

# Derivate des Ionentransporters Valinomycin; Synthese und Sensor-Anwendung

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Julia Braunagel  
geboren in Kirchheimbolanden

Mainz, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Oktober 2009 in der Materialforschungsgruppe des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Hofmeister

1. Gutachter: Prof. Wolfgang Knoll

2. Gutachter: Prof. Rudolf Zentel

Übrige Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Heiner Detert  
Prof. Jochen Gutmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2009

Es heißt, dass Johannes Brahms mit einem Freund am Strand spazieren ging, der sich beklagte, alle gute Musik sei schon geschrieben worden.

„Oh schau“, sagte Brahms und zeigte aufs Meer hinaus.

„Da kommt die letzte Welle.“

**T. Pratchett, I. Stewart, J. Cohen: „Die Philosophen der Rundwelt“**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
I.1 STRUKTUR UND FUNKTION NATÜRLICHER ZELLMEMBRANEN.....	2
I.1.1 Natürliche Lipide .....	3
I.1.2 Polymorphismus .....	4
I.2 MODELLMEMBRANEN.....	6
I.2.1 Vesikel .....	6
I.2.2 Schwarzfilmmembranen (BLMs, <i>black lipid membranes</i> ) .....	7
I.2.3 Tropfengrenzflächen-Lipiddoppelschicht (DIB, <i>Droplet interface Bilayers</i> ) .....	9
I.2.4 Festkörperunterstützte Membranen .....	10
I.2.4.1 sBLMs ( <i>supported bilayer lipid membranes</i> ).....	11
I.2.4.2 tBLMs ( <i>tethered bilayer lipid membranes</i> ) .....	12
I.3 VALINOMYCIN .....	15
I.4 ZIEL DIESER ARBEIT .....	16
<b>II THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>20</b>
II.1 PRINZIPIEN DER DEPSIPEPTIDSYNTHESE .....	20
II.1.1. Depsipeptidsynthese in Lösung .....	21
II.1.2 Festphasensynthese .....	22
II.1.2.1 Festphasensynthese mit Didepsidbausteinen .....	22
II.1.2.2 Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren .....	27
II.1.3 Zyklisierung.....	29
II.2 SENSORKONZEPTE.....	30
II.2.1 Biotin-Streptavidin.....	30
II.2.2 Ferrocen .....	33
II.2.3 Sulfonamid-Carboanhydrase .....	36
II.3 VALINOMYCIN .....	39
II.4 ELEKTROCHEMISCHE IMPEDANZ-SPEKTROSKOPIE .....	43
II.4.1 Theorie.....	43
II.4.2 Setup .....	46



III.2.6 Ferrocen-Valinomycin .....	93
III.2.5.1 Synthese.....	93
III.2.6.2 EIS-Messungen .....	96
III.2.5.3 Redox-Sensor.....	97
<b>IV ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>105</b>
IV.1 AUSBLICK .....	108
<b>V EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>109</b>
V.1 MATERIAL UND METHODEN, MEMBRANEN .....	109
V.1.1 Chemikalien.....	109
V.1.2 Substrate .....	109
V.1.3 Lipidmonolage .....	110
V.1.4 Lipiddoppelschicht.....	110
V.1.5 Inkorporation von Valinomycin.....	111
V.2 MATERIAL UND METHODEN, SYNTHESE .....	112
V.2.1 Liste der synthetisierten Verbindungen .....	114
V.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	116
V.2.3 Arbeitsvorschriften.....	118
<b>VI LITERATUR .....</b>	<b>134</b>
<b>VII ANHANG.....</b>	<b>141</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
BLM	<i>black lipid membrane</i>
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
bs	breites Singulett
c	zyklo, cyclo
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIB	<i>droplet interface bilayer</i>
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	Essigester, Ethylacetat
EIS	Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie
eq.	Moläquivalent
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization mass spectroscopy</i>
Fc	Ferrocen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HBTU	<i>O</i> -Benzotriazole- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i> )-on
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hyiv	Hydroxyisovaleriansäure
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	skalare Kopplungskonstante
m	Multipllett
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz
<i>o</i>	ortho
<i>p</i>	para
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PfpOH	Pentafluorophenol
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
PyBOP	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (DC)
RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit (HPLC)
s	Singulett
sBLM	<i>supported bilayer lipid membranes</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
t	Tripllett
Tab.	Tabelle

TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
tBLM	<i>tethered bilayer lipid membrane</i>
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TIPS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett
z	Ladung

# I Einleitung

Die Entwicklung von Sensoren oder Sensorsystemen, die auf molekularer Ebene Analyten auch in geringsten Konzentrationen erkennen können, ist in Bereichen wie Umwelttechnik oder pharmazeutischer Industrie ein stark anwachsendes Forschungsfeld. Ein großes Ziel ist die Konstruktion eines „Lab on a chip“, also eines möglichst kleinen Testsystem, das im besten Falle ortsunabhängig verwendet werden kann und mit einer Messung simultan mehrere Parameter bestimmen kann. Derartige Parameter könnten zum Beispiel Krankheitserreger wie Viren und Bakterien oder auf Schwermetalle sein, aber auch charakteristische Blutwerte, die Aufschluss über ein Krankheitsbild geben.

