit  $m/z = 759.30$  nach sechsständiger, nahezu vollständiger Hydrolyse der glycosidischen Bindungen.



**Abbildung 27:** Fragmentierung des Sialinsäure-Dimers **14**.

Die Bedeutung des verbrückten Sialinsäure-Dimers **14** wurde durch einen weiteren Versuch überprüft. Bei Verwendung von bis zu 3 Äquivalenten Monoepoxyoktan anstelle des Diepoxyoktans blieb der Reaktionsansatz flüssig. Dies zeigt, dass das Polysaccharid ausschließlich durch eine Molmassenerhöhung und nicht durch Vergrößerung der Hydrophobizität ein dreidimensionales, hydrophiles Netzwerk ausbilden kann. Abschließend muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass die zuvor durch ESI-MS ermittelten 9% der Verbindung **14** (Tabelle 3, S. 30) möglicherweise nicht vollständig zur Molmassenerhöhung beitragen. Das Abbauprodukt **14** kann zum einen aus einer intermolekularen Verknüpfung zweier Polysialinsäure-Ketten stammen, zum anderen aber auch durch intramolekulare Quervernetzung innerhalb einer einzigen Kette entstanden sein. Zwischen diesen beiden Arten der Quervernetzung kann nicht unterschieden werden.

### 3.3 Biologische Bewertung

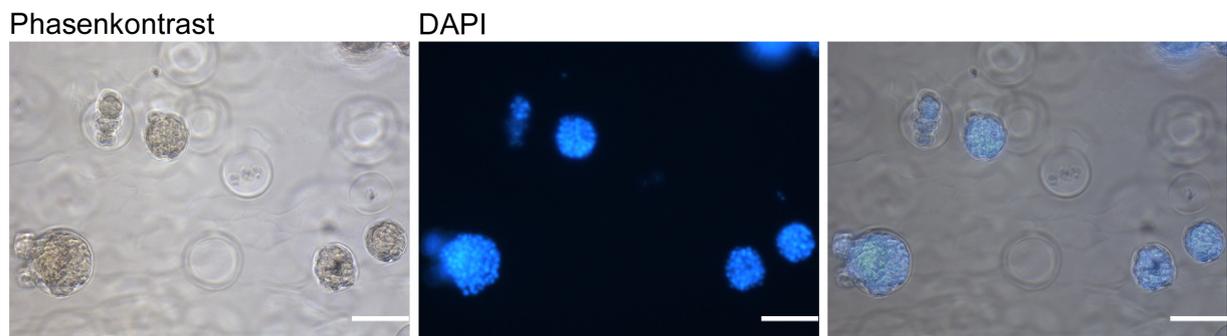
Neben der enzymatischen Abbaubarkeit stellt die Biokompatibilität eines Implantatmaterials die wichtigste biologische Eigenschaft dar. Zur biologischen Bewertung der synthetisierten Hydrogele wurden daher PC12 Zellen auf der Oberfläche des Materials kultiviert. Da die HG<sup>1.0</sup> Materialien neben dem beobachteten, langen enzymatischen Abbau auch eine geeignete Festigkeit aufwiesen und damit gut zu handhaben waren, wurden für die weitere Kultivierung der Zellen diese Matrizen verwendet.

PC12 Zellen wurden erstmals von Greene und Tischler aus einem Tumor des Nebennierenmarks einer Ratte im Jahre 1976 isoliert.<sup>82</sup> Es handelt sich um Vorläuferzellen, die bei der Kultivierung auf Kollagen und in Anwesenheit des Nervenwachstumsfaktors NGF

<sup>82</sup> L. A. Greene und A. S. Tischler, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1976**, 73, 2424-2428.

einen neuronalen Phänotyp aufweisen. PC12 Zellen ähneln sympathischen, peripheren Neuronen und wurden hier als Modellsystem für neuronale Zellen verwendet. Die Kultivierung und Differenzierung von PC12 Zellen auf den Polysialinsäure-Hydrogelen erfolgte für eine Bewertung der Matrizen als potenzielle Biomaterialien in der Nervenregeneration.

Die Kultivierung der PC12 Zellen wurde persönlich am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover vorgenommen. Die einzelnen Schritte der PC12-Kultivierung wurden nach einem Protokoll von J. van Bergeijk durchgeführt und für die spezielle Kultivierung auf den Hydrogelen modifiziert. Nach Sterilisation der Gele in 70%igem Ethanol wurden die PC12 Zellen 12 h unter Proliferationsbedingungen und weitere 3-6 d unter Differenzierungsbedingungen kultiviert. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) wurden die Zellen durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Zellen adhärten schlecht auf der Oberfläche der Gele. Morphologisch zeigten sie eine runde Form und wuchsen trotz vorheriger Vereinzelung in Zellverbänden. Das Wachstum neuronaler Ausläufer konnte im Gegensatz zur Kultivierung auf beschichteten Kulturschalen als Kontrolle nicht beobachtet werden (Abbildung 28).

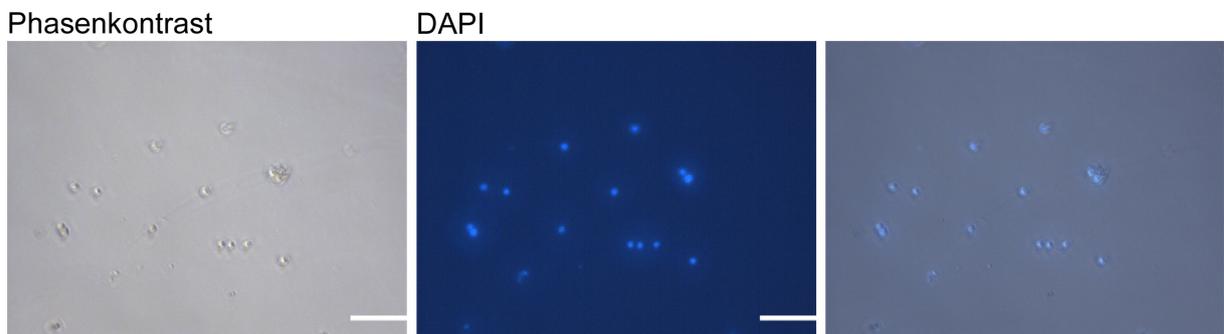


**Abbildung 28:** Kultivierung von PC12 Zellen auf der Oberfläche eines HG<sup>1.0</sup> Materials (Messbalken: 100  $\mu\text{m}$ ). Zellen konnten nur in den Vertiefungen beobachtet werden, die während der Reaktion durch die Emulsion der Diepoxyoktan-Tropfen in NaOH-Lösung entstanden. Die Mehrzahl der Zellen war nicht in der Lage auf dem Material zu adhären.

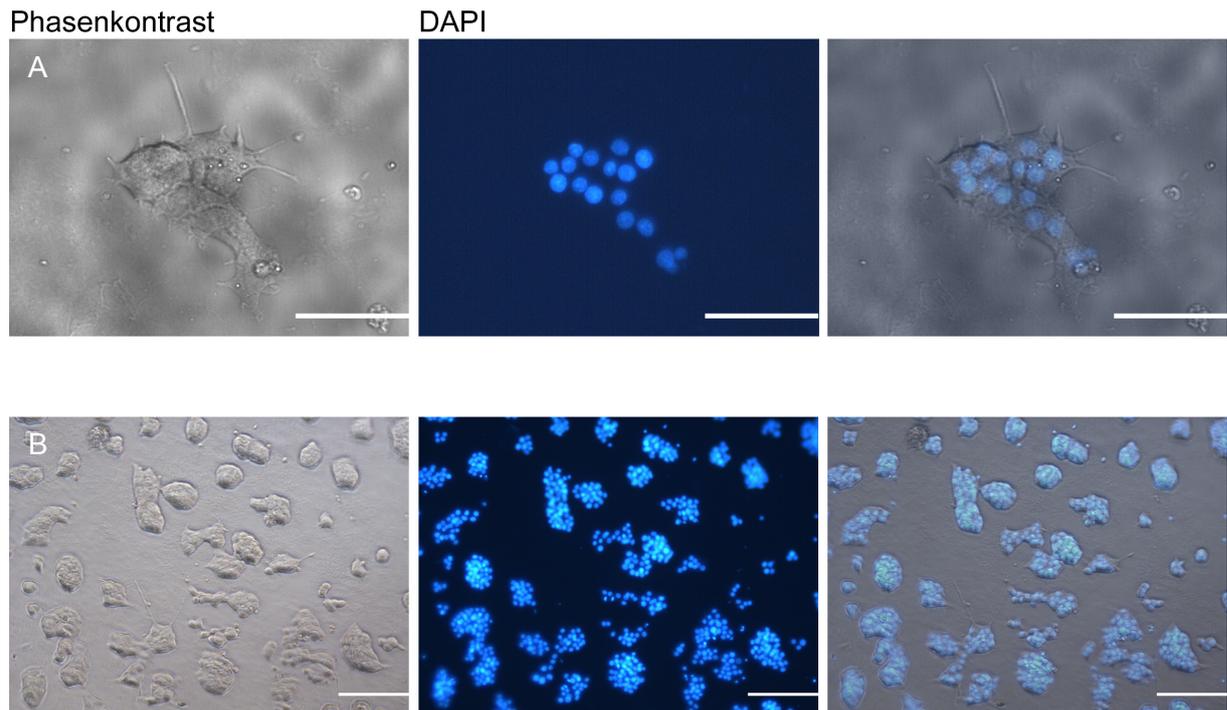
Die Gele wurden daher vor der Kultivierung in verschiedenen Proteinlösungen inkubiert, um die Oberfläche teilweise zu maskieren. Verwendet wurden Lösungen aus Poly-L-Lysin (PLL), Kollagen I, eine Mischung aus beiden und eine hochverdünnte Lösung von Matrigel. Letzteres stellt eine Mischung verschiedener Proteine aus der Extrazellulärmatrix dar, die konzentriert, bei 4 °C eine Flüssigkeit darstellt und beim Erwärmen auf Raumtemperatur ein

Gel bildet. Die Proteine werden durch ihre teilweise positiv geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche der negativ geladenen Polysialinsäure-Gele adsorbiert.

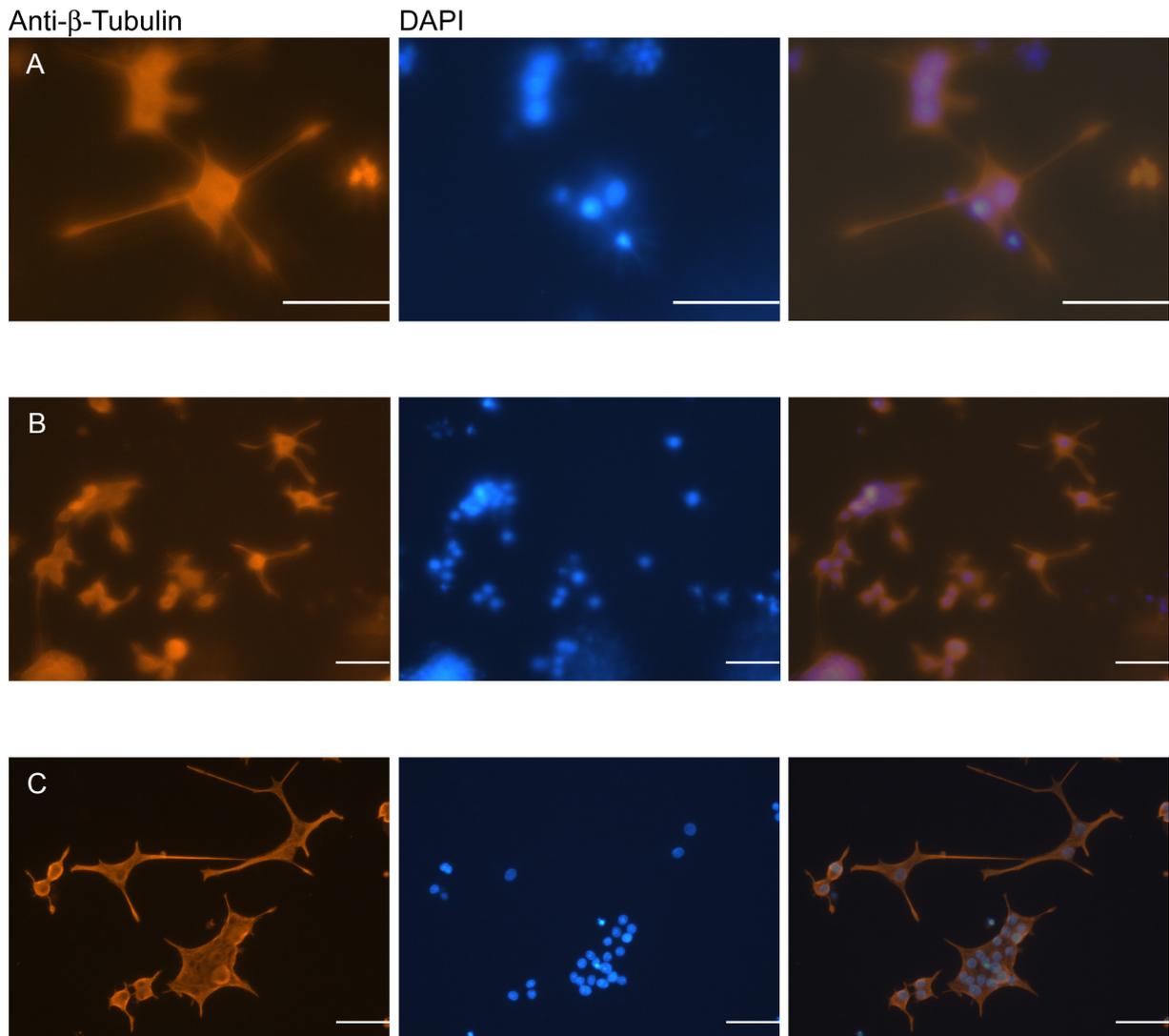
Die Ergebnisse der Zellkultur zeigten, dass durch Inkubation in PLL-Lösung die Adhäsion der Zellen nicht gesteigert werden konnte. Die Zellen konnten nur stark vereinzelt auf der Oberfläche beobachtet werden (Abbildung 29). Die Kultivierung auf Kollagen I, PLL/Kollagen I und Matrigel beschichteten Polysialinsäure-Hydrogelen deutete auf eine Steigerung der Adhäsion hin (Abbildung 30). Besonders für die Matrigel beschichteten HG<sup>1.0</sup> Materialien konnte nach optimierter Antikörperfärbung das Wachstum neuronaler Ausläufer beobachtet werden (Abbildung 31).



**Abbildung 29:** Kultivierung auf Poly-L-lysin (PLL) beschichteten Hydrogelen. Die Zellen sind zwar stark vereinzelt, können aber nicht auf dem Material adhären und bilden keine neuronalen Ausläufer.



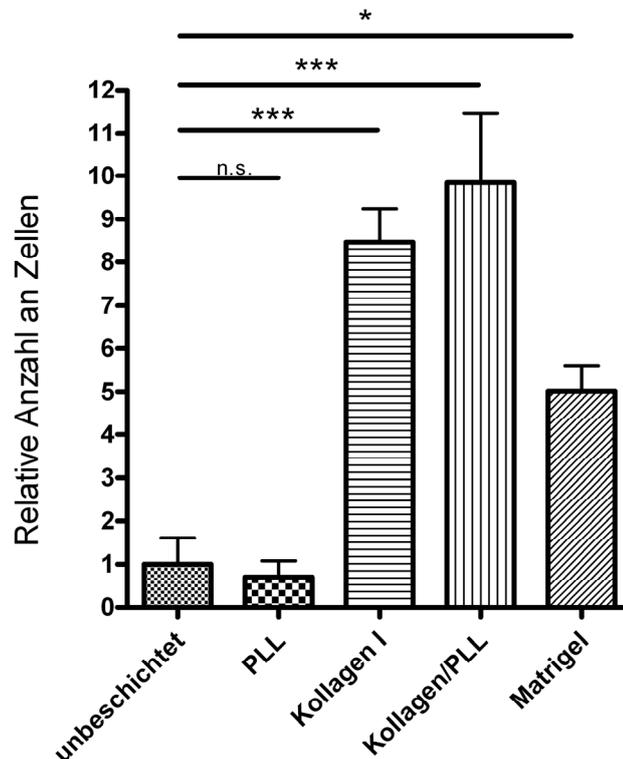
**Abbildung 30:** Morphologie der PC12 Zellen auf der HG<sup>1.0</sup> Oberfläche, die mit Kollagen I (A, Messbalken: 50  $\mu\text{m}$ ) oder einem Gemisch aus Kollagen I und PLL (B, Messbalken: 100  $\mu\text{m}$ ) maskiert wurde. Neuronale Ausläufer wurden verstärkt auf Kollagen beschichteten Oberflächen beobachtet. Die Tendenz von PC12 Zellen in kleineren Aggregaten zu wachsen, ist auch unter optimalen Zellkulturbedingungen zu beobachten, wurde jedoch auf den HG<sup>1.0</sup> Matrizen im Vergleich zur Kontrolle leicht gesteigert.<sup>82</sup>



**Abbildung 31:** PC12 Zellen auf HG<sup>1.0</sup>, das mit einer hochverdünnten Lösung Matrigel bestehend aus Komponenten der Extrazellulärmatrix vorinkubiert wurde (A, Messbalken: 40  $\mu\text{m}$ ; B, Messbalken: 50  $\mu\text{m}$ ). Zur Kontrolle wurden die Zellen auf Kollagen I beschichteten Zellkulturplatten im gleichen Zeitraum (24 h unter Proliferationsbedingungen und 6 d unter Differenzierungsbedingungen) kultiviert (C, Messbalken: 50  $\mu\text{m}$ ). Eine Anfärbung erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin (Zweitantikörper Alexa 555) und DAPI. Die Oberfläche der Gele konnte bei den ersten beiden Abbildungen nicht fokussiert werden, da die Hydrogele uneben waren.

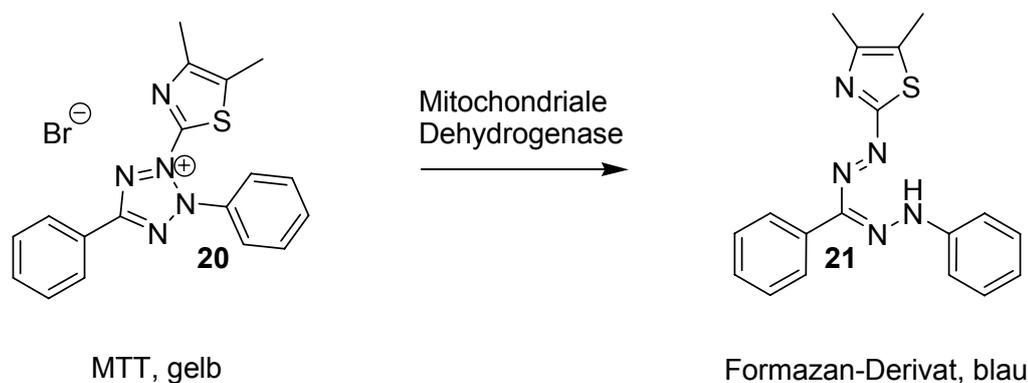
Zur weiteren Quantifizierung der Zelladhäsion wurden für jede einzelne Beschichtung drei weitere, unabhängige Experimente vorgenommen ( $n = 3$ ). Die PC12 Zellen wurden jeweils 24 h unter Proliferationsbedingungen und 72 h unter Differenzierungsbedingungen kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen und Färbung der Zellkerne wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop fünf aufeinander folgende Aufnahmen der Fläche  $21463 \mu\text{m}^2$  von jedem Gel angefertigt. Zellen mit intakten Zellkernen wurden gezählt und die Anzahl

anschließend auf die Zellzahl der Gele ohne Beschichtung normalisiert (unbeschichtet, Abbildung 32). Die Quantifizierung bestätigt die zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass die Inkubation mit dem positiv geladenen Polypeptid PLL keinen Einfluß auf die Adhärenz der Zellen hat. Die Dekoration mit dem Kollagen I Protein führte dagegen zu einem signifikanten Zuwachs an Zellen auf dem Gel. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Inkubation der Gele mit einer PLL/Kollagen I-Lösung. Die Inkubation des Gels mit Matrigel verbesserte ebenfalls die Zelladhäsion, die jedoch im Vergleich zur Beschichtung mit Kollagen I und Kollagen /PLL geringer ausfiel. Für die Differenzierung stellen Kollagen-beschichtete Oberflächen optimale Zellkulturbedingungen dar.<sup>82</sup> Die vergleichsweise verminderte Adhäsion auf Matrigel-beschichteten Gelen lässt sich auf das Aufschwimmen der Hydrogele während der Durchführung der Kultivierung, insbesondere bei der Zugabe des Mediums, zurückführen.



**Abbildung 32:** Quantifizierung der PC12 Zell-Adhäsion auf unbeschichteten und beschichteten HG<sup>1.0</sup> Materialien. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für  $n = 3$  angegeben. Der Vergleich der Werte erfolgte mit einem ANOVA-Verfahren und dem Dunn Post-hoc Test. Die Werte für PLL sind nicht signifikant (n.s.) im Vergleich zu den Ergebnissen der unbeschichteten Gele. Signifikanz wird mit \* (p-Wert ist kleiner als 0.05), \*\* (p-Wert ist kleiner als 0.01) und \*\*\* (p-Wert ist kleiner als 0.001) bezeichnet.

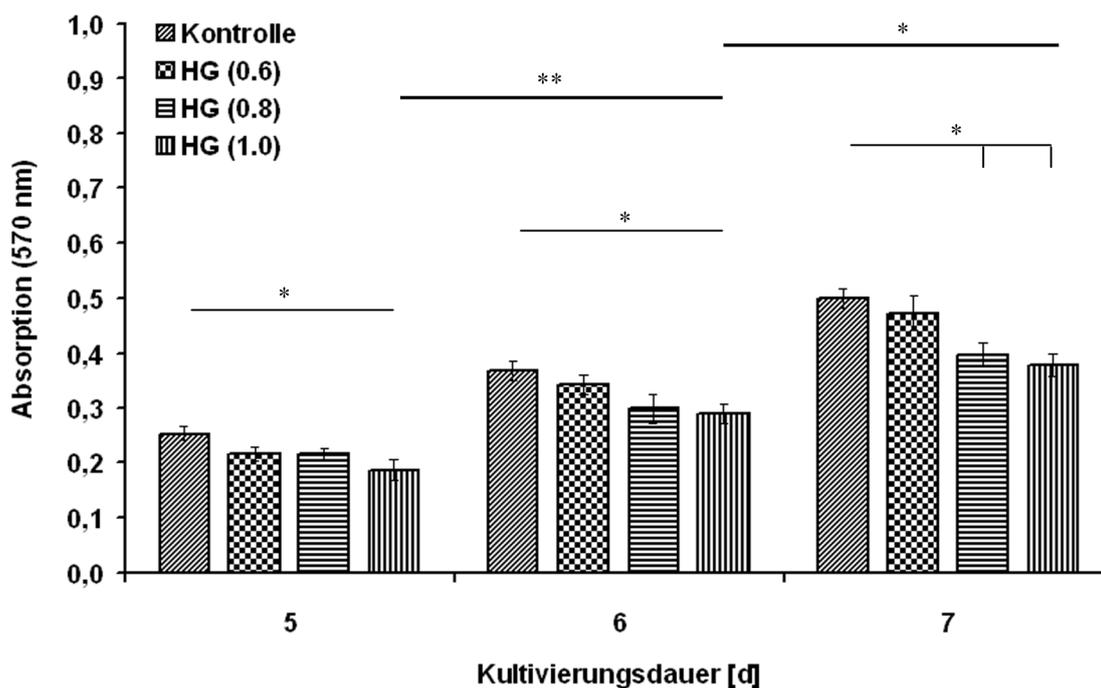
Zur weiteren Bewertung wurde ein Zytotoxizitätstest der Gele HG<sup>1.0</sup>, HG<sup>0.8</sup> und HG<sup>0.6</sup> durch Y. Stark (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt. Dazu wurden die PC12 Zellen zunächst 2 h auf PLL-beschichteten Kulturplatten kultiviert, mit den unterschiedlichen Hydrogele versetzt und in Anwesenheit der Gele über einen Zeitraum von 5-7 Tagen kultiviert. Die Hydrogele wurden anschließend aus den Wells entfernt und ein Viabilitätstest durchgeführt. Bei dem verwendeten Testsystem wird der Umsatz von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, **20**) durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu dem Formazan-Derivat **21** untersucht (Abbildung 33). Zellen, die eine hohe Viabilität aufweisen, setzen deutlich höhere Mengen des MTTs zu dem blauen Farbstoff um. Im Anschluss erfolgt eine photometrische Bestimmung der Absorption der Formazan-Lösungen bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die höchste Absorption wird erwartungsgemäß von Zellen erreicht, die unter optimalen Bedingungen kultiviert werden.



**Abbildung 33:** Umsatz des 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in den Mitochondrien zur Bestimmung der Viabilität von Zellen.

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Die höchste Umsatz wurde bei der Kultivierung der Zellen auf PLL beschichteten Polystyrol-Kulturplatten (Proliferationsbedingungen) erhalten, während die Hydrogele eine Verringerung der Viabilität verursachten. Bei den HG<sup>1.0</sup> Materialien ist diese Abnahme statistisch signifikant. Über den gesamten Zeitraum der Kultivierung steigt der Umsatz der mitochondrialen Dehydrogenase jedoch signifikant an. Die Gele sind daher nicht zytotoxisch. Offensichtlich scheint die hohe Ladungsdichte des festen HG<sup>1.0</sup> Materials einen Einfluss auf die Viabilität der PC12 Zellen zu haben. Ein verflüssigtes Gel gleicher Zusammensetzung, welches dem Institut für Neuroanatomie zur Verfügung gestellt wurde, zeigte keinen Einfluss auf die Viabilität primärer Schwann-Zellen.<sup>83</sup>

<sup>83</sup> Y. Haile, S. Berski, G. Dräger, A. Nobre, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn und C. Grothe, *Biomaterials*, **2008**, 29, 1880-1891.



**Abbildung 34:** MTT-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität der enzymatisch abbaubaren Hydrogele  $HG^{1.0}$ ,  $HG^{0.8}$  und  $HG^{0.6}$ . Der Assay wurde freundlicherweise von Y. Stark (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt. Die PC12 Zellen wurden in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit der Hydrogele auf PLL beschichteten Platten kultiviert. Der Vergleich der Werte erfolgte mit einem Mann-Whitney U Test bei Normalverteilung oder einem Student's two tailed t Test. Statistische Signifikanz wird mit \* (p-Wert ist kleiner als 0.05), \*\* (p-Wert ist kleiner als 0.01) und \*\*\* (p-Wert ist kleiner als 0.001) bezeichnet und wurde für  $HG^{1.0}$  (Tag 5, 6 und 7) and für  $HG^{0.8}$  (Tag 7) im Vergleich zur Kontrolle gefunden. Zusätzlich wurde ein signifikanter Anstieg der Viabilität bei gleichen Materialien von Tag 5 zu 6 und von Tag 6 zu 7 berechnet (im Detail: Tag 5 zu 6: \*\*\* Kontrolle, \*\*\*  $HG^{0.6}$ , \*  $HG^{0.8}$ , \*\*  $HG^{1.0}$ ; Tag 6 zu 7: \*\*\* Kontrolle, \*\*\*  $HG^{0.6}$ , \*  $HG^{0.8}$ , \*  $HG^{1.0}$ ). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nur das  $HG^{1.0}$  Material dargestellt.

In Zusammenarbeit mit Y. Haile (Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover) konnte in einer weiterführenden Studie gezeigt werden, dass auch bei primären Neuronen und Glial Zellen eine Beschichtung der  $HG^{1.0}$  Materialien essenziell ist und die Viabilität der kultivierten Zellen stark von einer Proteinmodifizierung abhängt. Besonders hohe Viabilitätswerte wurden auf Poly-L-ornithin/Laminin beschichteten Gelen für neonatale Schwann-Zellen, adulte Schwann-Zellen aus der Ratte und neuronale Stammzellen aus der Ratte unter Proliferationsbedingungen erhalten.<sup>83</sup>

Neben der Kultivierung von Zellen auf der Oberfläche der Materialien wurde die Abbaubarkeit der Hydrogele, die zuvor mit dem Protein Kollagen I adsorptiv modifiziert

worden waren, erneut überprüft. Eine Protein-Maskierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse. Eine Verflüssigung des Materials konnte innerhalb von 12 Tagen beobachtet werden.

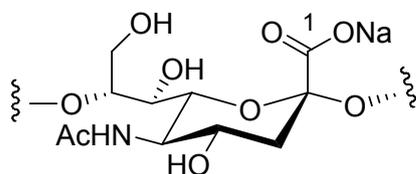
Die Ergebnisse aller biologischen Bewertungen weisen trotz weiterer notwendiger Derivatisierungen auf das große Potential der Polysialinsäure-Matrizen für eine spätere klinische Anwendung als Gerüstmaterial hin. Ein besonderer Vorteil besteht in der enzymatischen Abbaubarkeit des Materials, deren Hydrolysegeschwindigkeit je nach Notwendigkeit angepasst werden kann. Nach erfolgreicher Regenerierung des Nervengewebes wären so weitere medizinische Eingriffe, wie es bei Silikon-Implantaten der Fall ist, nicht erforderlich.

### 3.4 Modifikation der linearen Polysialinsäure-Kette

Die hohe Löslichkeit des nativen Polymers stellt ein besonderes Problem bei der Herstellung dreidimensionaler Matrizen dar. Polysialinsäure kann zwar z.B. durch Gefriertrocknung in poröse, schwammähnliche Formen verarbeitet werden, wird jedoch in Wasser schnell wieder in Lösung gehen. Aus diesem Grund wird es diese Struktur auch im Körper nicht beibehalten und vom Gewebe resorbiert werden. Darüber hinaus sind weitere biologische Bewertungen des Grundmaterials durch Kultivierung von Zellen nur erschwert möglich, da Zellkultur-Platten aus Polystyrol hergestellt werden und Polysialinsäure aufgrund seiner Eigenschaften nicht auf dem Boden dieser Platten adhärert. Eine Möglichkeit die Eigenschaften der Polysialinsäure in gewünschter Weise zu verändern, ist die direkte chemische Derivatisierung. Diese Modifizierungen müssen auf der einen Seite zu veränderten Materialeigenschaften führen, dürfen aber auf der anderen Seite nicht die biologische Aktivität, wie z.B. Biokompatibilität und Abbaubarkeit, inhibieren. In dieser Arbeit sollte daher nach erfolgter Derivatisierung auch die biologische Eigenschaft überprüft werden.

#### 3.4.1 C-1-Modifizierung der Polysialinsäure

Die C-1-Modifizierungen dienten vor allem dem Zweck die Löslichkeit durch Herabsetzen der negativen Ladung zu beeinflussen. Ein geplantes Derivat war zunächst der Methylester, der



mit Hilfe von Diazomethan in saurer methanolischer Lösung hergestellt werden sollte.

Bereits während der Diplomarbeit wurden die Bedingungen an der freien Sialinsäure getestet und führten hier zu einem vollständigen Umsatz. Bei dem Polymer wurde unter den gleichen

Bedingungen sowie in Lösungsmitteln wie DMF und DMSO im  $^{13}\text{C}$ -NMR eine vollständige Verschiebung des C-9 ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) Kohlenstoffs zu tieferem Feld beobachtet. Es erfolgte unter saurer Katalyse ein vollständiger Umsatz zum Lacton **23** erfolgt (Abbildung 35). Auch das Öffnen dieses Lactons durch Natriummethanolat in trockenem Methanol führte nicht zur gewünschten Ringöffnung des Lacton, sondern nach längerer Reaktionszeit lediglich zur Hydrolyse. Auch durch mehrtägige Gefriertrocknung konnte das Polymer nicht von seinem Restwassergehalt befreit werden. Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht eine Umsetzung unter neutralen Bedingungen durchzuführen.

Eine Veresterung wurde zunächst am Monomer erprobt. Hier wurde Sialinsäure (**18**) in das Cäsium-Salz überführt und anschließend mit Benzylbromid zum Benzylester in einer

Ausbeute von 77% umgesetzt (Abbildung 36).<sup>84</sup> Beim Polymer erfolgte die Herstellung des Cäsiumsalzes durch Dialyse gegen CsCl-Lösung. Eine Umsetzung unter den zuvor getesteten Bedingungen gelang jedoch auch bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel und höheren Temperaturen nicht (Abbildung 37).

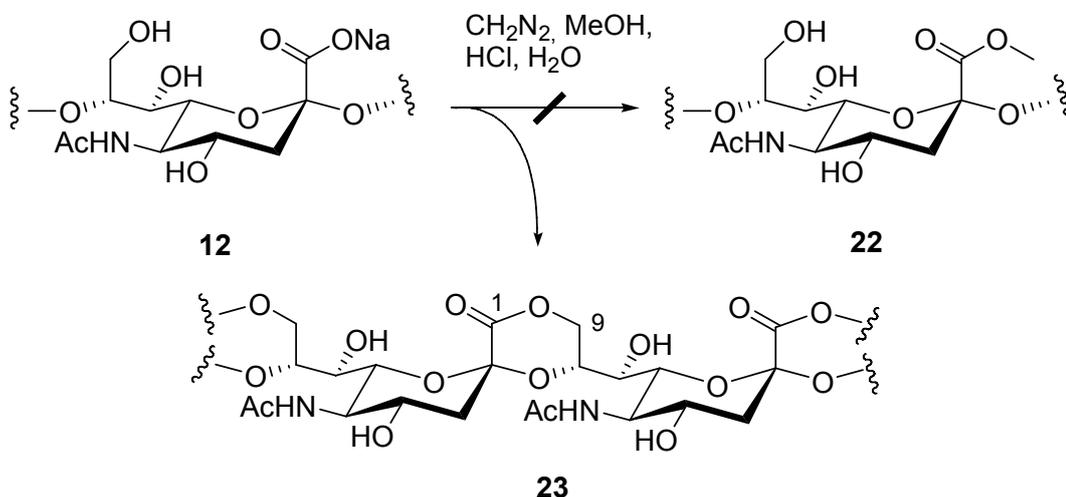


Abbildung 35: Reaktion der Polysialinsäure (12) unter sauren Bedingungen.

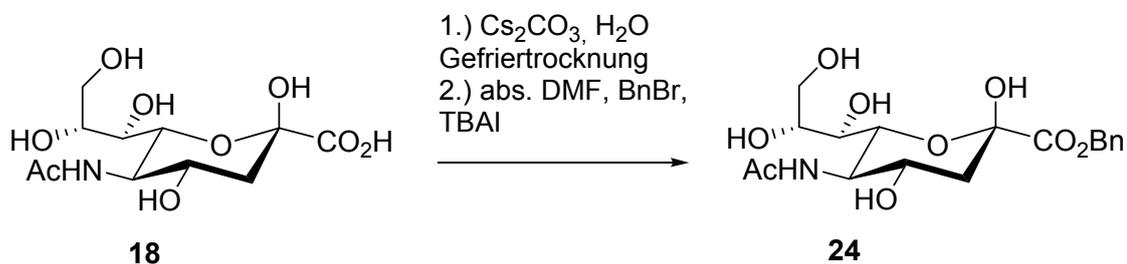


Abbildung 36: Überführung der Sialinsäure (18) in das Cäsiumsalz und anschließende Umsetzung zum Benzylester (24).

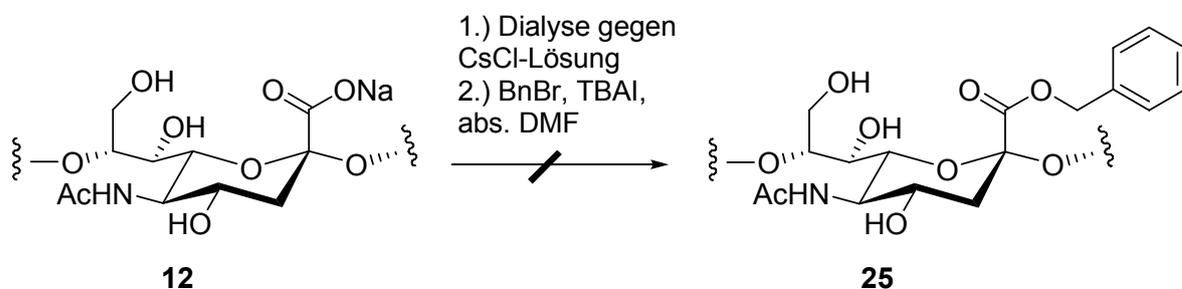
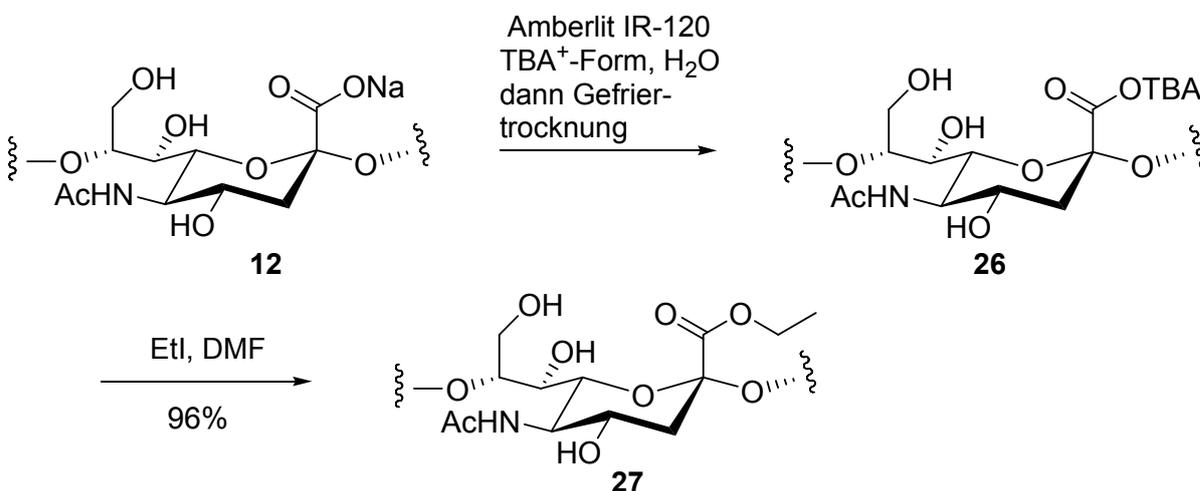


Abbildung 37: Erfolgreiche Umsetzung der Polysialinsäure Cs-Salz mit Benzylbromid.

<sup>84</sup> H. Ogura, K. Furuhashi, S. Sato, K. Anazawa, M. Itoh und Y. Shitori, *Carbohydr Res*, **1987**, 167, 77-86.

Der Grund für die erfolglose Veresterung konnte nur in der schlechten Löslichkeit des geladenen Polymers in den verwendeten organischen Lösungsmitteln liegen. Daher wurde eine Reihe ionischer Flüssigkeiten verwendet, die sowohl auf Imidazolium-Kationen als auch auf Pyridinium-Verbindungen mit variierenden Gegenionen basierten. Die Versuche zeigten, dass sogar die Polarität der ionischen Flüssigkeiten nicht ausreichte, um Polysialinsäure in Lösung zu bringen. Umsetzungen unter den neutralen Bedingungen konnten nicht beobachtet werden.

Daher wurde auf eine andere Strategie zurückgegriffen: Das relativ harte Natrium-Gegenion der Polysialinsäure sollte gegen ein voluminöses, hydrophobes Kation ausgetauscht werden, um als Löslichkeitsvermittler zwischen dem hydrophilen Polymer und dem organischen Lösungsmittel zu fungieren. Als Gegenion wurde das Tetrabutylammonium-(TBA)-Ion ausgewählt. Zur Überführung der Polysialinsäure von der  $\text{Na}^+$ - in die  $\text{TBA}^+$ -Form wurde ein Ionenaustauscher-Harz verwendet. Die Verwendung eines Harzes bot den Vorteil weitaus weniger Reagenz verwenden zu können, als es bei einer Dialyse gegen die entsprechende Salzlösung der Fall gewesen wäre. Die  $\text{H}^+$ -Ionen eines Amberlit IR-120 Harzes wurden zunächst gegen  $\text{Na}^+$ - und anschließend gegen  $\text{TBA}^+$ -Ionen ausgetauscht. Die Überführung in die  $\text{Na}^+$ -Form war notwendig, um Säurespuren im TBA-beladenen Harz zu vermeiden. Diese hätten eine Umsetzung der Polysialinsäure (**12**) in das Polysialinsäure-Lacton (**23**, Abbildung 35) bewirkt. In der  $\text{TBA}^+$ -Form war Polysialinsäure vollständig in DMF löslich und konnte in einer Ausbeute von 96% in den Ethylester überführt werden (Abbildung 38).

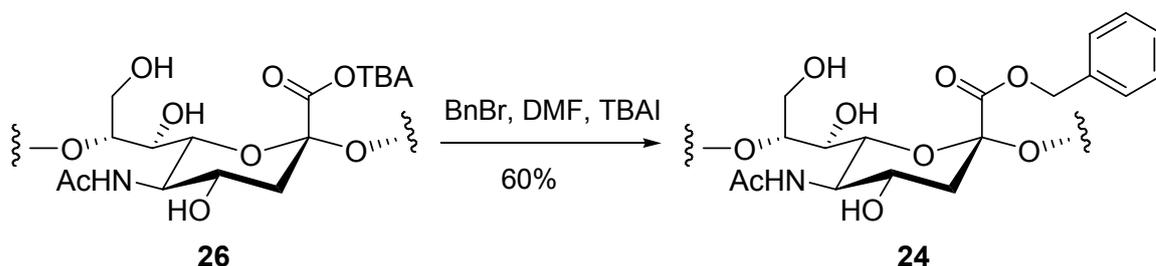


**Abbildung 38:** Darstellung des Polysialinsäure-Ethylester (**27**).

Auf diese Weise konnte auch der Polysialinsäure-Benzylester (**24**, Abbildung 39) hergestellt werden. Hier war die Ausbeute jedoch geringer (60%). Eine Erklärung dafür ist, dass der

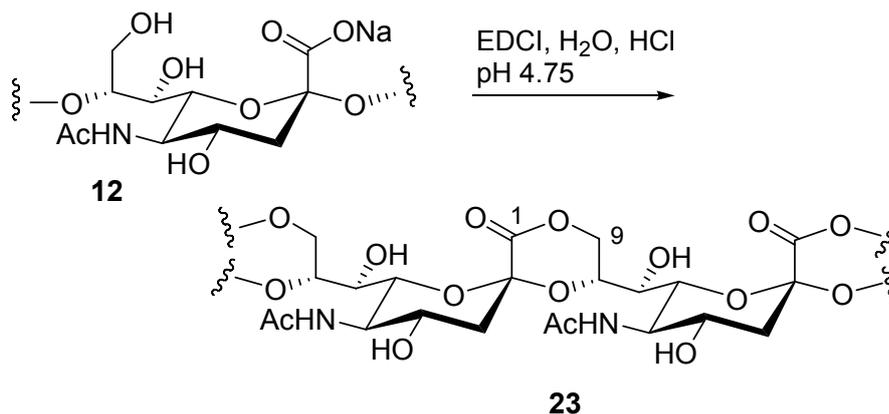
Benzylrest deutlich größer als der Ethylrest ist und es möglicherweise zu sterischen Hinderungen mit dem Polymer-Rückgrat kommt.

Bei beiden Estern konnte in wässriger Lösung und bei einem pH Wert von 7.0 über einen Zeitraum weniger Stunden eine vollständige Hydrolyse zur Polysialinsäure beobachtet werden. Die unerwartete Instabilität der Ester könnte auf eine Reaktion mit der direkt benachbarten Hydroxyl-Gruppe an C-9 zurückzuführen sein. Zusammenfassend wurde durch die Derivatisierung zwar die negative Ladung herabgesetzt, nicht aber die erforderliche Stabilität in wässriger Lösung erhalten. Die Ester sind daher für eine weitere Verarbeitung zu dreidimensionalen Netzwerken nicht geeignet.



**Abbildung 39:** Herstellung des Polysialinsäure-Benzylesters (**24**).

Weitere synthetisierte Derivate waren C-1-Amid-Verbindungen der Polysialinsäure. Dazu wurde PolySia erst durch Carbodiimid-Kupplung vollständig in das Lacton überführt (Abbildung 40).<sup>85</sup>

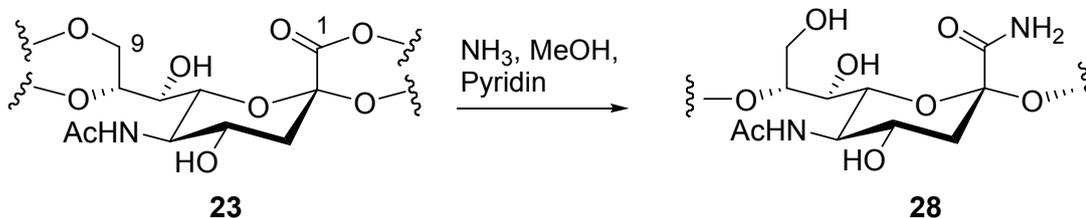


**Abbildung 40:** Überführung in das Polysialinsäure-Lacton (**23**) durch Carbodiimid-Kupplung.

Anschließend sollte das Lacton mit  $\text{NH}_3$  in Methanol geöffnet werden. Erste Versuche mit variierenden Äquivalenten an  $\text{NH}_3$  und verschiedenen Temperaturen brachten auch hier

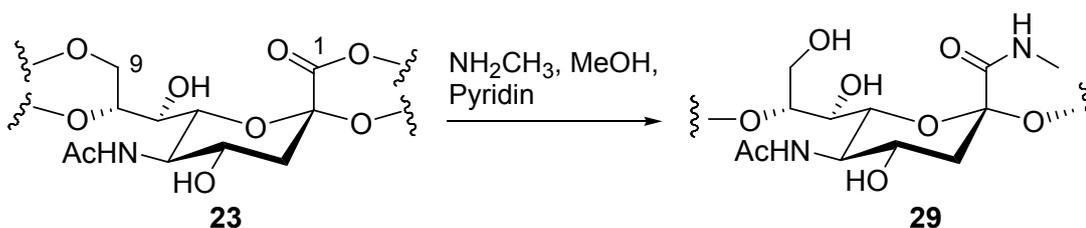
<sup>85</sup> M. R. Lively, A. S. Gilbert und C. Moreno, *Carbohydr Res*, **1981**, *94*, 193-203.

keinen Umsatz des Lactons. Erst durch Zugabe von Pyridin konnte die Polarität des Lösungsmittel soweit angepasst werden, dass sich das Polymer löste. Die Ausbeute des C1-NH<sub>2</sub>-Amids der Polysialinsäure (**28**) war mit Zusatz dieses für die Reaktion ungewöhnlichen Lösungsmittels quantitativ.



**Abbildung 41:** Umsatz des Polysialinsäure-Lactons (**23**) zum C-1-NH<sub>2</sub>-Amid (**28**).

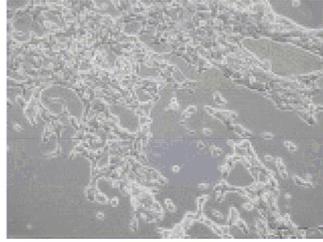
Auf diese Weise konnte zusätzlich auch das C-1-NHCH<sub>3</sub>-Amid hergestellt werden (Abbildung 42). Sekundäre Amine wie NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> waren nicht nukleophil genug, um das Lacton anzugreifen.



