

„Synthese von α,ω -funktionalisierten
Poly(ethylenglykol-*co*-*N*-isopropylacrylamid)
Blockcopolymeren“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät der Naturwissenschaften
der Universität Paderborn

von

Dipl.-Chem. Wolfgang Birnbaum
geboren am 19. August 1983 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Kuckling
Prof. Dr. René Wilhelm

eingereicht am: 05. Mai 2011

Tag der Verteidigung: 27. Mai 2011

Schriftenreihe Institut für Polymere Materialien und Prozesse

Band 2/2011

Wolfgang Birnbaum

**Synthese von α,ω -funktionalisierten
Poly(ethylenglykol-co-N-isopropylacrylamid)
Blockcopolymeren**

D 466 (Diss. Universität Paderborn)

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Paderborn, Univ., Diss., 2011

Abbildung 1-1 wurde freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, zur Verfügung gestellt.

Copyright Shaker Verlag 2011

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0164-8

ISSN 2191-2025

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Abstract

Biomolecular motor proteins are used as transporters of molecules or vesicles in cells. Those proteins act as sorting machines and could be used as nano-robots. However, reliable methods to gain control over the motor activity in artificial environments is currently lacking. Thermo-responsive polymers, in particular poly(*N*-isopropylacrylamide), were synthesized by Atom Transfer Radical Polymerization to control the motility of microtubules on kinesin coated surfaces. The motility of the microtubules could be controlled by the change in conformation of the polymer at different temperatures. Using the non-covalent binding between biotin and streptavidin the synthesized polymers were coupled to the microtubules. Amino, carboxylic acid and succinimidyl ester terminated initiators were synthesized in addition, to increase the possible options for binding polymers to molecules, biomolecules or surfaces. Different lengths of spacers were introduced to those initiators to earn higher binding efficiencies. Also the decoration of the polymers with different dyes could be used for simple monitoring in different applications. Therefore, rhodamine B, fluorescein and coumarine derivatives containing alkyne or acrylamide functions were synthesized und used for endgroup modifications of the polymer. Two concepts were pursued to introduce dyes into polymers: “click”-chemistry and synthesis of blockcopolymers. The first one achieved endgroup functionalities up to 60 %, with the other method up to two dye molecules were introduced into the polymer. The prepared compounds were studied by nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, gel permeation chromatography and differential scanning calorimetry. By fluorescence microscopy it was shown that microtubules can move at 20 °C but their motility was stopped at 35 °C.