Ein Sensor besteht im Prinzip aus drei Elementen, einem Erkennungs- oder Sensorelement, in dem in der Regel ein Analyt gebunden wird, einem *Transducer*, der den Bindungsvorgang in ein physikalisch detektierbares Signal, zum Beispiel Strom oder Licht umwandelt und einer Ausleseinheit. Als Sensorelemente eignen sich insbesondere biologische Rezeptoren, die im Idealfall einzelne Moleküle erkennen können und somit kleinste Analytmengen detektieren können. Hierfür werden zum Beispiel natürliche Membranproteine chemisch modifiziert oder leicht verändert synthetisiert, um sie als Sensorelemente nutzen zu können.<sup>[1]</sup> Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die meisten Rezeptoren nur in ihrer natürlichen Umgebung, der Zellmembran, funktionieren.

Biologische Membranen umgeben jede lebende Zelle, sie sind somit ubiquitär. Sie bestehen aus amphiphilen Lipiden, die eine fluide, quasi zweidimensionale Struktur aufbauen, in die Proteine integriert sind.<sup>[2]</sup> Diese Membranproteine „schwimmen“ in der Membran und sind für eine große Anzahl an Funktionen wie z.B. Signaltransduktion und interzelluläre Kommunikation wichtig.

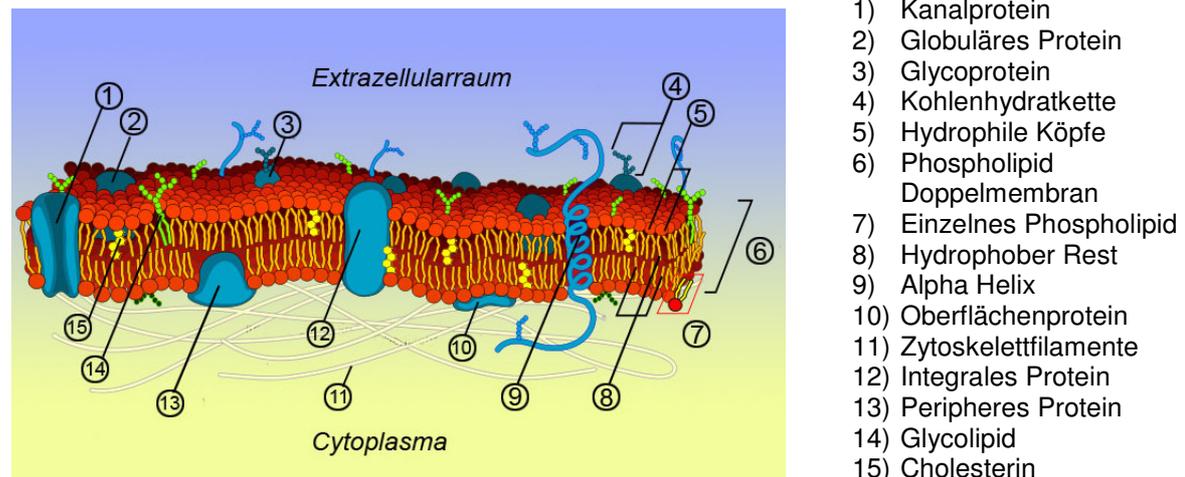
Um modifizierte Membranproteine in einem Sensor als aktive Elemente nutzen zu können, muss somit eine geeignete Matrix genutzt werden. Dies

können entweder zelluläre Systeme oder Modellmembranen sein. Letztere bieten dabei den Vorteil, dass sie über eine genau festgelegte Zusammensetzung verfügen. Somit sind die untersuchten Prozesse leichter zu analysieren, da Nebeneffekte mit unbekanntem Zellbausteinen entfallen. Einige Modellmembransysteme können leicht über Schwefel-Ankergruppen auf Goldoberflächen aufgebracht werden und eignen sich somit bestens als Grundlage für ein „Lab on a chip“. Wird darin ein chemisch modifiziertes Membranprotein oder –peptid inkorporiert, kann das Testergebnis des Sensors über das Gold als Elektrode direkt elektronisch ausgelesen werden. In dieser Arbeit wurden Derivate des Ionentransporters Valinomycin mit verschiedenen Sensoreigenschaften synthetisiert und in festkörperunterstützten Modellmembranen untersucht.