**Abbildung 42:** Umsatz des Polysialinsäure-Lactons (**23**) zum C-1-NHCH<sub>3</sub>-Amid (**29**).

Die Derivate waren wasserunlöslich und über mehrere Monate bei pH 7.4 stabil, konnten jedoch durch eine hohe Dosis des Enzyms EndoNF\* und über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen hydrolysiert werden. So wurde durch die chemische Derivatisierung zwar die Stabilität des Polymers erhöht, nicht aber die wichtige biologische Eigenschaft der Abbaubarkeit erhalten.

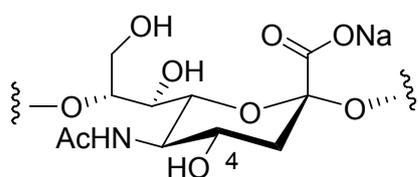
Das Polymer wurde dem Institut für Kautschuktechnologie e.V. zur Verfügung gestellt. Hier konnte es gelöst in DMSO durch einen Elektrosponning-Prozess in ein faserförmiges, dreidimensionales Gerüstmaterial verarbeitet werden. Zellkultivierungen durch das Institut für Technische Chemie konnten zeigen, dass immortalisierte Schwann-Zellen in der Lage waren, entlang der Faser dieses Amid-Derivats zu adhären. Diese gesteigerte Adhäsion der Zellen ist durch die Eliminierung der negativen Ladung der Polysialinsäure zu erklären, die nun ähnlich wie bei der Kultivierung von L929 Zellen auf einem 100% derivatisierten Hyaluronsäure-Benzylester (Abschnitt 1.4.3) eine normale Morphologie aufwies.



**Abbildung 43:** Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme immortalisierter Schwann-Zellen kultiviert auf einer dreidimensionalen Faser bestehend aus Celluloseacetat und dem Polysialinsäure-C-1-NH<sub>2</sub>-Amid (Kultivierung durch das Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover; Herstellung der Faser durch Ulrike Assmann, Institut für Kautschuktechnologie e.V., Hannover).

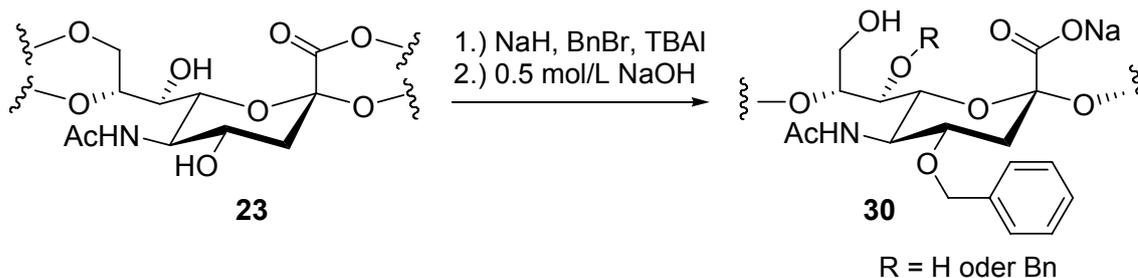
### 3.4.2 Substitutionen der OH-Gruppen der Polysialinsäure

Die in dem vorherigen Abschnitt beschriebenen Reaktionen konnten aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität des Carboxylats gegenüber den Hydroxylgruppen selektiv durchgeführt werden. Im folgenden sollte nun überprüft werden, ob auch die Reaktivität der



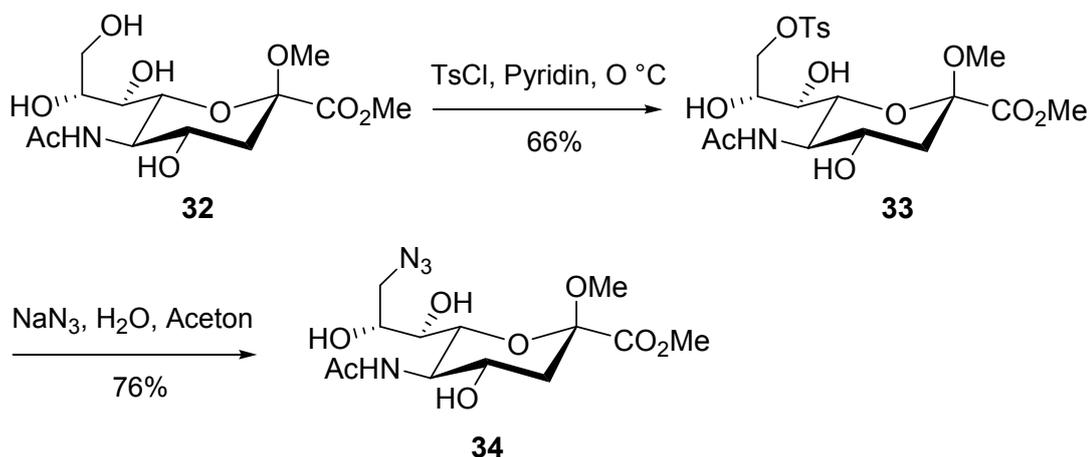
C-4-, C-7- und C-9-Hydroxylgruppen des Polymers so große Reaktivitätsunterschiede aufweisen, dass sie selektiv an nur einer Position jeder Sialinsäure-Einheit entlang der Kette derivatisiert werden können. Auch hier war erneut das Ziel, einen definierten Derivatisierungsgrad einzustellen und

die Hydrophobizität des Polymers zu erhöhen. Die Hydroxylgruppe an C-4 sollte als erstes mit hydrophoben Resten derivatisiert werden. Um zum einen die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu erhöhen und zum anderen die primäre OH-Gruppe an C-9 zu schützen, wurde Polysialinsäure in das entsprechende Lacton (**23**) überführt. Eine anschließende Umsetzung mit NaH, BnBr und katalytischen Mengen TBAI in DMF konnte bei Verwendung von 1 bis 3 Äquivalenten NaH nicht beobachtet werden. Erst unter Einsatz von 5 Äquivalenten NaH konnten annähernd eine Benzylgruppe pro Sialylrest eingeführt werden (Abbildung 44). Die NMR-spektroskopische Untersuchung nach der Verseifung in 0.5 mol/L NaOH zeigte jedoch doppelte  $^{13}\text{C}$ -Signale des C-2-, C-9-, C-5- und ein breites Signal bei 38-40 ppm des C-3-Kohlenstoffs. Alle anderen Signale konnten nicht zugeordnet werden. Eine zusätzlich durchgeführte ESI-MS-Untersuchung des Polymers **30**, das bei der hohen Spannung während der Messung in einzelne Sialylfragmente zerfällt, bestätigte zusätzlich die geringe Selektivität zwischen den Hydroxylgruppen an C-4 und C-7. Bei der Reaktion des Polymers mit NaH und EtI in DMF konnte zwar ein Derivatisierungsgrad von 60% erhalten werden, eine selektive Ethylierung der Hydroxyl-Gruppe an C-4 wurde jedoch nicht beobachtet. Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte neben monoethylierten Verbindungen ebenfalls disubstituierte Sialyl-Einheiten.



**Abbildung 44:** Umsetzung des Polysialinsäure-Lactons (**23**) mit Benzylbromid zur Verringerung der Hydrophilie des Polymers. Die Hydroxylgruppen an C-4 und C-7 weisen nur geringe Reaktivitätsunterschiede auf.

Im folgenden sollte die vermeindlich reaktivste der OH-Gruppen - die primäre Hydroxyl-Gruppe des Polymers - derivatisiert werden. Diese Gruppe sollte in ein Azid überführt werden und die Bedingung hierfür zunächst am Monomer optimiert werden. Um dieses Ziel in möglichst wenigen Reaktionsschritten zu erreichen und damit ein einheitliches Produkt zu erhalten, wurde versucht, Sialinsäure durch Mitsunobu-Reaktion in einem Schritt zu derivatisieren. Aber auch eine Reihe von Bedingungen führten nicht zu dem gewünschten Produkt. Daher musste das Methyl-Glycosid **32** der Sialinsäure zunächst in das entsprechende Tosylat **33** überführt werden und konnte anschließend in das Azid **34** überführt werden (Abbildung 45).<sup>86</sup>

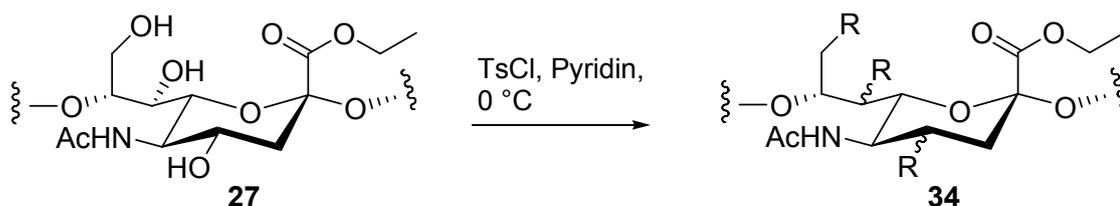


**Abbildung 45:** Überführung der Sialinsäure in das Tosylat **33** und weitere Umsetzung zum Azid **34**.

Die gleiche Methode sollte nun beim Polymer angewendet werden. Hier wurde der zuvor hergestellte Polysialinsäure-Ethylester (**27**) als Edukt verwendet, da er in einem hohen Derivatisierungsgrad von 96% vorlag. Da in diesem Fall die negative Ladung weitgehend

<sup>86</sup> R. Isecke und R. Brossmer, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 7445-7460.

eliminiert worden war, konnte das Polymer vollständig in Pyridin gelöst werden. Das Edukt **27** wurde analog zu der Reaktion des Monomers zum Tosylat **35** umgesetzt (Abbildung 46). Die Optimierung erfolgte, wie auch bei anderen Derivatisierungen des Polymers, in Einzelversuchen, da der Reaktionsfortschritt nicht durch Dünnschicht-Chromatographie überprüft werden konnte. Tabelle 4 zeigt, dass bei Verwendung von 1.0 und 1.5 Äquivalenten Tosylchlorid lediglich 17% und 32% Tosyl-Gruppen eingeführt werden konnten. Hier wird die verminderte Reaktivität des Polymer deutlich.



**Abbildung 46:** Umsetzung des Polysialinsäure-Ethylesters (**27**) zu einer tosylierten Verbindung **34** (R = H oder Ts).

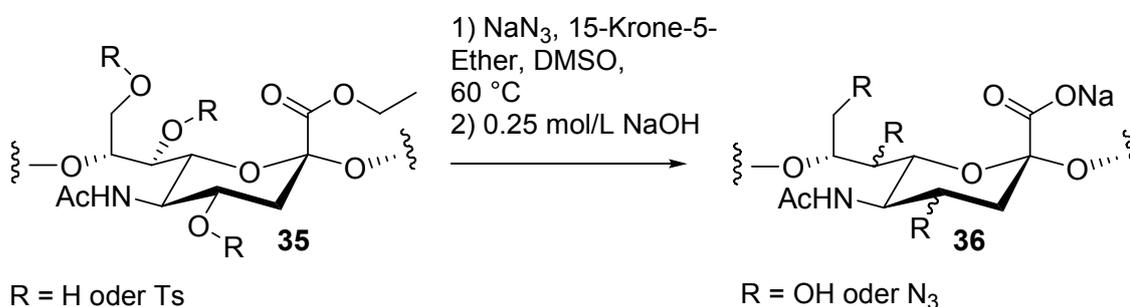
Reaktion	Äquivalente TsCl	Derivatisierungs- grad
1	1.0	17%
2	1.5	32%
3	2.0	65%
4	2.5	98%

**Tabelle 4:** Optimierung zur Einführung einer Tosyl-Gruppe entlang der Polymerkette.

Ein besonderes Problem stellte die saubere Isolierung der Substanz dar: Das Polymer konnte nicht durch Dialyse gegen dest. H<sub>2</sub>O gereinigt werden, da der instabile Ethylester **27** schnell hydrolysiert worden wäre. In einer anschließenden S<sub>N</sub>2-Reaktion wäre dann das Tosylat nicht durch das Azid, sondern durch die benachbarte Hydroxyl-Gruppe an C-9 substituiert worden. Eine Bildung des Polysialinsäure-Lactons (**23**) wäre die Folge gewesen. Daher musste das Rohprodukt, das durch Anhaften von hydrolysiertes, überschüssiger p-Toluolsulfonsäure die Konsistenz einer kleberartigen Substanz besaß, durch Ausfällung gereinigt werden. Die Substanz wurde in verschiedenen Lösungsmitteln wie Dichlormethan, THF und Essigester im Ultraschallbad suspendiert, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch alleiniges Suspendieren konnte das Polymer jedoch nicht von der

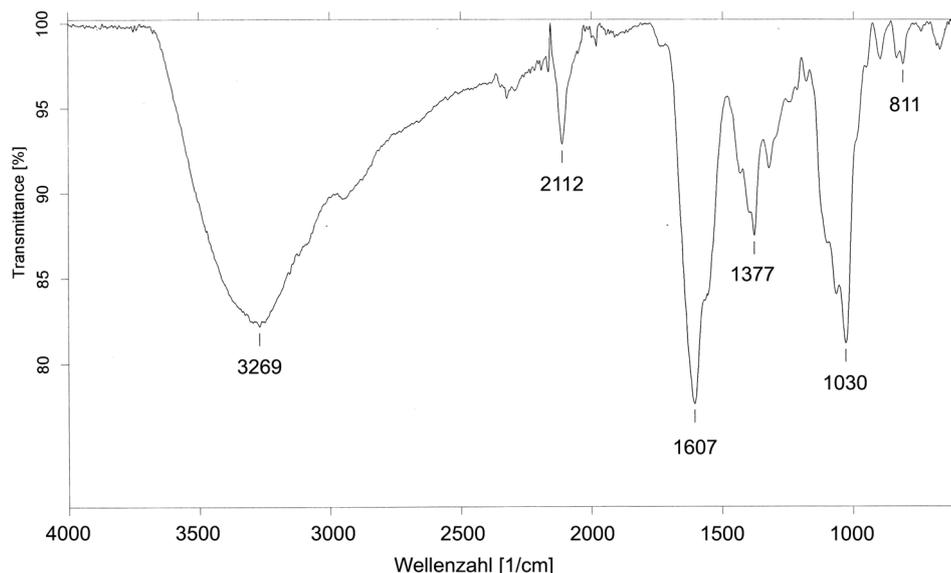
Verunreinigung getrennt werden. Das orange-rote Rohprodukt wurde daher in DMSO gelöst und konnte erst mit einer Mischung aus THF und MTB-Ether als leicht gelblicher Feststoff ausgefällt werden. Nach mehrfacher Behandlung wurde in einer Ausbeute von 54% und einem Derivatisierungsgrad 98% ein sauberes Produkt erhalten.

Im Anschluss erfolgte die Umsetzung zum Polysialinsäure-Azid (**36**, Abbildung 47). Anstelle des Aceton/Wasser Gemisches bei der Reaktion des Monomers wurde aufgrund der Instabilität des Esters abs. DMSO benutzt. Die Substanz wurde mit 0.25 mol/L NaOH nachbehandelt, um zum einen den Ester zu hydrolysieren und zum anderen restliche, nicht abreagierte Tosyl-Gruppen abzuspalten. Die Substanz konnte anschließend durch Dialyse sauber isoliert werden.



**Abbildung 47:** Reaktion des Polysialinsäure-Tosylat (**35**) und zum Azid **36**. Bei der Umsetzung mit Natriumazid wurde als Lösungsmittel DMSO anstatt des Aceton/Wasser-Gemisches verwendet, da der Ethylester instabil in Wasser ist.

Der Derivatisierungsgrad war bis zu diesem Punkt unbekannt. Ein Vergleich der IR-Spektren des Reaktionsproduktes und reiner Polysialinsäure zeigte deutlich die Anwesenheit einer Azid-Gruppe. Durch Verlängerung der Reaktionszeit von 24 h auf 48 h konnte der Umsatz weiter gesteigert werden. Die Intensität der Azid-Bande ( $2112\text{ cm}^{-1}$ ) ließ dennoch auf einen geringeren Substitutionsgrad schließen.



**Abbildung 48:** IR-Spektrum des hergestellten Polysialinsäure-Azids (**36**). Die Azid-Bande bei  $2112\text{ cm}^{-1}$  ist eher von geringer Intensität, während sie bei dem Monomer ebenso intensiv wie die Carbonyl-Bande ist. Der Substitutionsgrad ist daher gering.

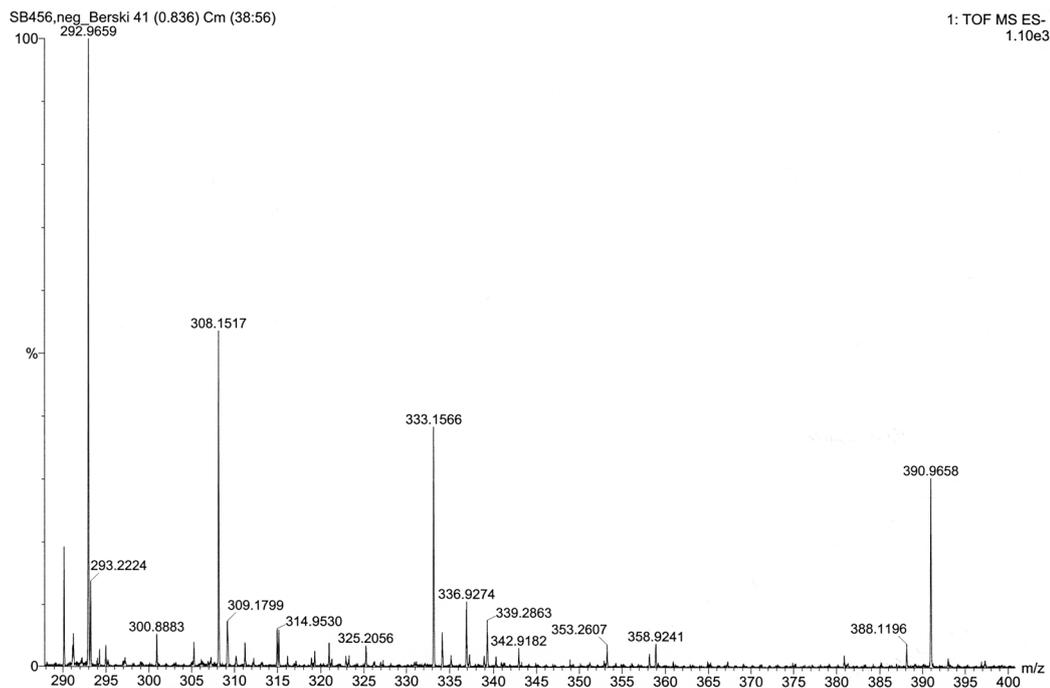
Um den tatsächlichen Derivatisierungsgrad zu bestimmen, sollte die Substanz daher zu den (derivatisierten) Sialinsäure-Monomeren hydrolysiert werden.

Eine Hydrolyse unter sauren Bedingungen wurde aus diesem Grund am nativen Polymer getestet. Zunächst wurde versucht das stabile Methylglycosid der Sialinsäure in HCl-haltigem abs. Methanol herzustellen (Tabelle 5, Reaktion 1). Ein Umsatz war jedoch aufgrund der bekannten Löslichkeitsprobleme des Polymers **12** nicht vorhanden. In wässriger, saurer Lösung konnte dagegen eine Hydrolyse beobachtet werden. Im Gegensatz zu allen anderen Reaktionen am Polymer konnte hier die Entstehung der Sialinsäure-Monomere per Dünnschichtchromatographie in einem polaren Laufmittel überprüft werden. Aber auch bei einer sauren Hydrolyse von bis zu 12 h, bei hohen Temperaturen und unter Variation der Säuren und ihrer Konzentrationen konnte laut DC- und  $^1\text{H-NMR}$ -Kontrolle keine vollständige Hydrolyse erreicht werden (Tabelle 5). Wurde die Reaktion länger als 12 h erhitzt trat Zersetzung ein. Erst die Verwendung von 1 M Trifluoressigsäure zeigte den Grund für die Unvollständigkeit der Reaktion: Unter Verwendung hoher Säurekonzentration konnte bereits nach 1 h die Entstehung eines farblosen, voluminösen Feststoffes beobachtet werden, der in DMSO löslich war und laut  $^{13}\text{C-NMR}$  das Polysialinsäure-Lacton (**23**) darstellte. Dieses Lacton war wegen seiner Unlöslichkeit in Wasser stabil gegenüber Säureangriffen. Bei weniger konzentrierten Säurelösungen entstand es in geringeren Mengen, konnte daher nicht beobachtet werden und wurde nach der anschließenden Neutralisation mit NaOH-Lösung (pH 7 – 8) sofort geöffnet. Im  $^1\text{H-NMR}$  konnten daher Polysialinsäure-Oligomere beobachtet werden.

Reaktion	Bedingung	Beobachtung
1	AcCl, MeOH, 64 °C	keine Reaktion
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MeOH, 64 °C	keine Reaktion
3	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
4	0.2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O/MeOH, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
5	0.2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, 100 °C	Zersetzung
6	0.5 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, 80 °C	Zersetzung
7	H <sub>2</sub> O, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2-3, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
8	0.1 M HCl in H <sub>2</sub> O, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
9	0.2 M HCl in H <sub>2</sub> O, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
10	1 M TFA, 80 °C	kaum Hydrolyse
11	0.5 M TFA, 80 °C	unvollständige Hydrolyse
12	0.1 M TFA, 80 °C	Hydrolyse

**Tabelle 5:** Reaktionsbedingungen bei der Optimierung der Hydrolyse der Polysialinsäure.

Um dennoch eine vollständige Hydrolyse zu erreichen, wurde die Reaktion bei 80 °C in 0.1 M TFA nach ca. 4 h unterbrochen, mit NaOH-Lösung auf pH 8 gebracht und das Lacton somit hydrolysiert. Mit stark verd. HCl wurde dann vorsichtig pH 7 eingestellt und erneut eine entsprechendes Volumen konz. TFA zugesetzt, so dass eine Endkonzentration an TFA von 0.1 M erreicht wurde. Es wurde weitere 4 h erhitzt und ein laut <sup>1</sup>H-NMR vollständig hydrolysiertes Produkt erhalten (Eintrag 12, Tabelle 5). Mit dieser Reaktion konnte nun auch derivatisierte Polysialinsäure analysiert werden.

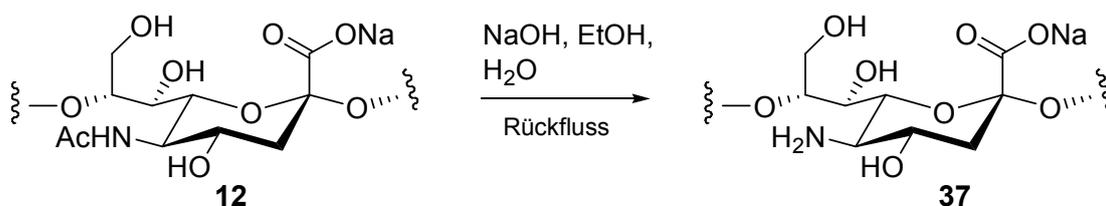


**Abbildung 49:** ESI-MS Spektrum des hydrolysierten Polysialinsäure-Azids (**36**). Das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) von 308.1517 stellt Sialinsäure dar. Der Peak bei  $m/z = 333.1566$  stellt das Azid dar.

Die Hydrolyse des Azids **36** und eine anschließende ESI-MS Untersuchung zeigte, dass das Azid in einer Ausbeute von 40% entlang der Kette eingeführt werden konnte. Auch durch Erhöhung der Reaktionszeiten und die Zugabe höherer Äquivalente Natriumazid konnte diese Ausbeute nicht gesteigert werden. Erschwerend für eine spätere Anwendung war die schlechte Maßstabsvergrößerung dieser Reaktionen. Bei größeren Ansätzen von 500 bis 700 mg konnte das viskose, kleberartige Tosylat der Polysialinsäure (**35**) nicht mehr durch Ausfällung gereinigt werden. Ebenso wenig ließ sich das Polymer durch Ultrafiltration unter Einsatz von Carbonat-Membranen sauber isolieren, da die Membranen in DMSO eine mangelnde Stabilität zeigten. Die erhaltenen Materialien wurden daher nicht weiter biologisch bewertet.

### 3.4.3 N-Derivatisierung der Polysialinsäure

Neue Amid-Substituenten entlang der Polysialinsäure-Kette sollten mit dem Ziel eingeführt werden, die Hydrophobie des Polymers zu erhöhen und eine Beschichtung von Polystyrolplatten zu erleichtern. Eine Deacetylierung der Polysialinsäure zur Herstellung der  $\gamma$ -Polyaminosäure gelang in einer Mischung aus NaOH in Ethanol und Wasser sowie Erhitzen unter Rückfluss. Alle Salze wurden nach der Reaktion durch Dialyse gegen dest. H<sub>2</sub>O entfernt. Eine Größenbestimmung der  $\gamma$ -Polyaminosäure durch Gelelektrophorese, wie bereits für Polysialinsäure vorgenommen (Abbildung 19), gelang nicht. Nach Alcianblau-Silber-Färbung konnte keine Substanz nachgewiesen werden. Bei dem pH Wert von 7.6 lag die  $\gamma$ -Polyaminosäure höchstwahrscheinlich am isoelektrischen Punkt vor.<sup>87</sup> Das Polymer war somit netto ungeladen und konnte in beiden Ausrichtungen des elektrischen Feldes nicht wandern.

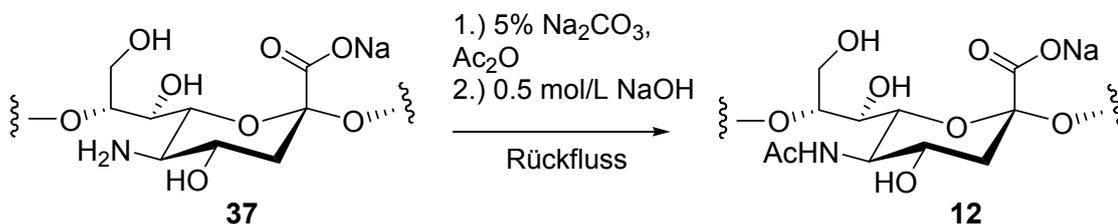


**Abbildung 50:** Herstellung der  $\gamma$ -Aminosäure **37** durch Deacetylierung unter basischen Bedingungen.

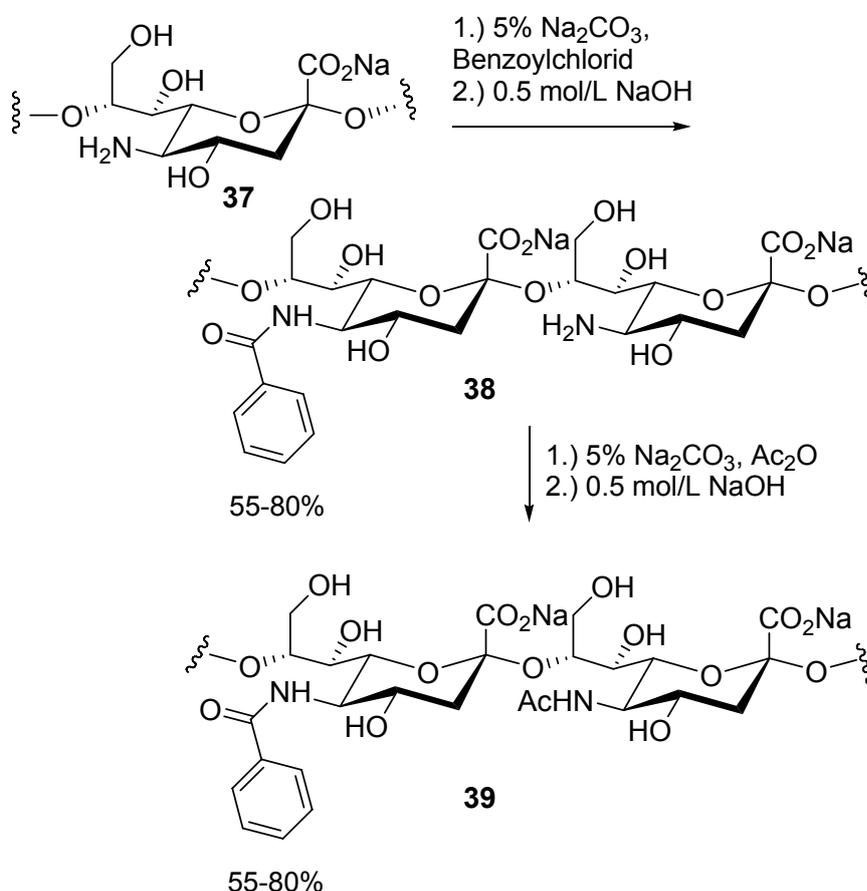
Zur späteren Einführung künstlicher Amidsubstituenten entlang der Kette sollte eine Modellreaktion ausgearbeitet werden, bei der die Aminosäure vollständig reacyliert würde. Der Umsatz war besonders leicht bei einer Acetylierung zu überprüfen, da das Produkt lediglich mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR mit natürlicher Polysialinsäure verglichen werden musste. Unter Standardbedingungen in Pyridin und hohem Überschuss an Acetanhydrid in Anwesenheit katalytischer Mengen DMAP, gelang die Einführung der Acetylgruppen jedoch nur in einer Ausbeute von 41%. Das erneute Versetzen mit reaktiverem Acetylchlorid in Pyridin erhöhte die Ausbeute lediglich auf 50%. Eine noch höhere Acetylierung gelang auch bei höheren Temperaturen nicht. Die schlechte Löslichkeit des zu 50% acetylierten Polymers in organischen Lösungsmitteln verhinderte die weitere Reaktion mit Acetylchlorid. Erst durch Verwendung von wässriger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und Acetanhydrid konnten die freien Aminogruppen vollständig in das entsprechende Amid überführt werden. Acetanhydrid musste dazu mehrmals in großem Überschuss zugegeben werden, da es in wässriger,

<sup>87</sup> S. Berski, *Diplomarbeit*, **2005**, Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover.

basischer Lösung nur über einen kurzen Zeitraum stabil war. Um die gebildeten O-Acetate zu spalten, wurde das Produkt mit 0.5 mol/L NaOH nachbehandelt.



**Abbildung 51:** Modellreaktion zur Einführung neuer künstlicher Amidsubstituenten.



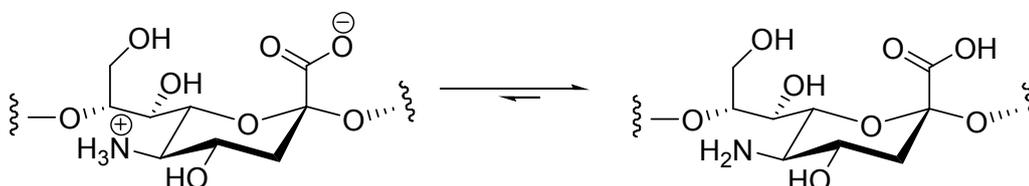
**Abbildung 52:** Herstellung der *N*-Benzoyl-polysialinsäure (**39**) unter Anwendung der Modellreaktion.

Diese Reaktionen konnte nun zur Herstellung eines neuen Derivats verwendet werden, das die Hydrophilie herabsetzen sollte. Eine erfolgreiche Umsetzung wurde mit Benzoylchlorid, das ebenfalls über einen angemessenen Zeitraum in Wasser stabil ist, erreicht (Abbildung 52). Die Ausbeute betrug zunächst 55%, konnte aber durch Zugabe weiterer Äquivalente Benzoylchlorid auf 80% erhöht werden. Um eine möglichst große Ähnlichkeit mit der

natürlichen Polysialinsäure zu erhalten, wurden die freien Aminogruppen anschließend reacyliert.

Die Reaktion konnte jedoch nicht auf die Einführung noch unpolarerer Reste, wie Oktadekanoyl- oder Myristoyl-(Tetradecansäurechlorid)-Substituenten, übertragen werden, da die Löslichkeit der Anhydride in Wasser gering war und die entsprechenden Säurechloride sofort hydrolysiert wurden. Es wurde angenommen, dass die Einführung unpolarer Reste die Polarität des Polymers herabsetzen und dadurch die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln erhöhen würde. Aus diesem Grund wurde die Reaktion erneut in Pyridin vorgenommen und das reaktive Myristoylchlorid zunächst bei 0 °C zugegeben und anschließend auf 40 °C erhitzt. Das erhaltene Produkt konnte jedoch nicht durch Dialyse in Methanol/Dichlormethan von überschüssiger Säure befreit werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit war hier ein Teil der freien Aminogruppen durch Myristoyl-Gruppen substituiert worden. Dieser Substitutionsgrad war zu hoch, da sich das Polymer nicht mehr in Wasser reinigen ließ und mit großer Wahrscheinlichkeit in den biologischen Tests toxisch gewesen wäre. Bei Verwendung geringerer Äquivalente Myristoylchlorid konnte trotz erhöhter Temperaturen keine Reaktion beobachtet werden. Offensichtlich war zunächst ein Überschuss an Myristoylchlorid notwendig, um die Substitution des schlecht löslichen Polymers in Pyridin zu erzwingen. Die Menge des Säurechlorid war jedoch anschließend zu hoch, um die Umsetzung auf einem niedrigen Substitutionsgrad zu stoppen. Die Reaktion war somit unkontrollierbar und ein notwendiger, geringerer Substitutionsgrad nicht einstellbar.

Aus diesem Grund wurde auf die Methode zurückgegriffen, die zuvor schon für die Herstellung der Polysialinsäure-Ester verwendet worden war: Die  $\gamma$ -Polyamino-säure sollte in ihr Tetrabutylammonium-(TBA)-Salz überführt werden. Bei der Aminosäure war zu beachten, dass sich ihr isoelektrischer Punkt höchstwahrscheinlich, wie bereits oben beschrieben, bei pH 7.6 befand (Abbildung 53).



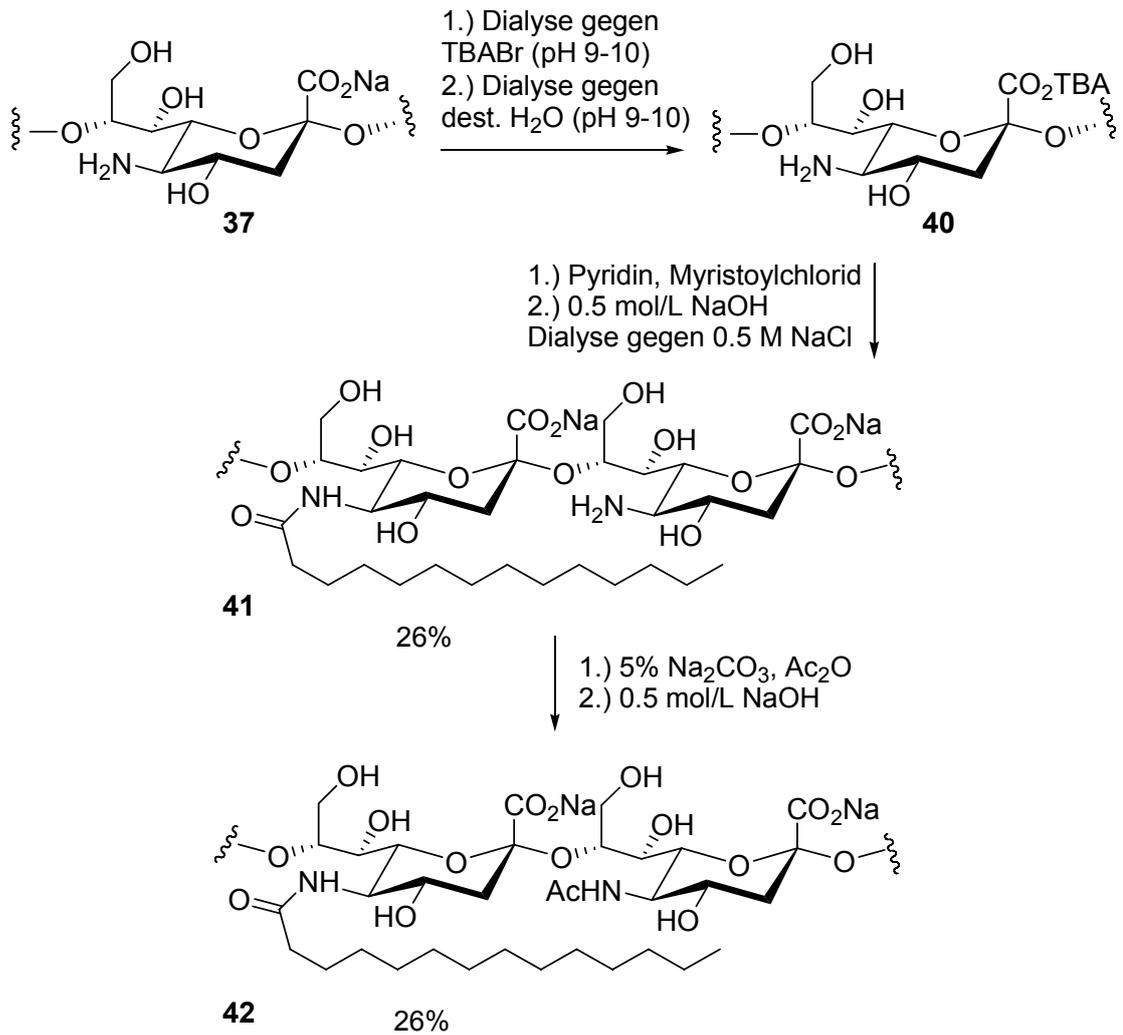
**Abbildung 53:** Isoelektrischer Punkt der  $\gamma$ -Polyamino-säure bei pH 7.6. Erhöhung des pH Wertes mit TBAOH-Lösung über diesen Punkt sollte zu einem Abfangen des  $H^+$ -Ions und somit zu einer geladenen Verbindung führen, die als Gegenion das  $TBA^+$ -Kation trägt.

Um sicherzustellen, dass tatsächlich das TBA<sup>+</sup>-Kation als Gegenion des Carboxylats eingeführt wurde, wurde die Säure bei pH 9-10 (Verwendung von TBAOH anstelle von NaOH) gegen TBABr-Lösung dialysiert. Zur Entfernung überschüssigen TBABr wurde die Substanz anschließend gegen dest. H<sub>2</sub>O (pH 9-10, Verwendung von TBAOH) dialysiert. Nach Gefriertrocknung konnte die Polyaminosäure vollständig in Pyridin gelöst werden. Eine anschließende Zugabe unterschiedlicher Äquivalente Myristoylchlorids zeigte, dass die Reaktion jetzt kontrollierbar war. Bei 0.8 Äq wurden nur 26% Myristoylgruppen eingeführt (Tabelle 6) und die gewünschte Löslichkeit in Wasser blieb erhalten. Das Derivat wurde anschließend reacyliert, um die Ähnlichkeit mit natürlicher Polysialinsäure weitgehend wiederherzustellen (Abbildung 54).

Myristoylchlorid [Äq]	Beobachtung
1.5	Produkt nur löslich in Dichlormethan
1	Produkt nur löslich in Dichlormethan
0.8	vollständig löslich in dest. H <sub>2</sub> O <sup>1</sup> H-NMR: 26% <i>N</i> -Myristoyl

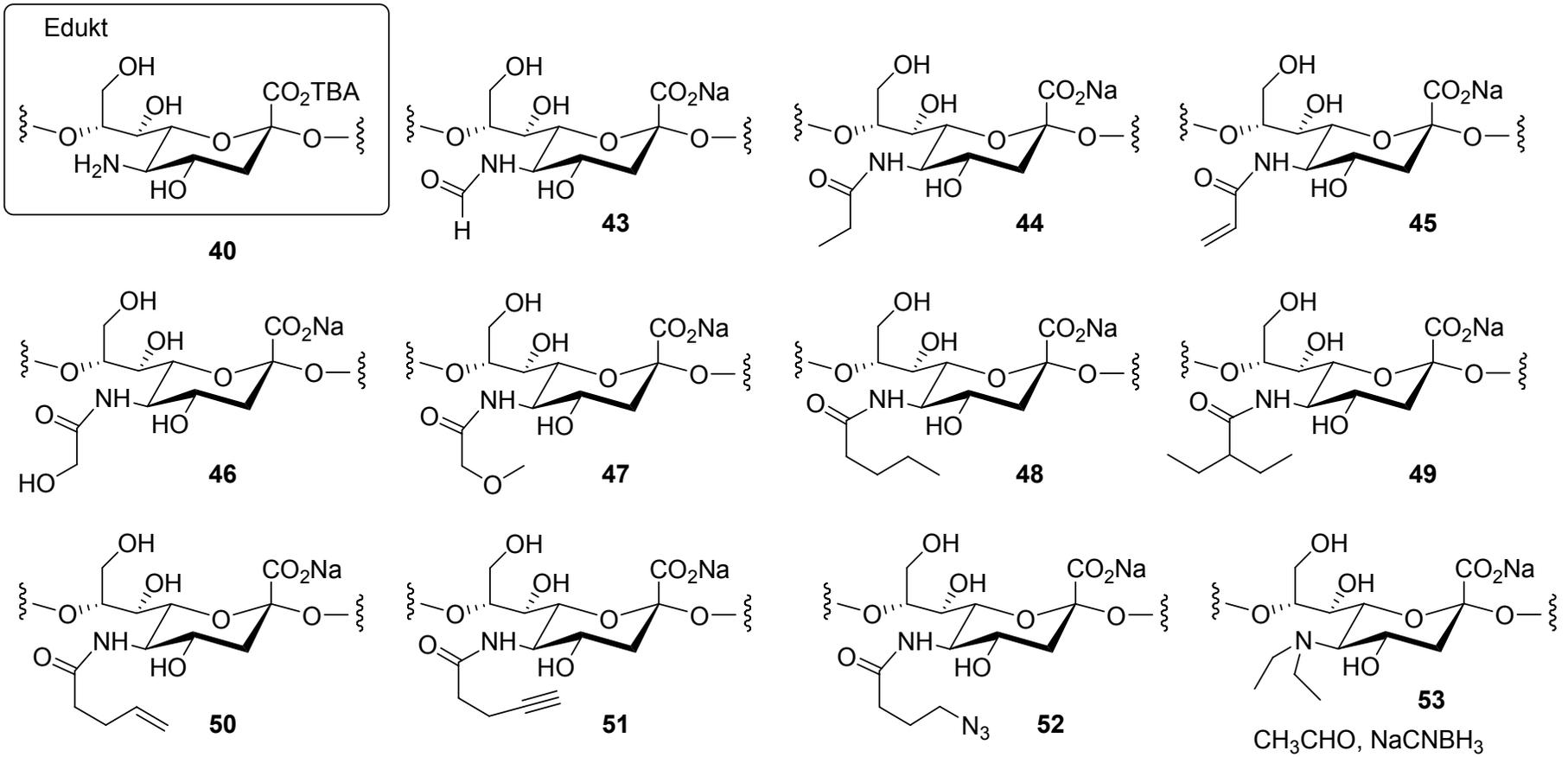
**Tabelle 6:** Verwendung verschiedener Äquivalente Myristoylchlorid zur Herstellung eines wasserlöslichen, hydrophoben Polysialinsäure-*N*-Derivats. Die Löslichkeit des Derivats in Wasser ist bei Einführung von 26% deutlich herabgesetzt.

Diese Reaktionsführung bietet den Vorteil, dass der Substitutionsgrad beliebig und in Abhängigkeit zu den erforderlichen biologischen Eigenschaften des Derivats eingestellt werden kann. Darüber hinaus lassen sich auch Derivate aus Anhydriden und Säurechloriden herstellen, die in Wasser über den Reaktionszeitraum instabil sind.



**Abbildung 54:** Einführung des Myristoylsubstituenten unter Kontrolle des Derivatisierungsgrades.

Im folgenden konnte die Methode erfolgreich zur Herstellung einer Reihe weiterer Polysialinsäure-Derivate angewendet werden. Eine Übersicht ist in Abbildung 55 dargestellt.



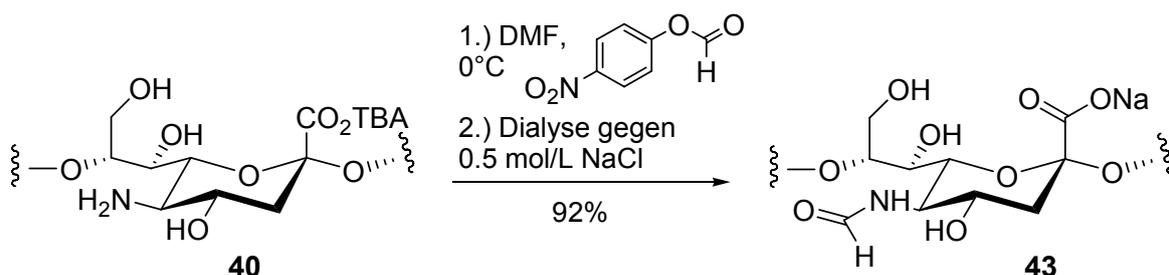
**Abbildung 55:** Übersicht der neben *N*-Benzoyl-(39)- und *N*-Myristoyl-polysialinsäure (42) hergestellten Derivate.

Die in Tabelle 7 aufgeführten Derivate wurden z.T. durch Reaktion der entsprechenden Säurechloride mit der  $\gamma$ -Polyaminosäure eingeführt. Zum Erreichen hoher Derivatisierungsgrade mussten grundsätzlich hohe Äquivalente der Säurechloride (bis zu 8 Äq) zugegeben werden. Auch hier zeigt sich eine verminderte Reaktivität des Polymers trotz vollständiger Löslichkeit in den verwendeten organischen Lösungsmitteln. Alle aus den Säurechloriden hergestellten Derivate wurden anschließend mit 0.5 mol/L NaOH nachbehandelt, um sicherzustellen, dass ausschließlich der Stickstoff acyliert wurde.

Verbindung	Substituent	Derivatisierungsgrad
<b>43</b>	<i>N</i> -Formyl	92%
<b>44</b>	<i>N</i> -Propionyl	93%
<b>45</b>	<i>N</i> -Acryl	30%
<b>46</b>	<i>N</i> -Glykolyl	67%
<b>47</b>	<i>N</i> -Methoxyacetyl	90%
<b>48</b>	<i>N</i> -Valeroyl	91%
<b>49</b>	<i>N</i> -(2-Ethyl)-butanoyl	79%
<b>50</b>	<i>N</i> -Pent-4-enoyl	98%
<b>51</b>	<i>N</i> -Pent-4-inoyl	80%
<b>52</b>	<i>N</i> -4-Azidobutanoyl	31-91%
<b>53</b>	5-Diethylamino	96%

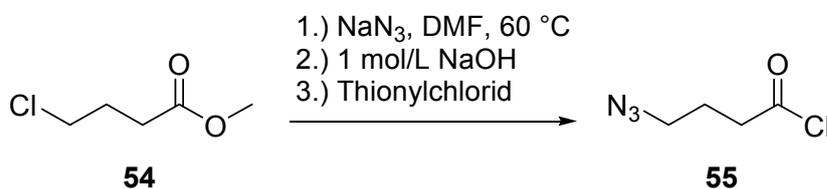
**Tabelle 7:** *N*-Derivate der Polysialinsäure und deren Derivatisierungsgrad.