Kurzzusammenfassung

In der Natur werden verschiedene biomolekulare Motorproteine zum Transport von größeren Molekülen oder Vesikeln innerhalb einer Zelle verwendet. Diese Proteine agieren somit als Sortierapparate und könnten auch als Nanoroboter eingesetzt werden. In künstlicher Umgebung ist vor allem die gezielte Steuerung der Motoraktivität über externe Signale bisher nicht oder äußerst limitiert möglich. Um die Bewegung von Mikrotubuli auf Kinesin-Oberflächen zu regeln, wurden deshalb temperatursensitive Polymere auf Basis von Poly(*N*-isopropylacrylamid) über Atom Transfer Radical Polymerization hergestellt. Diese Polymere verändern in Abhängigkeit der Temperatur ihre Konformation, wodurch die Beweglichkeit der Mikrotubuli gesteuert werden soll. Die Anbindung der Polymere an die Mikrotubuli erfolgte über die Bildung von Biotin-Streptavidin-Konjugaten. Um flexibel in der Art und Weise der Anbindung, auch in Bezug auf andere Moleküle, Biomoleküle oder Oberflächen, zu sein, wurden verschiedene Initiatoren mit Biotin-, Amino-, Carbonsäure- und Succinimidester-Endgruppen hergestellt. Zudem beinhalteten die Initiatoren noch verschieden lange Spacer, um ggf. eine effizientere Anbindung zu ermöglichen. Eine zusätzliche Ausstattung der Polymere mit Farbstoffen würde zu einer einfacheren und leichteren Überwachung in verschiedenen Anwendungen beitragen. Deshalb wurden Rhodamin B-, Fluorescein- und Coumarin-Derivate mit Alkin- und Acrylamid-Gruppen synthetisiert, welche in zwei verschiedenen Konzepten zur Endgruppenmodifizierung eingesetzt wurden. Die Einbindung der Farbstoffe erfolgte zum einen über „Click“-Chemie und zum anderen über den Aufbau von Blockcopolymeren. Über beide Konzepte konnten die Farbstoffe erfolgreich in das Polymer eingeführt werden. Bei ersteren wurden bis zu 60 % aller Polymerketten mit Farbstoff funktionalisiert und über die Synthese von Blockcopolymeren bis zu zwei Farbstoffmoleküle in das Polymer eingebunden. Die Charakterisierung der hergestellten Verbindungen erfolgte über Kernspinresonanz-, IR- und UV-Vis-Spektroskopie, sowie Massenspektrometrie, Gelpermeationschromatographie und Differential Scanning Calorimetry. Über Fluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass man die Bewegung der Mikrotubuli bei Erhöhung der Temperatur auf 35 °C stoppen und bei Erniedrigung auf 20 °C wieder starten kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Zielstellung.....	2
1.3	Aufgabenstellung	3
2	Kenntnisstand	4
2.1	Polymere	4
2.1.1	Sensitive Polymere.....	4
2.1.1.1	Temperatursensitive Polymere.....	6
2.1.2	Blockcopolymere	10
2.1.3	Polymere auf Basis von Poly(ethylenglykol)	13
2.1.4	„Click“-Chemie in der Polymersynthese	14
2.1.5	Ausnutzung der Bindung von Biotin und Streptavidin zur Bildung von Biomolekül-Polymer-Konjugaten.....	17
2.1.6	Die Verwendung von Aktivestern in der Polymerchemie	19
2.2	Polymerisationstechniken	21
2.2.1	Freie radikalische Polymerisation.....	21
2.2.2	Kontrollierte radikalische Polymerisationen.....	23
2.2.2.1	Nitroxide Mediated Radical Polymerization (NMRP)	25
2.2.2.2	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization (RAFT).....	26
2.2.2.3	Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)	28
2.3	Mikrotubuli und das Motorprotein Kinesin	33
2.4	Fluoreszenzfarbstoffe.....	36
3	Experimenteller Teil.....	39
3.1	Verwendete Methoden	39
3.2	Chemikalienübersicht.....	40
3.3	Synthese von niedermolekularen Verbindungen	44
3.3.1	Synthese von Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amin (1 , Me ₆ TREN).....	44
3.3.2	Synthese von 2-Chloropropansäure-2-[2-(biotinylamino)ethoxy]ethylester (5).....	44
3.3.2.1	N-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]biotinamid (2)	44

3.3.2.2	2-(2-Hydroxyethoxy)ethylammoniumchlorid (3).....	45
3.3.2.3	2-[-2-(2-Chloropropanoxy)ethoxy]ethylammoniumchlorid (4)	46
3.3.2.4	2-Chloropropansäure-2-[2-(biotinylamino)ethoxy]ethylester (5).....	47
3.3.3	Synthese von <i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -[2-(2- chloropropanoylamino)ethyl]hexaethylenglykol (8)	48
3.3.3.1	<i>O</i> -[2-(<i>tert.</i> -Butoxycarbonylamino)ethyl]- <i>O'</i> -[2-(2- chloropropanoylamino)ethyl]hexaethylenglykol (6)	48
3.3.3.2	<i>O</i> -(2-Aminoethyl)- <i>O'</i> -[2-(2- chloropropanoylamino)ethyl]hexaethylenglykol Hydrochlorid (7).....	49
3.3.3.3	<i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -[2-(2- chloropropanoylamino)ethyl]hexaethylenglykol (8)	50
3.3.4	Synthese von <i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -(2- chloropropanoyl)poly(ethylenglykol) 3000 (11)	51
3.3.4.1	<i>O</i> -[2-(<i>tert.</i> -Butoxycarbonylamino)ethyl]- <i>O'</i> -(2- chloropropanoyl)poly(ethylenglykol) 3000 (9)	51
3.3.4.2	<i>O</i> -(2-Aminoethyl)- <i>O'</i> -(2-chloropropanoyl)poly(ethylenglykol) 3000 Hydrochlorid (10)	52
3.3.4.3	<i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -(2-chloropropanoyl)poly(ethylenglykol) 3000 (11).....	53
3.3.5	Synthese von 2-Chloropropansäure- <i>N</i> -succinimidester (12)	54
3.3.6	Synthese von 2-(2-Chloropropanoylamino)essigsäure- <i>N</i> -succinimidester (15)	55
3.3.6.1	2-(2-Chloropropanoylamino)essigsäure- <i>tert.</i> -butylester (13).....	55
3.3.6.2	2-(2-Chloropropanoylamino)essigsäure (14).....	55
3.3.6.3	2-(2-Chloropropanoylamino)essigsäure- <i>N</i> -succinimidester (15)	56
3.3.7	Synthese von <i>O</i> -(2-Chloropropanoyl)- <i>O'</i> -[3-(<i>N</i> -succinimidyloxy)-3- oxopropyl]triethylenglykol (18).....	57
3.3.7.1	<i>O</i> -[2-(<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl)ethyl]- <i>O'</i> -(2- chloropropanoyl)triethylenglykol (16).....	57
3.3.7.2	<i>O</i> -(2-Carboxyethyl)- <i>O'</i> -(2-chloropropanoyl)triethylenglykol (17)	58
3.3.7.3	<i>O</i> -(2-Chloropropanoyl)- <i>O'</i> -[3-(<i>N</i> -succinimidyloxy)-3- oxopropyl]triethylenglykol (18).....	59
3.3.8	Synthese von <i>N</i> -(5-Fluoresceinyl)acrylamid (19).....	60
3.3.9	Synthese von Rhodamin B 2-(acrylamino)ethylester (20).....	60