Im Folgenden werden zunächst verschiedene Modellmembransysteme vorgestellt und dann der in dieser Arbeit synthetisierte Ionentransporter Valinomycin näher beschrieben.

### **I.1 Struktur und Funktion natürlicher Zellmembranen**

Jede eukariotische Zelle wird durch eine Zellmembran umgeben und dadurch von dem sie umgebenden Medium geschützt. Allein im menschlichen Körper gibt es ungefähr  $100 \text{ km}^2$  Membranen, die alle lediglich ca. 5 nm dick sind.<sup>[3]</sup> Membranen sind aber keine unüberwindbaren Wände, sondern sind hochselektive Permeabilitätsschranken.<sup>[4]</sup> Sie beinhalten Proteine wie Ionenpumpen, Transportproteine und Kanäle, die der Zelle eine Kommunikation mit dem sie umgebenden Medium ermöglichen. Gemäß des „Fluid-Mosaic-Modells“ von Singer und Nicolson „schwimmen“ diese Proteine in einem See aus Phospholipiden (Abb. I-1).<sup>[2]</sup> Das Modell beruht auf folgenden Annahmen: 1) Die Membran dient nicht nur als Permeabilitätsbarriere sondern auch als Lösungsmittel für integrale Membranproteine. 2) Einige Lipide sind für die Funktion der Membranproteine unerlässlich. 3) Membranproteine können lateral ungehindert in der Lipidmatrix diffundieren, es sei denn, dies wird durch spezifische Wechselwirkungen verhindert.



**Abb. I-1:** Aufbau einer Zellmembran nach dem „Fluid-Mosaic-Modell“

Desweiteren findet ein Austausch mit der Umgebung auch ohne die Hilfe von Proteinen statt, da Membranen für Moleküle wie Wasser durchlässig sind. Dabei spielen Parameter wie Größe und Hydrophilie bzw. Lipophilie eine entscheidende Rolle. Teilchen die nicht wasserlöslich sind, können die Membran wesentlich besser durchdringen als wasserlösliche. Dies ist auf den hydrophoben Charakter des Membraninneren zurückzuführen. Ladungen erschweren das Überwinden der Membran, da geladene Moleküle oft eine höhere Wasserlöslichkeit aufweisen.

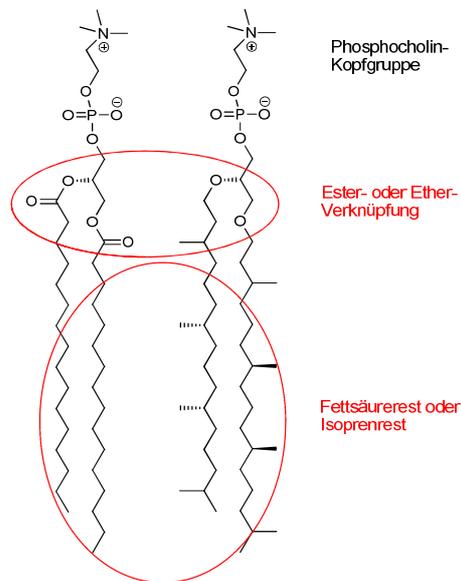
### I.1.1 Natürliche Lipide

In tierischen Zellmembranen kommen drei Arten von Lipiden vor, Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Sie sind Amphiphile, d.h. sie bestehen aus einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Rest. Sie können über drei Merkmale charakterisiert werden: 1) Größe und Ladung der Kopfgruppe; 2) Länge des hydrophoben Kohlenwasserstoffrestes und Anzahl der Doppelbindungen; 3) Aufbau des hydrophoben Restes (zwei identische oder verschiedene Kohlenwasserstoffketten).<sup>[5]</sup>

Die häufigsten Lipide sind die Phospholipide, die in Phosphoglyceride, die sich vom Glycerin ableiten, und Sphingolipide, die sich vom komplexeren Alkohol Sphingosin ableiten, unterteilt werden.<sup>[4]</sup> Die Phosphoglyceride unterteilen sich wiederum in Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylserine (PS) und Phosphatidyl-inositole (PI). Sie bestehen alle aus unverzweigten Kohlenwasserstoffketten, die über

Glycerin (→ Fettsäuren) und eine Phosphatgruppe an die unterschiedlichen Kopfgruppen angebunden sind.<sup>[6]</sup>

Bakterien, die in Gegenden leben, in denen extreme Bedingungen wie z.B. hohe Temperaturen, niedriger pH oder hohe Salzkonzentrationen herrschen (Archeae), verfügen über Lipide, die im Gegensatz zu den oben beschriebenen nicht über unverzweigte Kohlenwasserstoffketten, sondern über oxidationsstabile Isopreneinheiten im hydrophoben Teil verfügen. Desweiteren sind Kopf und hydrophober Rest nicht über säurelabile Esterbindungen, sondern über stabile Etherbindungen verknüpft (Abb. I-2).<sup>[7]</sup>



**Abb. I-2:** Vergleich zwischen einem Phospholipid einer tierischen Zellmembran (linke Seite) und einem Lipid aus einer Archeae-Membran (rechte Seite).