Der Formylsubstituent der Verbindung **43** wurde aufgrund der Instabilität des Ameisensäurechlorids und Anhydrids unter Verwendung eines Aktivesters in DMF bei 0 °C eingeführt (Abbildung 56).



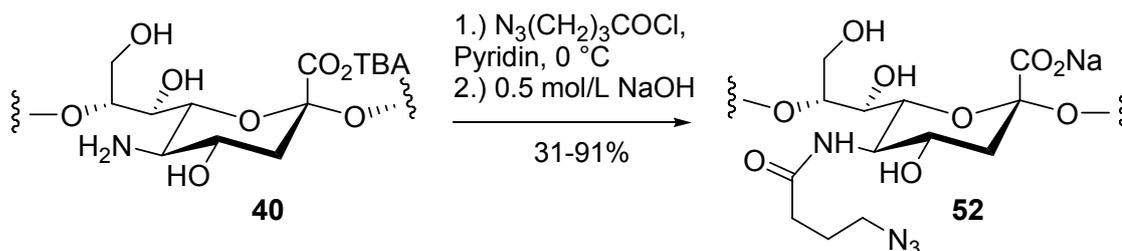
**Abbildung 56:** Herstellung der *N*-Formyl-polysialinsäure (**43**) unter Verwendung eines Aktivesters.

Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Substitution der Hydroxylgruppen durch eine Azid-Funktion (Abschnitt 3.4.2, S. 52) sollte die Einführung dieser Gruppe ebenfalls durch *N*-Derivatisierung erreicht werden. Der Vorteil bestand hier in der hohen Selektivität. Zunächst wurde versucht, ein Azid-Derivat unter Verwendung von 3-Azidopropionylchlorid herzustellen. Hier erfolgte jedoch bei der anschließenden Behandlung unter basischen Bedingungen eine Eliminierung zur *N*-Acryl-polysialinsäure (**45**, S. 61). Daher wurde für die folgende Azid-Herstellung das um eine CH<sub>2</sub>-Einheit verlängerte 4-Azido-buttersäurechlorid aus 4-Chlor-buttersäure-methylester (**54**) hergestellt (Abbildung 57).



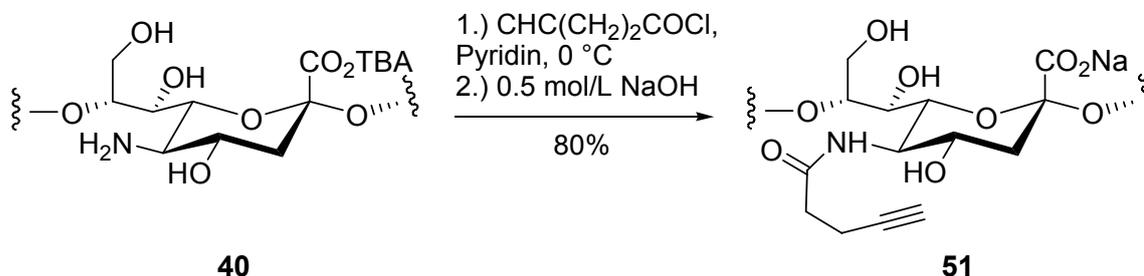
**Abbildung 57:** Herstellung des Azid-tragenden Säurechlorids **55**.

Bei Verwendung von 5 Äq Säurechlorid konnte das Azid mit einem Derivatisierungsgrad von 91%, bei Zugabe von 2 Äq zu 31% derivatisiert werden. Damit lassen sich auch niedrige *N*-Substitutionsgrade einstellen.



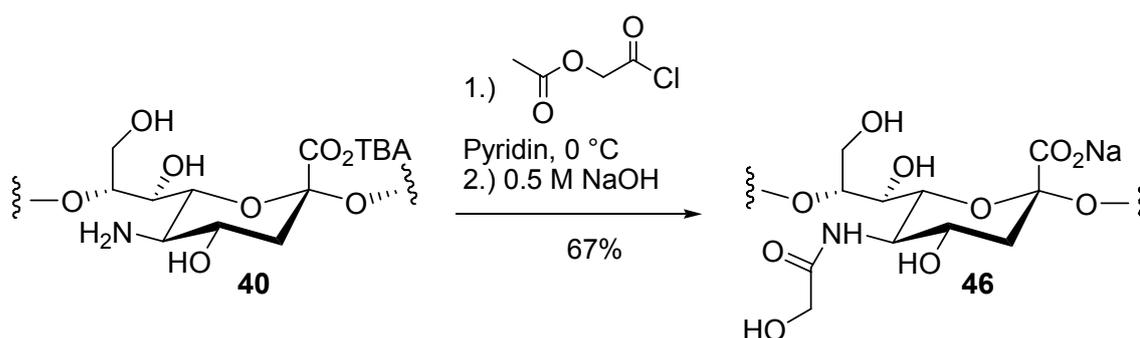
**Abbildung 58:** Einführung eines Azid-Substituenten.

Für die Herstellung des *N*-Alkin-Derivats **51** wurde ebenfalls das Säurechlorid aus 4-Pentinsäure und Thionylchlorid hergestellt. Bei der anschließenden Umsetzung konnte ein Alkin-Derivat mit einem Substitutionsgrad von 80% hergestellt werden.



**Abbildung 59:** Herstellung des Alkin-Derivats **51**.

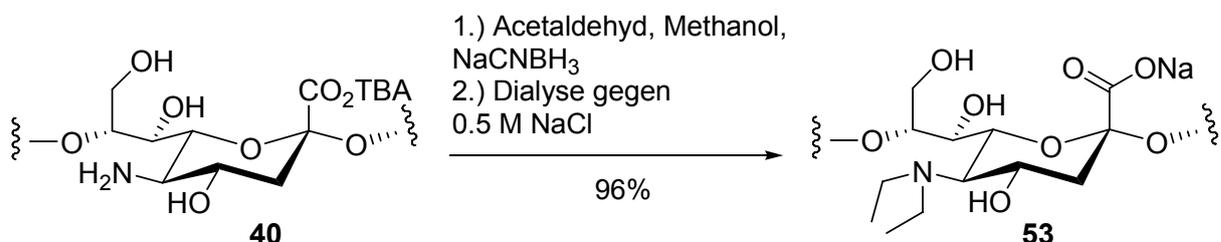
Die Verbindung **46** mit einem Glykolyl-Substituenten am Stickstoff ist ein natürliches vorkommendes Derivat der Polysialinsäure.<sup>88</sup> Zu seiner Darstellung wurde als Säurechlorid Acetoxyacetylchlorid verwendet und der Acetylrest zur Freisetzung der Hydroxyl-Gruppe nach der Reaktion verseift. Im <sup>1</sup>H-NMR konnte eine erhöhte Anzahl von Acetylresten beobachtet werden. Auch nach weiterer Nachbehandlung mit Base, bei der die restlichen Acetyl-Gruppen auf der Hydroxylfunktion des *N*-Glykolyl-Substituenten abgespalten worden wären, konnte der Acetyl-Substitutionsgrad nicht verändert werden. Bei der Reaktion mit dem acetylierten Säurechlorid hatte neben der Acylierung eine Aminolyse stattgefunden. Der Derivatisierungsgrad des Glykolyl-Derivats lag daher bei einem niedrigeren Wert von 67% (Abbildung 60, Tabelle 7).



**Abbildung 60:** Darstellung der *N*-Glykolyl-polysialinsäure (**46**).

<sup>88</sup> K. Kitajima, S. Inoue, Y. Inoue und F. A. Troy, *J Biol Chem*, **1988**, 263, 18269-18276.

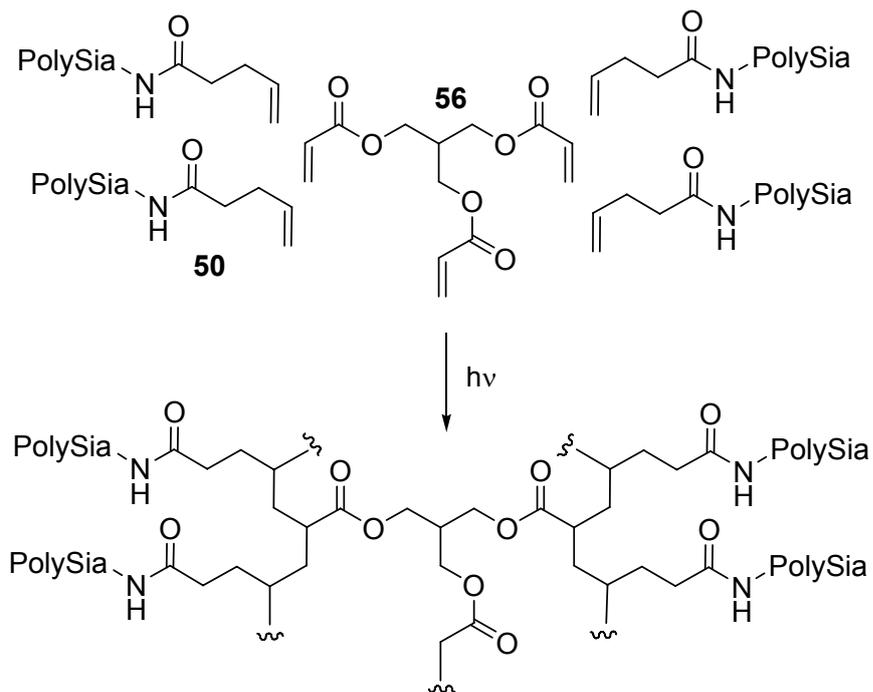
Durch reduktive Aminierung der Polyaminosäure mit Acetaldehyd und  $\text{NaCNBH}_3$  konnte ebenfalls ein Amin-Derivat der Polysialinsäure synthetisiert werden (Abbildung 61). Auch diese Reaktion gelang mit hohem Derivatisierungsgrad (96%), da sich das TBA-Edukt vollständig in Methanol löste. Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die auch bei der Modellreaktion des Monomers verwendet wurden.<sup>81</sup>



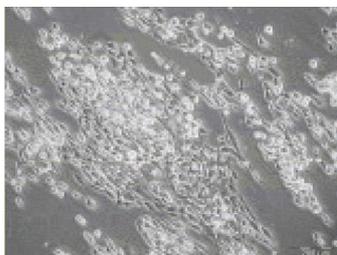
**Abbildung 61:** Herstellung der 5-Diethylamino-polysialinsäure (**53**).

Die Derivate waren aufgrund des Erhalts der negativen Ladung alle wasserlöslich. Im folgenden wurde eine Funktionalität eingeführt, die der Herstellung stabiler dreidimensionaler Gerüstmaterialien dienen sollte. Ziel war es, durch einen Elektrosponning-Prozess zunächst eine Faser des Derivats herzustellen und diese dann durch Aktivierung der Funktionalität quervernetzen. Die Faserstruktur sollte somit auch in Wasser erhalten bleiben.

Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht ein Acrylamid aus dem entsprechenden Acrylsäurechlorid und der TBA-Polyaminosäure herzustellen. Dieses gelang jedoch nicht. Die zu der Carbonylgruppe in Konjugation stehende Doppelbindung wurde durch Wasser oder Alkoholgruppen des Polymers unter basischen Bedingungen angegriffen. Daher wurde im Anschluss das *N*-Pent-4-enoyl-Derivat der Polysialinsäure (**50**) mit einem Derivatisierungsgrad von 98% hergestellt. Dieses Derivat wurde dem Institut für Kautschuktechnologie zur Verfügung gestellt und konnte hier in Anwesenheit von Polyethylenoxid und Triacrylat **56** zu Fasern versponnen werden. Eine anschließende UV-Aktivierung brachte ein quervernetztes Polysialinsäure-Derivat hervor, das eine ausreichende Stabilität in Wasser aufwies (Abbildung 62).



**Abbildung 62:** Schematische Darstellung der Quervernetzung der *N*-Pentenoyl-polysialinsäure (**50**) mit dem Triacrylat **56**. Das Derivat wurde zunächst in Fasern verarbeitet und die Doppelbindungen zur Quervernetzung mit UV-Licht aktiviert (Verarbeitung durch U. Assmann, Institut für Kautschuktechnologie e.V., Hannover).

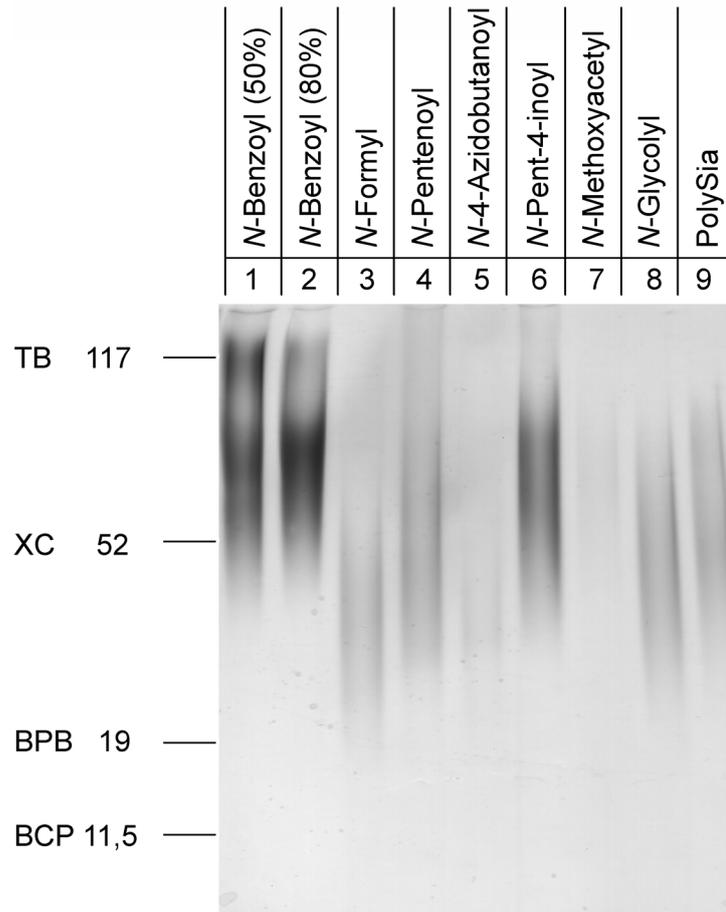


**Abbildung 63:** Immortalisierte Schwann Zellen auf dem mit Triacrylat quervernetzten *N*-Pent-4-enoyl-Derivat der Polysialinsäure in Anwesenheit von Polyethylenoxid (Kultivierung durch Y. Stark, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover).

Bei der Kultivierung von Schwann-Zellen auf den Matrizen konnte gezeigt werden, dass die Zellen entlang der Faser wuchsen und eine normale Morphologie aufwiesen.

### 3.4.4 Polymerisierungsgrad der *N*-Derivate

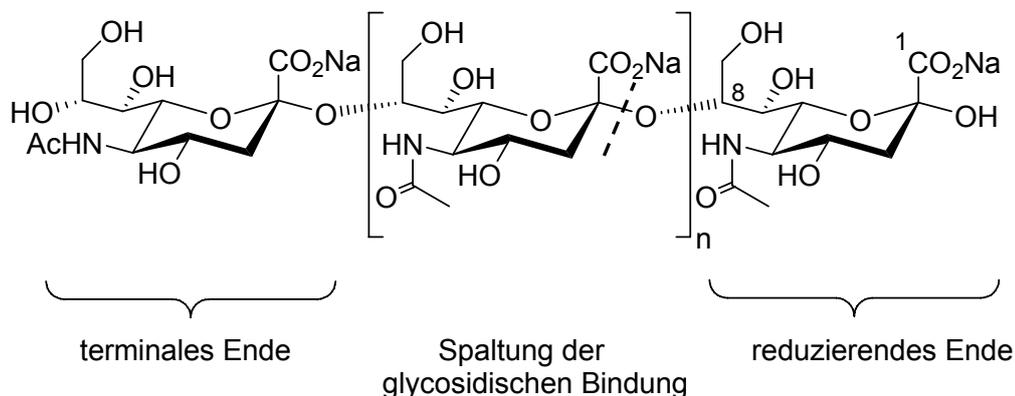
Mittels  $^1\text{H-NMR}$  konnte zwar der Derivatisierungsgrad nicht aber der Erhalt der Kettenlänge nach der Reaktion überprüft werden. Zur Größenbestimmung der Derivate wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese mit Alcianblau-Silberfärbung vorgenommen. Der Polymerisierungsgrad der Polysialinsäure liegt im Mittel bei 52 Sialyl-Einheiten (Abbildung 64, Spalte 9). Im Vergleich zu dem natürlichen Polymer sind die *N*-Benzoyl-(**39**)-Derivate (Spalte 1 und 2) aufgrund der längeren Substituenten weniger stark im elektrischen Feld gewandert. Auch für das *N*-Pentenoyl-(**50**, Spalte 4)-, das *N*-Pent-4-inoyl-(**51**, Spalte 6)-und das *N*-Methoxyacetyl-(**47**, Spalte 7)-Derivat trifft diese Aussage zu. Bei dem *N*-Glykolyld-Derivat (**46**, Spalte 8) wird lediglich eine Hydroxyfunktion eingeführt. Aus diesem Grund laufen Polysialinsäure und Derivat im elektrischen Feld in gleicher Höhe. Das *N*-Formyl-(**43**, Spalte 3)-Derivat hat dagegen aufgrund der Verkürzung des Acyl-Substituenten eine längere Strecke zurückgelegt. Im Allgemeinen bleibt der Polymerisationsgrad nach der Reaktion in Pyridin und unter Verwendung der entsprechenden Säurechloride sowie nach wässriger Aufarbeitung erhalten. Eine Ausnahme macht das *N*-4-Azidobutanoyl-(**52**)-Derivat in Spalte 5. Seine Bande ist zu kleineren Polymerisationsgraden verschoben. Da es in gleicher Weise aus dem Säurechlorid hergestellt wurde wie alle anderen Derivate, erscheint eine Hydrolyse während der Reaktion unwahrscheinlich. Möglicherweise wurde der pH-Wert von 8-9 während der wässrigen Aufarbeitung nicht eingehalten und das Polymer konnte im leicht sauren Milieu teilweise hydrolysiert werden. Das Ergebnis zeigt die Labilität des Polymers in leicht saurer Lösung, die auch schon an anderer Stelle beobachtet werden konnte. So konnten z.B Hydrogele (Abschnitt 3.1) über mehrere Monate stabil gelagert werden, wenn sie in einem Natrium-Phosphatpuffer bei pH 7.0 vorlagen. Bei Verwendung von leicht saurem dest.  $\text{H}_2\text{O}$  verflüssigte sich das Gel innerhalb von 14 Tagen. Diese Beobachtung war auf die Hydrolyse glycosidischer Bindungen zurückzuführen.



**Abbildung 64:** Polyacrylamid-Gel nach Gelelektrophorese mit anschließender Alcianblau-Silberfärbung der verschiedenen *N*-Derivate. Die Polysialinsäure als Kontrolle ist in Spalte 9 aufgetragen. Die Abkürzungen stehen für die mitgelaufenen Polysaccharid-Marker: TB = Trypanblau, XC = Xylolcyanol, BPB = Bromphenolbau, BCP = Bromkresolpurpur. Ihr Wanderungspunkt lässt sich dem Polymerisationsgrad (neben dem Gel vermerkt) der Polysialinsäure zuordnen.

### 3.5 Enzymatische Abbaubarkeit der *N*-Derivate

Eine enzymatische Aktivität der EndoNF\* gegenüber den C-1-Amiden der Polysialinsäure wurde, wie bereits in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, vollständig durch die chemische Derivatisierung inhibiert. Daher sollte im folgenden überprüft werden, in welcher Weise die Einführung neuer Amidsubstituenten an C-5 die Geschwindigkeit der Hydrolyse beeinflusst. Die Abbauraten der Derivate mussten dazu mit der des natürlichen Substrats verglichen werden. Die Bestimmung des Umsatzes kann mit Hilfe eines Thiobarbitursäure-Assays erfolgen. Ursprünglich wurde diese Technik zur Quantifizierung von Sialylresten, die terminal an Glycoproteine gebunden waren, verwendet. Die zu analysierenden Glycoproteine wurden vor der Sialinsäure-Bestimmung sauer hydrolysiert.<sup>89,90,91</sup> Zur Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit der Polysialinsäure und ihrer Derivate wurde ein Protokoll von D. Schwarzer (Institut für Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) verwendet. Bei der Hydrolyse unter Katalyse durch die Endosialidase werden die glycosidischen Bindungen innerhalb der Polysialinsäure-Kette gespalten und die Anzahl der freien reduzierenden Enden in Lösung steigt (Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Enzymatischer Abbau des natürlichen Substrats unter Bildung neuer reduzierender Enden.

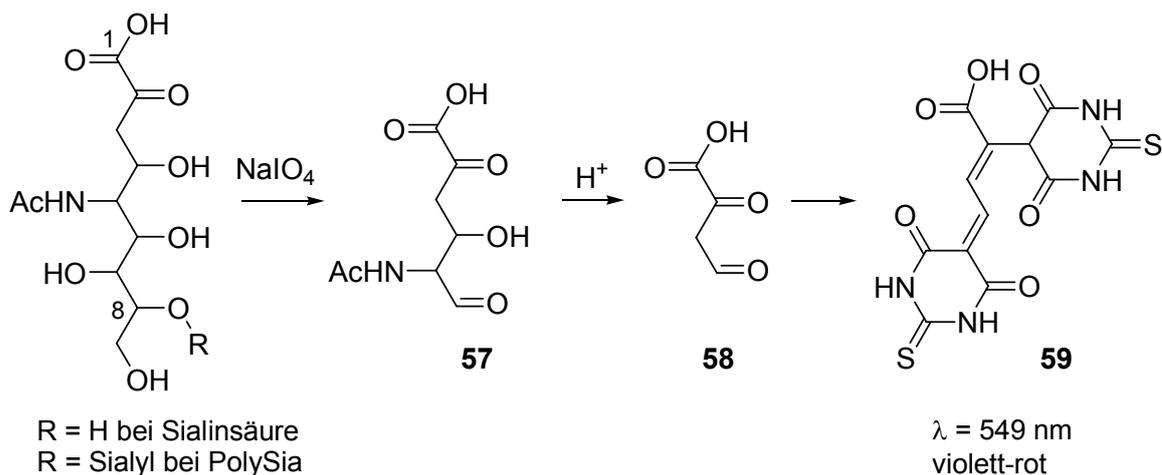
Diese freien Enden können in einem nachfolgenden Thiobarbitursäure-Assay spezifisch angefärbt werden. Der Mechanismus der Anfärbung ist für Sialinsäure und die freien reduzierenden Enden der Polysialinsäure identisch (Abbildung 66). Bei Zugabe von Natriumperodat wird zunächst das Diol des Sialyl-Restes zwischen C-6 und C-7 gespalten.

<sup>89</sup> L. Skoza und S. Mohos, *Biochem J*, **1976**, 159, 457-462.

<sup>90</sup> L. Warren, *J Biol Chem*, **1959**, 234, 1971-1975.

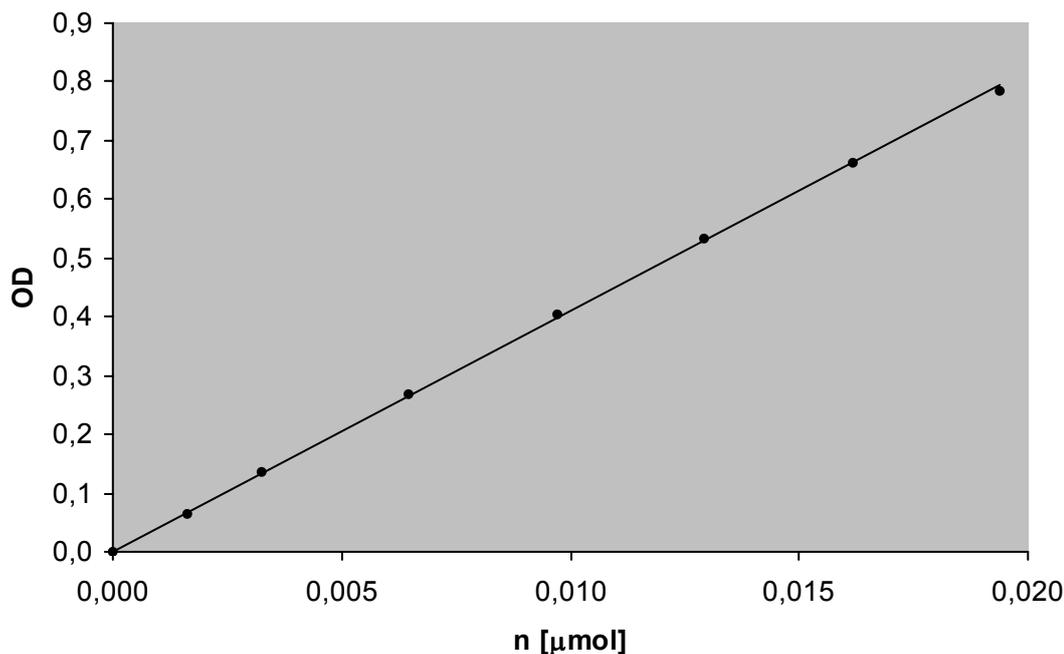
<sup>91</sup> G. B. Paerels und J. Schut, *Biochem J*, **1965**, 96, 787-792.

Der resultierende Aldehyd **57** reagiert in einer Retroaldolreaktion zu dem  $\beta$ -Formylpyruvat (**58**). Diese Spezies wird mit zwei Äquivalenten Thiobarbitursäure in den violett-roten Farbstoff **59** umgewandelt. Je höher die Stoffmenge an freien reduzierenden Enden in einer Lösung ist, desto intensiver sind auch die Proben gefärbt. Zur genauen Bestimmung der Intensität wird im Anschluss eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 549 nm durchgeführt und das Ergebnis als optische Dichte (OD) angegeben.



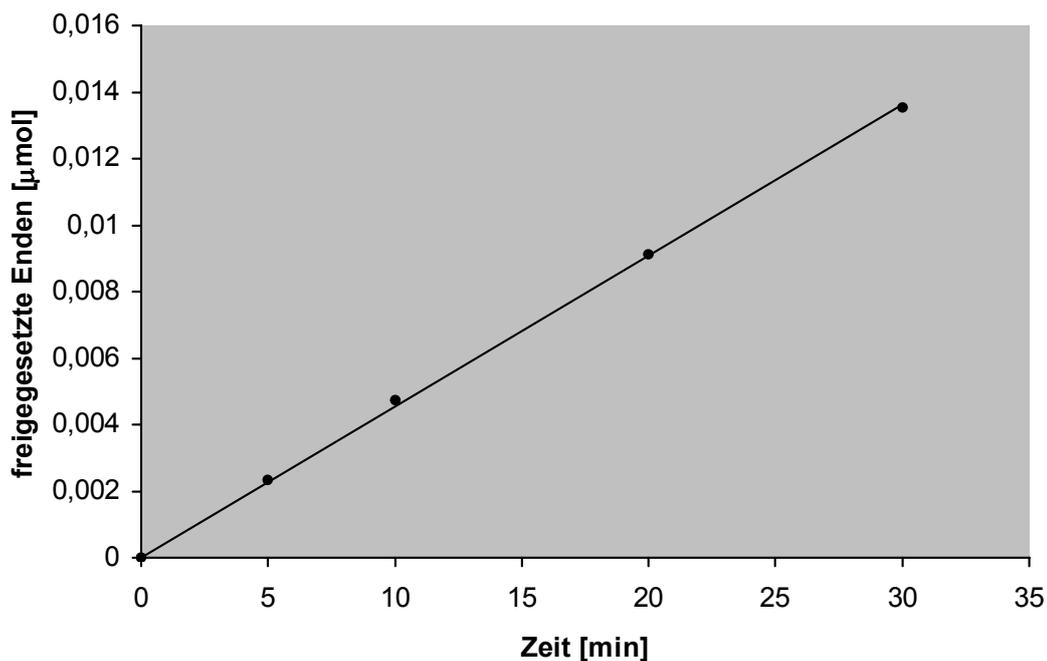
**Abbildung 66:** Umsetzung des freien reduzierenden Endes der Sialinsäure und der Polysialinsäure in dem Thiobarbitursäure-Assay. Zunächst wird das Diol der Sialinsäure durch Periodat gespalten. In der anschließenden Retroaldolreaktion wird das  $\beta$ -Formylpyruvat (**58**) freigesetzt. Diese Spezies reagiert mit zwei Äquivalenten Thiobarbitursäure zu einem violett-roten Farbstoff, dessen Gehalt photometrisch bestimmt wird.

In dieser Arbeit wurden nun für die Erstellung einer Eichgeraden zunächst Sialinsäure-Lösungen bekannter Stoffmenge in dem Assay angefärbt. Über die Funktion der Geraden konnte so jeder Stoffmenge  $n$  ein bestimmter gemessener Wert der Optischen Dichte zugeordnet werden. Der Zusammenhang ist in Abbildung 67 dargestellt. Umgekehrt ließ sich bei gemessener Optischer Dichte die Stoffmenge an freien reduzierenden Enden der Polysialinsäure ablesen.



**Abbildung 67:** Eichkurve von Sialinsäure-Lösungen mit bekannter Stoffmenge  $n$  und deren optische Dichte (**OD**) bei  $\lambda = 549$  nm nach Anfärbung durch Thiobarbitursäure-Assay (96-Well-Platte der Firma Nunc).

Als nächstes sollte die Geschwindigkeit des Umsatzes der Polysialinsäure durch das Enzym EndoNF\* bestimmt werden. Dazu wurde eine Polysialinsäure-Lösung mit einer definierten Stoffmenge an Enzym versetzt und der Abbau über einen Zeitraum von bis zu 30 min bei 37 °C und pH 5.1 verfolgt. Bei diesem Abbau steigt die Anzahl freier reduzierender Enden der Polysialinsäure (Abbildung 66) an. Während der Inkubationszeit kommt es neben der enzymatischen zu einer geringen chemischen Hydrolyse. Nach Bestimmung der Optischen Dichte der violett-rot farbenen Lösungen wurden daher die OD-Werte der Enzym-Lösungen um das Maß der chemischen Hydrolyse korrigiert. Der Wert der optischen Dichte wurde mit Hilfe der zuvor bestimmten Eichgeraden in die Stoffmenge an freigesetzten, reduzierenden Enden der Polysialinsäure umgewandelt. Je länger die Proben mit dem Enzym inkubiert werden, desto höher ist auch die Stoffmenge der freigesetzten reduzierenden Enden. Der Zusammenhang ist in Abbildung 68 dargestellt und in diesem betrachteten Zeitintervall linear.



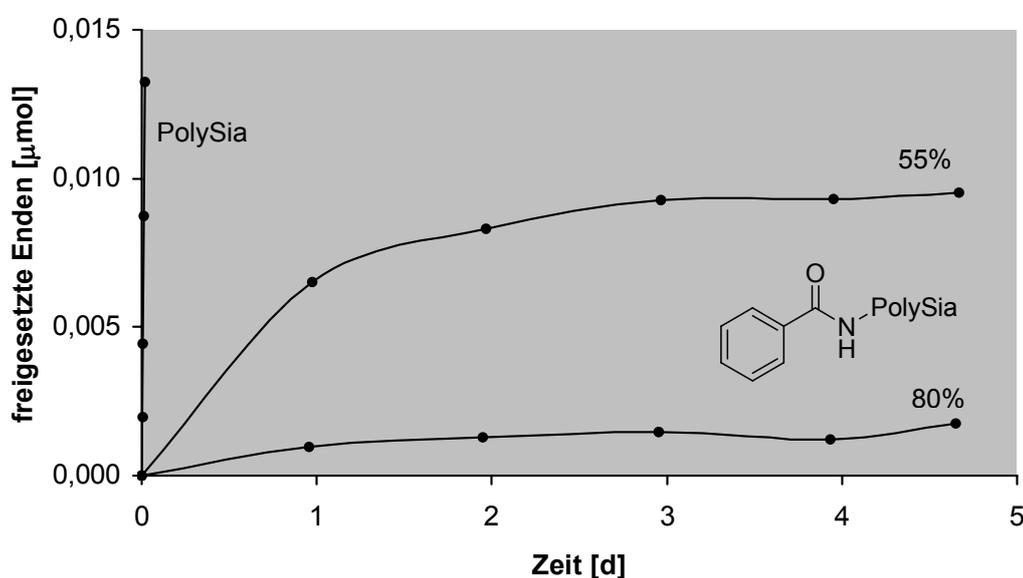
**Abbildung 68:** Bestimmung der Abbau-Rate der Polysialinsäure durch EndoNF\*. Die Anzahl freigesetzter Enden steigt über den Zeitraum von 30 min linear an.

Im folgenden wurde nun die Abbaubarkeit der Derivate überprüft. Bei jeder Durchführung wurde sowohl eine erneute Eichgerade aus Sialinsäure erstellt als auch die enzymatische Hydrolyse des natürlichen Substrats untersucht. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass ein verminderter oder fehlender Abbau des Derivats nicht durch einen Aktivitätsverlust des Enzyms bedingt wurde. Gleichzeitig sollte die korrekte Anfärbung sichergestellt werden.

Der enzymatische Abbau der *N*-Benzoyl-Derivate (**39**), die in einem Derivatisierungsgrad von 55% und 80% vorlagen, wurde als erstes getestet. Der Assay zeigte, dass die Abbau-Geschwindigkeit gegenüber dem natürlichen Substrat drastisch abgenommen hatte. Über einen Zeitraum von 30 min konnte bei dem künstlichen Derivat nur eine geringe Hydrolyse beobachtet werden. Daher wurde der Abbau über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt. Abbildung 69 zeigt die Freisetzung der reduzierenden Enden der drei Verbindungen in Abhängigkeit von der Zeit. Wie bereits in Abbildung 68 zu erkennen, wird Polysialinsäure sehr schnell unter Enzymkatalyse hydrolysiert. Werden 55% Benzoyl-Gruppen und 45% Acetyl-Gruppen eingeführt, so sinkt der Umsatz deutlich gegenüber dem natürlichen Substrat ab. Er steigt zunächst über einen Zeitraum von 24 h an. In den folgenden Tagen nimmt der Umsatz stetig ab und erreicht schließlich einen Hydrolyse-Endwert. Bei einer Derivatisierung

von 80% wird die Hydrolyse unterbunden. Dies verdeutlicht, wie hochselektiv das Enzym Polysialinsäure hydrolysiert.

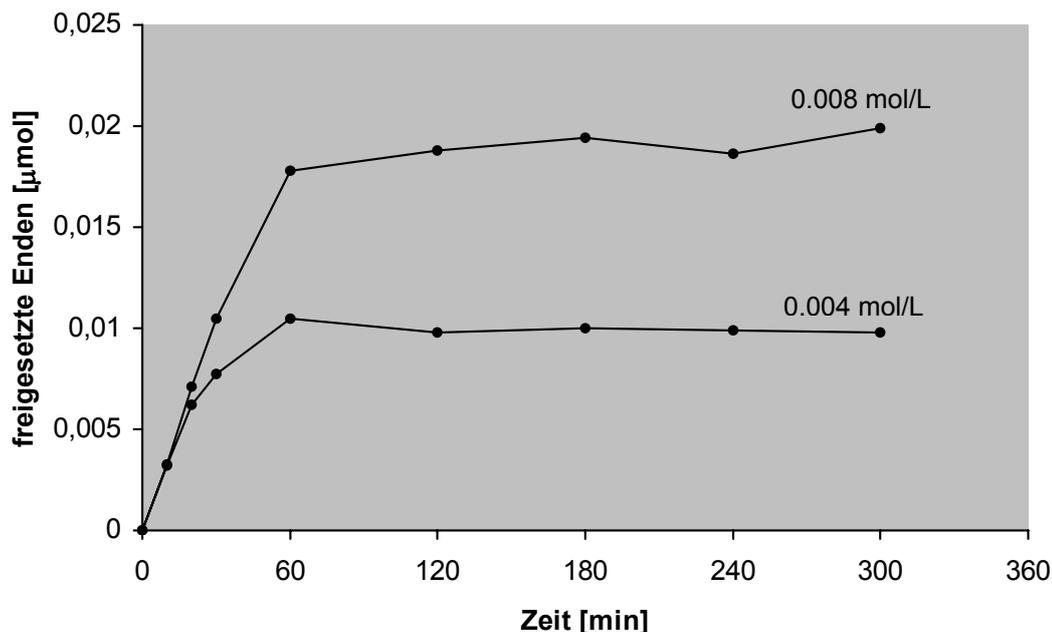
Bei einer Derivatisierung von 55% stehen dem Enzym noch ausreichend Acetyl-Reste zur Verfügung, um das Substrat im aktiven Zentrum zu binden (Abschnitt 1.5.2). Sind fast ausschließlich sterisch anspruchsvollere Amid-Substituenten vorhanden, so wird die Substrat-Bindung inhibiert und der Abbau des Polysialinsäure-Derivats gestört. Der Nachteil liegt in der hohen Substratspezifität des Enzyms. Ein großer Vorteil allerdings besteht darin, dass die Hydrolyse-Geschwindigkeit von dem Derivatisierungsgrad abhängt. Ein Gerüstmaterial aus diesen Materialien könnte damit im Hinblick auf die Hydrolysegeschwindigkeit definiert und je nach Verwendungszweck genau eingestellt werden.



**Abbildung 69:** Hydrolyse-Geschwindigkeit der Benzoyl-Derivate **39** mit einem Derivatisierungsgrad von 55% und 80% im Vergleich zur Polysialinsäure. Die Anzahl der während des enzymatischen Abbaus freigesetzten, reduzierenden Enden ist in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Für die weitere Einschätzung des Abbaugrades war jedoch auch wichtig, bis zu welchen Oligomeren-Einheiten Polysialinsäure hydrolysiert wird. In der oberen Abbildung ist lediglich der lineare Bereich, nicht aber der Hydrolyse-Endwert der Polysialinsäure zu erkennen. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass keine Hydrolyse bis zu den Monomeren erfolgt, da eine Endosialidase mehrere Sialyl-Einheiten eines Oligomers zur Bindung benötigt.<sup>61</sup> Im folgenden sollte untersucht werden, bis zu welchem Punkt unter den gegebenen Bedingungen und Konzentrationen das natürliche Substrat hydrolysiert wird.

Bei der ursprünglichen Hydrolyse wurde eine Konzentration der Polysialinsäure von 0.016 mol/L verwendet. Bei einem längeren enzymatischen Abbau, bei dem eine sehr hohe Anzahl reduzierender Enden freigesetzt wird, wäre die maximal messbare Optische Dichte des Photometers nach der Thiobarbitursäure-Anfärbung weit überschritten worden. Aus diesem Grund wurde der Abbau mit Polysialinsäure-Konzentrationen von 0.008 mol/L und 0.004 mol/L durchgeführt und im Assay angefärbt (Abbildung 70).



**Abbildung 70:** Abbau der Polysialinsäure durch EndoNF\* bis zum Endwert der Hydrolyse. Der Abbau wurde bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen über 5 h beobachtet.

Da die absolute Stoffmenge der Polysialinsäure (in gleichen Volumina) bei niedriger Konzentration geringer ist, wird auch ein geringerer Wert freigesetzter Enden erreicht. Bei einer Halbierung der Konzentration von 0.008 auf 0.004 mol/L wird somit auch der Hydrolyse-Endwert von ca. 0.02 auf ca. 0.01  $\mu\text{mol}$  halbiert. Das Verhältnis aus der Anzahl der freigesetzten Enden zu der Gesamtzahl aller Sialyl-Einheiten in Lösung muss jedoch konstant sein. Bei beiden Konzentrationen entspricht dieser Wert 15% aller verfügbaren Monomeren-Einheiten. Das entspricht im Mittel einer Spaltung jeder 6. bis 7. glycosidischen Bindung entlang der Polysialinsäure Kette. Andere Ergebnisse des enzymatischen Abbaus hatten jedoch gezeigt, dass das Polymer durchschnittlich in Tetramere gespalten wird, folglich ein Wert von 25% aller verfügbaren Monomereinheiten erreicht werden sollte.<sup>92</sup>

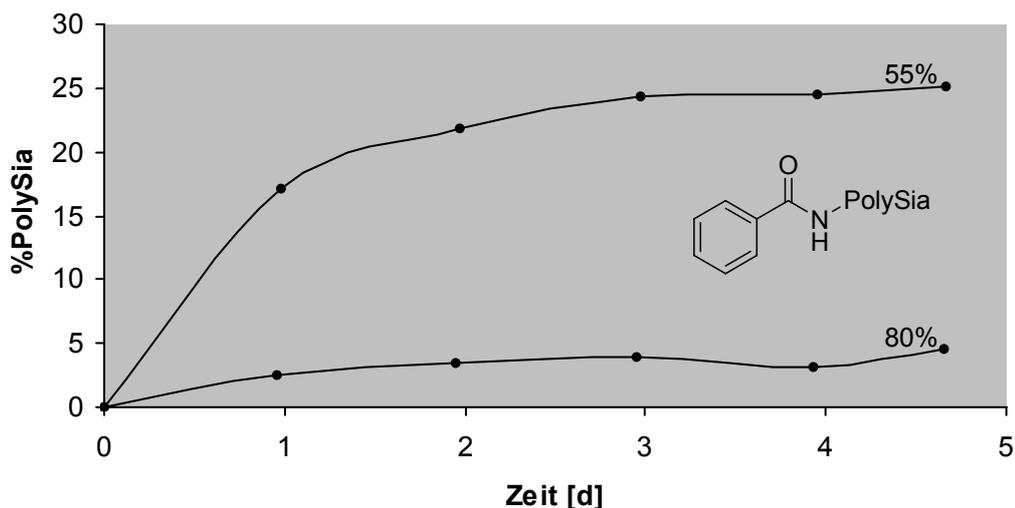
<sup>92</sup> D. Schwarzer, Institut für Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, persönliche Mitteilung

Der Grund für diese unterschiedlichen Werte lag möglicherweise an der Anfärbung im Thiobarbitursäure-Assay. Eine Anfärbung der reduzierenden Enden einer Lösung reiner Sialinsäure-Tetramere und einer Stoffmenge Sialinsäure, die exakt der Menge der reduzierenden Enden des Tetramers entsprach, zeigte kürzlich, dass die Intensität der Anfärbung bei dem Tetramer geringer ausfiel als bei Sialinsäure.<sup>92</sup> Der Grund für die schwächere Anfärbung könnte an der Periodatspaltung des Diols liegen (Abbildung 66). Sind weitere sterisch anspruchsvolle Reste an C-8 vorhanden, wie es beim Polymer der Fall ist, wird der Angriff des Periodats zwischen den Hydroxylgruppen an C-7 und C-6 erschwert und weniger  $\beta$ -Formylpyruvat freigesetzt. Die Anfärbung fällt somit geringer aus.

Eine absolute Bestimmung freier reduzierender Enden kann mit dieser Methode daher nicht erfolgen. Vergleichende Untersuchungen, wie sie beispielsweise für Aktivitätsstudien unterschiedlicher Endosialidasen publiziert wurden,<sup>93</sup> sind dennoch möglich und führen zu korrekten Ergebnissen. Auch bei den Derivaten der Polysialinsäure ist ein solcher Vergleich möglich: Hier lässt sich die Abbaubarkeit als Funktion der Zeit darstellen, wenn nicht die absolute Stoffmenge reduzierender Enden betrachtet wird, sondern die Umsetzung der Polysialinsäure-Derivate in Relation zur Hydrolyse des natürlichen Substrats gesetzt wird. Zu diesem Zweck wurde aus den jeweils vier letzten Messwerten der Endwert der Polysialinsäure-Hydrolyse ermittelt (Abbildung 70) und auf eine Konzentration von 0.016 mol/L, die der Konzentration der abgebauten Polysialinsäure-Derivate entspricht, umgerechnet. Zu jedem Zeitpunkt des Abbaus ließ sich damit beschreiben, wie viele glycosidische Bindungen des Derivats im Vergleich zur Polysialinsäure wurden. Dieses Verhältnis wird in allen folgenden Untersuchungen in %PolySia angegeben. Im Falle der Benzoyl-Derivate ergibt sich mit der Umrechnung die in Abbildung 71 dargestellte Grafik. Mit diesem Ergebnis lässt sich nun auch die Hydrolyse-Geschwindigkeit des Derivats einschätzen: Bei 55% *N*-Benzoylierung ist lediglich eine geringe Hydrolyse von bis zu 25% der im natürlichen Substrat spaltbaren glycosidischen Bindungen möglich.

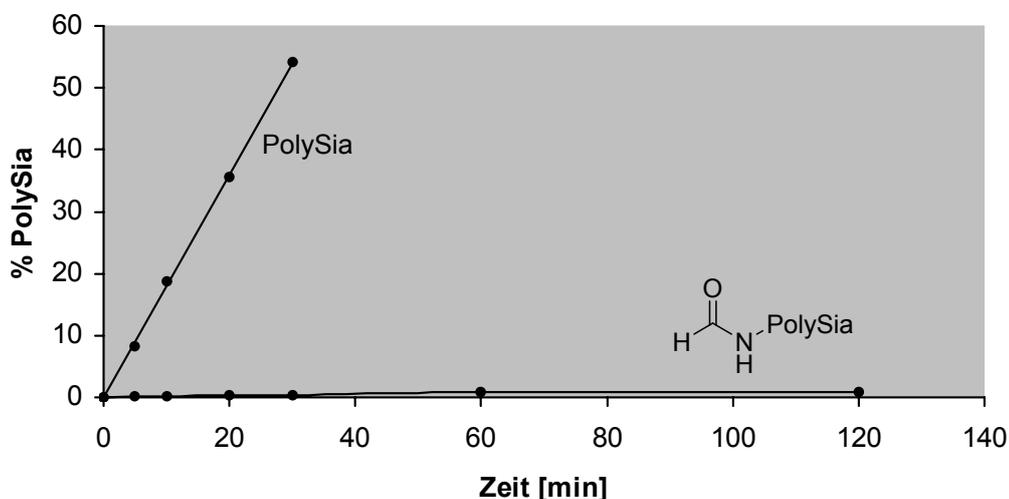
---

<sup>93</sup> M. Mühlhoff, K. Stummeyer, M. Grove, M. Sauerborn und R. Gerardy-Schahn, *J Biol Chem*, **2003**, 278, 12634-12644.



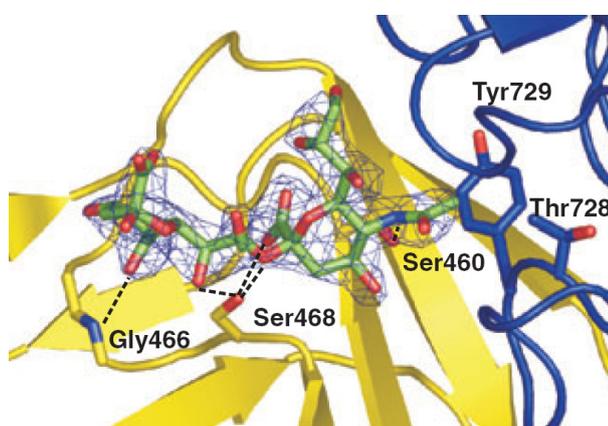
**Abbildung 71:** Enzymatischer Abbau der *N*-Benzoyl-Derivate relativ zum natürlichen Substrat. Die Daten wurden durch Umrechnung der in Abbildung 69 erhaltenen Werte erstellt. 25% der im natürlichen Substrat hydrolysierbaren glycosidischen Bindungen werden bei dem *N*-Benzoyl-Derivat (55% Derivatisierungsgrad) gespalten.