3.3.10	Synthese von 3-Acrylamino-propansäure-(4-methylcoumarin-7-yl)ester (22)....	62
3.3.10.1	3-Acrylamino-propansäure (21).....	62
3.3.10.2	3-Acrylamino-propansäure-(4-methylcoumarin-7-yl)ester (22).....	62
3.3.11	Synthese von Fluorescein <i>O</i> -(prop-2-in-1-yl) (24).....	63
3.3.11.1	Fluorescein <i>O</i> -(prop-2-in-1-yl)-prop-2-inylester (23).....	63
3.3.11.2	Fluorescein <i>O</i> -(prop-2-in-1-yl) (24).....	65
3.3.12	Synthese von Rhodamin B prop-2-inylester (25).....	66
3.3.13	Synthese von 4-Methyl-7-(prop-2-in-1-yloxy)coumarin (26).....	67
3.3.14	Synthese von 2-Azido-propionsäureethylester (27).....	68
3.3.15	Synthese von 2-Chloro- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (28).....	68
3.3.16	Synthese von 2-Azido- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (29).....	69
3.3.17	Modellversuch: Reaktion von 2-Azido- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (29) und Rhodamin B prop-2-inylester (25) zu Rhodamin B 1-(1-(isopropylamino)-1- oxopropan-2-yl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methylester (30).....	69
3.4	Synthese von Polymeren.....	70
3.4.1	Synthese von Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	70
3.4.1.1	Polymerisation von <i>N</i> -Isopropylacrylamid in DMSO.....	70
3.4.1.2	Polymerisation von <i>N</i> -Isopropylacrylamid in DMF/H ₂ O.....	72
3.4.1.3	Polymerisation von <i>N</i> -Isopropylacrylamid in Acetonitril.....	73
3.4.1.4	Polymerisation von <i>N</i> -Isopropylacrylamid in 2-Propanol.....	74
3.4.1.5	Activators Regenerated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization (ARGET ATRP) von <i>N</i> -Isopropylacrylamid.....	75
3.4.2	Darstellung von α -Biotinyl-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	76
3.4.2.1	Synthese von α -Biotinyl-ethylenglykol-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	76
3.4.2.2	Synthese von α -Biotinyl-heptaethylenglykol-poly(<i>N</i> - isopropylacrylamid).....	77
3.4.2.3	Synthese von α -Biotinyl-poly(ethylenglykol- <i>b-N</i> -isopropylacrylamid).....	79
3.4.3	Synthese von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	80
3.4.4	Synthese von Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)-Copolymeren mit Farbstoffen durch sequentielle Monomierzugabe.....	82
3.5	Polymeranaloge Reaktionen.....	84
3.5.1	Synthese von ω -Azido-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	84
3.5.2	Polymeranaloge Reaktionen von ω -Azido-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Farbstoffmolekülen.....	86