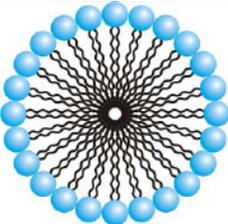
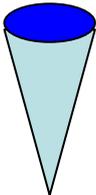
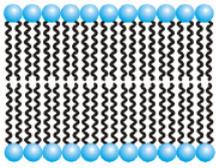
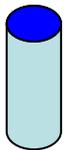
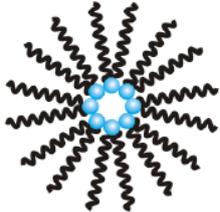
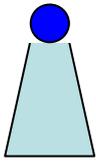
### I.1.2 Polymorphismus

Entscheidend für den Aufbau einer bimolekularen, lamellar-flüssigkristallinen Struktur wie einer Membran ist die Tatsache, dass Lipide in Wasser nicht löslich sind. Wird die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC, *critical micelle concentration*) überschritten, bilden sich Mizellen und andere Aggregate aus. Dabei führen verschiedene Geometrien von Lipiden zu unterschiedlichen Aggregaten. Die entscheidende Kraft dabei ist der hydrophobe Effekt, der durch eine große negative Entropieänderung bei der Anordnung der Wasserdipole um die hydrophoben Fettsäureketten

gekennzeichnet ist.<sup>[8, 9]</sup> Durch die Aggregation wird dieser Entropieverlust minimiert.<sup>[3]</sup>

In welcher Form sich die Lipide anordnen, wird von dem kritischen Packungsparameter (CPP, *critical packing parameter*) der Lipide vorgegeben (Tab. I-1). Dieser setzt sich aus dem Verhältnis des Volumens der Kohlenwasserstoffketten zum Produkt aus Kopfgruppenfläche und effektiver Länge der Kohlenwasserstoffketten zusammen. Auf den CPP haben Faktoren wie Ladung, Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentration der umgebenden Wasserphase einen entscheidenden Einfluss.<sup>[10]</sup>

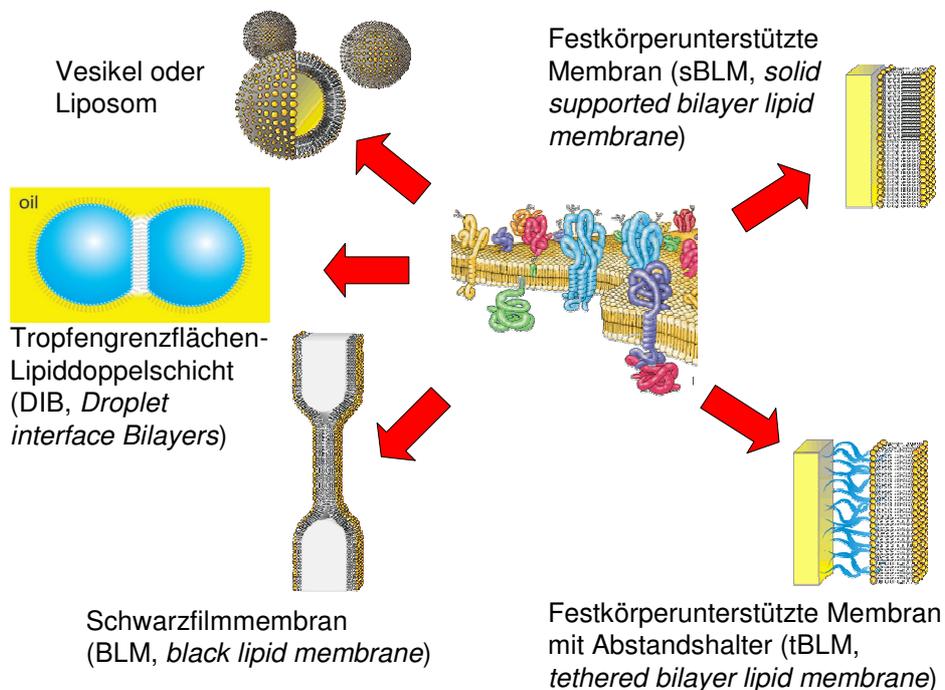
**Tab. I-1:** Abhängigkeit der Aggregatform eines Lipides in Wasser von der Form des jeweiligen Lipids.