Im Folgenden wurde das *N*-Formyl-Derivat **43** auf seine Abbaubarkeit hin getestet. Erwartet wurde zunächst, dass eine Verkürzung des Amidsubstituenten keinen nennenswerten Einfluss auf die Abbaubarkeit des Derivats ausübt. Die enzymatische Hydrolyse mit anschließendem Thiobarbitursäure-Assay zeigte jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Innerhalb von 120 min wird ein Wert von unter 1% der im natürlichen Substrat hydrolysierbaren, glycosidischen Bindungen erreicht (Abbildung 72). Die Verbindung erreicht damit Werte, die auch bei anderen nicht-hydrolysierbaren Derivaten wie der *N*-Benzoyl-polysialinsäure (**39**, Derivatisierungsgrad 80%) beobachtet wurden. Der enzymatische Abbau wurde daher nicht über mehrere Tage verfolgt.



**Abbildung 72:** Abbau des synthetisierten *N*-Formyl-Derivats **43** der Polysialinsäure.

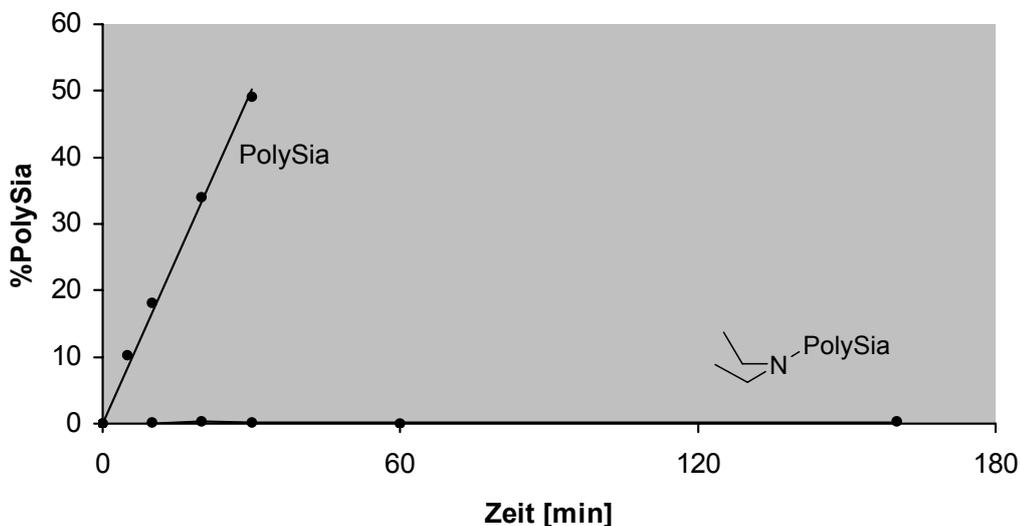
Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass das Derivat nicht in dem Thiobarbitursäure-Assay angefärbt werden konnte. Um dies zu überprüfen, wurde das Derivat in 0.1 mol/L Trifluoressigsäure 2.5 h bei 80 °C chemisch hydrolysiert und die Anfärbung erneut durchgeführt. Hier wurde eine violett-rote Lösung erhalten werden. Die während der Hydrolyse freigesetzten reduzierenden Enden konnten demnach in dem Assay nachgewiesen werden. Die geringe Abbaubarkeit des Derivats wurde damit bestätigt. Die in Abschnitt 1.5.2 beschriebene Kristallstrukturanalyse der EndoNF\* bietet eine Erklärung für die Stabilität des Derivats gegenüber der Enzym-Hydrolyse: In einer Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum des Enzyms wurde eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen der CH<sub>3</sub>-Gruppe des *N*-Acetyl-Substituenten und den Aminosäure-Resten Threonin (Thr728) und Tyrosin (Tyr729) nachgewiesen (Abbildung 73).



**Abbildung 73:** Bindungsstelle des Enzyms EndoNF\*, in der ein Sialinsäure-Dimer mit den Aminosäure-Resten des Enzyms EndoNF\* in Wechselwirkung tritt. Abgebildet sind zwei Protein-Ketten des Homotrimers. Die Aminosäure-Reste Gly466, Ser468 gehören zu einem Monomer, das in Gelb dargestellt ist. Die zweite Protein-Kette in Blau enthält die Aminosäure-Reste Tyr729 und Thr728. Ein Polymer wird an dieser Stelle gebunden und im benachbarten aktiven Zentrum hydrolysiert (Abbildung aus Stummeyer et al.).<sup>61</sup>

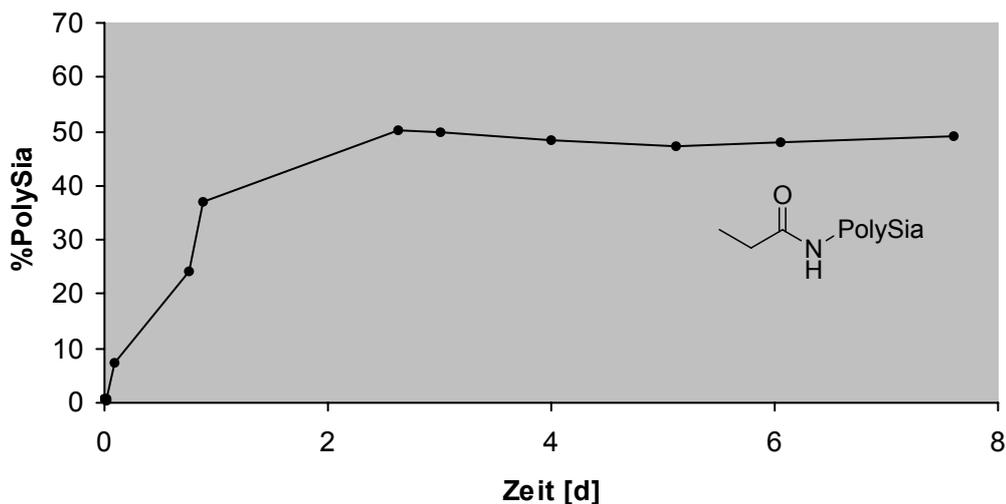
Diese Wechselwirkung kann bei Einführung eines Formyl-Substituenten nicht ausgebildet werden. Das Polymer wird so möglicherweise nicht in die richtige Konformation überführt, um in das benachbarte aktive Zentrum zu reichen. Eine Hydrolyse wird fast vollständig inhibiert. Vermutet wurde, dass auch der Stickstoff des Glycins (Gly466, Abbildung 73) eine für die Enzym-Substrat-Bindung wichtige Wechselwirkung mit dem Sauerstoff des Polysialinsäure-Acetamids eingeht. Daher wurde im Folgenden das *N*-Diethylamino-Derivat **53** (S. 61) untersucht, das als einzigem dieser Sauerstoff fehlt. Das Ergebnis des Thiobarbitursäure-Assays bestätigte die Bedeutung dieser Wechselwirkung. Über einen Zeitraum von 3 h

wurde ein Wert von 0.5% der im natürlichen Substrat abbaubaren Bindungen erreicht (Abbildung 74). Das Derivat ist damit nicht enzymatisch hydrolysierbar.



**Abbildung 74:** Untersuchung der Hydrolyse der 5-Diethylamino-polysialinsäure (**53**, Derivatisierungsgrad 96%) unter Katalyse durch das Enzym EndoNF\* relativ zu dem natürlichen Substrat.

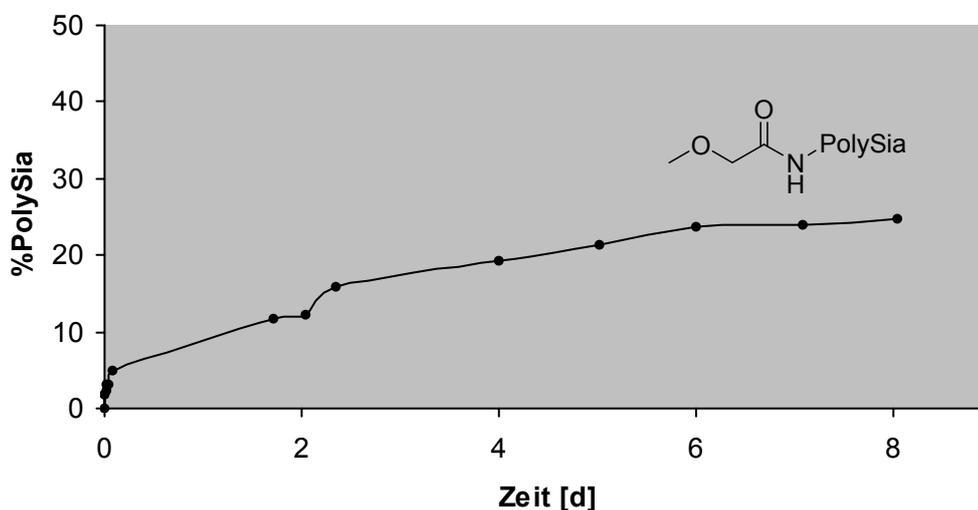
Im Folgenden sollte geklärt werden, wie sich eine Verlängerung des *N*-Acetyl-Substituenten auf die Abbaubarkeit auswirkt. Dieses wurde zunächst anhand des um eine CH<sub>2</sub>-Einheit erweiterten Derivats, der *N*-Propionyl-Verbindung **44** untersucht.



**Abbildung 75:** Hydrolyse der *N*-Propionyl-polysialinsäure (**44**, 93% derivatisiert, 7% Acetyl-Gruppen) unter Katalyse durch das Enzym EndoNF\* relativ zu dem natürlichen Substrat.

Der Abbau des Derivats erfolgte wie erwartet langsamer und erreichte einen Endwert von 50% der im natürlichen Substrat, hydrolysierbaren Bindungen. Da bei Polysialinsäure jede 4. glycosidische Bindung (25%) hydrolysiert wird, ergibt sich bei dem *N*-Propionyl-Derivat nur noch eine durchschnittliche Spaltung jeder 8. glycosidischen Bindung (12.5%). Der Vergleich mit dem Derivatisierungsgrad des Polymers (93% *N*-Propionyl und 7% *N*-Acetyl) zeigt, dass der Wert deutlich in der Nähe des *N*-Acetylsubstitutionsgrades von 7% liegt. Möglicherweise kann das Polymer nur dann hydrolysiert werden, wenn ein Acetylrest vorliegt. Auf diese Weise würde auch erklärt, warum das Derivat nach einem relativen Umsatz von 50% nicht langsam weiter hydrolysiert wird. Alle *N*-Acetylsialyl-Einheiten wären dann verbraucht und es befänden sich nur noch *N*-Propionyl-Gruppen innerhalb der Kette. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Erklärung rein hypothetisch ist. Wäre eine weitere Charakterisierung des Enzyms von Interesse, so könnte die Vermutung durch ein Kontrollexperiment überprüft werden: Bereits eine geringfügige Erhöhung des *N*-Acetyl-Grades (auf ca. 20%) müsste zu einem vollständigen Abbau des künstlichen Derivats führen.

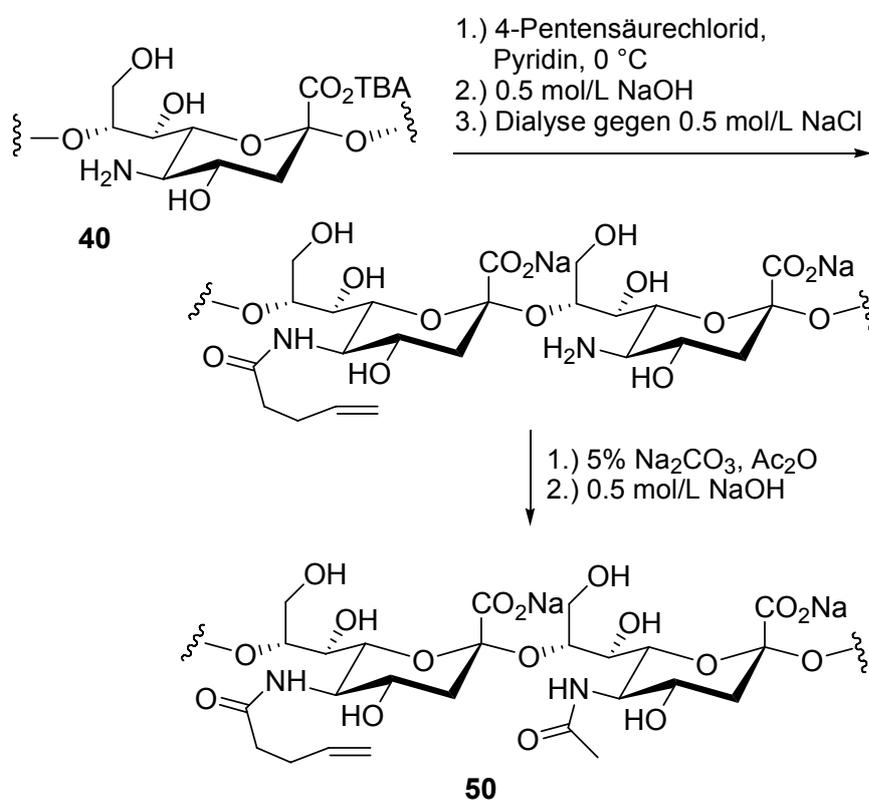
Wird die Acetamid-Gruppe der Polysialinsäure um eine weitere Methoxy-Gruppe erweitert (**47**, Derivatisierungsgrad 90%) so sinkt der Hydrolyse-Umsatz drastisch ab. Das Enzym kann nur noch wenige Enden spalten. Nach einer bestimmten Zeit wird so ein Endwert der Hydrolyse erreicht.



**Abbildung 76:** Enzymatischer Abbau der *N*-Methoxyacetyl-polysialinsäure (**47**, 90% Derivatisierung).

Wie bereits beschrieben, wurde das *N*-Pentenoyl-Derivat **50** durch einen Elektrospinning-Prozess in Anwesenheit von Triacrylat und Polyethylenoxid in ein dreidimensionales, faserförmiges Material überführt. Die Frage war nun, ob dieses Derivat unter Enzym-Katalyse hydrolysiert würde. Eine Analyse der linearen Verbindung mittels Thiobarbitursäure-Assay zeigte jedoch, dass das Derivat, das einen Derivatisierungsgrad von 98% besaß, nicht

durch das Enzym abgebaut wurde. Durch die Einführung der Alkyl-Kette wurde die Enzym-Substrat-Bindung vollständig unterbunden. Damit konnte auch das aus diesem Material hergestellte faserförmige Derivat nicht abgebaut werden. Um die biologischen Eigenschaften der Polysialinsäure aufrechtzuerhalten, musste der Derivatisierungsgrad chemisch verringert werden. Zur Synthese sollte die Methode verwendet, bei deren Verwendung bereits der Derivatisierungsgrad des *N*-Myristoyl-Derivats **42** (Abschnitt 3.4.3., S. 59) und des *N*-Azidobutanoyl-Derivats **52** kontrolliert eingestellt werden konnte. Um Verbindungen mit unterschiedlichem Substitutionsgrad der *N*-Pentenoyl-Gruppe zu erhalten, wurde die TBA- $\gamma$ -Aminosäure mit geringeren Äquivalenten 4-Pentensäurechlorids versetzt. Anschließend wurde die Produkt-Lösung gegen NaCl-Lösung dialysiert und die restlichen Amino-Gruppen in wässriger Natriumcarbonat-Lösung reacctyliert (Abbildung 77).



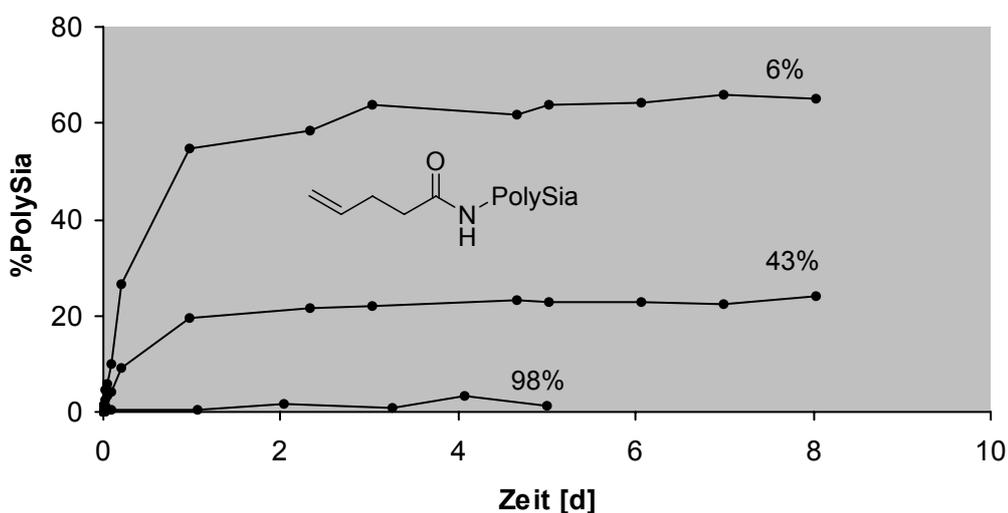
**Abbildung 77:** Herstellung der *N*-Pentenoyl-Derivate der Polysialinsäure (**50**) mit unterschiedlichen Derivatisierungsgraden.

Zur Herstellung des bereits erwähnten 98% substituierten Derivats **50** waren 5 Äquivalente 4-Pentensäurechlorid notwendig. Wie in Tabelle 8 dargestellt, lässt sich durch Einsatz geringerer Äquivalente der Substitutionsgrad kontrolliert herabsetzen.

Äquivalente 4-Pentensäurechlorid	Derivatisierungs- grad
5.0 Äq	98%
3.0 Äq	43%
0.2 Äq	6%

**Tabelle 8:** Darstellung der *N*-Pentenoyl-Derivate **50** mit verschiedenen Substitutionsgraden.

Im Anschluss an die Synthese der Verbindungen wurde die Hydrolyse der Derivate über einen Zeitraum von acht Tagen beobachtet. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse aller in Tabelle 8 aufgeführten Verbindungen ist in Abbildung 78 zusammengefasst.



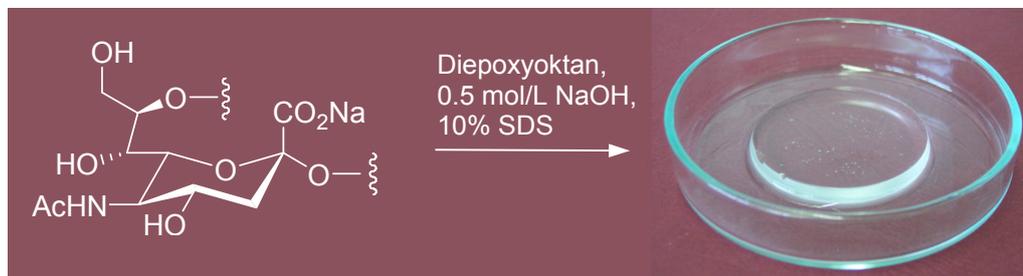
**Abbildung 78:** Enzymatischer Abbau der *N*-Pent-4-enoyl-polysialinsäure-Derivate (**50**) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden. Alle restlichen Substituenten des Stickstoffs sind Acetylreste.

Zu erkennen ist die deutliche Steigerung der Hydrolyse-Endwerte bei einer Verringerung des Derivatisierungsgrades von 98% über 43% auf 6%. Das zu 6% derivatisierte Polymer erreicht in zwei bis drei Tagen 65% des Endwertes des natürlichen Substrats. Dieses Derivat könnte nun ebenfalls, wie bereits für die 98% derivatisierte Verbindung erfolgt, zunächst in ein faserförmiges Material verarbeitet und anschließend über die funktionellen Gruppen quervernetzt werden. Eine Quervernetzung von 6% sollte ausreichen, um ein stabiles, unlösliches Material zu erhalten. Im Falle der Darstellung des Polysialinsäure-Hydrogels genügte ebenfalls eine Quervernetzung von 9%. Nach dieser Quervernetzung wäre das Enzym in der Lage, langsam die acetylierten Sialyl-Reste zu spalten.

Anhand der Abbau-Studien konnte gezeigt werden, dass das Enzym EndoNF\* nur dann in der Lage ist das Substrat zu hydrolysieren, wenn es einen bestimmten Grad an *N*-Acetyl-Gruppen aufweist. Sialyl-Reste, die künstliche Amid-Substituenten enthalten, können nicht im aktiven Zentrum gebunden und folglich nicht gespalten werden. Für die Verwendung als Biomaterial bietet dies den Vorteil, dass sich die Hydrolyse des Substrats von zwei Stunden (reine Polysialinsäure, Abbildung 70, S. 74) auf mehrere Tage erhöhen lässt. Darüber hinaus lässt sich mit der vorgestellten chemischen Methode die erforderliche Abbaubarkeit kontrolliert einstellen. Das Material kann so je nach Verwendungszweck exakt den erforderlichen, biologischen Eigenschaften angepasst werden. Zudem wird eine Funktionalisierung des Materials erreicht, die für eine Weiterverarbeitung zu einem dreidimensionalen Gerüstmaterial notwendig ist.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit Beendigung dieser Arbeit lässt sich in mehrfacher Hinsicht die eingangs gesetzte Hypothese einer potentiellen klinischen Anwendung von Polysialinsäure bestätigen. Das lineare Polymer besitzt eine hohe Wasserlöslichkeit, konnte aber mit Hilfe eines hydrophoben Quervernetzers in ein wasserunlösliches, dreidimensionales Gerüstmaterial überführt werden (Abbildung 79). Eine Vernetzung der Polysialinsäure wurde mit Diepoxyoktan in wässriger Lösung erreicht. Erst durch Zugabe von SDS als Löslichkeitsvermittler war es möglich, den Reaktionsmaßstab so zu vergrößern, dass vergleichende biologische Studien durchgeführt werden konnten. Die Hydrogele konnten reproduzierbar hergestellt werden und waren in Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 7.0 stabil.



**Abbildung 79:** Herstellung eines stabilen, unlöslichen Hydrogels basierend auf Polysialinsäure, das innerhalb von 11 Tagen durch die Endosialidase EndoNF\* abbaubar ist.

Im Anschluss wurde die Zusammensetzung eines in 0.1 mol/L Trifluoressigsäure hydrolysierten Hydrogels untersucht. Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass ein mit einem Äquivalent Diepoxyoktan hergestelltes Hydrogel einen Quervernetzungsgrad von 9% erreicht. Mit Hilfe der Endosialidase EndoNF\* konnte dieses Gel unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, 37 °C) innerhalb von 11 Tagen abgebaut werden. Bei Verwendung geringerer Mengen des Quervernetzers wurde der enzymatische Abbau beschleunigt und eine Verflüssigung des Materials trat innerhalb von zwei Tagen ein. Durch die weitere biologische Bewertung wurden die Hydrogele in Hinblick auf ihre Applikation als Matrizen für die Nervenregeneration eingeschätzt. Verwendet wurden PC12 Zellen, die unter Differenzierungsbedingungen und Zugabe des Nervenwachstumsfaktors NGF neuronale Ausläufer bilden. Sie zeigen damit Eigenschaften, die denen von Neuronen ähneln. Die Kultivierung von PC12 Zellen auf der Oberfläche der Hydrogele konnte zunächst lediglich die anti-adhäsive Eigenschaft der negativ geladenen Polysialinsäure bestätigen. Durch eine teilweise Maskierung der Oberfläche mit Kollagen I und einem Gemisch aus Poly-L-Lysin und Kollagen I gelang es jedoch, die Adhäsion der Zellen um das acht- bis zehnfache zu

steigern. Darüber hinaus wurde eine Differenzierung der PC12 Zellen besonders auf Gelen mit einer Beschichtung aus hochverdünntem Matrigel beobachtet. Auch die enzymatische Abbaubarkeit der Gele blieb bei der Protein-Maskierung erhalten. Desweiteren wurden am Institut für Neuroanatomie primäre Neuronen aus der Ratte auf der Oberfläche der Polysialinsäure-Hydrogele kultiviert und die Hydrogele als nicht zytotoxisch eingestuft. Auch hier mussten die Hydrogele mit passenden Protein-Lösungen vorinkubiert werden, um die Adhäsion und Viabilität der Zellen zu steigern. Die Ergebnisse zeigen das hohe Potential des Polysialinsäure-Materials für eine zukünftige therapeutische Anwendung bei der Nervenregeneration. Nach Läsion und einer *in vivo* Implantation könnte das künstliche Material während der Wiederherstellung der Nervenfasern hydrolysiert werden. Der enzymatische Abbau kann darüber hinaus exogen induziert werden, da kein spezifischer Mechanismus zur Spaltung von Polysialinsäure im Menschen bekannt ist. Ein weiterer medizinischer Eingriff, wie es bei Silikon-Implantaten der Fall ist, wäre nicht erforderlich.

Weitere hergestellte Derivate der linearen Kette der Polysialinsäure stellten die C-1-Amide der Polysialinsäure dar. Ein besonderes Problem bei der Derivatisierung der Polysialinsäure stellte die geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln dar. Die C-1-Amide wurden aus dem Polysialinsäure-Lacton (**23**) und dem entsprechenden Amin in Methanol hergestellt. Erst durch weiteren Zusatz von Pyridin konnte das Polymer in der Reaktionsmischung gelöst und ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Die Endoneuraminidase zeigte keine Aktivität gegenüber diesen Derivaten. Das C-1-NH<sub>2</sub>-Amid (**28**) konnte am Institut für Kautschuktechnologie in eine dreidimensionale Faser verarbeitet werden. Auf diesem Material kultivierte immortalisierte Schwann-Zellen wiesen eine natürliche Zellmorphologie auf.

Bei der Synthese der Polysialinsäure-Ester zeigten sich erneut starke Löslichkeitsprobleme des negativ geladenen Polymers in den verwendeten Flüssigkeiten. Hier wurde weder ein organisches Lösungsmittel noch eine ionische Flüssigkeit mit passender Polarität gefunden. Erst durch Austausch des relativ harten Natrium-Ions des Carboxylats gegen ein hydrophobes, voluminöses Tetrabutylammonium-Kation konnte das Polymer in organischen Lösungsmitteln gelöst werden. Der Ethylester der Polysialinsäure (**27**) konnte in einem Derivatisierungsgrad von 96% und der Benzylester (**24**) in einem Grad von 60% erhalten werden. Beide waren in Wasser instabil, konnten aber für weitere Derivatisierungen verwendet werden.

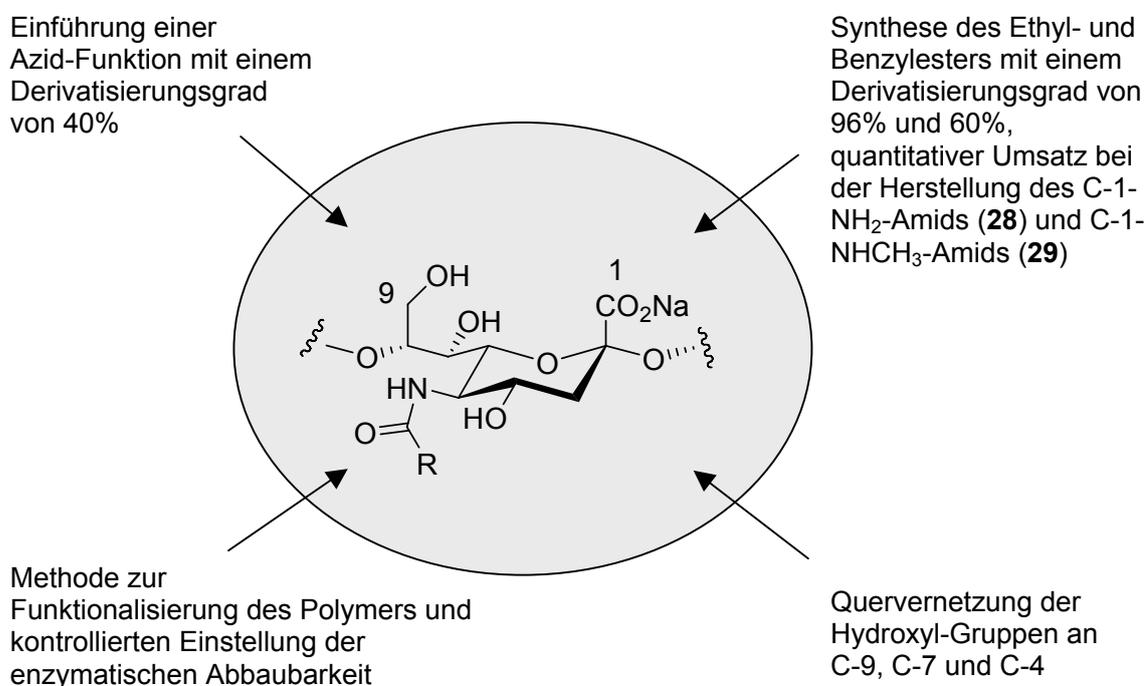
Die Hydroxyl-Gruppen der Polysialinsäure zeigten eine geringe Selektivität und Reaktivität bei der weiteren Derivatisierung. Da z.T. hohe Äquivalente der Reagenzien eingesetzt werden mussten, kam es im Falle der Ethyl-**(31)** und Benzyl-Verbindungen (**30**) zu

Mehrfachsubstitution. Das Azid (**36**) konnte zwar aus dem Ethylester über das Tosylat (**35**) in einer Monosubstitution erhalten werden, die Ausbeute betrug jedoch lediglich 40%. Ein Problem stellte die Aufarbeitung nach Maßstabsvergrößerung dar. Das Tosylat musste durch Ausfällung aus DMSO gereinigt werden und konnte bei größeren Ansätzen nicht sauber isoliert werden.

Zusätzliche Derivatisierungen der Polysialinsäure wurden vorgenommen, um eine gezielte *N*-Funktionalisierung des linearen Polymers zu erreichen. Die Einführung neuer, künstlicher Amidsubstituenten unter Standardbedingungen in Pyridin misslang zunächst aufgrund der Unlöslichkeit des nativen Polymers in organischen Lösungsmitteln. In wässriger Lösung dagegen konnte die  $\gamma$ -Polyaminosäure quantitativ reacyliert und zum anderen mit Benzoylchlorid zu der *N*-Benzoyl-polysialinsäure (**39**) umgesetzt werden. Die Derivatisierungsgrade lagen bei 55-80%. Restliche freie Aminogruppen wurden in das entsprechende Acetamid überführt. Die Reaktion zu hydrophoben, langkettigen Amiden konnte weder in Pyridin noch in Wasser durchgeführt werden, da das Polymer unzureichend löslich oder das verwendete Säurechlorid nicht ausreichend stabil war. Die  $\gamma$ -Polyaminosäure wurde daher bei pH 10 in ihre Tetrabutylammonium-Form überführt und konnte so vollständig in Pyridin gelöst werden. Auf diese Weise wurden insgesamt zwölf *N*-Derivate der Polysialinsäure synthetisiert (Abbildung 80). Durch eine Funktionalisierung mit einer endständigen Doppelbindung konnte das Derivat **50** nach Elektrosponning und Zugabe eines Triacrylats am Institut für Kautschuktechnologie in ein stabiles, wasserunlösliches Material verarbeitet werden.

Die *N*-Derivate wurden auch im Hinblick auf ihre Abbaubarkeit durch die Endosialidase untersucht. Das Derivat **43** mit dem kleinsten Substituenten, einem *N*-Formyl-Amid, das aus einem Aktivester in DMF hergestellt worden war, konnte durch eine fehlende Interaktion mit dem Enzym nicht hydrolysiert werden. Der Abbau misslang ebenso bei einem durch reduktive Aminierung gewonnenen Derivat **53**, dem der an der Enzym-Substrat-Bindung beteiligte Sauerstoff fehlte. Alle anderen Derivate zeigten eine Abbaubarkeit in starker Abhängigkeit von ihrem Derivatisierungsgrad. Mit Hilfe der zuvor optimierten Methode konnte der Derivatisierungsgrad bei Substituenten, wie *N*-Myristoyl (26%) und *N*-Azidobutanoyl (31% und 91%) herabgesetzt werden. Am Beispiel der *N*-Pent-4-en-polysialinsäure (**50**) wurde ebenfalls bewiesen, dass geringere Substitutionsgrade (von 98% über 43% auf 6%) kontrolliert eingestellt werden können. Das Herabsetzen des Derivatisierungsgrades einer nicht hydrolysierbaren Verbindung (98% *N*-Pentenoyl-Gruppen) führte zu einem Material, das innerhalb von zwei bis drei Tagen abgebaut werden konnte (6% *N*-Pentenoyl-Gruppen). Der enzymatische Abbau des natürlichen Substrats wurde damit nach Derivatisierung von zwei Stunden auf mehrere Tage verlangsamt. Abbaugeschwindigkeit und

N-Funktionalisierung können damit chemisch angepasst werden. Die Methode ist von hoher Relevanz für die Derivatisierung zukünftiger auf Polysialinsäure basierender Biomaterialien.

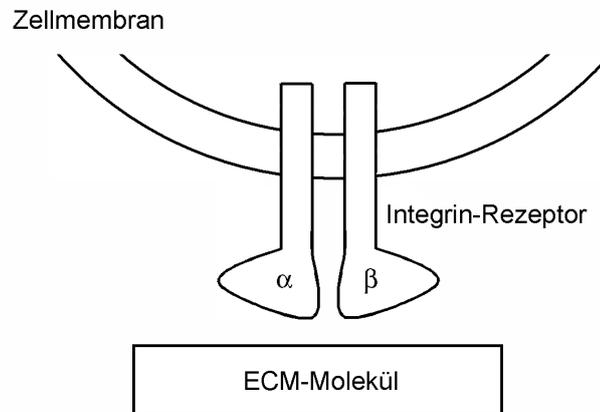


**Abbildung 80:** Übersicht über die Derivatisierungen der Polysialinsäure. Aus der TBA- $\gamma$ -Polyaminosäure wurden folgende N-Derivate hergestellt: R = H (**43**), CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**44**), CHCH (**45**), CH<sub>2</sub>OH (**46**), CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (**47**), CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**48**), CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**49**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub> (**50**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CCH (**51**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (**52**), CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub> (**42**) und R = Ph (**39**). Darüber hinaus wurde eine 5-Diethylamino-Verbindung (**53**) durch reduktive Aminierung erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben ebenfalls Hinweise auf eine zukünftige Verbesserung der Materialeigenschaften. Um die anti-adhäsiven Eigenschaften anzupassen, könnten spezielle, für die Zelladhäsion wichtige Aminosäure-Reste eingeführt werden. Bereits 1984 entdeckten Pierschbacher und Ruoslahti, dass eine Sequenz aus nur wenigen Aminosäure-Resten des Fibronectins, einem Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, für die Adhäsion einer Mehrzahl von Zellen verantwortlich ist.<sup>94</sup> Die für diese Funktion wichtige Domäne ließ sich auf lediglich drei Aminosäure-Reste reduzieren: Arginin (R), Glycin (G) und Asparginsäure (D). Die RGD-Sequenz bindet an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, der

<sup>94</sup> M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti, *Nature*, **1984**, 309, 30-33.

zu einer Klasse innerhalb der Integrin-Familie gehört.<sup>95</sup> Integrine stellen wichtige Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar, an die Moleküle der Extrazellulärmatrix binden (Abbildung 81).<sup>96</sup>



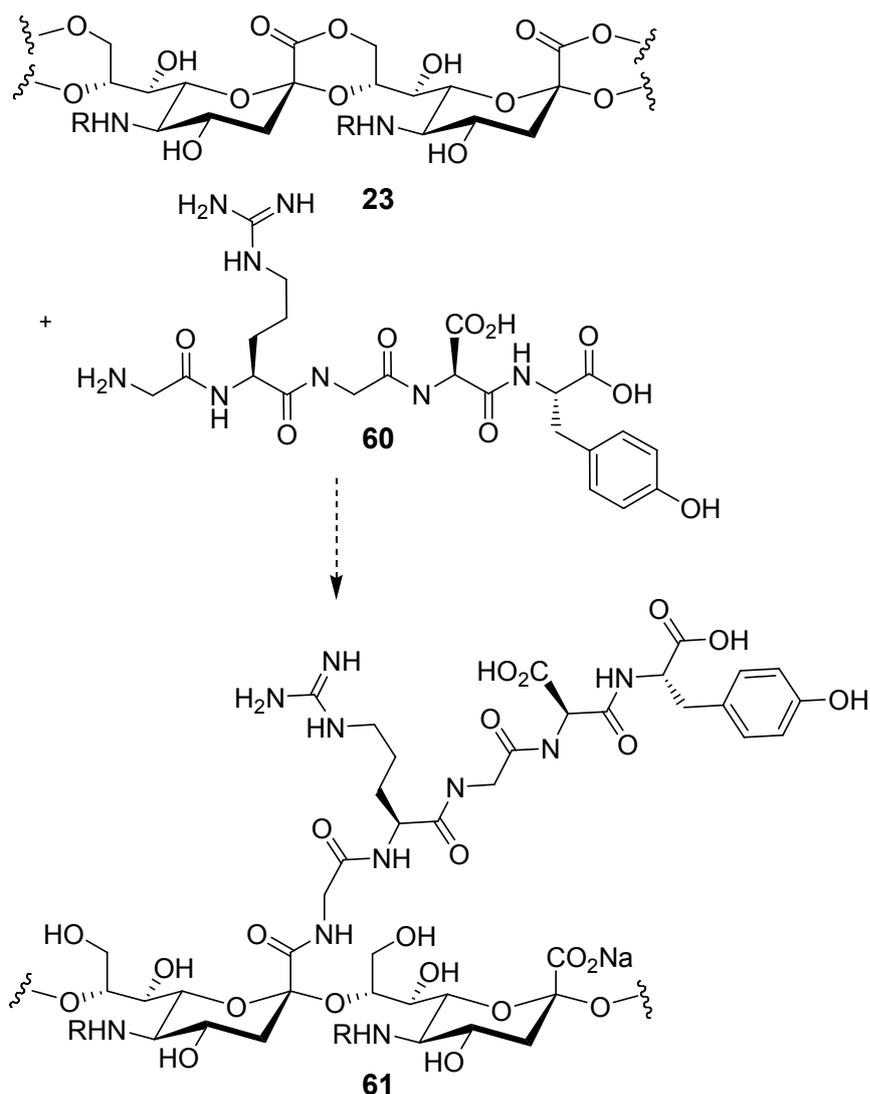
**Abbildung 81:** Schematische Darstellung der Integrin-vermittelten Matrix-Interaktion. Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Extrazellulär binden sie an spezifische ECM-Moleküle. Intrazellulär besitzen sie eine Reihe weiterer Mechanismen.<sup>96</sup>

Die RGD-Sequenzen, aber auch andere Zellerkennungsmotive, könnten gezielt auf dem Biomaterial immobilisiert werden. Zur Herstellung adhäsiver Polysialinsäure-Biomaterialien könnte beispielsweise das *N*-Pentenoyl-Derivat **50** in einer Carbodiimid-Kupplung in das entsprechende Lacton (**23**) überführt werden. Anschließend könnte die Ringöffnung mit dem Stickstoff des Glycins, das zu einer Sequenz aus den Aminosäure-Resten Glycin-Arginin-Glycin-Asparginsäure-Tyrosin (GRGDY, Abbildung 82) gehört, erfolgen. Bei einem geringeren Derivatisierungsgrad, ist das Produkt weiterhin wasserlöslich. Nach der anschließenden Verarbeitung in ein faserförmiges Material könnte die Quervernetzung über die funktionellen Gruppen erfolgen.

---

<sup>95</sup> C. Bökel und N. H. Brown, *Dev Cell*, **2002**, 3, 311-321.

<sup>96</sup> G. Löffler und P. E. Petrides, *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1998**.

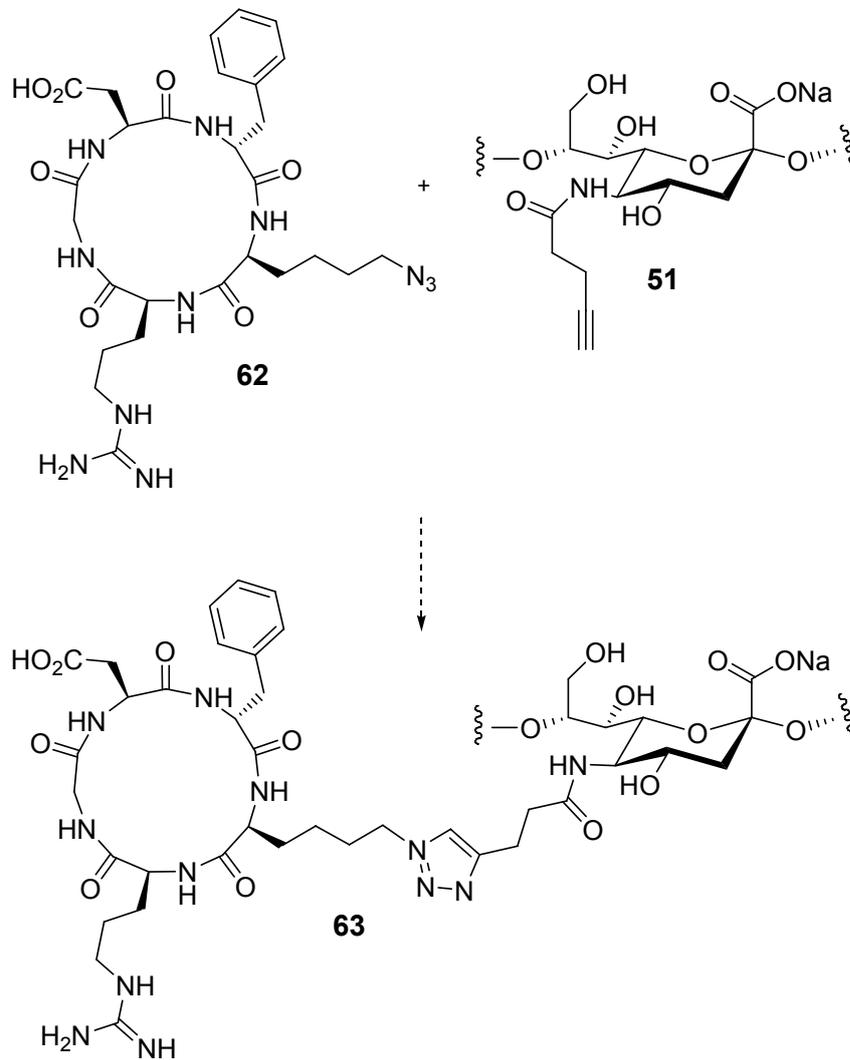


**Abbildung 82:** Einführung einer Sequenz aus den Aminosäure-Resten Glycin-Arginin-Glycin-Asparginsäure-Tyrosin (GRGDY) durch Ringöffnung des Lactons (**23**). Mit  $\text{R} = \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CHCH}_2$  (Verbindung **50**) ließe sich das Derivat anschließend verspinnen und quervernetzen.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Adhäsion von Zellen auf dem Material stellt die Einführung zyklischer RGD-Strukturen dar. Hierzu ließe sich das *N*-Pent-4-inoyl-Derivat **51** durch 1,3-dipolare Cycloaddition mit dem Azido-Pentapeptid **62** (hergestellt nach Dijkgraaf et al.<sup>97</sup>) derivatisieren (Abbildung 83). Würde lediglich ein bestimmter Teil der Alkin-Gruppen des Polymers durch das Peptid belegt, könnten die restlichen Alkin-Funktionen mit dem Polysialinsäure-Azid (**52**) durch weitere 1,3-dipolare Cycloaddition verbunden werden. Möglicherweise würde, wie im Falle des mit Diepoxyoktan hergestellten Hydrogels, eine

<sup>97</sup> I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. W. van Esse, A. J. Brouwer, F. H. Corstens, O. C. Boerman, D. T. Rijkers und R. M. Liskamp, *Org Biomol Chem*, **2007**, *5*, 935-944.

9%ige Vernetzung mit dem Polysialinsäure-Azid (**52**) ausreichen, um ein stabiles, adhäsives Hydrogel zu erhalten.



**Abbildung 83:** 1,3-Dipolare Cu-katalysierte Cycloaddition einer Verbindung aus *N*-Pent-4-inoyl-polysialinsäure (**51**) und eines zyklischen Pentapeptids (**62**), das aus den Aminosäure-Resten Arginin, Glycin, Asparaginsäure, Phenylalanin und Lysin besteht.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeines

#### Reaktionen

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in im Ölpumpenvakuum evakuierten Glasgeräten in einer sauerstofffreien, trockenen Argonatmosphäre durchgeführt. Wenn erforderlich, wurden die Geräte zuvor im Vakuum ausgeheizt. Wenn nicht anders angegeben, wurde mit einem Magnetrührer gerührt.

#### Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren getrocknet<sup>98</sup> und unter Argonatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt.

Absolute Lösungsmittel, wie DMSO und DMF wurden käuflich erworben (FLUKA, ACROS) und wie geliefert ohne weitere Reinigung eingesetzt.

#### Dünnschicht- und Flashchromatographie

Qualitative Dünnschichtchromatogramme erfolgten auf Silicagel - beschichteten Aluminiumfolien vom Typ 60 F254 der Firma Merck. Der Nachweis der Substanzen geschah durch Fluoreszenzdetektion unter UV - Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254 \text{ nm}$ , mittels Entwicklung durch Eintauchen in eine Lösung aus 1.2 g Thymol, 10 ml konz. Schwefelsäure und 190 ml Ethanol mit anschließender Wärmebehandlung oder Entwicklung durch Eintauchen in eine Lösung aus 10 ml konz. Schwefelsäure, 10 ml Eisessig und 80 ml Methanol mit anschließender Wärmebehandlung.<sup>99</sup>

Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel der Korngröße 40 - 63  $\mu\text{m}$  der Firma J. T. BAKER verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden zuvor destilliert. Das verwendete Eluentenverhältnis ist in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben.

---

<sup>98</sup> D. D. Perrin und W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.

<sup>99</sup> J. Leonard, B. Lygo und G. Procter, *Praxis der organischen Chemie*, VCH - Verlag, Weinheim, **1996**.

### Dialyse

Zur Reinigung der Polymere wurden die Dialysemembranen Visking der Firma Roth mit einer Ausschlussgrenze von 14000 g/mol und einem Durchmesser von 21.5 und 49 mm verwendet. Die Dialyse erfolgte auf zwei Arten: Zum einen wurde sie in 5 L Bechergläsern durchgeführt. Dest. H<sub>2</sub>O oder NaCl-Lösung wurden mind. dreimal täglich ausgetauscht. Zum anderen wurde die wässrige Lösung kontinuierlich ausgetauscht. Hierzu wurde die entsprechende Lösung aus einem 5-L-Vorratsgefäß in ein Becherglas gepumpt (Verwendung einer Aquariumpumpe). Die vollständige Aufreinigung dauerte ein bis zwei Tage.

### Ultrafiltration

Zur Reinigung wurden neben der Dialysemembranen die Ultrafiltrationseinheiten Amicon Ultra der Firma Millipore mit einer Ausschlussgrenze von 10000 g/mol verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei maximal 5000 x g.