3.5.3	Polymeranaloge Reaktionen von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Anilin und Benzylamin	88
3.5.3.1	Reaktion von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Anilin	88
3.5.3.2	Reaktion von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Benzylamin	89
3.6	Bestimmung der Polymerzusammensetzung und des Farbstoffgehaltes über Kernspinresonanzspektroskopie und Gelpermeationschromatographie	90
4	Ergebnisse und Diskussion	94
4.1	Synthese von niedermolekularen Verbindungen	94
4.1.1	Synthese von Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amin (1)	94
4.1.2	Darstellung der Biotin-Initiatoren	95
4.1.2.1	Synthese von 2-Chloropropansäure-2-[2-(biotinylamino)ethoxy]-ethylester (5)	95
4.1.2.2	Synthese von <i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -[2-(2-chloropropanoylamino)ethyl]hexaethylglykol (8)	97
4.1.2.3	Synthese von <i>O</i> -[2-(Biotinylamino)ethyl]- <i>O'</i> -(2-chloropropanoyl)poly(ethylenglykol) 3000 (11)	98
4.1.3	Darstellung der Succinimidylester-Initiatoren	99
4.1.3.1	Synthese von 2-Chloropropansäure- <i>N</i> -succinimidester (12)	99
4.1.3.2	Synthese von 2-(2-Chloropropanoylamino)essigsäure- <i>N</i> -succinimidester (15)	100
4.1.3.3	Synthese von <i>O</i> -(2-Chloropropanoyl)- <i>O'</i> -[3-(<i>N</i> -succinimidyloxy)-3-oxopropyl]triethylglykol (18)	101
4.1.4	Darstellung der Fluorescein-Derivate	102
4.1.4.1	Synthese von <i>N</i> -(5-Fluoresceinyl)acrylamid (19)	102
4.1.4.2	Synthese von Fluorescein <i>O</i> -(prop-2-in-1-yl) (24)	103
4.1.5	Darstellung der Rhodamin B-Derivate	104
4.1.5.1	Synthese von Rhodamin B 2-(acrylamino)-ethylester (20)	104
4.1.5.2	Synthese von Rhodamin B prop-2-inylester (25)	105
4.1.6	Darstellung der Coumarin-Derivate	106
4.1.6.1	Synthese von 3-Acrylamino-propansäure-(4-methylcoumarin-7-yl)ester (22)	106
4.1.6.2	Synthese von 4-Methyl-7-(prop-2-in-1-yloxy)coumarin (26)	107

4.1.7	Darstellungen im Zusammenhang zur Endgruppenmodifizierung von Polymeren	107
4.1.7.1	Synthese von 2-Azido-propionsäureethylester (27).....	108
4.1.7.2	Synthese von 2-Chloro- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (28)	108
4.1.7.3	Synthese von 2-Azido- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (29)	109
4.1.7.4	Modellversuch: Reaktion von 2-Azido- <i>N</i> -isopropyl-propanamid (29) und Rhodamin B prop-2-inylester (25) zu Rhodamin B 1-(1-(isopropylamino)-1-oxopropan-2-yl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methylester (30).....	109
4.2	Synthese von Polymeren	111
4.2.1	Polymerisation von <i>N</i> -Isopropylacrylamid	111
4.2.1.1	Polymerisation in DMF/H ₂ O, DMSO und 2-Propanol	111
4.2.1.2	Polymerisation in Acetonitril	114
4.2.1.3	Polymerisation über Activators Regenerated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization (ARGET ATRP)	116
4.2.2	Synthese von α -Biotinyl-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)	118
4.2.3	Synthese von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid).....	123
4.2.4	Synthese von Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)-Copolymeren mit Farbstoffen durch sequentielle Monomierzugabe	125
4.3	Polymeranaloge Reaktionen	132
4.3.1	Synthese von ω -Azido-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)	132
4.3.2	Polymeranaloge Reaktionen von ω -Azido-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Farbstoffmolekülen	134
4.3.3	Polymeranaloge Reaktionen von α - <i>N</i> -Succinimidylester-poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) mit Anilin und Benzylamin	140
4.4	Steuerung der Mikrotubuli-Bewegung mit Hilfe von Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) 143	
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	147
6	Danksagung	151
7	Literaturverzeichnis	153
8	Anhang	167
8.1	Abkürzungsverzeichnis	167
8.2	Anerkennung der Promotionsordnung und eidesstattliche Erklärung	169