Struktur	Lipidform	CPP	Beispiel
 Mizelle	 Kegel	< 0,33	Natriumdodecylsulfat
 Lipiddoppelschicht	 Zylinder	0,5 - 1	Phosphatidylcholin
 Inverse Mizelle	 Kegelstumpf	> 1	Ungesättigtes Phosphatidylethanolamin

## I.2 Modellmembranen

Modellmembranen sind für die Erforschung der Funktionsweise von Membranproteinen heutzutage essentiell, da sie im Gegensatz zu einer natürlichen Zellmembran eine wohldefinierte Umgebung darstellen. Desweiteren lassen sie sich mit präzisen physikalischen Messmethoden analysieren und liefern somit wertvolle Informationen über das Phasenverhalten von Lipiden, Proteinfunktionalitäten und die Interaktion zwischen Lipiden und Proteinen.

Man unterscheidet mehrere Klassen an Modellmembranen: Vesikel oder Liposome und planare festkörperunterstützte bzw. freitragende quasi-zweidimensionale Lipiddoppelschichten (Abb. I-3).<sup>[3]</sup>



**Abb.I-3:** Darstellung verschiedener Modellmembransysteme.<sup>[11]</sup>

### I.2.1 Vesikel

Vesikel bilden sich aus Wasserdispersionen ab einer bestimmten kritischen Mizellbildungskonzentration. Sie können anhand ihrer Größe und ihrer uni- oder multilamellaren Struktur unterschieden werden.

Multilamellare Vesikel (MLV) bestehen aus vielen geschlossenen, konzentrischen Lamellen, die durch dünne Wasserfilme voneinander getrennt

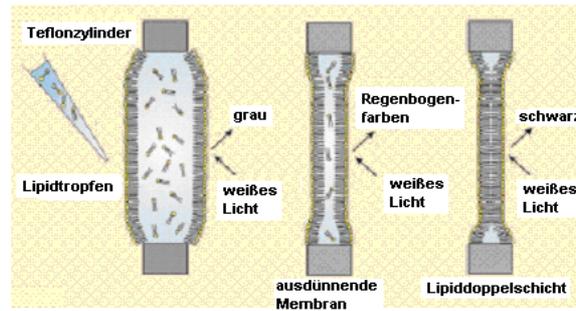
sind. Sie können einen Durchmesser von einigen  $\mu\text{m}$  erreichen. Die Größenverteilung ist allerdings oft sehr inhomogen.

Setzt man eine Lipidsuspension einige Zeit Ultraschall aus<sup>[12]</sup> oder drückt man sie durch eine Polymermembran mit einem bestimmten Porendurchmesser,<sup>[13]</sup> so erhält man kleine unilamellare Vesikel (SUV, *small unilamellar vesicle*) mit einem Durchmesser von 20 bis 50 nm. Dabei erhält man bei der letztgenannten Methode eine homogenere Größenverteilung. Aufgrund ihrer geringen Stabilität eignen sich SUVs bestens, um planare Lipidmembranen herzustellen (Kap. 1.2.4 und 1.2.5). Dabei können auch Proteine in die Liposome integriert werden und nach dem Fusionieren mit einer Lipidmonolage Membranen mit bereits inkorporierten Proteinen erhalten werden.<sup>[14, 15]</sup>

Unilamellare Vesikel existieren in verschiedenen Größen, bis hin zu 200  $\mu\text{m}$ . Damit können sie im Inneren auch nennenswerte Mengen an Lösung aufnehmen und dienen so z.B. in der Pharmazie als „Transport-Behälter“ für Medikamente.<sup>[16, 17]</sup> Als Membran-Testsystem eignen sich Liposome weniger, da sie nur mit einigen speziellen Messmethoden wie z.B. Patch-Clamp oder Lichtstreuung untersucht werden können.

### **1.2.2 Schwarzfilmmembranen (BLMs, *black lipid membranes*)**

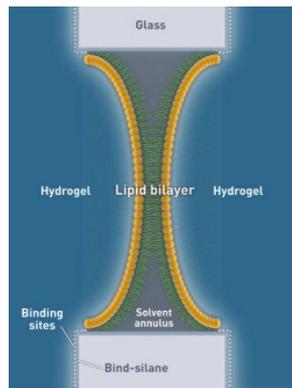
Müller *et al.* stellten 1962 erstmals eine BLM her, indem sie Phospholipide über ein kleines Loch ( $\varnothing = 0,8 - 2,5 \text{ nm}$ ) in einem Teflonzylinder spannten.<sup>[18]</sup> Dabei sind die Phospholipide in einem organischen Lösungsmittel (meistens Decan) gelöst und werden mit einer Pipette über das Loch „gepinselt“ (Müller-Rudin-Methode). Es entsteht ein relativ dicker Lipidfilm ( $> 100 \text{ nm}$ ). Dieser Lipidfilm erscheint zunächst grau, dann bunt, ähnlich wie Öl auf Wasser. Er dünnt aufgrund des höheren Wasserdrucks nach und nach aus und es erscheinen schwarze Flecken.<sup>[19]</sup> Sobald die Membran vollständig ausgebildet ist, erscheint das Loch komplett schwarz, daher der Name Schwarzfilmmembranen (Abb. I-4). Dieser Effekt wird von den destruktiven Interferenzen zwischen dem reflektierten Licht der Wasser/Lipid-Grenzfläche und dem phasenverschobenen Licht der Lipid/Wasser-Grenzfläche ausgelöst.