### <sup>1</sup>H - NMR - Spektroskopie

Die Aufnahme von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erfolgte mit den Geräten DPX-200 (200 MHz) und AM-400 (400 MHz) der Firma Bruker bei Raumtemperatur. Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$  - Werten (ppm) und die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hertz (Hz) angegeben, die Multiplizitäten wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, se = Sextett, sep = Septett, m = Multipllett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Abkürzungen geben an: d = doppelt, t = dreifach.

### <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie

<sup>13</sup>C-NMR - Spektren wurden mit den Geräten AM-400 (100 MHz) der Firma BRUKER aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten (ppm) angegeben, der Bezug ist bei den jeweiligen Messungen vermerkt. Die angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren, wobei folgende Abkürzungen verwendet werden: s = Singulett (quartärer Kohlenstoff), d = Dublett (tertiär), t = Triplett (sekundär), q = Quartett (primär). Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen  $\alpha$ -ständigen Wasserstoffatome wurde nach der DEPT 90- und DEPT 135-Methode bestimmt. Sofern notwendig und möglich wurden für eine vollständige Interpretation <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-Korrelationspektren, HMBC-, HMQC- oder NOE-Experimente durchgeführt.

### Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen wurden mit einem Micromass LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop - Modus in eine HPLC -Anlage der Firma Waters (Alliance 2695).

### Infrarotspektroskopie

IR - Spektren wurden mit einem FT-IR-Gerät Vektor der Firma Bruker gemessen, die Aufnahme der Spektren erfolgte über eine ATR-Einheit. Die Lage der Schwingungen wird in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben, charakteristische oder besonders intensive Banden werden mit den Kürzeln b für breit oder s für stark versehen.

### Gelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde mit einer vertikalen Flachgelapparatur der Firma Roth durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Roth und Aldrich bezogen.

### CHN-Analyse

Elementaranalysen wurden auf einem Elementar Vario EL (Geräteversion F) der Firma Analyse Systeme GmbH im Routinebetrieb gemessen. Die gemessenen Werte für den Kohlenstoff und Stickstoff-Anteil weichen aufgrund der Hygroskopie des Polymers z.T. stark von den berechneten ab (Tabelle 9). Bei dem Verhältnis C/N wird der  $\text{H}_2\text{O}$ -Gehalt des Polymers nicht berücksichtigt. Es ergibt sich lediglich eine Abweichung von 0.76% des gemessenen von dem berechneten Wert.

$C_{\text{berechnet}}$	$C_{\text{gemessen}}$	$N_{\text{berechnet}}$	$N_{\text{gemessen}}$	$C/N_{\text{berechnet}}$	$C/N_{\text{gemessen}}$
42.18	34.02	4.47	3.63	9.44	9.36

**Tabelle 9:** CHN-Analyse der käuflich erworbenen  $\alpha$ -2,8-Polysialinsäure (Nacalai Tesque) nach weiterer Gefriertrocknung mit einer Reinheit von 98% laut Herstellerangaben.

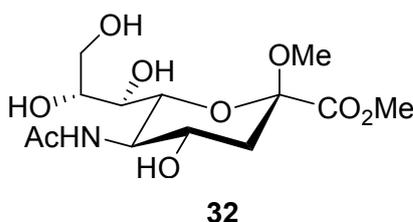
Bei allen Derivaten der Polysialinsäure wird unter Berücksichtigung des Derivatisierungsgrades das C/N-Verhältnis angegeben.

### **Bestimmung des Derivatisierungsgrad**

In den folgenden Versuchsvorschriften wird neben der Ausbeute auch der Derivatisierungsgrad der jeweiligen Polymerverbindung angegeben. Er beschreibt das durch  $^1\text{H-NMR}$ - und in wenigen Fällen auch durch  $^{13}\text{C-NMR}$ -Untersuchung bestimmte Maß der Polysialinsäure-Modifizierung. Die Signal-Integration einer eingeführten funktionellen Gruppe erfolgte entweder in Relation zu dem Signal des  $\text{H-3}_{\text{eq}}$ , den  $\text{CH}_3$ -Protonen des Acetamids (falls vorhanden) oder dem  $\text{H-3}_{\text{ax}}$  der Polysialinsäure.

## 5.2 Derivatisierungen der Sialinsäure

### Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-β-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (32)



Zur Herstellung des Methylglycosids wurde das Ionenaustauscher-Harz Amberlite IR-120 H<sup>+</sup> verwendet. Das Harz wurde zunächst mit Methanol, Wasser und erneut mit Methanol bis zum Erhalt eines farblosen Filtrats gewaschen und im Vakuum getrocknet.

1 g (3.2 mmol) gefriergetrocknete Sialinsäure (**18**) wurden mit 1.7 g Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>, 0.71 mL (6.4 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 150 mL abs. Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Harz abfiltriert und sorgfältig mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft und das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Insgesamt wurden 793 mg als farbloser, amorpher Feststoff (2.35 mmol, 74%) erhalten. In einer Ausbeute von 63% wurde das reine β-Methylglycosid erhalten, die restlichen 11% stellten eine Mischfraktion des α- und β-Methylglycosids da.

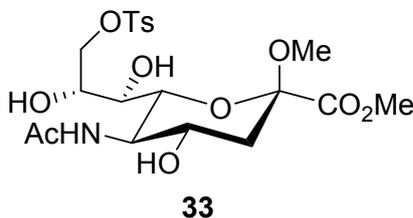
**Rf** : 0.14 (α-Anomer); 0.10 (β-Anomer) (DCM/MeOH 5:1)

β-Anomer: **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ: 4.02 (dddd, J = 11.3, 8.0, 4.9, 1.9 Hz, 1H, H-4), 3.92-3.78 (m, 4H, H-8, H-5, H-9<sub>a</sub>, H-6), 3.82 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (dd, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H, H-9<sub>b</sub>), 3.52 (d, 12.9 Hz, 1H, H-7), 3.28 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.36 (dd, J = 12.8, 4.9 Hz, 1H, 3-H<sub>eq</sub>), 2.03 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.66 (dd, J = 12.8, 11.3 Hz, 1H, 3-H<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 173.82 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 169.90 (s, C-1), 99.41 (s, C-2), 71.30 (d, C-6), 70.42 (d, C-8), 69.19 (d, C-7), 66.71 (d, C-4), 64.31 (t, C-9), 52.78 (d, C-5), 52.21 (q, COOCH<sub>3</sub>), 50.68 (q, OCH<sub>3</sub>), 40.58 (t, C-3), 21.81 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS (ESI)**: m/z = 360.1285 (berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub> + Na<sup>+</sup>: m/z = 360.1271)

**Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-9-O-p-toluolsulfonyl-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (33)**

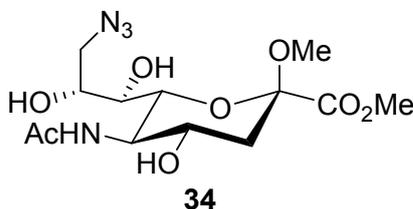


30 mg (0.089 mmol) des  $\beta$ -Methyglycosids **32** wurden in 0.75 mL abs. Pyridin gelöst, auf 0 °C gekühlt und zu der Lösung 17 mg (0.089 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid (TsCl) zugegeben.<sup>77</sup> Anschließend wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt und dabei auf RT erwärmt. Es wurden weitere 5 mg TsCl bei 0 °C zugegeben und 4 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Es wurden 29 mg (0.059 mmol, 66%) eines farblosen Öles erhalten.

**Rf:** 0.48 (DCM/MeOH = 5:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.81 (d, J = 8.19 Hz, 2H, H-2<sub>ar</sub>), 7.46 (d, J = 8.19, 2 H, H-3<sub>ar</sub>), 4.32 (dd, J = 9.38, 0.85 Hz, 1 H, H-9<sub>a</sub>), 4.07 (dd, 9.38, 6.14 Hz, 1 H, H-9<sub>b</sub>), 4.05-3.97 (m, 2 H, H-4, H-8), 3.80 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 3.83-3.74 (m, 2 H, H-5, H-6), 3.45 (d, J = 9.21 Hz, 1 H, H-7), 3.22 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.47 (s, 3 H, ar-CH<sub>3</sub>), 2.34 (dd, J = 12.94, 4.78 Hz, 1 H, H-3<sub>eq</sub>), 2.02 (s, 3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.62 (dd, J = 12.94, 11.44, 1 H, H-3<sub>ax</sub>);

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 173.6 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 169.3 (s, C-1), 145.0 (s, C-4<sub>ar</sub>), 132.8 (s, C-1<sub>ar</sub>), 129.7 (d, C-3<sub>ar</sub>), 125.6 (d, C-2<sub>ar</sub>), 99.0 (s, C-2), 72.9 (t, C-9), 70.7 (d, C-6), 68.5 (d, C-7), 67.7 (d, C-8), 66.1 (d, C-4), 53.4 (d, C-5), 52.3 (q, COCH<sub>3</sub>), 50.2 (q, OCH<sub>3</sub>), 40.2 (t, C-3), 21.3 (q, NHCOCH<sub>3</sub>), 20.2 (q, ar-CH<sub>3</sub>);

**Methyl-5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (34)**

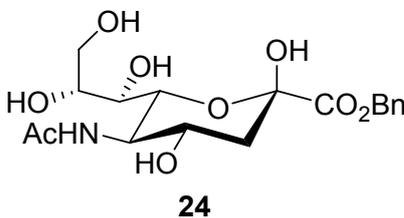
63 mg (0.13 mmol) Tosylat **33** wurden in einer Mischung aus 0.5 mL H<sub>2</sub>O und 1.5 mL Aceton gelöst und 75 mg NaN<sub>3</sub> zugefügt. Die Lösung wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösungsmittel wurden abgezogen und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH = 10:1). Es wurden 36 mg (0.099 mmol, 76%) als amorpher, farbloser Feststoff erhalten.<sup>77</sup>

**Rf:** 0.40 (DCM/MeOH = 5:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 4.02 (dddd, J = 11.18, 7.51, 5.12, 2.22 Hz, 1 H, H-4), 3.97 (ddd, J = 9.22, 6.14, 2.90 Hz, 1 H, H-8), 3.87-3.80 (m, 2 H, H-5, H-6), 3.82 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 3.60 (dd, J = 12.63, 2.90 Hz, 1 H, H-9<sub>a</sub>), 3.49 (d, J = 9.22 Hz, 1 H, H-7), 3.42 (dd, J = 12.63, 6.14 Hz, 1 H, H-9<sub>b</sub>), 3.27 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.37 (dd, J = 12.97, 5.12 Hz, 1 H, H-3<sub>eq</sub>), 2.04 (s, 3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.65 (dd, J = 12.97, 11.26 Hz, 1 H, H-3<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 174.9 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 170.8 (q, C-1), 100.4 (s, C-2), 72.1 (d, C-6), 70.7 (d, C-7), 70.5 (d, C-8), 67.6 (d, C-4), 56.4 (t, C-9), 53.8 (d, C-5), 53.2 (q, COOCH<sub>3</sub>), 51.6 (q, OCH<sub>3</sub>), 41.6 (t, C-3), 22.7 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**IR** (Golden Gate)  $\nu$ : 2103 (N<sub>3</sub>), 1738, 1636, 1557, 1439, 1374, 1277, 1229, 1169, 1130, 1066, 1038, 895 cm<sup>-1</sup>.

**5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäurebenzylester (24)**

100 mg (0.32 mmol) Sialinsäure (**18**) wurden in 2 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst und mit 53 mg Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt.<sup>84</sup> Das Cäsium-Salz der Sialinsäure wurde gefriergetrocknet und anschließend in 1 mL abs. DMF gelöst. Nach Zugabe von 55  $\mu$ l (0.46 mmol) Benzylbromid und katalytischer Mengen TBAI wurde die Lösung 3 d bei RT gerührt. Das DMF wurde im Vakuum verdampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. 101 mg (0.26 mmol, 77%) des Produktes wurden als farbloses Öl erhalten.

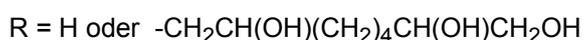
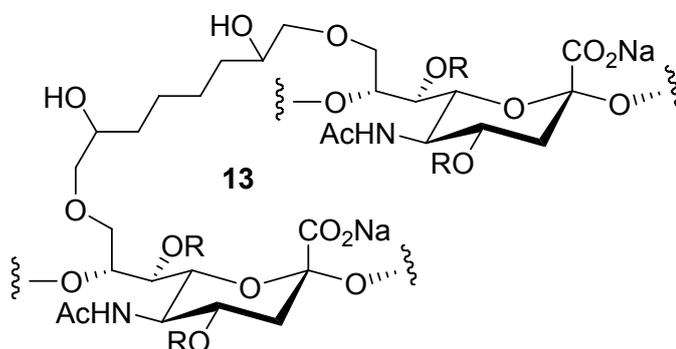
Rf: 0.17 (DCM/MeOH = 5:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.44-7.34 (m, 5 H, H<sub>ar</sub>), 5.28 (d, J = 12.29 Hz, 1 H, CHPh), 5.23 (d, J = 12.29 Hz, 1 H, CHPh), 4.07 (ddd, J = 11.01, 10.58, 4.69 Hz, 1 H, H-4), 4.02 (dd, J = 10.58, 1.37 Hz, 1 H, H-6), 3.83 (dd, J = 10.58, 10.58 Hz, 1 H, H-5), 3.82 (dd, J = 11.09, 2.56 Hz, 1 H, H-9<sub>a</sub>), 3.73 (ddd, J = 8.96, 5.72, 2.56 Hz, 1 H, H-8), 3.65 (dd, J = 11.09, 5.72 Hz, 1 H, H-9<sub>b</sub>), 3.51 (dd, J = 8.96, 1.37 Hz, 1 H, H-7), 2.26 (dd, J = 12.80, 4.69 Hz, 1 H, H-3<sub>eq</sub>), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.93 (dd, J = 12.08, 11.01 Hz, 1 H, H-3<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 176.0 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 172.0 (q, C-1), 137.9 (s, C-1<sub>ar</sub>), 130.5 (d, C-3<sub>ar</sub>), 130.2 (d, C-4<sub>ar</sub>), 130.0 (d, C-2<sub>ar</sub>), 97.6 (s, C-2), 73.0 (d, C-6), 72.6 (d, C-8), 71.1 (d, C-7), 69.1 (t, CH<sub>2</sub>Ph), 68.7 (d, C-4), 65.7 (t, C-9), 55.2 (d, C-5), 41.6 (t, C-3), 23.5 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm

**LC-MS (ESI)**: m/z (berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>9</sub>Na<sup>+</sup>) = 422.1418; gefunden m/z = 422.1427

### 5.3 Quervernetzung von Polysialinsäure



Colominsäure wurde zunächst zur Entfernung kleiner Oligomere gegen dest.  $\text{H}_2\text{O}$ , das mit  $\text{NaOH}$  (0.5 mol/L) auf pH-Wert 9 gebracht worden war, dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

**Darstellung eines Hydrogel aus 1 Äq Diepoxyoktan:** 200 mg (0.639 mmol) Colominsäure wurden im Ultraschallbad in 1 mL  $\text{NaOH}$  (0.5 mol/L), die 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, gelöst. Anschließend wurden 96  $\mu\text{L}$  (0.66 mmol) Diepoxyoktan zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur 2-3 d langsam geschüttelt. Das entstandene Hydrogel wurde 7 d gegen Natriumphosphat-Puffer (0.1 mol/L, pH 7.0) dialysiert und der Puffer zweimal täglich ausgetauscht.

Zur weiteren massenspektrometrischen Untersuchung wurden 20 mg gequollenes Hydrogel mit 3 mL Trifluoressigsäure (0,1 mol/L) versetzt und 2, 4 und 6 h bei 80 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie verfolgt (Laufmittel Isopropanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ / $\text{H}_2\text{O}$  6:1:2).

**ESI-MS (nach 6 h):** (M = Sialinsäure, S = Diepoxyoktan-Substituent)

Molekül	Massenpeak	Intensität
[M-H <sup>+</sup> ]	308.0992	3.9
(M+1*S)-H <sup>+</sup>	468.2114	2
(M+2*S)-H <sup>+</sup>	628.3231	1.8
(M+3*S)-H <sup>+</sup>	788.4295	1
(2*M+1*S)-H <sup>+</sup>	759.2983	0,8

Das Molekül (2\*M+1\*S) konnte des weiteren durch LC-MS/MS Fragmentierung als zwei Sialinsäure-Molekül, die durch ein Diepoxyoktan-Einheit verbunden sind, identifiziert werden (Abschnitt 3.2).

**Darstellung weiterer Hydrogele und Analyse:**

Analog zu der beschriebenen Durchführung (siehe S.98) wurden weitere Hydrogele mit unterschiedlichen Äquivalenten Diepoxyoktan hergestellt. Ein Gel wurde durch Lösen von 200 mg dialysierter Colominsäure in 1 mL NaOH (0.5 mol/L), die 10% SDS enthielt, und Zugabe der in Tabelle 10 angegebenen Volumina Diepoxyoktan synthetisiert (Tabelle 10).

Hydrogel	Diepoxy- oktan [Äq]	Diepoxy- oktan [μl]	CHN-Analyse C/N-Verhältnis
HG <sup>3.0</sup>	3.0	270	15.54
HG <sup>2.0</sup>	2.0	135	14.79
HG <sup>1.0</sup>	1.0	96	11.96
HG <sup>0.8</sup>	0.8	76	11.02
HG <sup>0.6</sup>	0.6	58	10.62

**Tabelle 10:** Herstellung der verschiedenen Hydrogele im 200-mg-Maßstab (Anmerkung zur CHN-Analyse siehe S. 92).

#### **5.4 Abbau der Hydrogele durch EndoNF\***

39 mg gequollenes Hydrogel (1.4 mg getrocknetes, Puffer-freies Material), das einen Anteil von maximal 1 Äq Diepoxyoktan enthielt, wurden auf einer 24-Well-Platte mit 400 µL PBS-Puffer versetzt. 4.26 µg des Enzyms EndoNF\* (Stammlösung = 2.13 g/L) wurden hinzupipettiert und die Probe bei 37 °C inkubiert. Nach 11 d war die Probe vollständig hydrolysiert, während die Kontrolle noch immer ein Hydrogel aufwies.

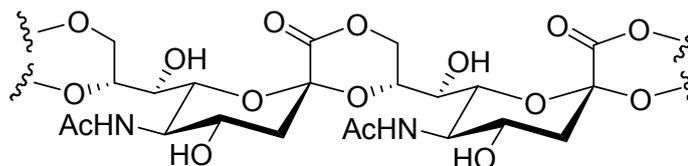
Zum Abbau eines beschichteten Hydrogels wurden 45 mg gequollenes Material mit 500 µL einer Kollagen-I-Lösung (0.06 mg/mL) versetzt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde zweimal mit 500 µL PBS-Puffer (pH 7.4) gewaschen und die enzymatische Abbau wie oben durchgeführt. Nach 12 Tagen war die Probe vollständig hydrolysiert, während bei dem Kontrollansatz ohne Enzym ein festes Hydrogel beobachtet werden konnte.

In gleicher Weise wurden Gele, die zuvor mit 0.8 Äq, 0.6 Äq Diepoxyoktan quervernetzt worden waren, mit EndoNF\* behandelt. Bei beiden Hydrogelen konnte eine Verflüssigung innerhalb von 2 d beobachtet werden.

## 5.5 Derivatisierungen der Polysialinsäure

### 5.5.1 Experimente zur C-1-Modifizierung

#### Lacton der Polysialinsäure (**23**)



**23**

Zur Darstellung des Lactons **23** wurde eine leicht veränderte Variante von Lively et al. verwendet.<sup>85</sup> 500 mg (1.6 mmol) Colominsäure Na-Salz (**12**) wurden in 20 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2.5 g (13 mmol) EDC\*HCl versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit verd. HCl (1 mol/L) auf 4.75 gesenkt und die Lösung 4 h bei RT gerührt.

Der ausgefallene, gelbliche Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zunächst wurde 2 x für jeweils 10 min in Aceton und dann 7 x in Dichlormethan im Ultraschallbad resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Trocknung im Vakuum wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

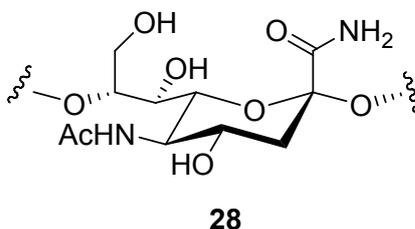
**Ausbeute:** 401 mg (1.468 mmol), 92%

**Derivatisierungsgrad:** quantitativ

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; DMSO)  $\delta$ : 172.7 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 166.1 (s, C-1), 96.4 (s, C-2), 73.0 (d, C-6), 70.2 & 69.6 (d, C-7; d, C-8), 68.4 (d, C-4), 66.7 (t, C-9), 52.1 (d, C-5), 42-38 (t, C-3)\*, 23.0 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm (in Übereinstimmung mit den Literaturdaten).

\*unter dem DMSO Signal

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 9.42; C/N<sub>gemessen</sub> = 8.84 (siehe Anmerkung S. 92).

**C-1-NH<sub>2</sub>-Amid der Polysialinsäure (28)**

500 mg (1.8 mmol) Lacton **23** wurden in 17 mL Pyridin gelöst und bei RT mit 7 mL NH<sub>3</sub> in MeOH (7 mol/L) versetzt. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt, wobei bereits nach 5 h ein Niederschlag ausfiel. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand zur Entfernung von Pyridinresten 3 x mit Dichlormethan versetzt, im Ultraschallbad 10 min suspendiert und anschließend 15 min abzentrifugiert. Der farblose Feststoff musste zum Lösen in deuteriertem DMSO erhitzt werden.

**Ausbeute:** 521 mg (1.796 mmol), 99%

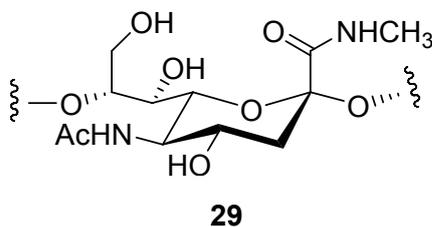
**Derivatisierungsgrad:** quantitativ

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; DMSO) δ: 171.1 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 170.7 (s, C-1), 101.8 (s, C-2), 74.9 (d, C-6; d, C-8), 66.3 (d, C-7; d, C-4), 59.9 (t, C-9), 52.9 (d, C-5), 43-38 (t, C-3)\*, 23.5 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.<sup>100</sup>

\*unter dem DMSO Signal

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 4.72; C/N<sub>gemessen</sub> = 4.63 (siehe Anmerkung S. 92).

<sup>100</sup> in Übereinstimmung mit den <sup>13</sup>C-Daten des Sialinsäure-Monomers: R. Roy und C. A. Laferrière, *Can. J. Chem.*, **1990**, *68*, 2045-2054.

**C-1-NHCH<sub>3</sub>-Amid der Polysialinsäure (29)**

178 mg Lacton (0.65 mmol) Lacton **23** wurden in 10 mL Pyridin gelöst und mit 5 mL MeNH<sub>2</sub> in Ethanol (8 mol/L) versetzt. Anschließend wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand zur Entfernung von Pyridinresten 3 x mit Dichlormethan versetzt, im Ultraschallbad 10 min suspendiert und anschließend 15 min abzentrifugiert.

**Ausbeute:** 192 mg (0.631 mmol), 97%

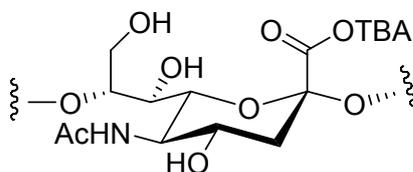
**Derivatisierungsgrad:** quantitativ

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; DMSO) δ: 170.5 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 169.2 (s, C-1), 102.3 (s, C-2), 75.3 (d, C-6; d, C-8), 66.1 (d, C-7; d, C-4), 60.1 (t, C-9), 52.4 (d, C-5), 43-38 (t, C-3)\*, 26.7 (q, NHCH<sub>3</sub>), 23.6 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

\*unter dem DMSO Signal

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 5.14; C/N<sub>gemessen</sub> = 5.88 (siehe Anmerkung S. 92).

## Polysialinsäure TBA-Salz (26)



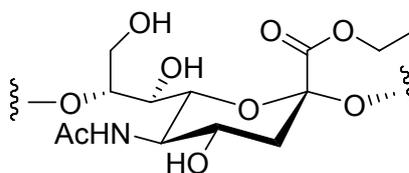
26

Zur Herstellung der Colominsäure Tetrabutylammonium-(TBA)-Salz wurde zunächst ein Amberlit-Harz in folgender Weise mit TBA-Ionen beladen:

10 mL Amberlit IR-120 ( $H^+$ -Form, Volumen im Messzylinder bestimmt) wurden zunächst bis zur Farblosigkeit des Filtrats mit Methanol, dest.  $H_2O$  und erneut mit Methanol gespült. Anschließend wurde das Harz mit  $Na^+$ -Ionen beladen, indem mit 100 mL NaOH-Lösung (1 mol/L) und erneut mit dest.  $H_2O$  gespült wurde, bis das Waschwasser neutral reagierte. Anschließend wurde zum Austausch gegen TBA-Ionen eine TBA-Bromid-Lösung über Nacht langsam über das Harz gegeben. Nach dem Spülen mit dest.  $H_2O$  wurde das Harz zu 350 mg Colominsäure Natrium-Salz (**12**) in ca. 15 mL dest.  $H_2O$  gegeben. Die Mischung wurde langsam 12 h geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren und Waschen des Harzes mit dest.  $H_2O$  wurde die Polysialinsäure TBA-Salz gefriergetrocknet.

Die Signale des  $^1H$ -NMR sind durch die Diffusion der TBA-Ionen in Lösung stark verbreitert und konnten nicht ausgewertet werden.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz; DMSO, stark verbreiterte Signale)  $\delta$ : 173.2-172.2 (s,  $NHCOCH_3$  & q, C-1), 101.0 (s, C-2), 77.3 (d, C-8), 73.7 (d, C-6), 70.6 (d, C-7), 68.9 (d, C-4), 62.4 (t, C-9), 58.4 (t,  $N^+CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 54.1 (d, C-5), 43-38.1 (t, C-3), 23.1 (t,  $N^+CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 19.1 (t,  $N^+CH_2CH_2CH_2CH_3$  & q,  $NHCOCH_3$ ), 12.9 (t,  $N^+CH_2CH_2CH_2CH_3$ ) ppm.

**Polysialinsäure-Ethylester (27)****27**

50 mg (0.162 mmol) Polysialinsäure TBA-Salz **26** wurden in 1 mL abs. DMF gelöst und mit 52  $\mu$ L (0.647 mmol) Ethyliodid versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden 36 mg (0.647 mmol) NaCl in wenig dest. H<sub>2</sub>O (ca. 0.1 mL) gelöst und zu der Reaktionslösung gegeben. Nach Zugabe von Aceton wurde die Substanz als farbloser, amorpher Feststoff erhalten, der abzentrifugiert und dessen Überstand abgesaugt wurde. Zur Entfernung des restlichen Ethyliodids und DMF wurde die Substanz zunächst in Aceton, dann in Dichlormethan im Ultraschallbad resuspendiert, 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Diese Prozedur wurde 5 x (ab 100 mg Edukt 10 x) wiederholt.

In Natriumphosphat-Puffer (0.1 mol/L, pH 7.0) wird die Substanz zur Säure hydrolysiert und konnte daher nicht dialysiert werden.

**Ausbeute:** 37 mg (0.117 mmol), 72%

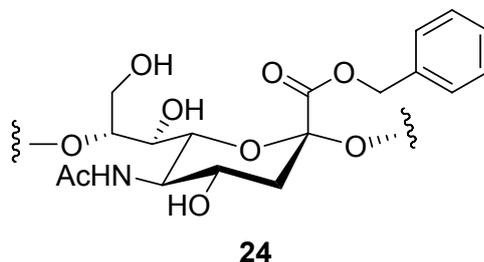
**Derivatisierungsgrad:** 96%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 3.37 (2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.48 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 1.88 (3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.64 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>), 1.27 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; DMSO)  $\delta$ : 172.0 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 168.5 (s, C-1), 99.5 (s, C-2), 77.3 (d, C-8), 74.8 (d, C-6), 69.8 (d, C-7), 66.4 (d, C-4), 61.9 (t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.9 (t, C-9), 53.2 (d, C-5), 43-38.1 (t, C-3)\*, 23.3 (q, NHCOCH<sub>3</sub>), 14.5 (q, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

\*unter dem DMSO Signal;

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 11.07; C/N<sub>gemessen</sub> = 10.36 (siehe Anmerkung S. 92).

**Benzyl-Ester der Polysialinsäure (24)**

50 mg (0.162 mmol) Polysialinsäure TBA-Salz (**26**) wurden in 1 mL abs. DMF gelöst und mit 193  $\mu$ l (1.62 mmol) Benzylbromid und katalytischen Mengen TBAI versetzt. Nach 12 h wurde die Reaktionsmischung mit einer Lösung aus 36 mg NaCl und geringen Mengen dest. H<sub>2</sub>O (ca. 0.1 mL) versetzt, um in der nachfolgenden Zugabe von Aceton das Natriumsalz der Polysialinsäure auszufällen. Der mit Aceton ausgefällte, gelbliche Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur Entfernung restlichen Benzylbromids und DMF wurde die Substanz in Dichlormethan im Ultraschallbad resuspendiert, 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Diese Prozedur wurde 5 x wiederholt. In Natriumphosphat-Puffer (0.1 mol/L, pH 7.0) wurde die Substanz zur Säure hydrolysiert und konnte daher nicht dialysiert werden.

**Ausbeute:** 62 mg (0.133 mmol), 83 %

**Derivatisierungsgrad:** 60%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 7.37 (3 H\*, H<sub>Ph</sub>), 1.87 (3 H, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

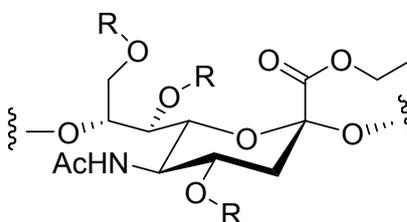
**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 12.75; C/N<sub>gemessen</sub> = 13.34 (siehe Anmerkung S. 92).

\*Das Integral entsprach einer Fläche von 3 anstatt von 5 im Vergleich zum Acetamid, da eine Derivatisierung von 60% erreicht wurde.

Die Signale des <sup>13</sup>C-Spektrums konnten den jeweiligen C-Atomen nicht zugeordnet werden, da die uneinheitliche Verteilung von -CO<sub>2</sub>Na und -CO<sub>2</sub>Bn entlang der Kette (Derivatisierung 60%) eine starke Verbreiterung der <sup>13</sup>C-Signale zur Folge hatte.

## 5.5.2 Experimente der OH-Substitutionen

### Tosylat des Polysialinsäure-Ethylesters (**35**)



R = H oder Tosylat

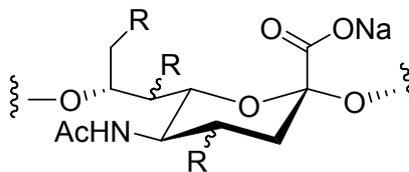
**35**

100 mg (0.313 mmol) Polysialinsäure-Ethylester (**27**) wurden in 7.5 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 149 mg (0.783 mmol) p-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mit MTB-Ether im Ultraschallbad behandelt. Der orange-rote Rückstand war in dem Ether nicht löslich und konnte auch nach mehrmaliger Behandlung nicht gereinigt werden. Daher wurde die Rohsubstanz in einer minimalen Menge DMSO gelöst und anschließend erst mit THF und anschließend MTB-Ether versetzt. Der voluminöse, gelbliche Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur weiteren Entfernung von überschüssigem TsCl und Pyridin wurde die Substanz erneut in DMSO gelöst und wie oben beschrieben ausgefällt. Die Prozedur wurde insgesamt 5 x wiederholt. Die Substanz konnte als leicht gelblicher Feststoff mit einer Derivatisierung von einer Tosylat-Gruppe pro Monomer-Einheit isoliert werden.

**Ausbeute:** 80 mg (0.169 mmol), 54%

**Derivatisierungsgrad:** quantitativ

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 7.72 (2 H, H-2<sub>ar</sub>), 7.48 (2H, H-3<sub>ar</sub>), 2.41 (4H, ar-CH<sub>3</sub>, 3-H<sub>eq</sub>), 1.89 (3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.57 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>), 1.24 (3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**Polysialinsäure-Azid (36)**R = H oder N<sub>3</sub>**36**

80 mg (0.169 mmol) des tosylierten Polysialinsäure-Ethylesters (**35**) wurden in 8 mL abs. DMSO gelöst und mit 167  $\mu$ L (0.85 mmol) 15-Krone-5-Ether und 55 mg (0.85 mmol) NaN<sub>3</sub> versetzt. Die Reaktionlösung wurde 48 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurden 8 mL NaOH-Lösung (1 mol/L) zugesetzt, um den Ester zu verseifen und überschüssige, nicht abreagierte Tosyl-Gruppen von der Polymerkette abzuspalten. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei RT gerührt und bei pH 8-9 dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 44 mg (0.1377 mmol), 81%

**Derivatisierungsgrad:** 40%, Analyse siehe unten

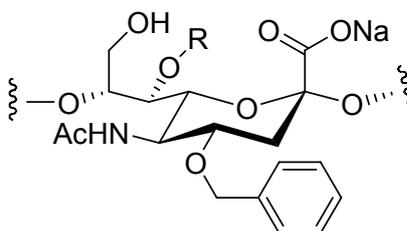
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 2.59 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 2.03 & 1.98 & 1.92 (3 H, Signal aufgespalten, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.61 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>) ppm.

**IR** (Golden Gate)  $\nu$ : 2112 (N<sub>3</sub>), 1607, 1377, 1030 cm<sup>-1</sup>.

Die <sup>13</sup>C-Signale konnten nicht eindeutig zugewiesen werden, da ein geringer Derivatisierungsgrad (40%) entlang der Polymerkette zu einer Verbreiterung der Signale führte.

Zur weiteren Untersuchung der Produktverteilung entlang der Kette wurde das Polymer zu den (derivatisierten) Monomeren hydrolysiert. Dazu wurden 16 mg Polysialinsäure-Azid und mit 3.5 mL Trifluoressigsäure (0.1 mol/L) 6 h auf 80 °C erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

Das ESI-MS Spektrum zeigte das Verhältnis Masse/Ladung zweier Verbindungen: Sialinsäure und Sialinsäure mit Azid-Substitution. Unter der Annahme, dass beide Verbindungen die gleiche Ionisierbarkeit besitzen, konnten 40% Azid-Substituenten entlang der Polymerkette eingeführt werden (s. Spektrum S. 55).

**Benzylierte Polysialinsäure (30)**

R = H oder Bn

**30**

300 mg (1.098 mmol) Lacton (**23**) wurden in 30 mL abs. DMF gelöst und mit 652  $\mu$ L Benzylbromid, katalytischen Mengen TBAI und 221 mg (5.49 mmol) NaH (60%, Suspension in Öl) bei 0 °C versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssigem NaH unter Kühlung ca. 5 mL Methanol und zur Verseifung des Lactons 15 mL NaOH-Lösung (1 mol/L) zugesetzt. Nach 4 h Rühren bei RT wurde die Substanz sorgfältig gegen dest. H<sub>2</sub>O (pH 9) dialysiert.

**Ausbeute:** 257 mg (0.6371 mmol), 58%

**Derivatisierungsgrad:** 99%

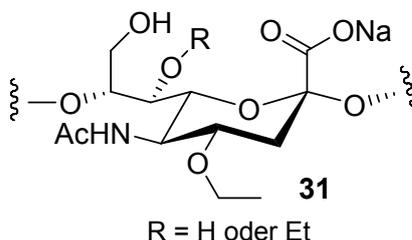
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.56 (5 H, H<sub>Ph</sub>), 2.58 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 2.00 (3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.65 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; DMSO)  $\delta$ : 175.0 & 174.5 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 173.2 (s, C-1), 138.4 & 137.8 (t, C-1<sub>Ph</sub>), 130–126 (d, C-2, C-3, C-4<sub>Ph</sub>), 101.4 & 100.9 (s, C-2), 78.7, 77.8, 76.1, 73.1 70.8, 69.1, 68.3, 61.8 & 61.2 (t, C-9), 52.4 & 50.6 (d, C-5), 40–38 (t, C-3), 22.4 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) pm.

Die <sup>13</sup>C-Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die jeweils doppelten Signale der Kohlenstoffe des Amids, des C-2, des C-9, des C-5 und das breite Signal bei 38–40 ppm des C-3 weisen darauf hin, dass die Reaktion nicht selektiv ist und kein Reaktivitätsunterschied zwischen C-4 und C-7 besteht.

Als weitere Analyse wurde eine ESI-MS Untersuchung vorgenommen, bei der das Polymer hauptsächlich in Dimere gespalten wurde. Einer großer Anteil dieser Dimere war nicht derivatisiert (m/z = 581.1665). Daneben wurden Dimere mit einem Benzyl- (m/z = 671.2080), zwei Benzyl- (m/z = 761.2464) und drei Benzyl-Substituenten (m/z = 851.2990) beobachtet.

## Ethylierte Polysialinsäure (31)



25 mg (0.091 mmol) Lacton (**23**) wurden in 1.5 mL abs. DMF gelöst und mit 36  $\mu$ L (0.45 mmol) Ethyliodid und 19 mg (0.45 mmol) NaH (60%, Suspension in Öl) bei 0 °C versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssigem NaH ca. 1 mL Methanol zugesetzt und zur Verseifung des Lactons der pH-Wert mit 1 mL NaOH-Lösung (1 mol/L) erhöht. Nach 4 h Rühren bei RT wurde die Substanz neutralisiert und gegen dest. H<sub>2</sub>O (pH 9) dialysiert.

**Ausbeute:** 11 mg (0.033 mmol), 36%

**Derivatisierungsgrad:** 70%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2.55 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 1.98 (3 H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.64 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>), 1.04 (2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

Das <sup>13</sup>C-NMR Spektrum der Verbindung konnte aufgrund der starken Verbreiterung der Signale nicht ausgewertet werden. Durch die unselektive Derivatisierung konnten die Signale nicht eindeutig zugeordnet werden.

Die anschließende ESI-MS-Analyse des Polymers, das bei der hohen Spannung in derivatisierte Monomere, Dimere und Trimere zerfällt, zeigte neben monoethylierten Sialyl-Resten auch diethylierte Produkte.

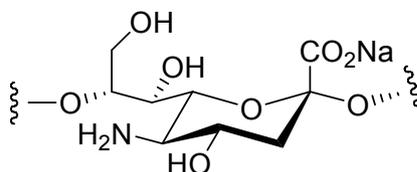
## Hydrolyse der Polysialinsäure

30 mg (0.096 mmol) Colominsäure Na-Salz (**12**) wurden in 2 ml Trifluoressigsäure (0.1 mol/L) gelöst und 4 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die trübe Lösung mit wenig Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt und anschließend mit 50  $\mu$ L NaOH (2 mol/L) auf einen pH-Wert von 8 gebracht bis eine klare Lösung entstand. Mit verd. HCl wurde wieder vorsichtig neutralisiert,

15  $\mu\text{L}$  konz. Trifluoressigsäure hinzugegeben und die Lösung erneut 4 h lang auf 80 °C erhitzt. Die Reaktion wurde per Dünnschichtchromatographie verfolgt (Laufmittel: 1-Propanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ / $\text{H}_2\text{O}$ : 6:1:2). Das Wasser wurde im Vakuum verdampft und das Rohprodukt getrocknet. Laut  $^1\text{H-NMR}$  lag das Produkt vollständig in der monomeren Form vor.

### 5.5.3 Experimente zur *N*-Derivatisierung

#### $\gamma$ -Polyaminosäure der Polysialinsäure (**37**)



**37**

3 g (9.7 mmol) Colominsäure Natrium-Salz (**12**) wurden mit 200 mL einer Mischung aus 7.5 g NaOH, 12 mL H<sub>2</sub>O und 188 mL EtOH versetzt und 20 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise mit verdünnter HCl (0.5 M) neutralisiert und das Ethanol im Vakuum abgezogen. Zur Entfernung der Salze wurde über Nacht gegen dest. H<sub>2</sub>O (pH 9) dialysiert und die erhaltene Lösung gefriergetrocknet. Die Analyse erfolgte mittels <sup>13</sup>C-NMR.

**Derivatisierungsgrad:** 94 bis 98%

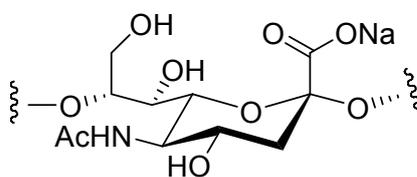
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2.97 (1 H, H-5), 2.59 (1 H, H-3<sub>eq</sub>), 1.68 (1 H, H-3<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 173.8 (s, C-1), 101.3 (s, C-2), 77.6 (d, C-8), 75.1 (d, C-6), 69.9 (d, C-4), 69.6 (d, C-7), 61.4 (t, C-9), 53.5 (d, C-5), 39.9 (t, C-3) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 7.83; C/N<sub>gemessen</sub> = 8.14 (siehe Anmerkung S. 92).

Zur Überführung der Substanz in ihr TBA-Salz (Verbindung **40**) wurden 460 mg (1.49 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure **37** 24 h in 500 mL TBABr-Lösung (0.25 mol/L) bei pH 9-10 (Verwendung von TBAOH-Lösung) in einem Becherglas dialysiert. Die Entfernung überschüssigen TBA-Salzes erfolgte in dest. H<sub>2</sub>O bei pH 9-10 über 2 d. Anschließend wurde die Substanz gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 497 mg (1.013 mmol), 68%

**Reacetylierung der  $\gamma$ -Polyaminosäure (12)****12**

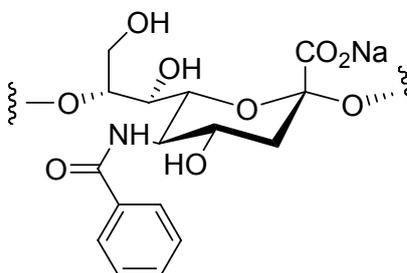
44 mg (0.162 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure Na-Salz (**37**) wurden in 5 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst und der pH Wert mit NaOH-Lösung auf pH 11 erhöht. Es wurden 150  $\mu$ L (1.6 mmol) Acetanhydrid bei 0 °C hinzugefügt und der pH Wert erneut auf 11 eingestellt. Nach 6 h wurde der pH-Wert mit festem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf ca. 12 erhöht und weitere 150  $\mu$ L (1.6 mmol) Acetanhydrid bei 0 °C zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Behandlung mit NaOH (0.5 mol/L), Dialyse gegen dest. H<sub>2</sub>O und Gefriertrocknung wurde ein laut <sup>1</sup>H-NMR vollständig reacetyliertes Produkt erhalten. Die NMR-Daten stimmen mit denen der käuflich erworbenen Polysialinsäure überein.

**Ausbeute:** 48 mg (0.153 mmol), 94%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2.59 (H-3<sub>eq</sub>), 1.97 (NHCOCH<sub>3</sub>), 1.65 (H-3<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 172.9 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 171.1 (s, C-1), 98.8 (s, C-2), 75.8 (d, C-8), 71.1 (d, C-6), 66.9 (d, C-7), 66.2 (d, C-4), 59.1 (t, C-9), 50.3 (d, C-5), 37.7 (t, C-3), 20.4 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 9.44; C/N<sub>gemessen</sub> = 9.42 (siehe Anmerkung S. 92).

**N-Benzoyl-polysialinsäure (39)****39**

150 mg (0.55 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure Na-Salz (**37**) wurden in 21 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (5%) gelöst und unter starkem Rühren 0.6 mL (5.1 mmol) Benzoylchlorid bei 0 °C zugefügt. Nach ca. 6 h wurde der pH Wert mit festem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  erhöht und weitere 0.6 mL Benzoylchlorid bei 0 °C hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Zur Entfernung eventueller Benzoessäureester der OH-Gruppen wurde eine NaOH-Lösung (1 mol/L) im Verhältnis 1:1 zugegeben und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde neutralisiert, überschüssige Benzoessäure und Salze durch Dialyse (pH 9) entfernt und die Substanz gefriergetrocknet. Das Produkt war laut  $^1\text{H-NMR}$  zu 55% *N*-benzoyliert.

**Ausbeute:** 170 mg (0.509 mmol), 93%

Alle restlichen  $\text{NH}_2$ -Gruppen wurden anschließend reacetyliert. Dazu wurden 170 mg (0.509 mmol) benzoylierte  $\gamma$ -Polyaminosäure in 19 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5%) gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL (6.3 mmol) Acetanhydrid bei 0 °C versetzt. Nach 3 h wurde 0.95 g festes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und weitere 0.6 mL Acetanhydrid zugegeben und über Nacht gerührt. Nach Behandlung mit NaOH (0.5 mol/L), Dialyse gegen dest.  $\text{H}_2\text{O}$  und Gefriertrocknung wurde ein laut  $^1\text{H-NMR}$  vollständig reacetyliertes Produkt erhalten.

**Ausbeute:** 161 mg (0.459 mmol), 95%

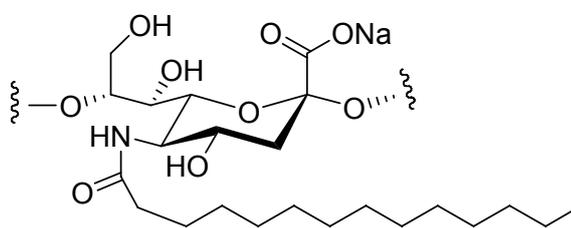
**Derivatisierungsgrad:** 55% *N*-Benzoyl, 45% *N*-Acetyl

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7.73 (2 x  $\text{H-2}_{\text{Ph}}$ ), 7.57 ( $\text{H-4}_{\text{Ph}}$ ), 7.45 (2 x  $\text{H-3}_{\text{Ph}}$ ), 2.56 ( $\text{H-3}_{\text{eq}}$ ), 1.97 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 1.66 ( $\text{H-3}_{\text{ax}}$ ) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; D<sub>2</sub>O) δ: 174.9 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 173.4 (s, C-1), 171.6 (s, NHCOPh), 133.2 (s, C-1<sub>Ph</sub>), 132.6 (d, C-4<sub>Ph</sub>), 128.8 (d, 2xC-3<sub>Ph</sub>), 127.1 (d, 2xC-2<sub>Ph</sub>), 101.3 (s, C-2), 77.5 (d, C-8), 73.1 (d, C-6), 69.8 (d, C-7), 69.2 & 68.5 (d, C-4), 61.4 (t, C-9), 52.9 & 52.8 (d, C-5), 39.5 & 38.6 (t, C-3), 23.2 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.<sup>101</sup>

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 11.60; C/N<sub>gemessen</sub> = 11.67 (siehe Anmerkung S. 92).