**Abb. I-4:** Herstellung von Schwarzfilmmembranen<sup>[3]</sup>

Eine weitere Möglichkeit BLMs zu erzeugen ist die „lösungsmittelfreie“ Methode (Montal-Müller-Methode).<sup>[20]</sup> Dabei werden die Lipide in einem Lösungsmittel auf eine Wasseroberfläche aufgebracht, so dass sich ein monomolekularer Lipidfilm auf der Oberfläche bildet. Der Flüssigkeitsspiegel wird so weit abgesenkt, dass das Wasserniveau bis unter das Loch im Teflonzylinder sinkt. Der erste Monolayer ist damit gebildet, ein erneutes Anheben des Niveaus führt zur Ausbildung der Lipiddoppelschicht. Hierbei kann man die Lipide vor dem Anheben auch austauschen, was zu unsymmetrischen Membranen führt.<sup>[21]</sup> Die so gebildeten Membranen sind im Gegensatz zur Müller-Rudin-Methode nahezu lösungsmittelfrei.

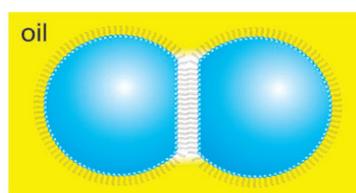
In BLMs können diverse Membranproteine wie Ionenkanäle oder Ionencarrier inkorporiert werden. Durch elektrochemische Messmethoden kann dann die Funktion dieser Proteine untersucht werden.<sup>[22, 23]</sup> Ein großer Nachteil der BLMs liegt in ihrer Kurzlebigkeit (bis zu einigen Stunden), die auf die geringe Stabilität gegenüber Störungen von außen (mechanisch oder akustisch) zurückzuführen ist. Die Stabilität kann z.B. mit Hilfe eines Hydrogels signifikant erhöht werden. Dabei wird die BLM in einer Hydrogel-Precursor-Lösung hergestellt und anschließend das Hydrogel polymerisiert (Abb. I-5). Mit dieser Methode sind die BLMs bis zu zwei Wochen stabil, das Einbringen von Proteinen ist weiterhin möglich.<sup>[24]</sup>



**Abb. I-5:** Hydrogel-stabilisierte BLM.<sup>[24]</sup>

## I.2.3 Tropfengrenzflächen-Lipiddoppelschicht (DIB, *Droplet interface Bilayers*)

Die geringe Stabilität der zuvor beschriebenen BLMs ist vor allem auf den Übergang (Annulus) zwischen BLM und Teflonzylinder zurückzuführen. In diesem Übergangsbereich befinden sich zusätzlich zu den Lipidmolekülen auch noch Reste des Lösungsmittels. Dadurch findet ein Austausch zwischen Wasserphase und Bilayer statt, was die Stabilität der gesamten Membran gefährdet. Dieser Nachteil tritt bei DIBs nicht auf, da hier der Bilayer zwischen zwei Tropfen gebildet wird (Abb. I-6).<sup>[25]</sup> Dabei wird ein Wassertropfen in eine Lipidlösung (in Decan) getaucht und es formen sich an der Grenzfläche spontan Monolayer. Beim Kontakt zweier solcher Tropfen entsteht an der Grenzfläche ein Bilayer.