### N-Myristoyl-polysialinsäure (42)



42

70 mg (0.143 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz **40** wurden in 3 mL Pyridin gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 31  $\mu$ L (0.113 mmol) Myristoylchlorid (Tetradecansäurechlorid) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft und 5 mL NaOH-Lösung (0.5 mol/L) zur Verseifung eventuell gebildeter Ester hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Nach Neutralisation mit verd. HCl wurde die Substanz 24 h gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und 24 h gegen dest H<sub>2</sub>O (pH 9) dialysiert. Die Substanz wurde nach Gefriertrocknung als farbloser, voluminöser Feststoff erhalten. Anschließend wurden die freien Amino-Gruppen reacctyliert. Dazu wurden 54 mg Edukt, das laut <sup>1</sup>H-NMR z.T in Form des TBA-Salzes vorlag, in 10 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5%) gelöst und 0.2 mL (2 mmol) Acetanhydrid hinzugefügt. Nach 4 h wurde erneut festes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0.2 mL Acetanhydrid hinzugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Nach Neutralisation und dreitägiger Dialyse gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und dest H<sub>2</sub>O wurde die Substanz gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 32 mg (0.088 mmol), 62%

<sup>101</sup> Anmerkung: Für C-3, C-4 und C-5 werden aufgrund der unterschiedlichen N-Substitution jeweils zwei Signale der <sup>13</sup>C-Atome beobachtet.

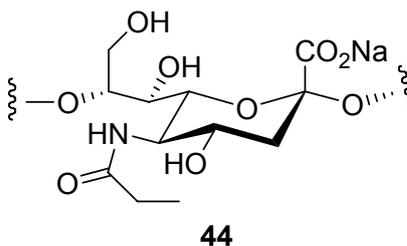
**Derivatisierungsgrad:** 26% *N*-Myristoyl, 74% *N*-Acetyl

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 2.57 (H-3<sub>eq</sub>), 2.24 (NHCOCH<sub>2</sub>R), 1.99 (NHCOCH<sub>3</sub>), 1.65 ((H-3<sub>ax</sub>), 1.51 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R), 1.18 (NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>), 0.77 (NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O) δ: 174.2 (s, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>), 172.5 (s, C-1), 100.2 (s, C-2), 77.1 (d, C-8), 72.4 (d, C-6), 68.3 (d, C-7), 67.6 (d, C-4), 60.4 (t, C-9), 51.6 (d, C-5), 39.0 (t, C-3), 35.4 (t, NHCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>), 30.4-28.0 (t, NHCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.7 (q, NHCOCH<sub>3</sub>), 21.3 (t, NHCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.7 (q, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 11.35; C/N<sub>gemessen</sub> = 11.97 (siehe Anmerkung S. 92).

### ***N*-Propionyl-polysialinsäure (44)**



150 mg (0.306 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden in 12 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 210  $\mu$ L (2.4 mmol) Propionylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Das Pyridin wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand zur Verseifung acylierter Hydroxyl-Gruppen mit 10 mL NaOH-Lösung (0.5 mol/L) versetzt. Nach 6 bis 8 h wurde die Reaktionsmischung mit verd. HCl (0.5 mol/L) neutralisiert. Das Rohprodukt wurde zur Entfernung des TBA<sup>+</sup>-Kations 2 bis 3 Tage gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und weitere 24 h gegen dest. H<sub>2</sub>O dialysiert. Das Produkt wurde nach Gefriertrocknung als farbloser, voluminöser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 86 mg (0.263 mmol), 86%

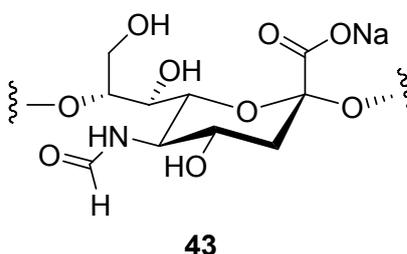
**Derivatisierungsgrad:** 93%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 2.59 (H-3<sub>eq</sub>), 2.26 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.66 (H-3<sub>ax</sub>), 1.04 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 178.9 (s,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_3$ ), 173.0 (s, C-1), 101.0 (s, C-2), 77.3 (d, C-8), 73.1 (d, C-6), 69.2 (d, C-7), 68.3 (d, C-4), 61.2 (t, C-9), 52.2 (d, C-5), 40.0 (t, C-3), 29.3 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_3$ ), 9.4 (q,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

**CHN-Analyse:**  $\text{C}/\text{N}_{\text{berechnet}} = 10.29$ ;  $\text{C}/\text{N}_{\text{gemessen}} = 9.99$  (siehe Anmerkung S. 92).

### N-Formyl-polysialinsäure (43)



50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden mit 3 mL DMF, 87  $\mu\text{l}$  *N*-Ethyl-diisopropylamin und 85 mg (0.509 mmol) Ameisensäure-4-nitrophenylester bei 0 °C versetzt und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und zunächst gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L), dann gegen dest.  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 9) dialysiert.

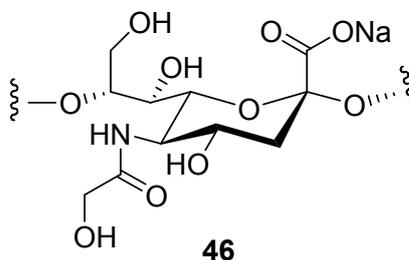
**Ausbeute:** 29 mg (0.097 mmol), 95%

**Derivatisierungsgrad:** 92%

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.20 (1 H,  $\text{NHCOH}$ ), 2.60 (1 H, 3- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 1.71 (1 H, 3- $\text{H}_{\text{ax}}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 173.0 (s, C-1), 165.2 (d,  $\text{NHCOH}$ ), 101.1 (s, C-2), 77.7 (d, C-8), 73.0 (d, C-6), 69.2 (d, C-7), 68.0 (d, C-4), 61.2 (t, C-9), 51.0 (d, C-5), 39.5 (t, C-3) ppm.

**CHN-Analyse:**  $\text{C}/\text{N}_{\text{berechnet}} = 8.58$ ;  $\text{C}/\text{N}_{\text{gemessen}} = 8.31$  (siehe Anmerkung S. 92).

**N-Glykolyl-polysialinsäure (46)**

50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden in 2.5 mL Pyridin gelöst. Bei 0 °C wurden anschließend 55  $\mu$ L (0.51 mmol) Acetoxyacetylchlorid zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Verdampfen des Pyridins im Vakuum wurde der Rückstand mit 5 mL NaOH-Lösung (0.5 mol/L) versetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde neutralisiert und 3 Tage gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und dest. H<sub>2</sub>O dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

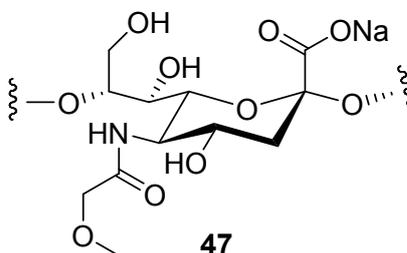
**Ausbeute:** 29 mg (0.088 mmol), 86%

**Derivatisierungsgrad:** 67% N-Glykolyl, 33% N-Acetyl

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 176.1 (s, NHCOCH<sub>2</sub>OH), 173.0 (s, C-1), 100.6 (s, C-2), 78.2 (d, C-8), 73.0 (d, C-6), 68.8 (d, C-7), 68.3 (d, C-4), 61.1 (t, C-9), 61.1 (t, NHCOCH<sub>2</sub>OH), 52.2 (d, C-5), 40.2 (t, C-3), 22.4 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.<sup>102</sup>

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 9.44; C/N<sub>gemessen</sub> = 9.55 (siehe Anmerkung S. 92).

<sup>102</sup> In Übereinstimmung mit den <sup>13</sup>C-Daten publiziert in: R. Roy und R. A. Pon, *Glycoconjugate Journal*, **1990**, 7, 3-12.

**N-Methoxyacetyl-polysialinsäure (47)**

150 mg (0.306 mmol)  $\gamma$ -Polyamino-säure TBA-Salz (**40**) wurden nach der Vorschrift zur Darstellung von *N*-Propionyl-polysialinsäure (S. 116) mit 175  $\mu$ L (2.4 mmol) Methoxyacetylchlorid versetzt. Das Derivat wurde zusätzlich weitere 24 h gegen NaCl-Lösung und 24 h gegen dest H<sub>2</sub>O dialysiert werden.

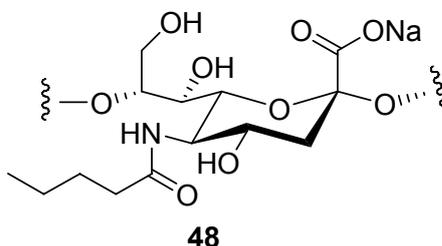
**Ausbeute:** 97 mg (0.355 mmol), 82%

**Derivatisierungsgrad:** 90%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 3.33 (3 H, NHCOCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 2.55 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 1.61 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 173.4 (s, NHCOCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 173.2 (s, C-1), 101.1 (s, C-2), 77.6 (d, C-8), 73.0 (d, C-6), 70.8 (t, NHCOCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 69.1 (d, C-7), 67.9 (d, C-4), 61.2 (t, C-9), 59.1 (q, NHCOCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 52.2 (d, C-5), 40.1 (t, C-3), 22.5 (q, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 10.29; C/N<sub>gemessen</sub> = 10.71 (siehe Anmerkung S. 92).

**N-Valeroyl-polysialinsäure (48)**

150 mg (0.306 mmol)  $\gamma$ -Polyamino-säure TBA-Salz (**40**) wurden nach der Vorschrift zur Darstellung von *N*-Propionyl-polysialinsäure (S. 116) mit 229  $\mu$ L (2.4 mmol) Valeroylchlorid versetzt. Die Substanz muss erneut dialysiert werden, da noch TBA-Ionen im  $^1\text{H-NMR}$  beobachtet werden konnten. Die Dialyse erfolgte für weitere 48 h gegen NaCl-Lösung und 24 h gegen dest. $\text{H}_2\text{O}$ .

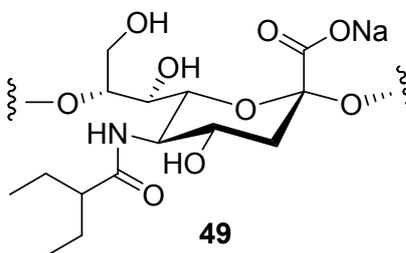
**Ausbeute:** 105 mg (0.297 mmol), 97%

**Derivatisierungsgrad:** 91%

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 2.62 (H-3<sub>eq</sub>), 2.26 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.67 (H-3<sub>ax</sub>), 1.51 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.27 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.83 (NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 178.3 (s, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 173.2 (s, C-1), 101.2 (s, C-2), 77.6 (d, C-8), 73.3 (d, C-6), 69.3 (d, C-7), 68.3 (d, C-4), 61.3 (t, C-9), 52.3 (d, C-5), 40.1 (t, C-3), 35.9 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27.4 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.7 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.2 (q, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 12.01; C/N<sub>gemessen</sub> = 11.48 (siehe Anmerkung S. 92).

**N-2-Ethylbutanoyl-polysialinsäure (49)**

50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden in 2.5 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C 70  $\mu$ L (0.511 mmol) Ethylbutyrylchlorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und 10 mL NaOH-Lösung (0.5 mol/L) zugegeben und über Nacht gerührt. Da wenig unlöslicher Rückstand zu beobachten war, wurde die Substanz zur vollständigen Verseifung 30 min bei 40 °C gerührt. Die Dialyse erfolgte 3 Tage lang gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und 24 h gegen dest. H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Substanz gefriergetrocknet.

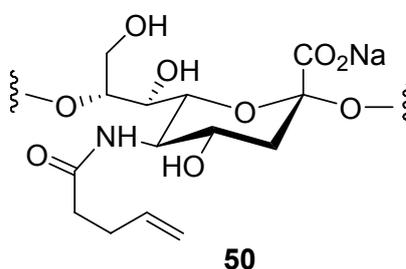
**Ausbeute:** 33 mg (0.089 mmol), 87%

**Derivatisierungsgrad:** 79%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2.65 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 2.04 (1 H, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.68 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>), 1.42 (4 H, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79 (6 H, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 180.7 (s, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 173.1 (s, C-1), 101.7 (s, C-2), 77.1 (d, C-8), 73.3 (d, C-6), 69.1 (d, C-7), 68.2 (d, C-4), 61.2 (t, C-9), 52.1 (d, C-5), 50.7 (d, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 40.2 (t, C-3), 25.4 & 25.2 (t, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 11.5 & 11.3 (q, NHCOCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 12.05; C/N<sub>gemessen</sub> = 12.25 (siehe Anmerkung S. 92).

**N-Pent-4-enoyl-polysialinsäure (50)**

800 mg (1.63 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden in 30 mL Pyridin gelöst und nach der Vorschrift zur Herstellung der N-Propionylpolysialinsäure (S. 116) bei 0 °C tropfenweise mit 1.43 mL (13 mmol) 4-Pentenoylchlorid versetzt.

**Ausbeute:** 502 mg (1.42 mmol), 86%

**Derivatisierungsgrad:** 98%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 5.81 (1 H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5.00 (1 H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.58 (1 H, 3-H<sub>eq</sub>), 2.29 (4 H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 1.65 (1 H, 3-H<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 177.0 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 173.1 (s, C-1), 137.4 (d, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 115.5 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 101.1 (s, C-2), 77.6 (d, C-8), 73.3 (d, C-6), 69.2 (d, C-7), 68.2 (d, C-4), 61.3 (t, C-9), 52.3 (d, C-5), 40.1 (t, C-3), 35.2 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 29.2 (t, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>) ppm.

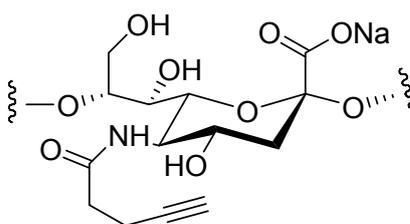
**CHN-Analyse:** C/N<sub>berechnet</sub> = 11.96; C/N<sub>gemessen</sub> = 11.83 (siehe Anmerkung S. 92)

Bei der Herstellung geringer substituierter Derivate wurden 50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz in 2 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C entweder mit 34  $\mu$ L (0.306 mmol) oder 2  $\mu$ L (0.02 mmol) Pentenoylchlorid versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der Versuchsvorschrift zur Herstellung der N-Propionyl-polysialinsäure (S. 116).

Volumen (Pentenoylechlorid)	Äquivalente 4-Pentensäurechlorid	Derivatisierungsgrad
34 $\mu\text{L}$	3.0 Äq	43%
2 $\mu\text{L}$	0.2 Äq	6%

Die freien Aminogruppen der *N*-Pentenoyle-Derivate wurden anschließend nach der Vorschrift zur Reacetylierung der *N*-Benzoyl-polysialinsäure (S. 114) mit Acetanhydrid in Wasser umgesetzt.

### ***N*-Pent-4-inoyle-polysialinsäure (51)**



**51**

**Darstellung des 4-Pentensäurechlorids:** 150 mg (1.5 mmol) 4-Pentensäure wurden in einem 5 mL Spitzkolben mit 122  $\mu\text{L}$  (1.7 mmol) Thionylchlorid versetzt. Nach dem Erhitzen auf 80 °C konnte eine Gasentwicklung beobachtet werden, die nach 60 min vollständig abgeklungen war. Die Substanz wurde direkt in der folgenden Reaktion eingesetzt.

**Darstellung der *N*-Pent-4-inoyle-polysialinsäure (51):** 55 mg (0.112 mmol) der  $\gamma$ -Polyamino-säure TBA-Salz (**40**) wurden in 3 mL Pyridin gelöst. Anschließend wurden bei 0 °C 55  $\mu\text{L}$  des oben hergestellten Säurechlorids hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft und 5 mL NaOH-Lösung (0.5 mol/L) zugefügt. Die Reaktion wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und gegen NaCl-Lösung (0.5 mol/L) und dest. H<sub>2</sub>O dialysiert. Die Substanz wurde nach Gefriertrocknung als leicht bräunlicher Feststoff erhalten.

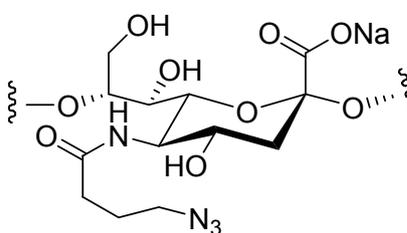
**Ausbeute:** 20 mg (0.056 mmol), 50%

**Derivatisierungsgrad:** 80%

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 175.4 (s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 173.3 (s, C-1), 101.1 (s, C-2), 84.0 (s,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 77.6 (d, C-8), 73.2 (d, C-6), 70.1 (d,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 69.2 (d, C-7), 68.3 (d, C-4), 61.3 (t, C-9), 52.4 (d, C-5), 39.9 (t, C-3), 34.6 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 14.3 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CCH}$ ) ppm.

**CHN-Analyse:**  $\text{C}/\text{N}_{\text{berechnet}} = 11.44$ ;  $\text{C}/\text{N}_{\text{gemessen}} = 11.01$  (siehe Anmerkung S. 92).

### **N-4-Azidobutanoyl-polysialinsäure (52)**



**52**

**Darstellung der 4-Azidobutansäure:** 1 mL (8.2 mmol) 4-Chlorbuttersäure-methylester wurden mit 5 mL abs. DMF, 640 mg (9.84 mmol, 1.2 Äq) Natriumazid und katalytischen Mengen  $\text{NaI}$  versetzt und 24 h bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktion wurde dest.  $\text{H}_2\text{O}$  zugefügt und dreimal mit MTB-Ether extrahiert sowie über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Ether wurde im Vakuum verdampft und zu dem erhaltenen Öl 10 mL  $\text{NaOH}$  (1 mol/L) gegeben. Nach 4 h wurde die Rohmischung zur Entfernung eventuell nicht abreagierten Methylesters mit MTB-Ether extrahiert und anschließend mit  $\text{HCl}$  auf pH 1 gebracht. Es wurde erneut mit MTB-Ether extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft.

**IR** (Golden Gate)  $\nu$ : 2099 ( $\text{N}_3$ ), 1709 (CO), 1415, 1351, 1256, 1079, 926  $\text{cm}^{-1}$ .

**Darstellung der 4-Azidobutansäurechlorids:** 1 g (7.7 mmol) 4-Azido-butansäure wurden mit 0.8 mL Thionylchlorid versetzt und zunächst 1 h bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  und 1 h bei  $80\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt, bis die Gasentwicklung abgeklungen war. Anschließend wurde eine Kugelrohrdestillation bei  $80\text{ }^\circ\text{C}$  und 30 mbar durchgeführt. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit mit einer durch Auswaage bestimmten Dichte von 1.36 g/mL erhalten.

**IR** (Golden Gate)  $\nu$ : 2095 ( $\text{N}_3$ ), 1790 (CO), 1446, 1404, 1352, 1256, 955  $\text{cm}^{-1}$ .

**Darstellung der N-4-Azidobutanoyl-polysialinsäure (52):** 50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden nach der Versuchsvorschrift zur Herstellung von N-Propionyl-polysialinsäure (S. 116) unter Verwendung mit 55  $\mu$ L (0.51 mmol) oder 22  $\mu$ L (0.204 mmol) des zuvor hergestellten 4-Azidobutansäurechlorids hergestellt.

**Ausbeute:** 36 mg (0.094 mmol), 92%

**Derivatisierungsgrad:** 31% und 91%

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 3.31 ( $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2.59 (H-3<sub>eq</sub>), 2.34 ( $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.99 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 1.82 ( $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.66 (H-3<sub>ax</sub>) ppm.

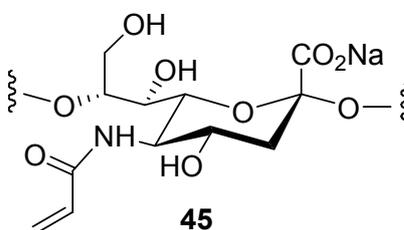
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 176.6 (s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 173.2 (s, C-1), 101.1 (s, C-2), 77.7 (d, C-8), 73.2 (d, C-6), 69.2 (d, C-7), 68.3 (d, C-4), 61.3 (t, C-9), 52.3 (d, C-5), 50.4 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 40.0 (t, C-3), 33.1 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 24.4 (t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ) ppm.

**IR** (Golden Gate)  $\nu$ : 2105 (s,  $\text{N}_3$ ), 1611 (s, CO), 1552, 1394, 1291, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .

**CHN-Analyse:**  $\text{C/N}_{\text{berechnet}} = 5.47$ ;  $\text{C/N}_{\text{gemessen}} = 5.17$  (für 31%, siehe Anmerkung S. 92).

**CHN-Analyse:**  $\text{C/N}_{\text{berechnet}} = 2.98$ ;  $\text{C/N}_{\text{gemessen}} = 3.22$  (für 91%).

### N-Acryl-polysialinsäure (45)



**Darstellung der 3-Azidopropionsäure:** 1 g (9.2 mmol) 3-Chlorpropionsäure wurden zur Überführung in das Na-Salz in wenig Wasser gelöst und mit 4.6 mL NaOH-Lösung (2 mol/L) versetzt. Anschließend wurden 718 mg  $\text{NaN}_3$  hinzugefügt und die Reaktionsmischung 3 d unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert, mit MTB-Ether extrahiert und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet.

IR (Golden Gate)  $\nu$ : 2095 (N<sub>3</sub>), 1709 (CO), 1403, 1233, 1175 cm<sup>-1</sup>.

**Darstellung des 3-Azidopropionsäurechlorids:** 799 mg (6.9 mmol) der 3-Azidopropionsäure wurden mit 0.75 mL Thionylchlorid versetzt und auf 80 °C erhitzt. Nach ca. 3 h war die Gasentwicklung abgeklungen. Das Rohprodukt wurde anschließend bei 60 °C und 22 mbar kugelrohrdestilliert.

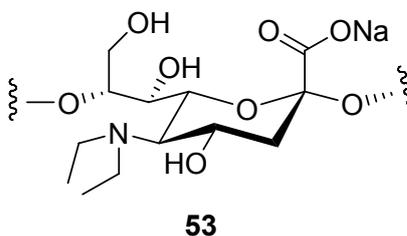
**Reaktion zur N-Acryl-polysialinsäure:** 50 mg (0.102 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz wurden in 3 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 98  $\mu$ L 3-Azidopropionsäurechlorid versetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Substanz mit 3 mL NaOH-Lösung versetzt und über Nacht gerührt. Zur schnellen Aufreinigung wurde die Substanz insgesamt 5 x mit NaCl-Lösung versetzt und 15 min ultrafiltriert (Filter-Einheit mit einer Ausschlussgrenze 10000 g/mol). Im Anschluss erfolgte die Ultrafiltration mit dest. H<sub>2</sub>O zur Entfernung der NaCl-Salze. Im IR-Spektrum konnte keine Absorption im Bereich der N<sub>3</sub>-Schwingung beobachtet werden. Die NMR-Analyse zeigte die unerwünschte Reaktion zum Acrylamid.

**Ausbeute:** 21 mg (0.073 mmol), 72%

**Derivatisierungsgrad:** 30%

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 6.19 (0.6 H, COCHCH<sub>cis</sub>H<sub>trans</sub>), 5.73 (0.3, COCHCH<sub>cis</sub>H<sub>trans</sub>), 2.88 (0.5, H-5), 2.57 (H-3<sub>eq</sub>), 1.99 (0.30, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.69 (H-3<sub>ax</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 173.8 (s, NHCOCHCH<sub>2</sub>), 169.3 (s, C-1), 129.9 (d, NHCOCHCH<sub>2</sub>), 128.0 (t, NHCOCHCH<sub>2</sub>), 101.1 (s, C-2), 77.6 (d, C-8), 73.3 (d, C-6), 69.4 (d, C-7), 68.4 (d, C-4), 61.3 (t, C-9), 53.5 & 52.4 (d, C-5), 39.3 (t, C-3) ppm.

**5-Diethylamino-polysialinsäure (53)**

40 mg (0.082 mmol)  $\gamma$ -Polyaminosäure TBA-Salz (**40**) wurden in 3 mL Methanol gelöst, mit 39 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  sowie mit 0.05 mL Acetaldehyd versetzt und die Reaktion über Nacht gerührt. Nach Dialyse gegen  $\text{NaCl}$ -Lösung (0.5 mol/L) und dest  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 9) wurde die Substanz gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 25 mg (0.077 mmol), 94%

**Derivatisierungsgrad:** 96%

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 2.61 (1 H, 3- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 1.79 (1 H, 3- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 1.27 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

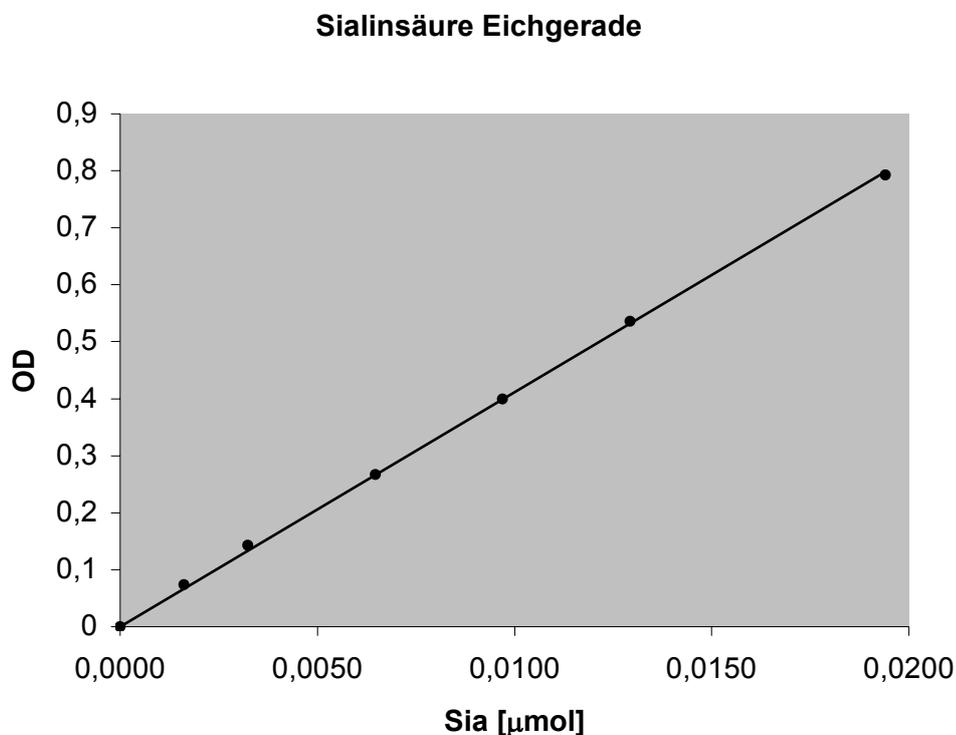
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 173.2 (s, C-1), 100.8 (s, C-2), 76.7 (d, C-8), 71.9 (d, C-6), 70.0 (d, C-7), 63.5 (d, C-4), 62.1 (d, C-5), 61.2 (t, C-9), 48.3 (t,  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 39.8 (t, C-3), 11.0 (q,  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

**CHN-Analyse:**  $\text{C/N}_{\text{berechnet}} = 11.03$ ;  $\text{C/N}_{\text{gemessen}} = 11.07$  (siehe Anmerkung S. 92).

## 5.6 Thiobarbitursäure-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der Endo-*N*-acetylneuraminidase (proteolytisch gespaltenes Enzym EndoNF ohne die Aminosäure-Reste 1-245, als EndoNF\* bezeichnet) gegenüber dem natürlichen Substrat wurde ein Thiobarbitursäure-Assay durchgeführt.

**Bestimmung der Eichgeraden:** Die Eichgerade wurde durch Anfärbung unterschiedlicher Sialinsäure-Konzentrationen erstellt. Dazu wurden aus einer Stammlösung Sialinsäure (1g/L) Ansätze mit 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 und 6  $\mu\text{g}$  Sialinsäure pipettiert und mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 180  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Diese Lösungen wurden wie die unten beschriebenen Polysialinsäure-Proben gefärbt. Man erhält nach dieser Anfärbung folgende Eichkurve, aus der sich die Steigung bestimmen lässt (OD = Optische Dichte):



**Messung der Enzymaktivität:** Nach 5, 10, 20 und 30 min wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  Polysialinsäure (5 g/L = 0.016 mol/L) mit 2.5  $\mu\text{L}$  Natriumphosphatpuffer (1 M, pH 5.1) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 2.5  $\mu\text{L}$  einer endoNF\*-Lösung (Stammlösung (2.13 g/L) 1:5.73 verdünnt) gestartet. Der Abbau erfolgte bei 37 °C. Als Leerwert wurden 20  $\mu\text{L}$  Polysialinsäure, 2.5  $\mu\text{L}$  Natriumphosphatpuffer (1 M, pH 5.1) und 2.5  $\mu\text{L}$  bidestilliertes Wasser verwendet und wie die Enzymproben behandelt. Um den Enzymabbau nach den jeweiligen Zeiten zu beenden, wurden 20  $\mu\text{L}$  der Ansätze in 20  $\mu\text{L}$  eisgekühlten Ethanol

pipettiert und sofort auf Eis gestellt. Die fertigen Proben wurden entweder direkt weitergefärbt oder bei -20 °C eingefroren.

**Thiobarbitursäure-Anfärbung:** Die Reaktion des Polymers mit Thiobarbitursäure wurde wie folgt durchgeführt: Sowohl die Polysialinsäure-Proben als auch die Proben der Eichgeraden wurden mit 50 µL Periodsäurelösung versetzt, vermischt, zentrifugiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µL Arsenit-Lösung, Mischen der Proben und Zentrifugieren wurden 100 µL Thiobarbitursäure-Lösung zugesetzt, vermischt, zentrifugiert und 7.5 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt. Bei der Reaktion färbten sich die Proben violett-rot und wurden zur Intensivierung der Färbung mit 400 µL DMSO versetzt. Zur Vorbereitung der photometrischen Messung wurden jeweils 150 µL der Proben in eine 96-Well-Platte mit Flachboden pipettiert (Nunc F bottom, Material: Polystyrol). Die Intensitätsmessung der unterschiedlich stark gefärbten Proben erfolgte bei einer Wellenlänge 549 nm an einem Multiplate-Reader.

### **Verwendete Reagenzien**

#### **Periodsäurelösung:**

61 mg Orthoperiodsäure  
492 µL Schwefelsäure (1 M)  
mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 10 mL aufgefüllt

#### **Arsenit-Lösung**

0.2 g Natrium(meta)arsenit  
420 µL konz. Salzsäure  
mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 10 mL aufgefüllt

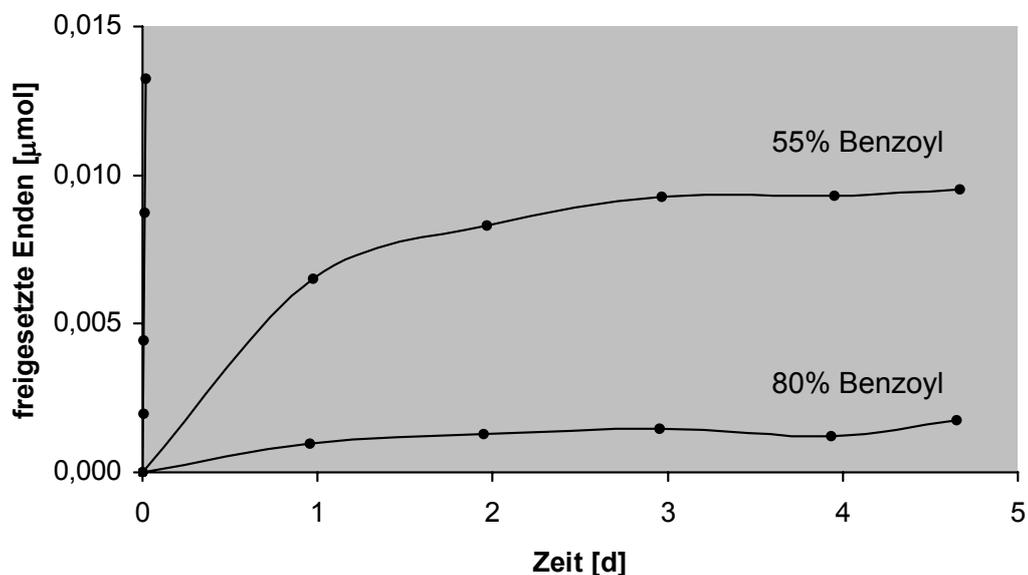
#### **Thiobarbitursäure-Lösung**

600 mg 2-Thiobarbitursäure  
mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 10 mL aufgefüllt  
mit ca. 1.5 mL NaOH (2 M) ein pH-Wert von 9 eingestellt

### 5.6.1 Enzymatischer Abbau der Polysialinsäure-Derivate und Analyse mittels Thiobarbitursäure-Assay

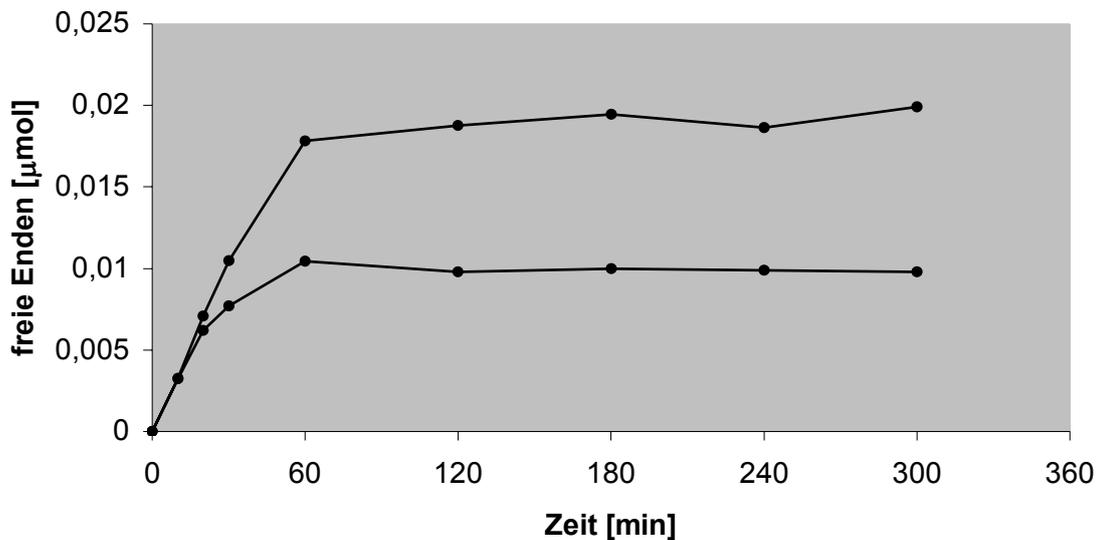
Zur Analyse der Derivate wurde eine Stammlösung in dest. H<sub>2</sub>O mit der molaren Konzentration, die mit dem des natürlichen Substrats identisch ist (0.016 mol/L), hergestellt und wie unter Abschnitt 5.6 behandelt. Bei jeder Durchführung wurde auch die Hydrolyse das natürliche Substrats untersucht, um eine Inaktivierung der EndoNF\* auszuschließen. Die Enzym-enthaltenen Lösungen der Derivate und ihre jeweiligen Leerwerte wurden dabei zunächst bis zu 2 h inkubiert. Nach erfolgter Anfärbung und Auswertung wurden der Abbau bei sehr langsamer Hydrolyse über einen Zeitraum von bis zu zehn Tagen beobachtet. Dazu wurden aus einer Stammlösung mit Enzym und der des Leerwertes nach 24 h jeweils 20 µL abgenommen, in 20 µL eisgekühltes Ethanol pipettiert und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Bei allen Derivaten konnte zunächst ein steiler Anstieg des Abbaus beobachtet werden, der nach der angegebenen Zeit einen konstanten Wert erreichte.



Um nun diesen Endwert mit dem des natürlichen Substrats zu vergleichen und eine Aussage über den prozentualen Anteil treffen zu können, wurde auch der Endwert der Polysialinsäure bestimmt. Bei einer Konzentration von 5 g/L wird jedoch nach einem Abbau von länger als 30 min die Optische Dichte von 1 überschritten und der lineare Bereich der Messung verlassen. Daher wurde eine Konzentration von 2.5 und 1.25 g/L der Polysialinsäure verwendet und der Abbau wie unter Abschnitt 5.6 beschrieben durchgeführt.

**PolySia (1,25 + 2,5 g/L)**



Aus den letzten vier Messwerten der jeweiligen Konzentrationen wurde ein Mittelwert bestimmt und der Anteil an den theoretisch zur Verfügung stehenden freien Enden bestimmt, wenn alle Polymerketten bis zum Monomer abgebaut würden (als Monomer-Einheiten bezeichnet, Tabelle unten).

PolySia [g/L]	PolySia [mol/L]	Anzahl der freien Reduzierenden Enden [ $\mu\text{mol}$ ]	Monomer-Einheiten [ $\mu\text{mol}$ ]	Prozentualer Anteil
1.25	0.004	0.0099 (gemessen)	0.0639	15.4%
2.5	0.008	0.0192 (gemessen)	0.1277	15.0%
5	0.016	0.0384 (berechnet)	0.2560	15.2%

Der errechnete Wert liegt bei 15.2%. Das entspricht einer Spaltung jeder 6. bis 7. glycosidischen Bindung. Dieser Wert wurde auf eine Polysialinsäure Konzentration von 5 g/L (0.016 mol/L) umgerechnet. Der Endwert liegt bei 0.0384  $\mu\text{mol}$ . Alle Graphen der Derivate wurden anschließend auf diesen Wert normiert.

### 5.6.2 Auswertung der Daten

Im folgenden wird exemplarisch eine Auswertung des Thiobarbitursäure-Assays anhand des *N*-Pent-4-enoyl-Derivats (**50**) mit 6%iger Derivatisierung vorgestellt. Zunächst wurde eine Eichkurve mit einer Masse an Sialinsäure ( $m_{\text{Sia}}$ ) zwischen 0.5 und 6  $\mu\text{g}$  erstellt und mit einer Molmasse von 309.27 g/mol in die Stoffmenge der Sialinsäure ( $n_{\text{Sia}}$ ) umgerechnet. Im Anschluss wurde die Optische Dichte der angefärbten Lösungen an einem Photometer bei einer Wellenlänge von 549 nm gemessen. Die Leerprobe ohne Sialinsäure erreichte ebenfalls einen geringen Wert der Optischen Dichte ( $n_{\text{Sia}} = 0$ ; OD = 0.0455, Tabelle 11). Dieser Wert musste von allen Proben subtrahiert werden und wird in der Tabelle als korrigierte Optische Dichte ( $\text{OD}_{\text{korrigiert}}$ ) angegeben. Jeder Stoffmenge Sialinsäure lässt sich ein Wert der Optischen Dichte zuordnen. Aus dieser Funktion wurde die Steigung der Geraden bestimmen. Ihr Wert beträgt  $42.74 \mu\text{mol}^{-1}$ .

$m_{\text{Sia}} [\mu\text{g}]$	$n_{\text{Sia}} [\mu\text{mol}]$	OD	$\text{OD}_{\text{korrigiert}}$
0	0.0000	0.0455	0.0000
0.5	0.0016	0.1175	0.0720
1	0.0032	0.1849	0.1394
2	0.0065	0.3250	0.2795
3	0.0097	0.4532	0.4077
4	0.0129	0.5988	0.5533
5	0.0162	0.7443	0.6988
6	0.0194	0.8697	0.8242

**Tabelle 11:** Erstellung einer Eichgeraden nach Anfärbung verschiedener Sialinsäurekonzentrationen.

Als nächstes wurde die Hydrolyse des Derivats über einen Zeitraum von 5 min bis 5 h verfolgt. Es wurden ebenfalls Polymerproben angefärbt, die kein Enzym enthielten und über den gleichen Zeitraum inkubiert wurden. Die zu einem Zeitpunkt erhaltene optische Dichte der Leerprobe ( $\text{OD}_{\text{leer}}$ ) wurde von der optischen Dichte der Enzymprobe ( $\text{OD}_{\text{Enzym}}$ ) subtrahiert, um einen korrigierten Wert ( $\text{OD}_{\text{korrigiert}}$ ) zu erhalten, der ausschließliche die enzymatische Hydrolyse beschreibt (Tabelle 12).

Zeit [min]	Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [μmol]	%PolySia
5	0.0035	0.1862	0.1814	0.0048	0.0001	0.3
10	0.0069	0.2010	0.1775	0.0235	0.0006	1.4
20	0.0139	0.2177	0.1775	0.0402	0.0009	2.5
30	0.0208	0.2543	0.1772	0.0771	0.0018	4.7
60	0.0417	0.2838	0.1928	0.0910	0.0021	5.6
120	0.0833	0.3444	0.1799	0.1645	0.0038	10.1
295	0.2049	0.6175	0.1862	0.4313	0.0101	26.6

**Tabelle 12:** Gemessene Optische Dichten des enzymatischen Abbaus des *N*-Pent-4-enoyl-Derivats (**49**) nach einem Thiobarbitursäure-Assay. Die Abkürzungen lauten wie folgt: OD<sub>Enzym</sub> = optische Dichte der Proben mit Enzym; OD<sub>leer</sub> = optische Dichte der Proben ohne Enzym; OD<sub>korrigiert</sub> = korrigierte optische Dichte; n<sub>red. Enden</sub> = Stoffmenge der während des enzymatischen Abbaus freigesetzten, reduzierenden Enden.

Die korrigierten Werte der optischen Dichte wurden anschließend mit der Steigung aus der Eichgeraden von 42.74 μmol<sup>-1</sup> in die Stoffmenge an freigesetzten, reduzierenden Enden (n<sub>red. Enden</sub>) umgerechnet. Mit dem in Abschnitt 5.6.1 erhaltenen Hydrolyse-Endwert des natürlichen Substrats von 0.0384 μmol lässt sich die Anzahl freigesetzter, reduzierender Enden relativ zur Polysialinsäure angeben. Dieser Wert ist in Tabelle 12 in %PolySia angegeben. Nach der angegebenen Zeit war nicht der Hydrolyse-Endwert des Derivats erreicht. Daher wurde ein neuer Abbau über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt. Zusätzlich wurde eine neue Eichgerade erstellt. Die aus dieser Geraden ermittelte Wert betrug 40.91 cm<sup>-1</sup>.

Zeit [h]	Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [μmol]	%PolySia
23.5	0.9792	1.0404	0.1924	0.8480	0.0207	54.6
56	2.3333	1.1014	0.1958	0.9055	0.0221	58.3
72.5	3.0208	1.1975	0.2077	0.9899	0.0242	63.7
112	4.6667	1.1865	0.2290	0.9575	0.0234	61.6
120.5	5.0208	1.2207	0.2278	0.9929	0.0243	63.9
145.5	6.0625	1.2486	0.2529	0.9956	0.0243	64.0
168	7.0000	1.2874	0.2650	1.0224	0.0250	65.8
192.5	8.0208	1.2943	0.2804	1.0139	0.0248	65.2

**Tabelle 13:** Gemessene Optische Dichten des enzymatischen Abbaus des *N*-Pent-4-enoyl-Derivats (**50**) nach Thiobarbitursäure-Assay über einen Zeitraum von 8 Tagen. Die Abkürzungen lauten wie folgt: OD<sub>Enzym</sub> = optische Dichte der Proben mit Enzym; OD<sub>leer</sub> = optische Dichte der Proben ohne Enzym; OD<sub>korrigiert</sub> = korrigierte optische Dichte; n<sub>red. Enden</sub> = Stoffmenge der während des enzymatischen Abbaus freigesetzten, reduzierenden Enden.

Die Daten wurden wie zuvor berechnet und der Abbau relativ zu dem der Polysialinsäure in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Bei jedem Abbau wurde auch die Aktivität der EndoNF\* gegenüber dem natürlichen Substrat überprüft. Die Berechnung dieser Werte und die Bestimmung der Aktivität wird im folgenden exemplarisch aufgeführt. Es wurde zunächst Sialinsäure-Eichgerade ermittelt und der Wert der Steigung bestimmt ( $m = 40.26 \mu\text{mol}^{-1}$ ). Anschließend wurde der Abbau des natürlichen Substrats nach 5, 10, 20 und 30 min bestimmt. Nach Thiobarbitursäure-Assay und photometrischer Messung wurden die erhaltenen optischen Dichten um die optischen Dichten der chemischen Hydrolyse korrigiert (Tabelle 14) und mit Hilfe der in der Eichgeraden erhaltenen Steigung in die Anzahl der freien reduzierenden Enden umgerechnet.

Zeit [min]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [μmol]
5	0.21086	0.13129	0.07957	0.00198
10	0.30662	0.12798	0.17864	0.00444
20	0.48313	0.13131	0.35182	0.00874
30	0.66164	0.12816	0.53348	0.01325

**Tabelle 14:** Hydrolyse des natürlichen Substrats. Die Abkürzungen lauten wie folgt: OD<sub>Enzym</sub> = optische Dichte der Proben mit Enzym; OD<sub>leer</sub> = optische Dichte der Proben ohne Enzym; OD<sub>korrigiert</sub> = korrigierte optische Dichte; n<sub>red. Enden</sub> = Stoffmenge der während des enzymatischen Abbaus freigesetzten, reduzierenden Enden.

Mit dem Zusammenhang  $U = n \cdot (\text{Zeit} \cdot n_{\text{Enzym}})^{-1}$  wurde nun die Aktivität U des Enzyms bestimmt (n = Stoffmenge freigesetzter reduzierender Enden; n<sub>Enzym</sub> = Stoffmenge des Enzyms). Die benötigten Werte wurden der Tabelle entnommen. Die eingesetzte Stoffmenge des Enzyms entsprach  $2.4 \cdot 10^{-6}$  μmol. Damit wurde eine mittlere Aktivität von 178.95 min<sup>-1</sup> berechnet. Zu beachten ist, dass nach der bereits im Ergebnisteil (Abschnitt 3.5) aufgeführten Argumentation der Wert (Abschnitt 3.4.3, S. 75) um einen bestimmten Anteil nach oben korrigiert werden muss.

### 5.6.2.1 Enzymatischer Abbau der *N*-Benzoyl-polysialinsäure (39)

Derivatisierungsgrad: 55%

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $41.126 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
6.09	0.9411	0.5353	0.4058	0.0099	26.0
4.67	0.8431	0.4516	0.3915	0.0095	25.1
3.95	0.7713	0.3881	0.3831	0.0093	24.5
2.97	0.6952	0.3146	0.3806	0.0093	24.4
1.97	0.5860	0.2443	0.3416	0.0083	21.9
0.98	0.4387	0.1708	0.2679	0.0065	17.1

Derivatisierungsgrad: 80%

Die aus der Eichgeraden bestimmten Steigung betrug  $41.126 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
4.65	0.5976	0.5261	0.0716	0.0017	4.6
3.93	0.5161	0.4667	0.0495	0.0012	3.2
2.95	0.4451	0.3849	0.0602	0.0015	3.9
1.95	0.3567	0.3033	0.0534	0.0013	3.4
0.96	0.2474	0.2072	0.0402	0.0010	2.6

### 5.6.2.2 Enzymatischer Abbau der *N*-Methoxyacetyl-polysialinsäure (47)

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $41.673 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
1.71	0.3662	0.1711	0.1951	0.0047	12.3
2.04	0.3729	0.1720	0.2010	0.0048	12.7
2.35	0.4284	0.1725	0.2560	0.0061	16.2
4.00	0.4964	0.1843	0.3122	0.0075	19.7
5.02	0.5317	0.1798	0.3519	0.0084	22.2
6.00	0.5433	0.1936	0.3497	0.0084	22.1
7.08	0.5822	0.1959	0.3863	0.0093	24.4
8.04	0.5677	0.1961	0.3716	0.0089	23.5

### 5.6.2.3 Enzymatischer Abbau der *N*-Pentenoyl-polysialinsäure (50)

Derivatisierungsgrad: 43%

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $42.763 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
0.003	0.1738	0.1680	0.0057	0.0001	0.4
0.007	0.1826	0.1641	0.0185	0.0004	1.1
0.014	0.1929	0.1735	0.0194	0.0005	1.2
0.021	0.1986	0.1761	0.0225	0.0005	1.4
0.042	0.2266	0.1746	0.0520	0.0012	3.2
0.083	0.2333	0.1687	0.0646	0.0015	4.0
0.205	0.3261	0.1755	0.1505	0.0035	9.3

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $40.765 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
0.979	0.4813	0.1778	0.3035	0.0074	19.6
2.333	0.5431	0.2078	0.3353	0.0082	21.6
3.021	0.5580	0.2183	0.3397	0.0083	21.9
4.667	0.6089	0.2523	0.3566	0.0087	23.0
5.021	0.6096	0.2581	0.3515	0.0086	22.7
6.063	0.6325	0.2766	0.3559	0.0087	23.0
7.000	0.6355	0.2912	0.3443	0.0084	22.2
8.021	0.6586	0.2871	0.3715	0.0091	24.0

Derivatisierungsgrad: 98%

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $43.189 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
0.003	0.1460	0.1426	0.0033	0.00008	0.20
0.007	0.1428	0.1450	-0.0022	-0.00005	-0.13
0.014	0.1487	0.1494	-0.0007	-0.00002	-0.05
0.021	0.1579	0.1461	0.0118	0.00027	0.72
0.042	0.1632	0.1561	0.0071	0.00016	0.43
0.083	0.1725	0.1638	0.0087	0.00020	0.53
1.069	0.1825	0.1758	0.0067	0.00016	0.41
2.043	0.2494	0.2193	0.0301	0.00070	1.83
3.251	0.2689	0.2559	0.0130	0.00030	0.79
4.064	0.3446	0.3221	0.0226	0.00052	1.37

#### 5.6.2.4 N-Formyl-polysialinsäure (43)

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $41.673 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [min]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
5	0.12758	0.12545	0.00213	0.00005	0.13
10	0.13119	0.12864	0.00255	0.00006	0.16
20	0.13277	0.12854	0.00423	0.00010	0.27
30	0.13398	0.12936	0.00462	0.00011	0.29
60	0.14153	0.12919	0.01234	0.00030	0.78
120	0.14215	0.12789	0.01426	0.00034	0.90

### 5.6.2.5 N-Propionyl-polysialinsäure (44)

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $42.018 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [d]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
0.003	0.5019	0.4895	0.0124	0.0003	0.8
0.014	0.5518	0.5463	0.0055	0.0001	0.3
0.021	0.5745	0.5608	0.0137	0.0003	0.9
0.083	0.6617	0.5473	0.1144	0.0027	7.2
0.750	0.9718	0.5865	0.3853	0.0092	24.1
0.875	1.1409	0.5522	0.5886	0.0140	36.9
2.625	1.4342	0.6342	0.8000	0.0190	50.1
3.000	1.4386	0.6407	0.7979	0.0190	50.0
4.000	1.4120	0.6395	0.7725	0.0184	48.4
5.125	1.4440	0.6863	0.7576	0.0180	47.5
6.063	1.4976	0.7299	0.7677	0.0183	48.1
7.604	1.5449	0.7626	0.7823	0.0186	49.0

### 5.6.2.6 5-Diethylamino-polysialinsäure (53)

Die aus der Eichgeraden bestimmte Steigung betrug  $43.189 \mu\text{mol}^{-1}$ .

Zeit [min]	OD <sub>Enzym</sub>	OD <sub>leer</sub>	OD <sub>korrigiert</sub>	n <sub>red. Enden</sub> [ $\mu\text{mol}$ ]	%PolySia
5	0.13848	0.14150	-0.00302	-0.00007	-0.18
10	0.13972	0.13659	0.00313	0.00007	0.19
20	0.14701	0.14203	0.00498	0.00012	0.30
30	0.14577	0.14333	0.00244	0.00006	0.15
60	0.14613	0.14583	0.00030	0.00001	0.02
160	0.15460	0.14862	0.00598	0.00014	0.36

## 5.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Colominsäure und ihre Derivate wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.<sup>103</sup> Die Teilchen besitzen unabhängig von ihrem Polymerisationsgrad ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse und werden in einem Polyacrylamidgel nur aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Größen getrennt.

### Puffer und Lösungen

#### 10 x TBE

0.98 mol/L Tris

0.98 mol/L Borsäure

0.02 mol/L EDTA

#### 50 % Acrylamidstock

49.6 g Acrylamid

0.40 g Bisacrylamid

auf 100 mL auffüllen, entgasen,  
lagern bei 4 °C

#### Größen-Marker

0.05% Trypanblau

0.02% Xylencyanol

0.02% Bromphenolblau

0.02% Phenolrot

0.02% Bromkresopurpur

#### Auftragspuffer

2 mol/L Sucrose

in 10 x TBE

**Gelelektrophorese:** Es wurden 15 mL eines 25%igen Acrylamidgels aus 7.5 mL der 50%igen Acrylamidstocklösung, 1.5 mL 10 x TBE und 6 mL H<sub>2</sub>O hergestellt. Die

---

<sup>103</sup> S. Pelkonen, J. Hayrinen und J. Finne, *J Bacteriol*, **1988**, *170*, 2646-2653.

Polymerisation des Acrylamidgels wurde durch Zugabe von 62.5  $\mu\text{L}$  einer 10%igen APS-Lösung und 12.5  $\mu\text{L}$  TEMED gestartet. Die Mischung wurde zwischen 10 cm lange Glasplatten gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurde ein Gelvorlauf von 1 h bei 100 V und 4 °C durchgeführt.

Die Proben wurden 1:1 mit dem Probenpuffer vermischt und nach Beendigung des Gelvorlaufs in einem Volumen von 10  $\mu\text{L}$  auf das Gel pipettiert. Von jeder Probe wurden 2  $\mu\text{g}$  und 5  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 14 h lang bei einer Spannung von 60 V ( $\sim 6 \text{ V/cm}$ ) und 4 °C durchgeführt.

## 5.8 Alcianblau-Silberfärbung

Anschließend wurden die Gele durch Alcianblau-Silberfärbung gefärbt.

### **Puffer und Lösungen:**

#### **Fixierlösung:**

40% Ethanol

5% Essigsäure

#### **Silbernitrat-Lösung:**

1.6 mL Ammoniak (25%ig)

1 mL 2 mol/L NaOH

auffüllen auf 100 mL

0.6 g Silbernitrat zugeben

#### **Periodsäure-Lösung:**

0.7 g Periodsäure

100 mL Fixierlösung

#### **Formaldehydentwickler:**

100 mL 240  $\mu\text{mol/L}$  Zitronensäure

135  $\mu\text{L}$  Formaldehyd (37%ig)

#### **Trocknerlösung:**

10% Glycerin

20% Ethanol

**Färbung:** 0.5 g Alcianblau wurden mit 100 mL Wasser versetzt und 15 min bei 40 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung filtriert. Alle weiteren Schritte dieser Durchführung erfolgten unter Schütteln bei Raumtemperatur. Das Gel wurde mit der vorbereiteten Alcianblau-Lösung 30 min lang gefärbt und anschließend mit dest. H<sub>2</sub>O entfärbt, bis die blauen Polysaccharidbanden deutlich zu erkennen waren (das Gel blieb dabei leicht bläulich). Anschließend wurde das Gel 30–60 min in Fixierlösung gelegt. Für die Silberfärbung wurde das Gel mit Perjodsäurelösung versetzt, 5 min geschüttelt und dreimal für 15 min mit ca. 300 mL dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte die Inkubation für 10 min mit Silbernitrat-Lösung und dreimaliges Waschen mit dest. Wasser für 10 min. Das Gel wurde nun mit Formaldehydentwicklerlösung versetzt und die Entwicklung nach 1-3 min durch Waschen mit 5 %iger Essigsäure beendet.

Die gefärbten Gele wurden für 30–60 min in Trocknerlösung gelegt und zwischen Celophanfolie bei 45 °C im Trockenschrank getrocknet.

## 5.9 Biologische Evaluierung der Hydrogele

### 5.9.1 Kultivierung von PC12 Zellen

PC12 Zellen entstammen einem Tumor des Nebennierenmarks (Phaeochromozytom) und zeigen auf Kollagen in Anwesenheit des Nervenwachstumsfaktors NGF einen neuronalen Phänotyp, der dem von sympathischen, adrenergen Neuronen ähnelt. Die Zellen sind in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren sowie verschiedene Neurotransmitter zu synthetisieren und freizusetzen.<sup>82,104</sup>

Die Experimente zur Kultivierung von Zellen auf den Hydrogelen wurden nach einer Einweisung am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule durchgeführt. Für die Kultivierung der PC12 Zellen wurden zunächst Polystyrol-Zellkulturflaschen mit einer sterilen 0.5 mg/ml Poly-L-lysin-(PLL)-Lösung (5 ml auf 75 cm<sup>2</sup>) für 1 h bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37 °C beschichtet. Nach zwei Wachsritten mit jeweils 10 ml sterilem bidest. H<sub>2</sub>O wurden 10<sup>6</sup> Zellen in 12 ml Proliferationsmedium (Zusammensetzung s. unten) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in einem befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter 8.5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium ersetzt und die Zellen einmal pro Woche umgesetzt.

Hierzu wurden sie zwei Mal mit einer sterilen, Phosphat-gepufferten NaCl-Lösung (Dulbecco's PBS, Zusammensetzung s. unten) gewaschen und mit 3 ml einer 0.05% (w/v) Trypsin/0.83 mM EDTA-Lösung für 3 bis 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Unter Klopfen lösten sich die Zellverbände von der Oberfläche ab. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von zwei Volumenäquivalenten Proliferationsmedium gestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei 235 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Medium aufgenommen. Mit einer über dem Bunsenbrenner enggeschmolzenen Glas-Pasteurpipette wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren trituiert und mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt. Anschließend erfolgte eine Trypanblau-Ausschlussfärbung zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 0.4% Trypanblau-Lösung versetzt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde unter dem Mikroskop im Phasenkontrast das Verhältnis von toten, blauen zu lebenden, farblosen Zellen in einem Volumen 0.1 µl ermittelt.

---

<sup>104</sup> G. Mandel, S. S. Cooperman, R. A. Maue, R. H. Goodman und P. Brehm, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, *85*, 924-928.

**Proliferationsmedium:**

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) high glucose  
10% Pferde-Serum  
5% Fötale Kälberserum  
6 mM L-Glutamin  
1 mM Natriumpyruvat  
0.1 mg/ml Penicillin/Streptomycin

**Dulbecco's PBS:**

136.9 mM NaCl  
8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2.7 mM KCl  
1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 5.9.2 Kryokonservierung von PC12 Zellen

Bei einer fortdauernden Kultivierung der Zellen kommt es zu Alterungsprozessen und das Risiko von Kontaminationen steigt. Aus diesem Grund werden die Zellen in Form von Stocks in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eine eigene Reserve an Zellen anzulegen, wurde ein frisches Aliquot aufgetaut, mit 25 ml Medium versetzt und in einer großen, mit PLL beschichteten Zellkulturflasche (10 ml 0.5 mg/ml PLL auf 150 cm<sup>2</sup>) über Nacht im Brutschrank inkubiert (s. oben). Nach Wechsel des Mediums am folgenden Tag erfolgte eine Kultivierung wie beschrieben für sieben Tage. Anschließend erfolgte nach dem Ablösen der Zellen, der Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in 10 ml Medium, die Bestimmung der Lebendzellzahl.

Es wurden nun  $35 \cdot 10^6$  Zellen erneut zentrifugiert, um Rückstände an Trypsin zu entfernen und das Pellet nach Trituieren in insgesamt 7 ml Proliferationsmedium mit 10% DMSO aufgenommen. Die Suspension wurde in sechs Aliquots von jeweils  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter aufgeteilt und der Rest verworfen. In einem Isopropanol-ummanteltem Gefäß wurden die Aliquots über Nacht zunächst langsam auf  $-84 \text{ }^\circ\text{C}$  im Tiefkühlschrank abgekühlt, bevor sie endgültig in Stickstoff überführt wurden. Die Verwendung von DMSO im Einfriermedium dient als Frostschutzzusatz und vermindert die Zellyse beim Einfrier- bzw. Auftauprozess. DMSO erhöht die Permeabilität der Zellmembran und vermindert die Eiskristallbildung.<sup>105</sup>

---

<sup>105</sup> J. E. Lovelock und M. W. Bishop, *Nature*, **1959**, 183, 1394-1395.

### 5.9.3 Differenzierung von PC12 Zellen

Für die biologische Evaluierung der Hydrogele sollten PC12-Zellen auf diesen kultiviert und neuronal differenziert werden. Als Kontrolle dienten in jedem Versuchsansatz 24-Well-Polystyrol-Kulturplatten, deren Wells nach Bedarf über Nacht jeweils mit 200 µl einer 0.06 mg/ml Kollagen I Lösung (Stammlösung: 4 mg/ml in 0.1 M Essigsäure) inkubiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen wurden. Nach der Aussaat von 30000 Zellen in 500 µl Proliferationsmedium pro 24 Well erfolgte eine Kultivierung für 24 h im Brutschrank. Das Medium wurde vollständig abgenommen und durch Differenzierungsmedium mit frisch zugesetztem NGF ersetzt (s. unten). Nach Kultivierung im Brutschrank für 72 h wurde die Flüssigkeit abgenommen und durch eine warme 4% Paraformaldehyd in PBS Lösung ersetzt, um die Zellen zu fixieren. Nach 15 min wurde in drei Schritten jeweils 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend immunzytochemisch markiert (Abschnitt 5.9.5).

#### Differenzierungsmedium:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) high glucose

1% Pferde-Serum

6 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

0.1 mg/ml Penicillin/Streptomycin

100 ng/ml NGF-β 7S

### 5.9.4 Kultivierung von PC12 Zellen auf den Polysialinsäure-Hydrogelen

Die Gele wurden vorsichtig in 1.13 cm<sup>2</sup> große Scheiben mit einer Stärke von ca. 2 mm (6 mg pufferfreies, gefriergetrocknetes Material) geschnitten, in 24-Well-Platten überführt und zur Sterilisation mit 70% Ethanol versetzt. Nach dem Transport erfolgte ein Austausch der Lösung und eine erneute Inkubation in 70% Ethanol für 24 h. Die Gele wurden zunächst für 3 h, anschließend für 24 h in sterilem PBS gelagert, um den verbliebenen Alkohol vollständig zu entfernen.

Die Hydrogele wurden entweder mit 400 µl PBS (Kontrolle), PLL (0.5 mg/ml), Kollagen I (0.06 mg/ml) in PBS oder einer Lösung bestehend aus PLL (0.5 mg/ml) und Kollagen I (0.06 mg/ml) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in PBS. Für die Beschichtung mit Matrigel musste die Stammlösung (11.35 mg/ml) auf Eis aufgetaut und mit eisgekühlten Pipettenspitzen und kaltem PBS auf 0.4 mg/ml verdünnt werden, da die Proteinlösung unverdünnt bei Raumtemperatur ein festes Gel bildet.

60000 Zellen wurden pro Well sowie Hydrogel ausgesät und für 24 h in Proliferationsmedium kultiviert. Anschließend wurde die Lösung durch Differenzierungsmedium ersetzt. Nach 72 h erfolgte entweder die Fixierung oder ein Austausch des Differenzierungsmediums und eine Kultivierung für weitere 72 h.

Für die Fixierung der Zellen auf den Hydrogelen wurden diese etwas länger (40 min) mit einer warmen 4% Paraformaldehyd in PBS Lösung inkubiert. Wenn keine immunzytochemische Markierung erfolgte (Abschnitt 5.9.5), wurden die Zellen anschließend direkt in zwei Waschschritten von jeweils 5 min, sowie in einem Schritt für 20 min mit einer sterilen Lösung aus 0.3% Triton-X-100 in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Detergenz führte zur Permeabilisierung der Zellmembran und erleichterte die Aufnahme des Kernfarbstoffs.

Für die Markierung der nukleären DNA wurde eine 3 mM Stammlösung aus 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 in PBS mit 0.3% Triton-X-100 verdünnt und 300 µl der Lösung für 15 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in zwei Schritten für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. DAPI interkaliert in die DNA-Doppelhelix und zeigt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregung von 364 nm ein Emissionsmaximum von 454 nm im blauen Bereich des sichtbaren Lichts.

### **5.9.5 Immunzytochemie**

Bei der Immunzytochemie werden zelluläre Strukturen über Antikörperbindung nachgewiesen. In diesem Fall wurde ein gegen das  $\beta$ -Tubulin gerichteter, monoklonaler Primärantikörper aus der Maus mit einem gegen Maus gerichtetem Sekundärantikörper, der mit dem Fluorophor Alexa-555 gekoppelt war und aus der Ziege stammt, nachgewiesen. Alexa-555 zeigt im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 550 nm ein Emissionsmaximum von 565 nm im orange-roten Bereich des sichtbaren Lichts. Zur Markierung wurde bewusst  $\beta$ -Tubulin gewählt, da es am Aufbau des Zytoskeletts der Zelle beteiligt ist und der Nachweis zur Anfärbung der gesamten Zelle führt.

Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen zunächst in drei Schritten über einen Zeitraum von 35 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 300 µl/Well Proteinlösung bestehend aus 5% Serumalbumin des Rindes (BSA, bovine serum albumin) in PBS mit 0.3% Triton-X-100, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Polystyrol-Oberfläche oder die Hydrogele zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper, der 1:300 in 1% BSA in PBS mit 0.3% Triton-X-100 verdünnt wurde, versetzt. Nach 3 h erfolgten drei Waschschrritte mit PBS für jeweils 5 min und eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der 1:400 in 1% BSA in PBS verdünnt wurde, für 2 h. Nach einem erneuten Waschschrtritt mit PBS für 5 min erfolgte eine 15 min Inkubation mit

3  $\mu\text{M}$  DAPI in PBS. Die Zellen wurden erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und unter dem Mikroskop ausgewertet.

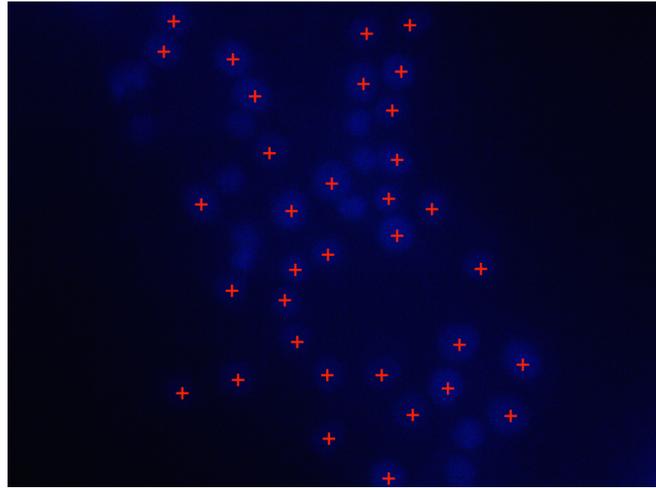
### **5.9.6 Mikroskopische Betrachtung**

Für die Untersuchung der Zellen wurde ein inverses Olympus IX70 Fluoreszenz-Mikroskop verwendet. Dabei kamen die 4x, 10x, 20x, 40x Objektive zum Einsatz. Fluoreszenz-Betrachtungen erfolgten unter zu Hilfenahme der Filtereinsätze UMNU (360 – 370 nm, Sperrfilter >420 nm) für DAPI sowie UMNG (530 – 550 nm, Sperrfilter >590 nm) für Alexa555 markierte Strukturen. Bilder wurden mit einer CCD-Digitalkamera und der Analysis 3.1 Software aufgenommen.

### **5.9.7 Assay zur Adhäsionsquantifizierung**

Zur exakten Quantifizierung der Zelladhäsion auf der Material-Oberfläche wurden für die Hydrogele mit und ohne Beschichtung drei unabhängige PC12-Zellkultivierungen vorgenommen. Als Beschichtungen wurden verwendet: Kollagen I, eine Mischung aus Kollagen I und PLL und eine hochverdünnte Lösung von Matrigel. Die Hydrogele mit einer Fläche von  $1.13 \text{ cm}^2$  und mit einer Stärke von ca. 2 mm (6 mg gefriergetrocknetes Material) wurden auf einer 24-Well-Kulturschale wie unter Abschnitt 5.9.4 beschichtet. Eine Kultivierung erfolgte für 24 h unter Proliferationsbedingungen und 72 h unter Differenzierungsbedingungen. Bei der Verwendung von Matrigel konnte ein Aufschwimmen der Gele bei der Zugabe der PC12 Zellen beobachtet werden.

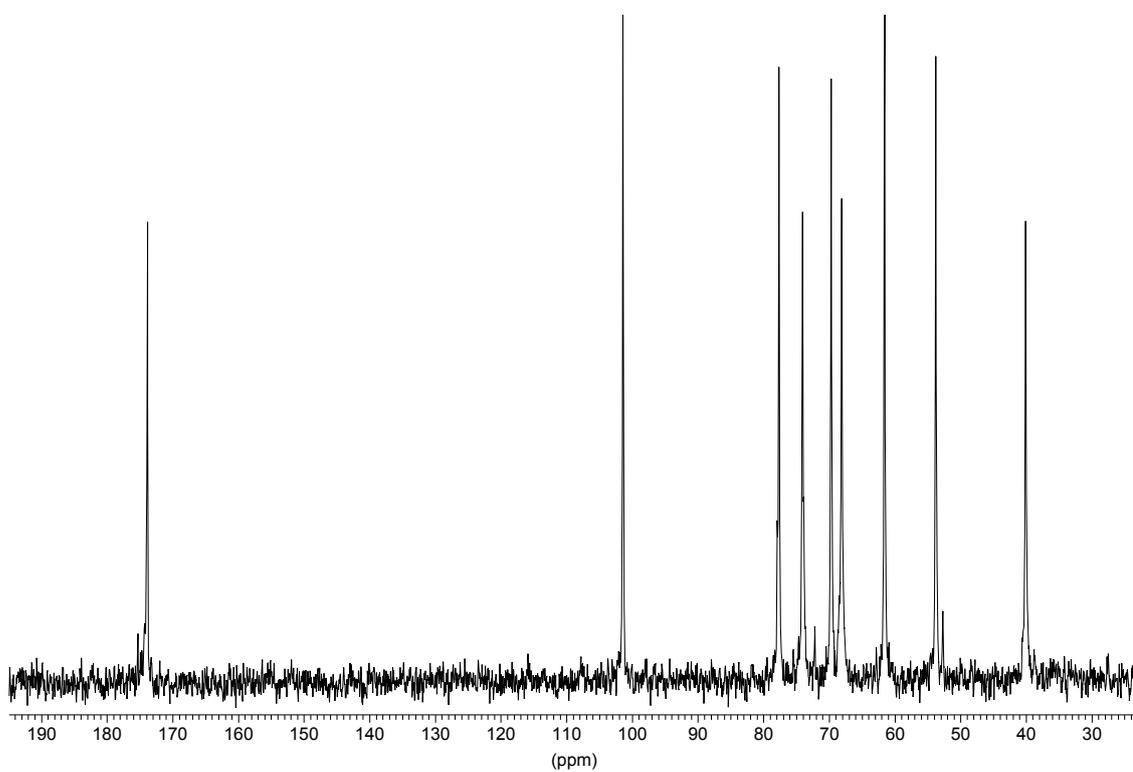
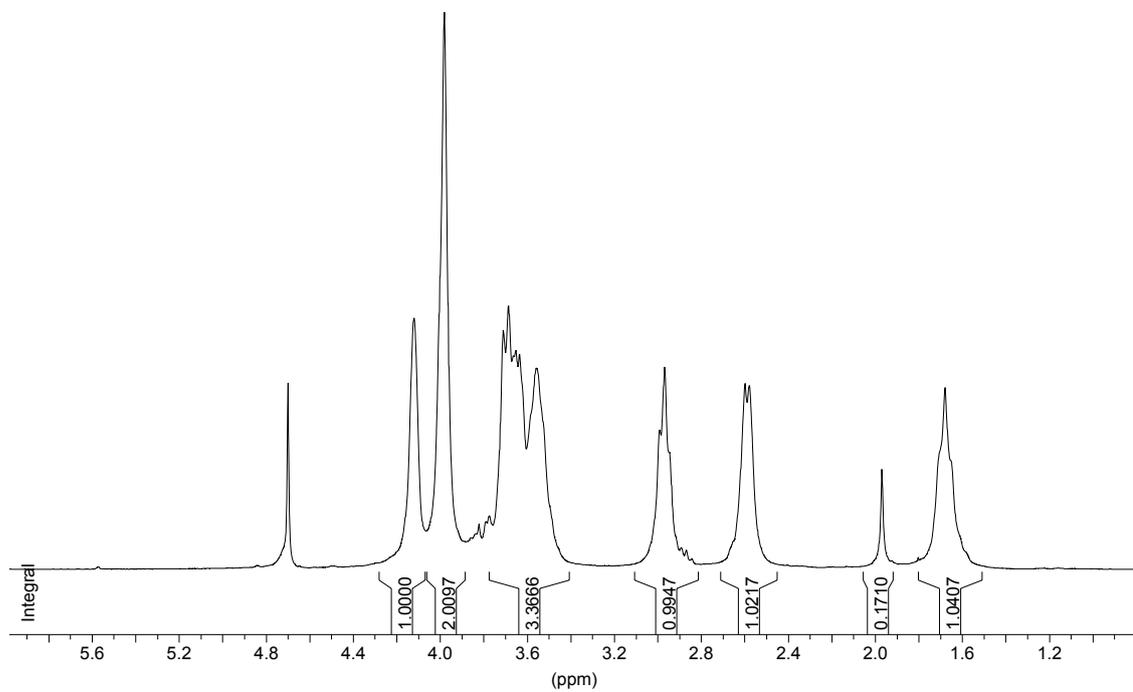
Nach Fixierung und Kernfärbung wurden die Hydrogele unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für jedes Gel mit und ohne Beschichtung wurden fünf aufeinander folgende Aufnahmen der Fläche  $127 \mu\text{m} \times 170 \mu\text{m}$  angefertigt und die Zellkerne auf diesen Bildern ausgezählt (Abbildung 84). Es wurden ausschließlich Zellen gezählt, die intakte Zellkerne aufwiesen. Die Auswertung der Zellzahlen erfolgte mit der Prism 4 Software. Die Mittelwerte mit dem Fehler der Standardabweichung wurden statistisch ausgewertet. Hierbei wurde ein ANOVA gefolgt von einem Dunn's posthoc Test verwendet.

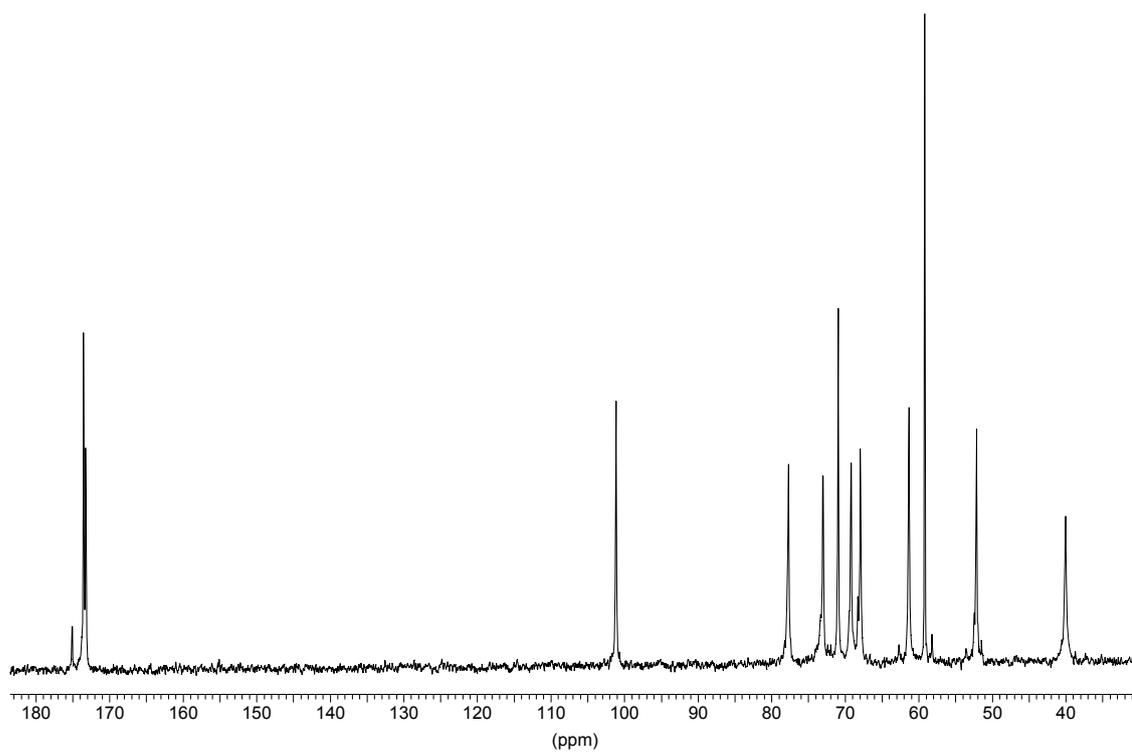
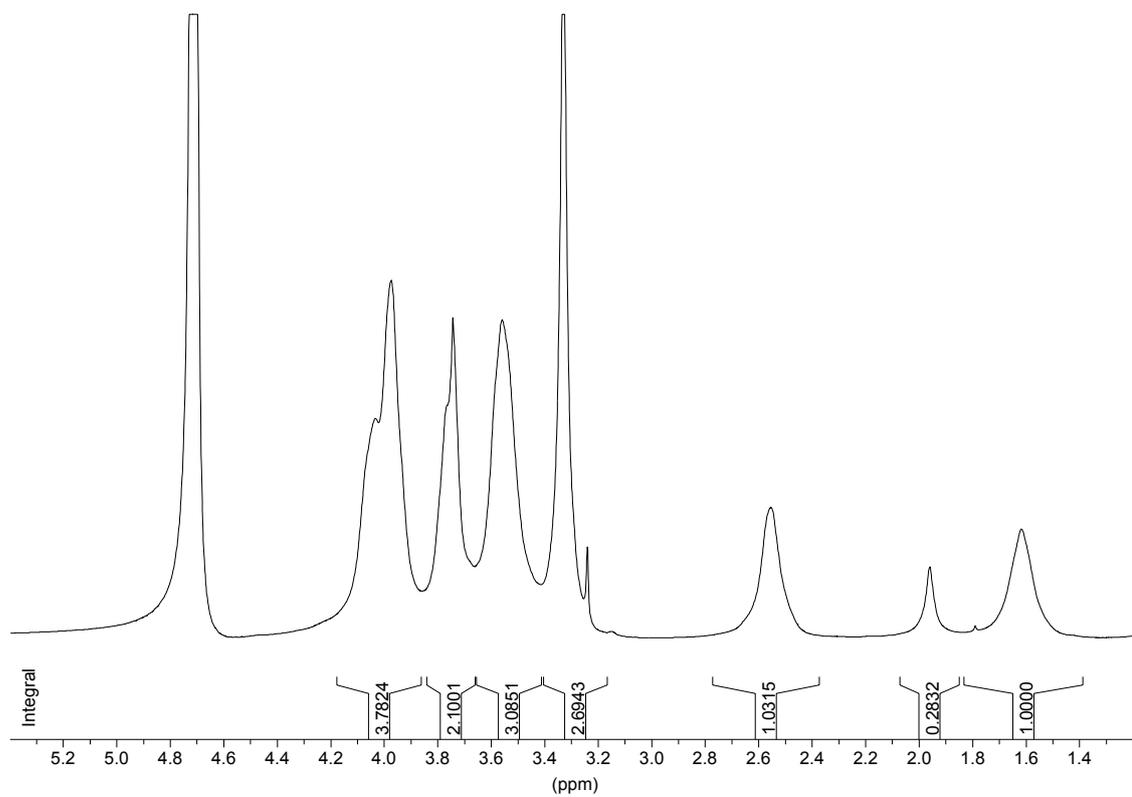


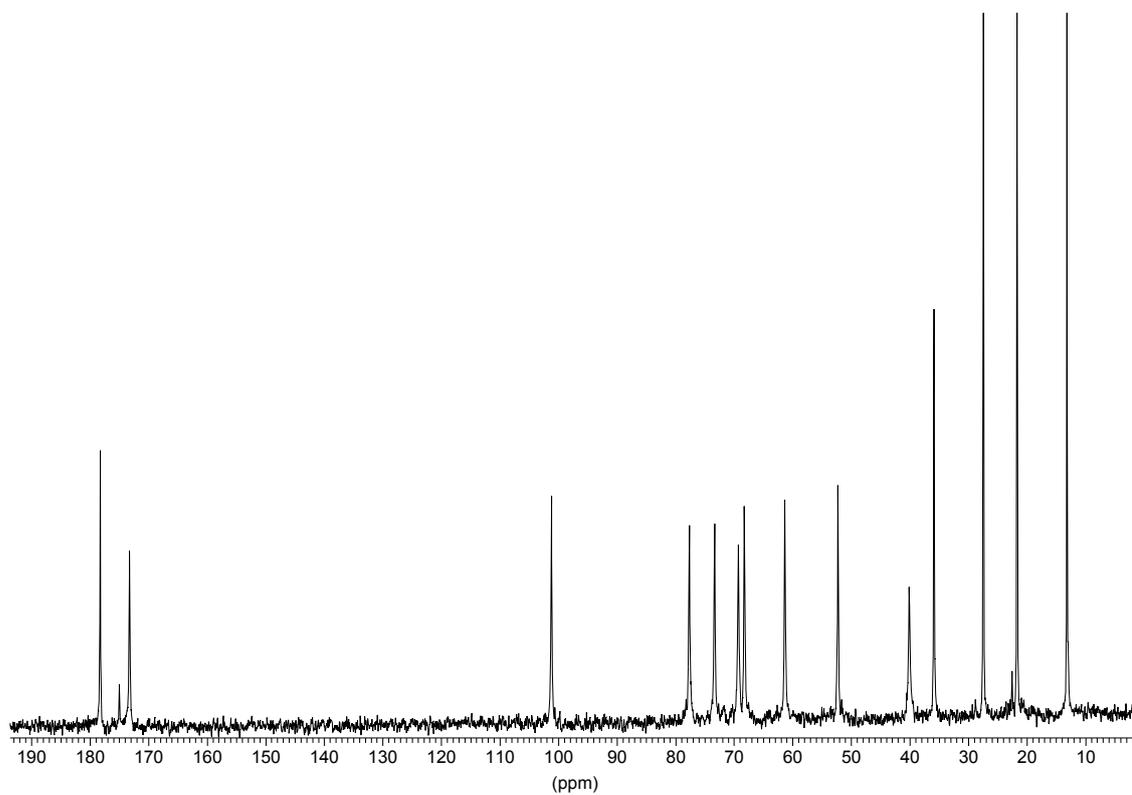
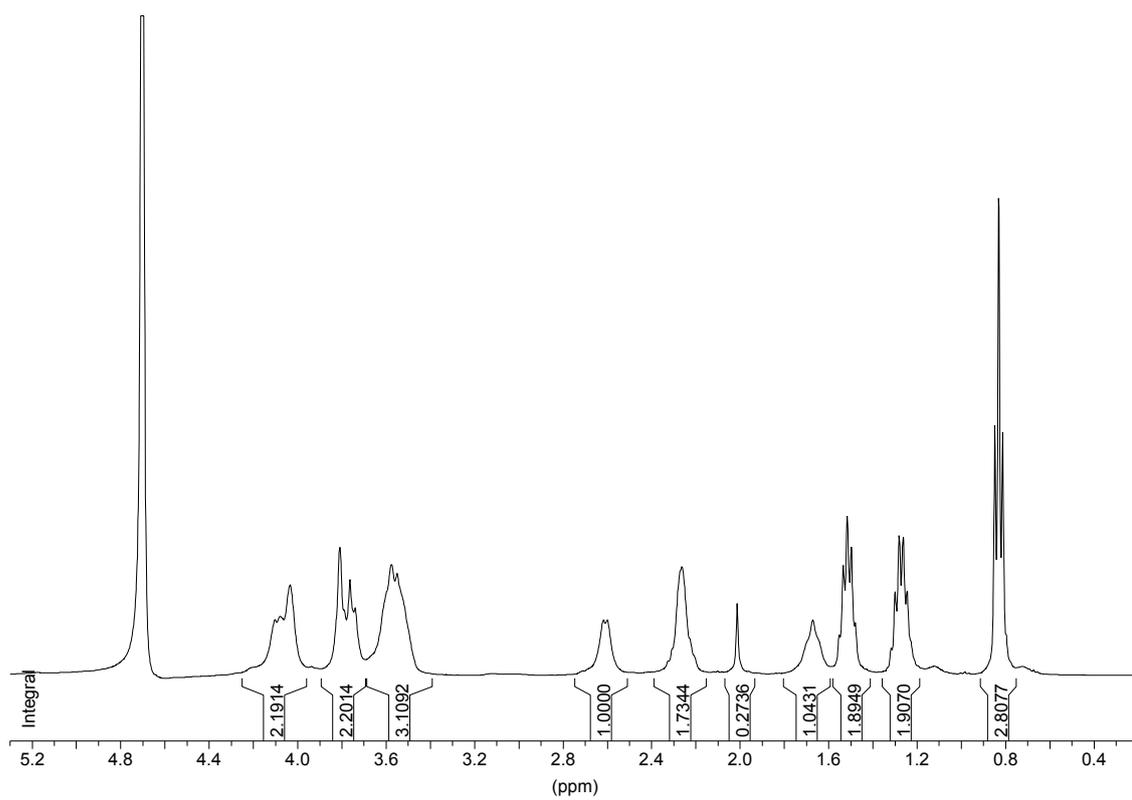
**Abbildung 84:** Assay zur Quantifizierung der Zelladhäsion auf der Oberfläche der Hydrogele. Die abgebildete Aufnahme umfasst eine Fläche von 127  $\mu\text{m}$  x 170  $\mu\text{m}$ .

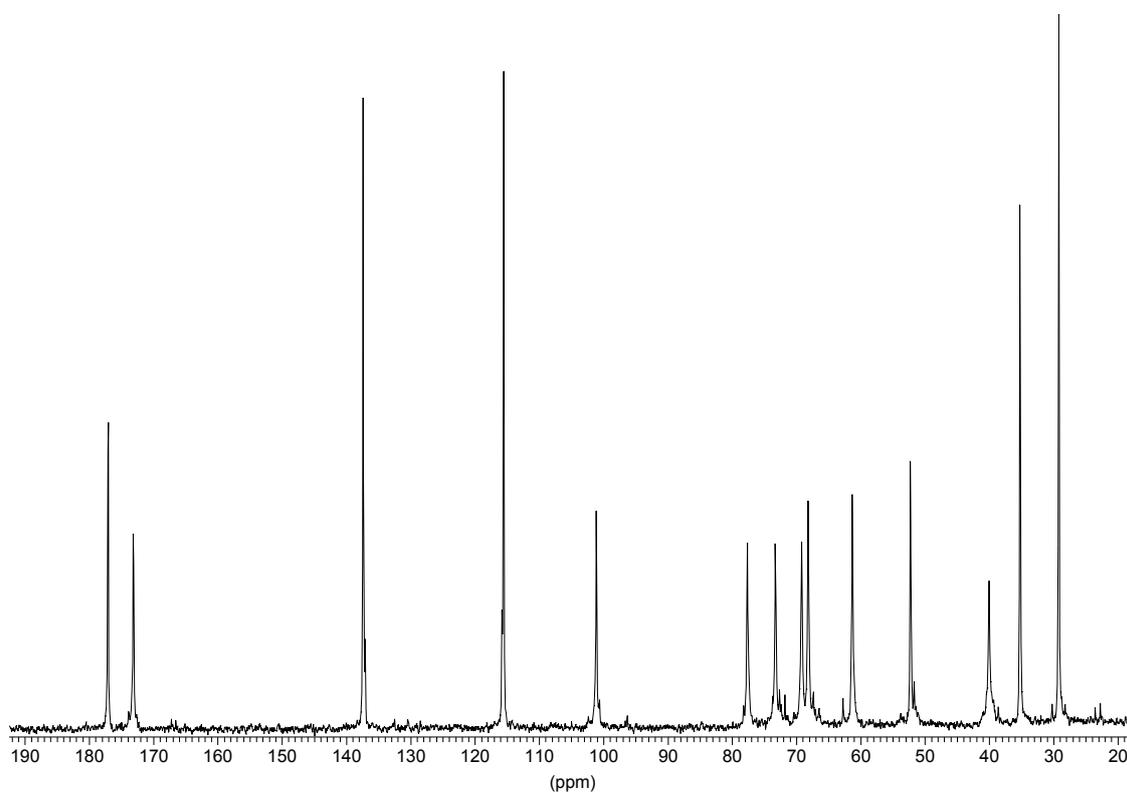
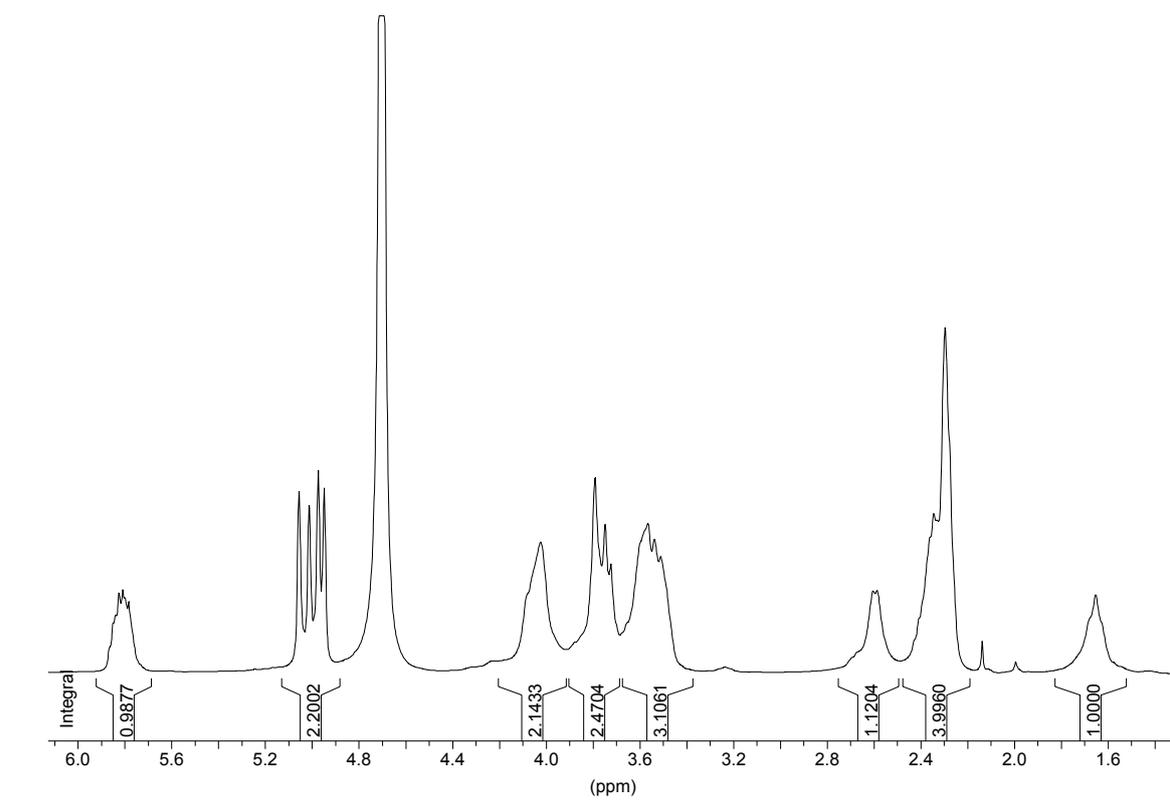
## 6 Anhang

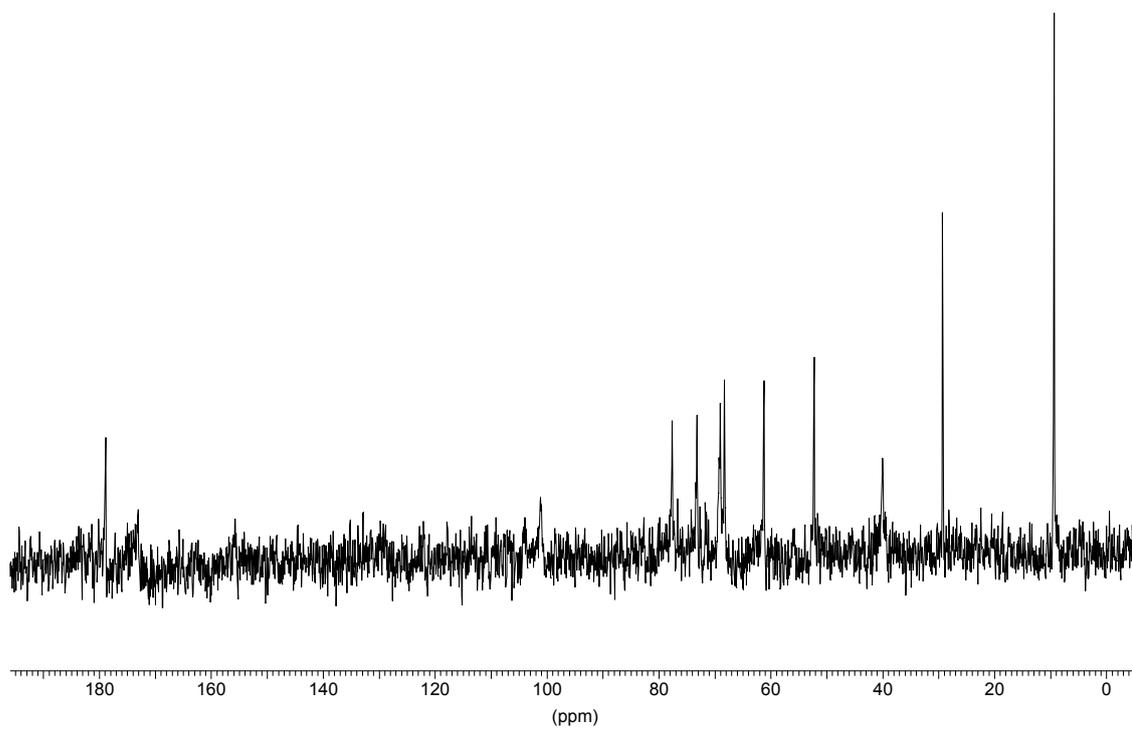
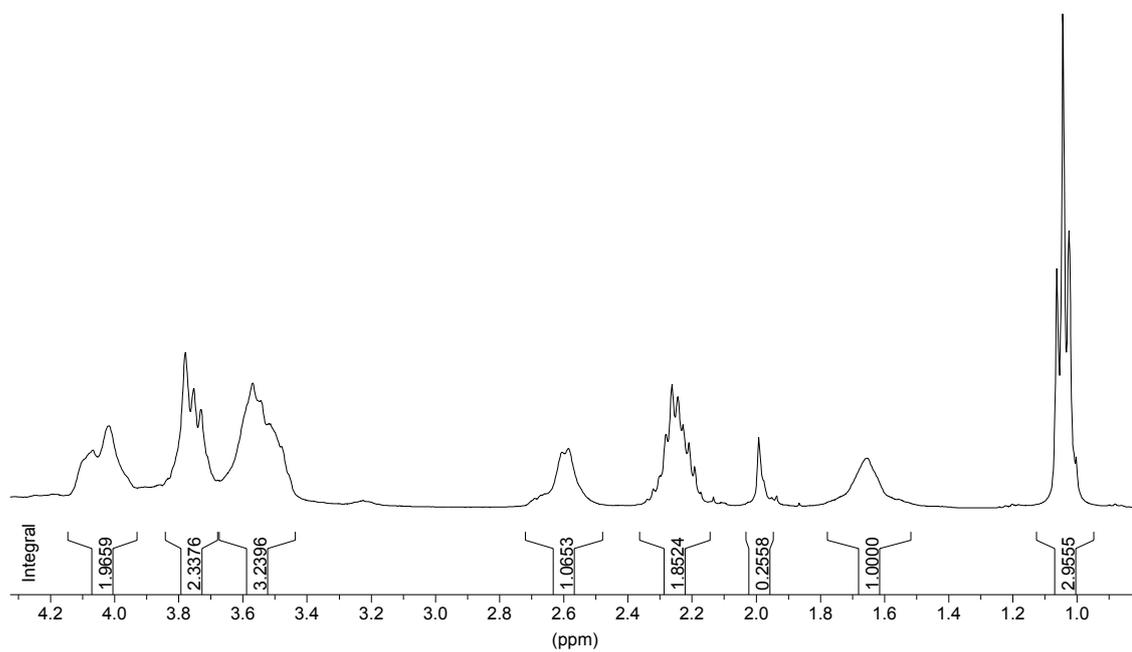
$\gamma$ -Polyaminosäure der Polysialinsäure (40)