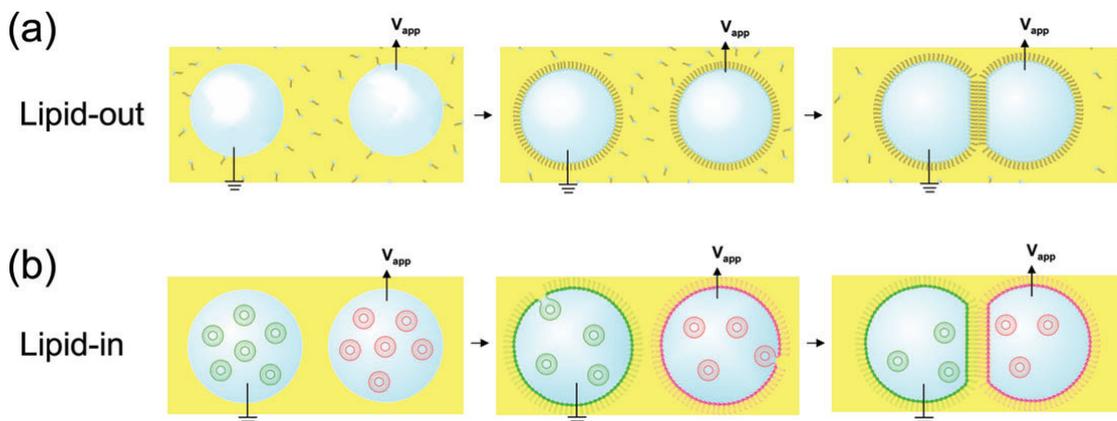


**Abb. I-6:** Darstellung einer Tropfengrenzflächen-Lipiddoppelschicht (DIB)<sup>[25]</sup>

Elektroden innerhalb der Tropfen ermöglichen sowohl das Anlegen eines Potentials als auch die Messung des Ionenstroms, der durch eingebaute Kanäle und Poren fließt. DIBs sind auch bei angelegtem Potential über Wochen stabil.

DIBs können nach zwei Methoden hergestellt werden. Bei der „Lipid-out“-Methode (Abb. I-7 a)) ist das Lipid in einem Lösungsmittel gelöst. An eingebrachten Wassertropfen bilden sich Monolayer aus, durch

Zusammenschieben der Tropfen werden Lipiddoppelschichten erhalten. Die so entstandenen Bilayer sind symmetrisch. Asymmetrische Bilayer kann man nach der „Lipid-in“-Methode erhalten. Dabei werden in unterschiedliche Wassertropfen unterschiedliche Lipid-Vesikel eingebracht. Beim Kontakt zweier solcher Tropfen entstehen asymmetrische Lipiddoppelschichten (Abb. I-7 b)).



**Abb. I-7:** Herstellung von DIBs nach a) der „Lipid-out“-Methode und b) der „Lipid-in“-Methode<sup>[25]</sup>

DIBs können in vielen Bereichen eingesetzt werden. Man kann z.B. die verschiedensten Proteine inkorporieren oder sogar direkt innerhalb der Tropfen über Proteinexpression einen funktionsfähigen Ionenkanal herstellen.<sup>[26]</sup>

### I.2.4 Festkörperunterstützte Membranen

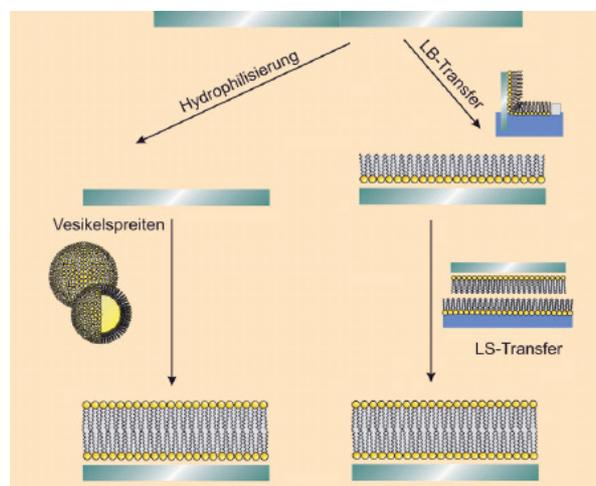
Festkörperunterstützte Membranen können auf Substraten wie Glas,<sup>[27]</sup> Indiumzinnoxid (*indium tin oxide*, ITO),<sup>[28]</sup> Glimmer,<sup>[29]</sup> Platin,<sup>[30]</sup> Gold,<sup>[31]</sup> Aluminiumoxid<sup>[32]</sup> oder Titandioxid<sup>[33]</sup> präpariert werden. Aufgrund des starken Kontakts zwischen Membran und Substrat verfügen sie über eine hohe Langzeit- und mechanische Stabilität. Dieser Kontakt kann entweder wie im Falle der sBLMs (*supported bilayer lipid membranes*) durch Physisorption oder wie im Falle der tBLMs (*tethered bilayer lipid membranes*) durch Chemisorption erfolgen. Im Falle der sBLMs ist eine laterale Beweglichkeit der Lipide gegeben, da sich zwischen Membran und hydrophilem Substrat ein dünner Wasserfilm (~ 1 nm) ausbildet. Diese Beweglichkeit erfolgt bei den tBLMs allerdings nur in der distalen Lipidschicht. Festkörperunterstützte