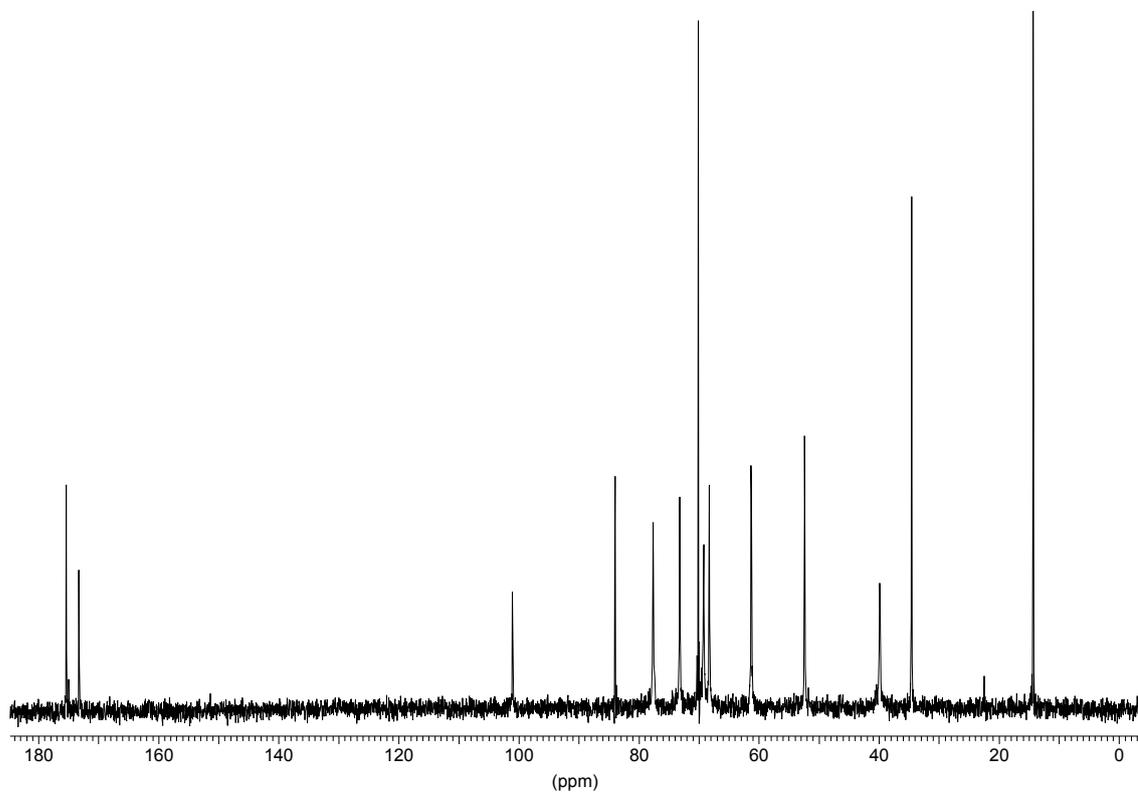
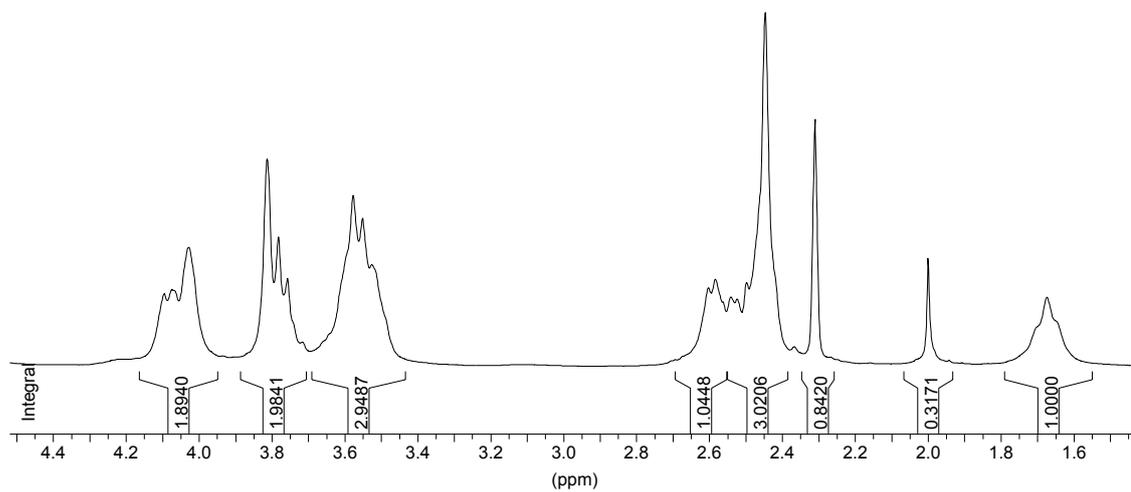


*N*-Methoxyacetyl-polysialinsäure (47)

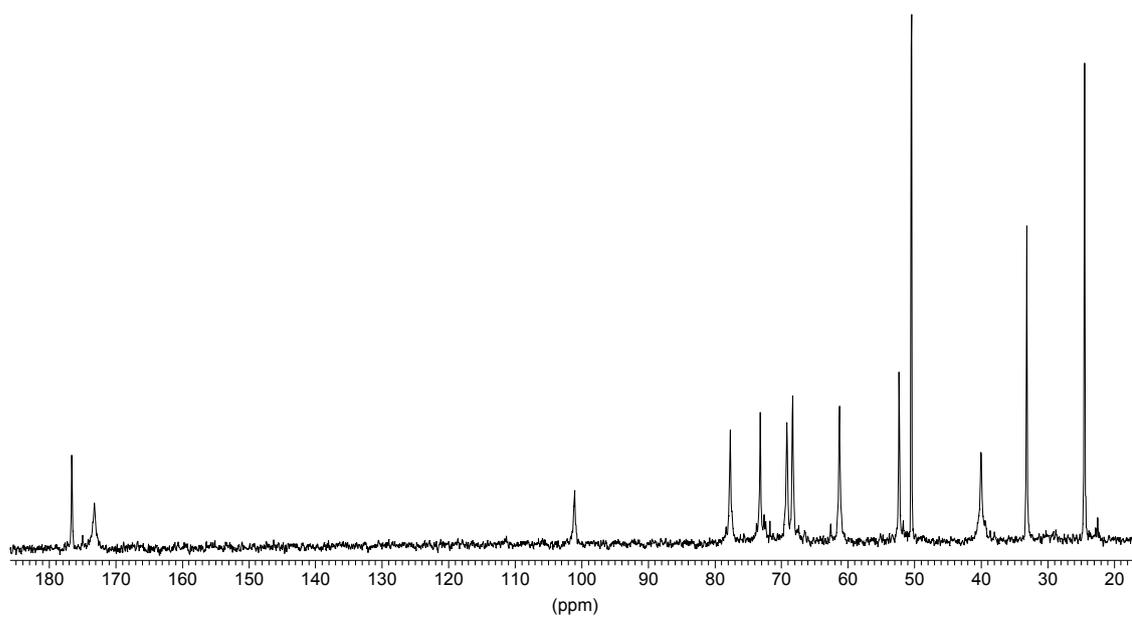
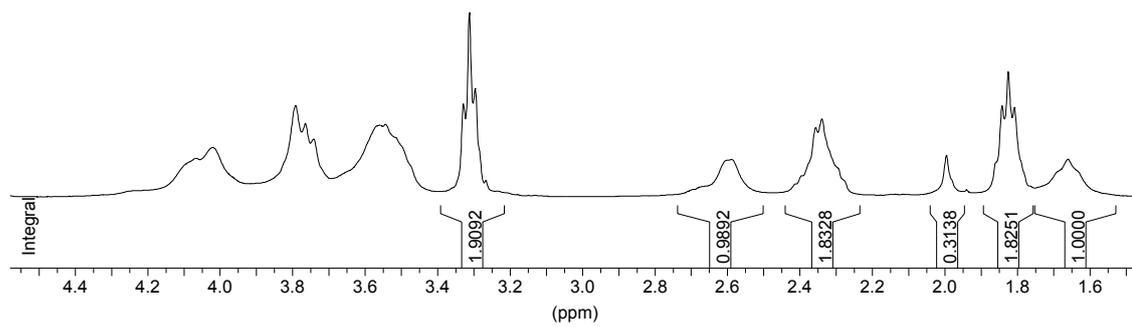
*N*-Valeroyl-polysialinsäure (47)

*N*-Pent-4-enoyl-polysialinsäure (**50**)

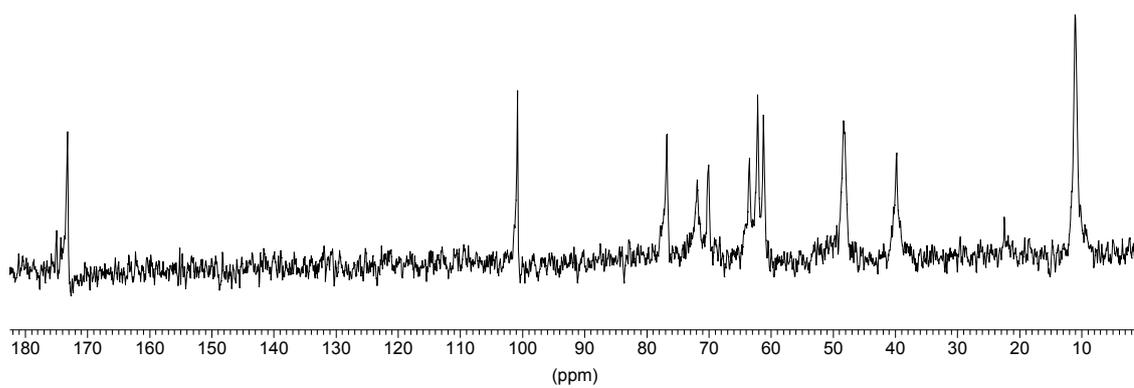
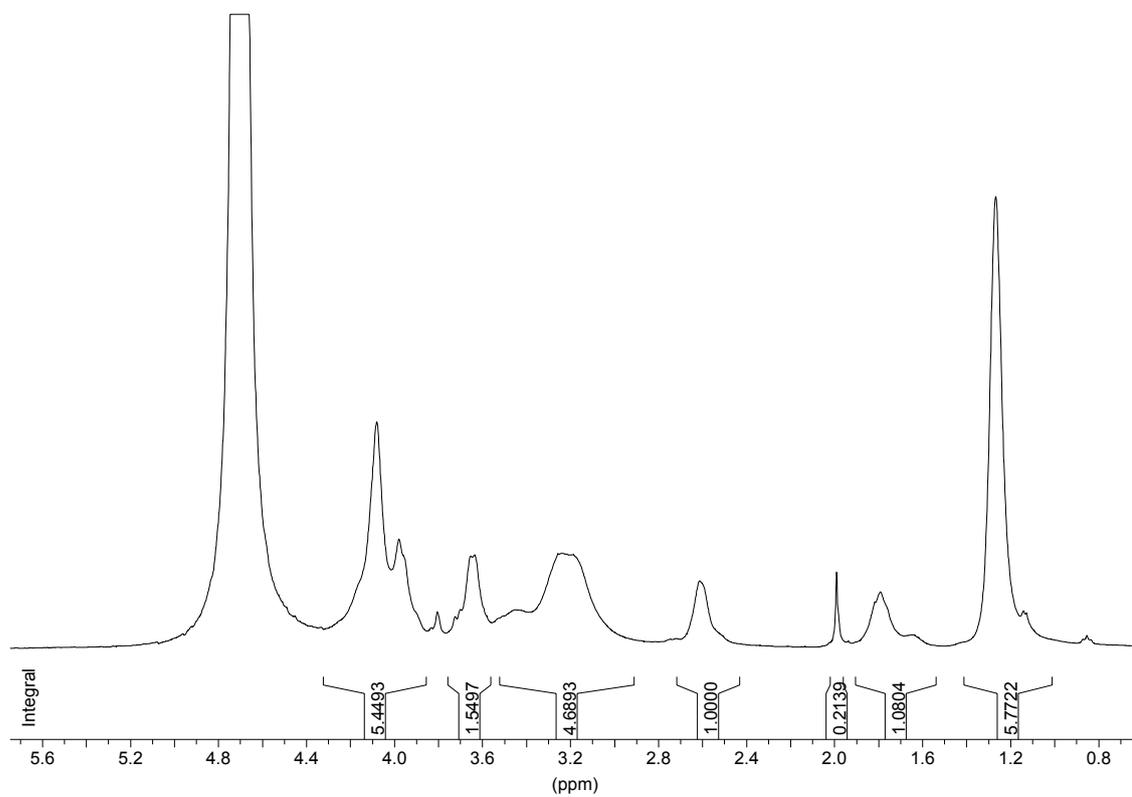
*N*-Propionyl-polysialinsäure (**44**)

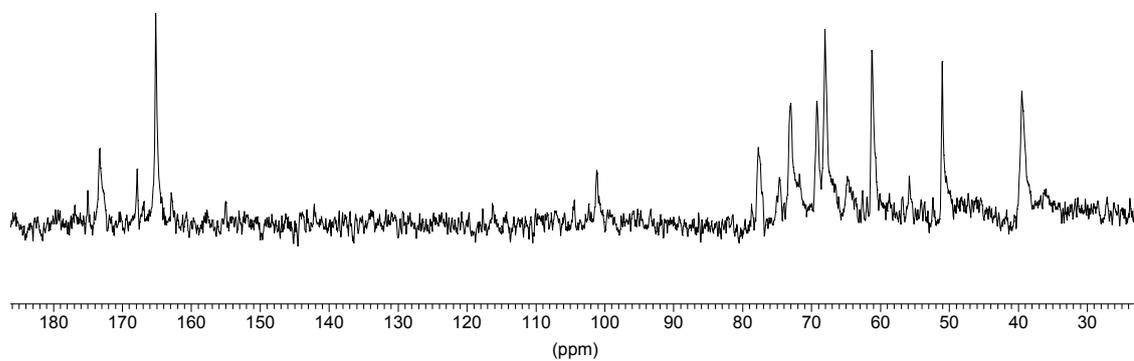
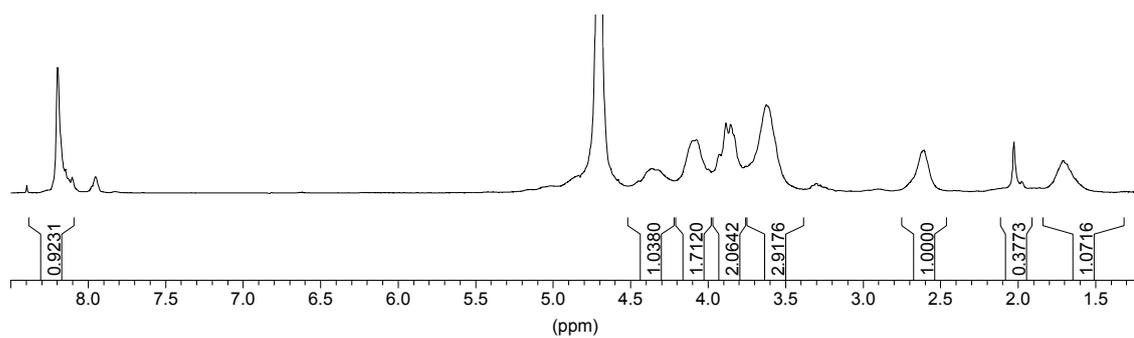
*N*-Pent-4-in-polysialinsäure (51)

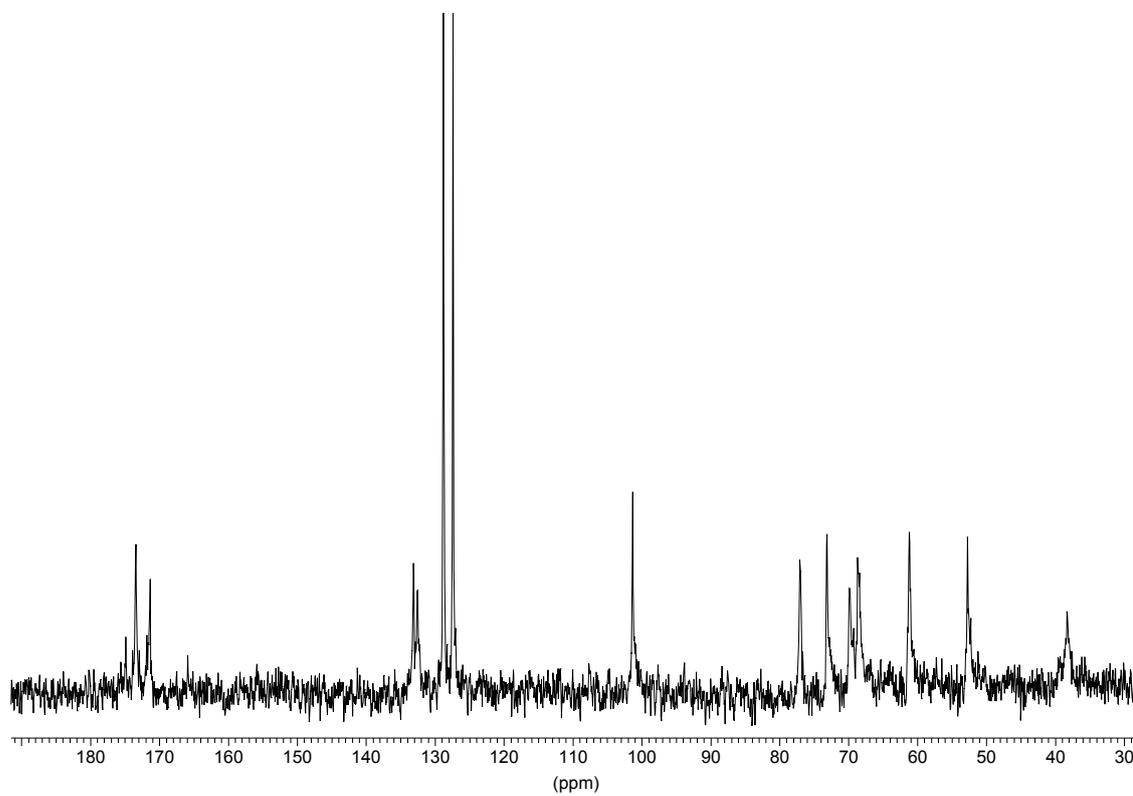
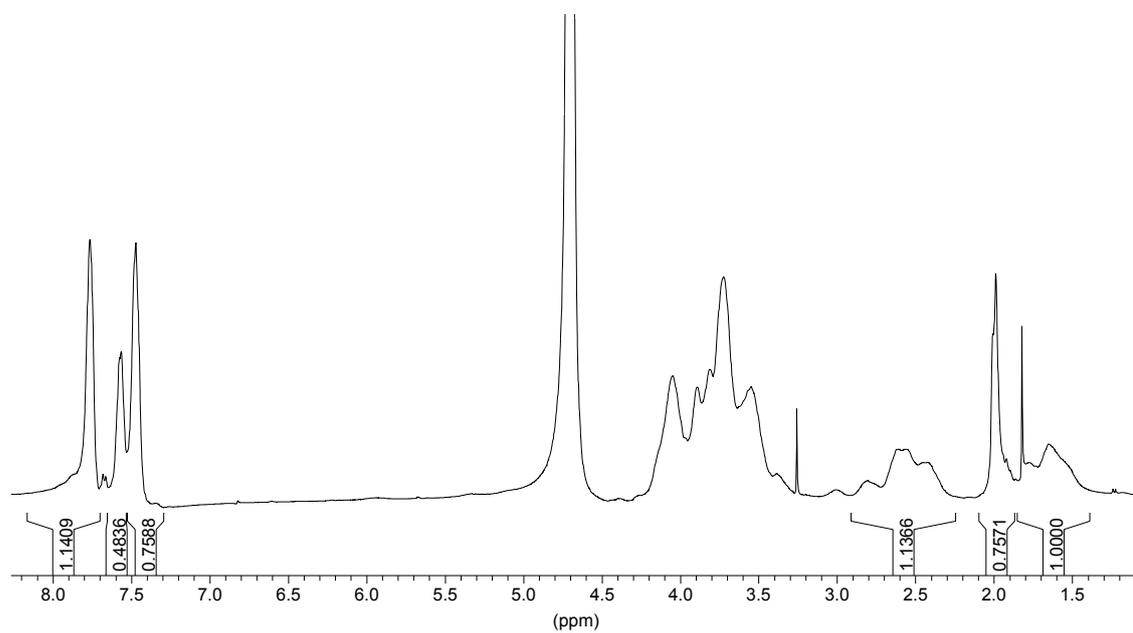
## Azidobutanoyl-polysialinsäure (52)

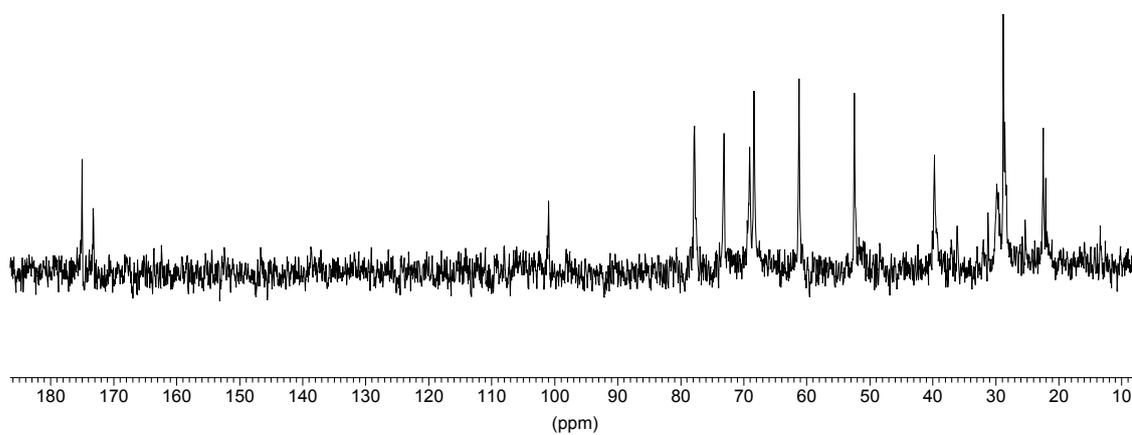
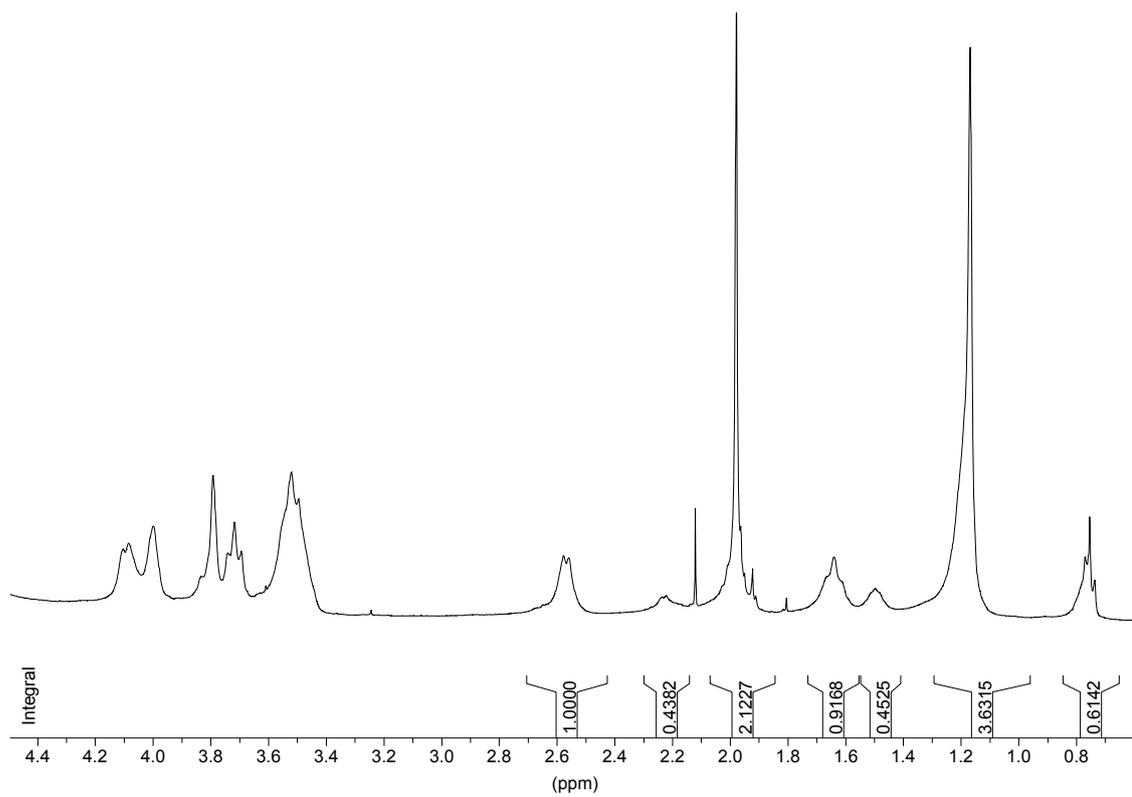


## 5-Diethylamino-polysialinsäure (53)

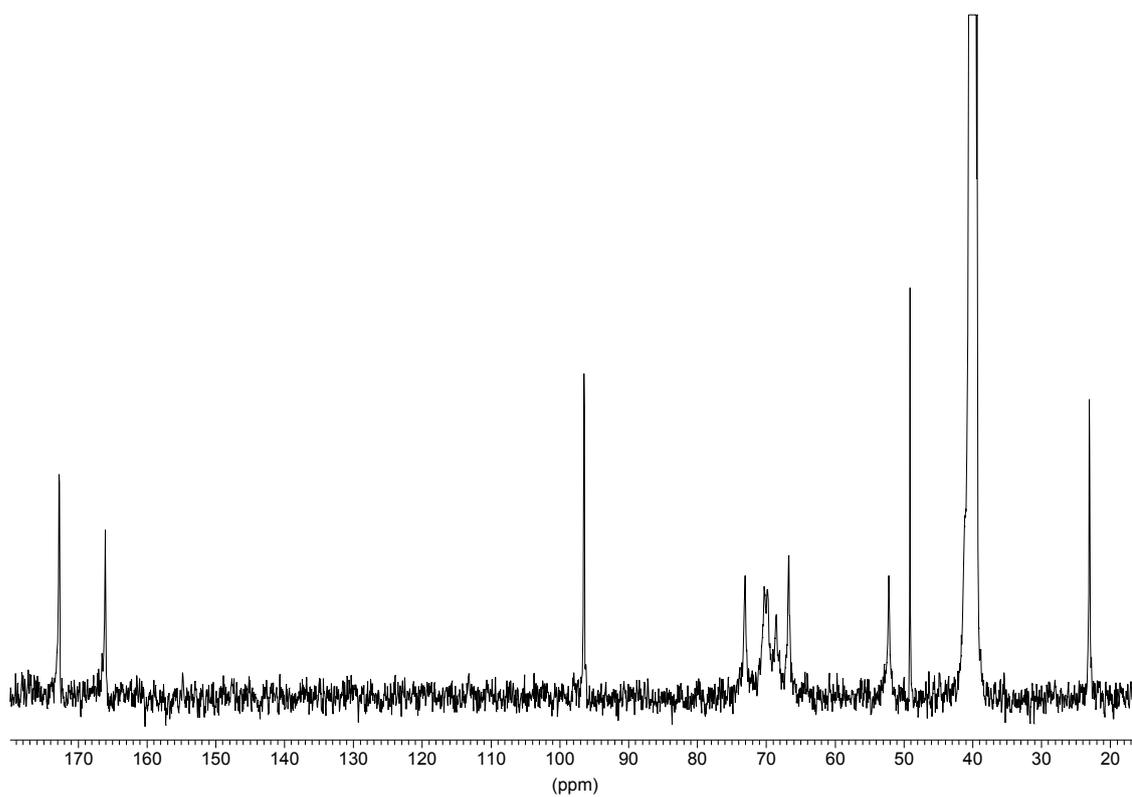
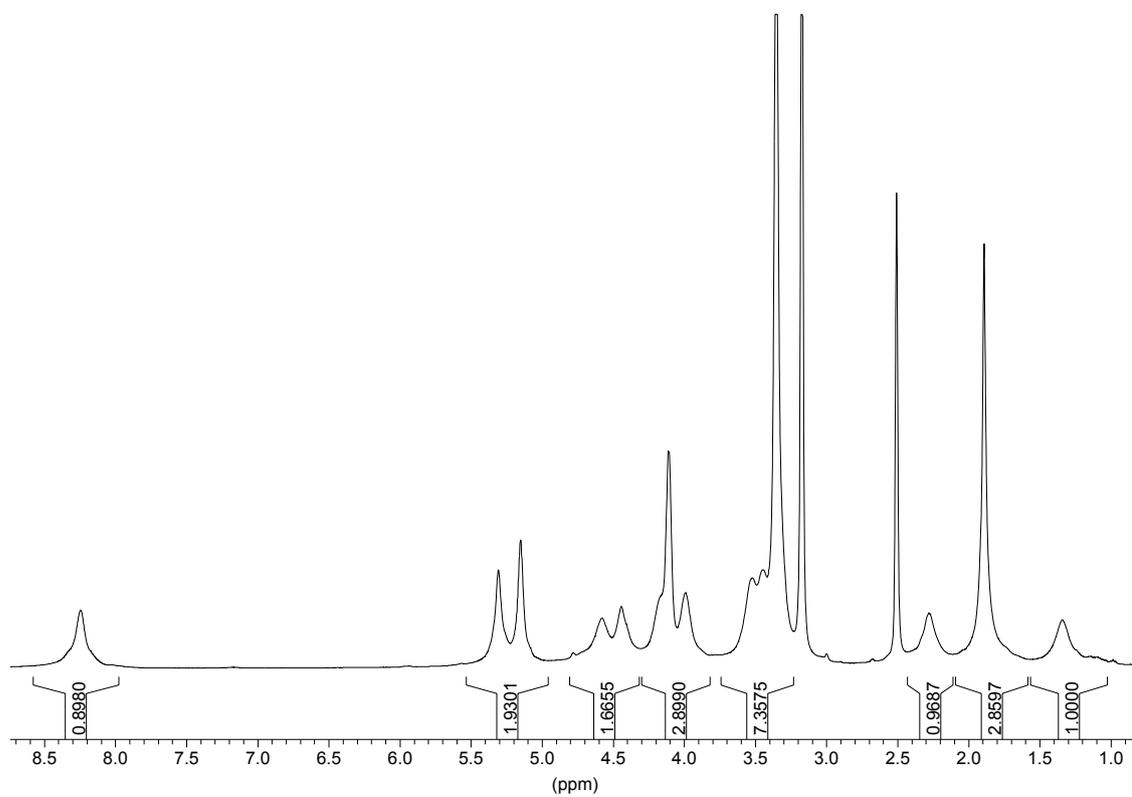


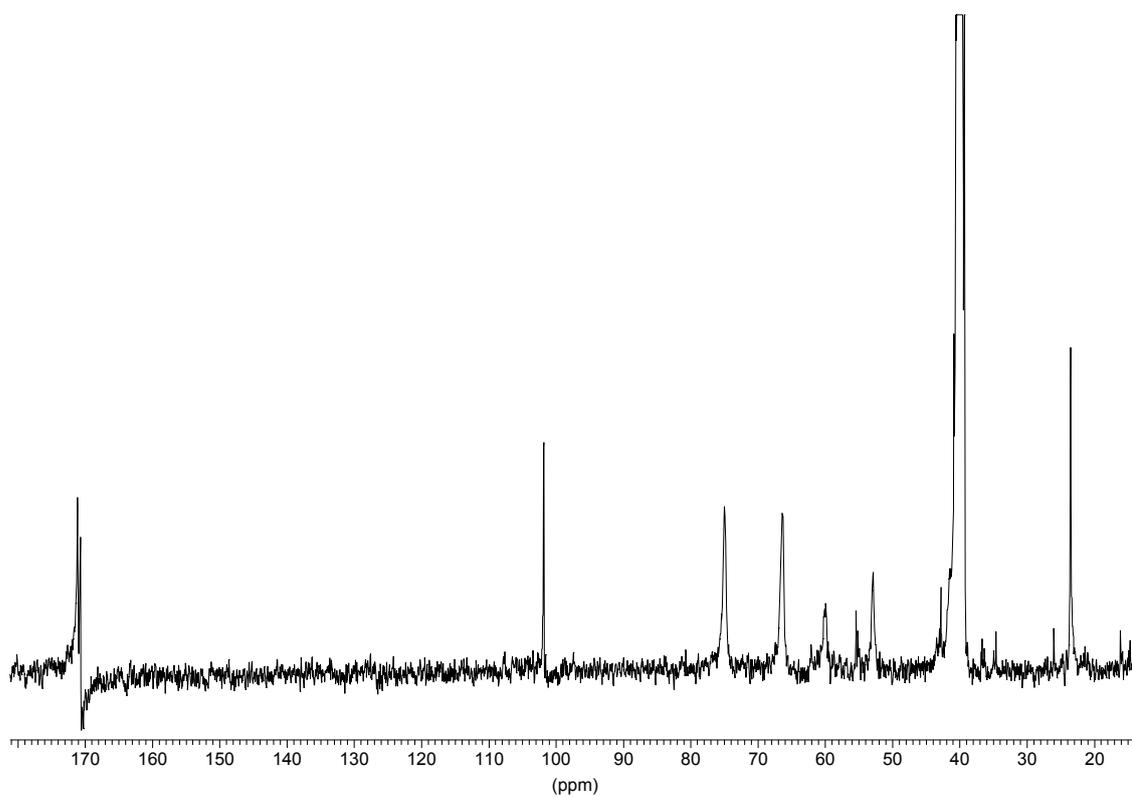
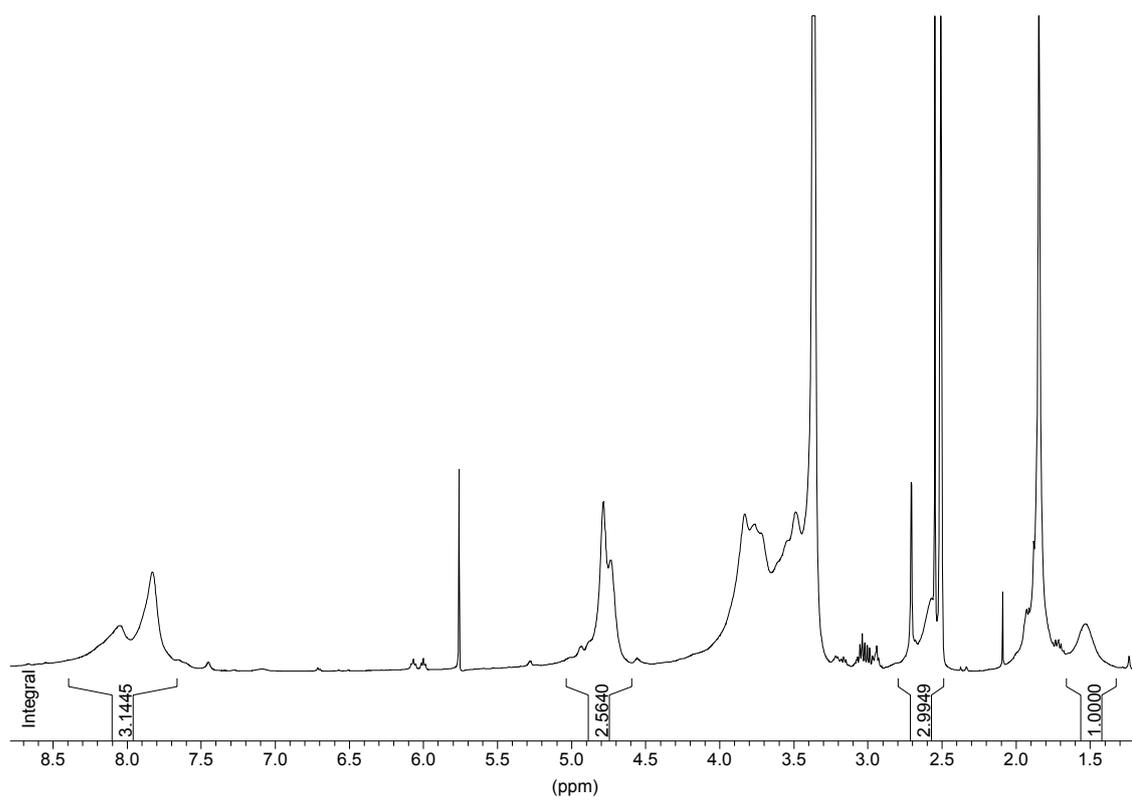
*N*-Formyl-polysialinsäure (43)

*N*-Benzoyl-polysialinsäure (39)

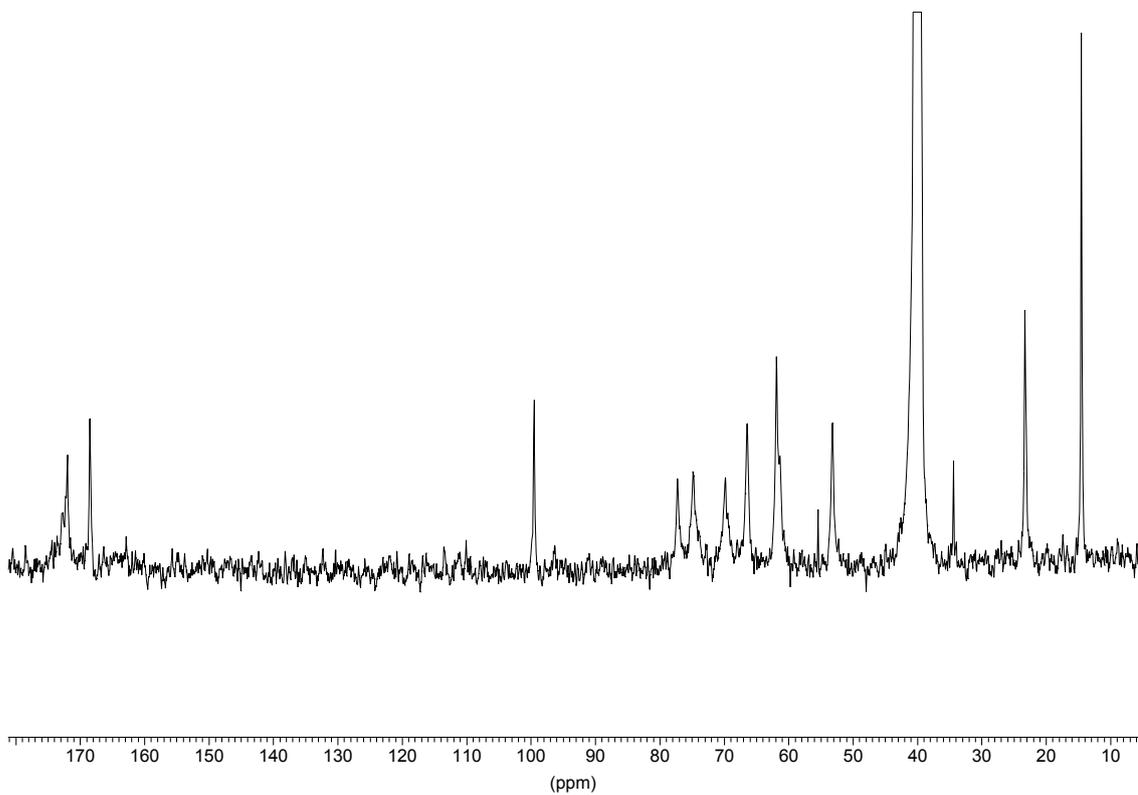
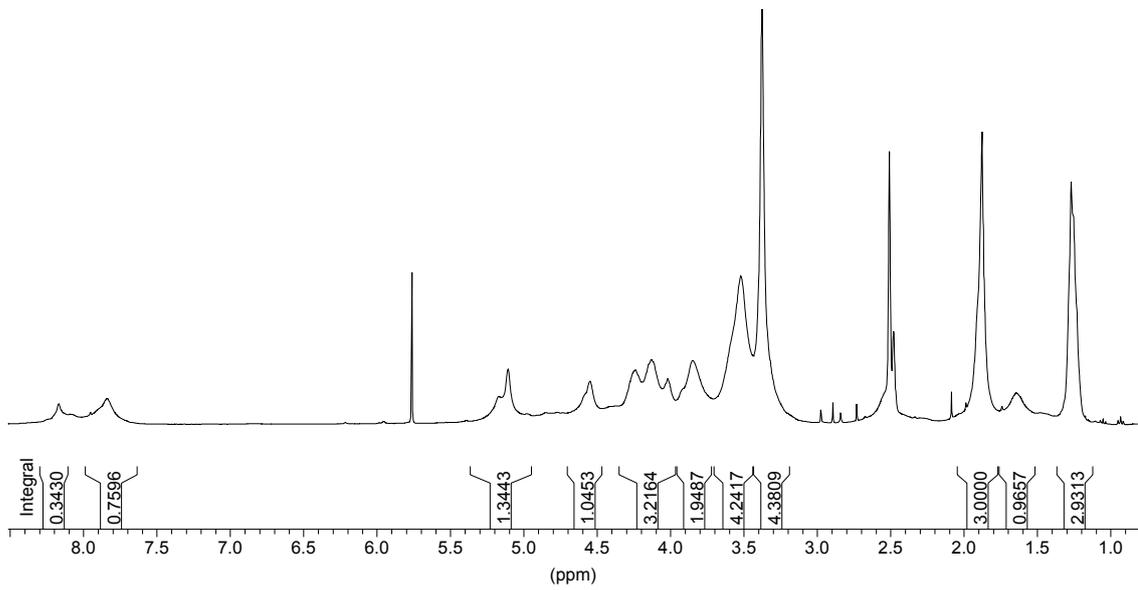
*N*-Myristoyl-polysialinsäure (42)

## Polysialinsäure-Lacton (23)



C-1-NH<sub>2</sub>-Amid der Polysialinsäure (**28**)

## Polysialinsäure-ethylester (27)



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Kirschning für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken. Er hat neben dieser Arbeit auch den internationalen wissenschaftlichen Erfahrungsaustausch ermöglicht und stets unterstützt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerald Dräger, der mir bei der Gestaltung des Themas soviel Freiraum wie möglich gewährt hat. Seine große Diskussionsbereitschaft und fachübergreifende Sichtweise haben dazu beigetragen, schwierige Sachverhalte aus unterschiedlichen Blickwinkeln zu betrachten.

Herrn Prof. Dr. M. Boysen danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke auch Dr. Sina Hartlieb für all die Stunden im Labor, in denen wir uns trotz der manchmal bitteren Erfahrungen mit Zuckern nicht die gute Laune haben verderben lassen, und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Sowohl ihr fachliches als auch privates Interesse haben wesentlich dazu beigetragen, dass der Laboralltag niemals eintönig geworden ist.

Ich danke der gesamten Polysialinsäure-Forschergruppe für die besondere Atmosphäre in den Seminaren, bei denen es auch um die gemeinschaftliche Bewältigung bestimmter Fragestellungen ging. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Gerardy-Schahn, die durch ihre Motivation und ihre Ideen den regen Austausch an wissenschaftlicher Erfahrung gefördert hat.

Mein Dank gilt auch Dr. David Schwarzer, der meine Fragen bezüglich der Endosialidase immer gerne beantwortet hat und mir den Einstieg in den TBA-Assay so leicht wie möglich gemacht hat.

Ich danke der spektroskopischen Abteilung, insbesondere Dagmar Körtje und Monika Rettstadt, für ihren kompetenten Einsatz bei der Lösung zahlreicher Messprobleme.

Zutiefst dankbar bin ich meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Mein mit Abstand größter Dank gilt meinem Freund Jeroen. Neben seiner fachlichen Unterstützung bei der PC12 Zellkultivierung ist besonders seine private Anteilnahme von unschätzbarem Wert für mich. Mit seinem Humor hat er mich die unliebsamen Dinge des Alltags schnell vergessen lassen.

## Lebenslauf

### Personalien:

Name: Silke Berski  
Geburtsdatum: 05.04.1980  
Geburtsort: Hannover  
Familienstand: ledig

### Promotion

06/2008 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Kirschning, Leibniz Universität Hannover  
03/2005 – 06/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover

### Studium:

Fachrichtung: Diplom Chemie  
09.02.2005 Zuerkennung des Diploms  
10/1999 – 01/2005 Leibniz Universität Hannover

### Schulbildung:

Juli 1999 Erlangen der Hochschulreife  
1996 - 1999 Gymnasium Leibnizschule Hannover

## Veröffentlichungen

S. Berski, J. van Bergeijk, D. Schwarzer, Y. Stark, C. Kasper, T. Scheper, C. Grothe, R. Gerardy-Schahn, A. Kirschning und G. Dräger, Synthesis and Biological Evaluation of a new Polysialic Acid Hydrogel as Enzymatically Degradable Scaffold Material for Tissue Engineering, **2008**, eingereicht.

Y. Haile, S. Berski, G. Dräger, A. Nobre, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn und C. Grothe, The effect of modified polysialic acid based hydrogels on the adhesion and viability of primary neurons and glial cells, *Biomaterials*, **2008**, 29, 1880-1891.

Y. Haile, K. Haastert, K. Cesnulevicius, K. Stummeyer, M. Timmer, S. Berski, G. Dräger, R. Gerardy-Schahn und C. Grothe, Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid, *Biomaterials*, **2006**, 28, 1163-73.