Membranen können im Gegensatz zu Vesikeln und BLMs mit vielen verschiedenen Methoden wie z.B. Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscope*), Ellipsometrie, FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, Kap. II.6), Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance* SPR, Kap. II.5), elektrochemische Impedanz-Spektroskopie EIS (Kap. II.4) und der Quarzmikrowaage (QCM-D, *quartz crystal microbalance - dissipation*) untersucht werden.<sup>[34]</sup>

### I.2.4.1 sBLMs (*supported bilayer lipid membranes*)

Die Präparationsmethode für sBLMs hängt davon ab, welche Messmethoden und Anwendungen mit der fertigen Membran durchgeführt werden sollen. Auch das Material des Festkörpers muss entsprechend gewählt werden. Für mikroskopische Untersuchungen können beispielsweise nur transparente Materialien wie Glass oder Quartz benutzt werden.<sup>[35]</sup> EIS und SPR werden dagegen am besten mit goldbeschichteten Substraten durchgeführt.

SBLMs lassen sich entweder über Vesikel-Spreiten oder über Langmuir-Blodgett-Transfer (LB-Transfer) herstellen (Abb. I-8). Für beide Methoden sind hydrophile Oberflächen notwendig.



**Abb. I-8:** Präparationsmethoden für sBLMs; linke Seite über Vesikelspreiten, rechte Seite über LB-Transfer mit anschließendem Langmuir-Schäfer-Transfer (LS-Transfer)

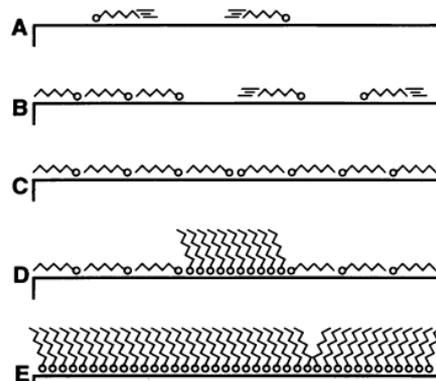
Der Mechanismus der Vesikelfusion ist immer noch nicht komplett aufgeklärt. Man geht davon aus, dass einzelne Vesikel an der Oberfläche adsorbiert werden und mit anderen zu größeren Vesikeln fusionieren.<sup>[36]</sup> Die großen Vesikel flachen durch die Anziehung der Oberfläche ab, reißen beim Erreichen einer kritischen Adhäsionskraft auf und bilden Lipiddoppelschicht-Inseln auf dem Substrat.<sup>[37]</sup> Diese Inseln fusionieren nach und nach, bis die gesamte Oberfläche von der Membran bedeckt ist.<sup>[38]</sup> Die so entstandene Membran ist defektfrei, da bei ausreichender Menge an Vesikeln alle Defekte während des Spreitens behoben werden. Die Geschwindigkeit der Vesikelfusion kann durch Temperatur und osmotischen Druck beeinflusst werden.<sup>[39-42]</sup>

Im Falle der Langmuir-Blodgett-Technik werden Lipide (meist in Chloroform gelöst) auf eine Wasseroberfläche aufgebracht und bei einem definierten Oberflächendruck durch vertikales Herausziehen des Trägers aus der wässrigen Subphase auf das Substrat übertragen.<sup>[43]</sup> Durch erneutes Eintauchen wird die zweite Monolage erzeugt. Alternativ dazu liefert die Langmuir-Schäfer-Technik Lipiddoppelschichten, indem das mit einem Monolayer funktionalisierte Substrat zur Ausbildung der zweiten Monolage horizontal auf die mit Lipiden belegte Wasseroberfläche gelegt und dann durch diese hindurch in das Wasser gestoßen wird. Der Filmdruck der Lipide muss hierbei - je nach Lipid - bei mind. 30 mN/m liegen. Im Gegensatz zum Vesikel-Spreiten können die so erzeugten sBLMs asymmetrisch aufgebaut werden, jedoch verfügen die durch Vesikel erzeugten sBLMs über höhere Packungsdichten. Außerdem können die Vesikel auch als Transporter für Membranproteine genutzt werden, so dass nach Fertigstellung der Membran die Proteine bereits inkorporiert sind.<sup>[44]</sup>

### **1.2.4.2 tBLMs (*tethered bilayer lipid membranes*)**

Festkörperunterstützte Membranen weisen aufgrund ihrer Nähe zum unterstützenden Substrat eine hohe Stabilität auf, der geringe Abstand behindert jedoch die Inkorporation funktionsfähiger Proteine und Peptide. Dieses Problem kann durch das Einfügen von Abstandshaltern zwischen der Membran und dem Festkörper gelöst werden. Durch den hydrophilen Abstandshalter wird ein wasserhaltiges Reservoir zwischen dem Festkörper

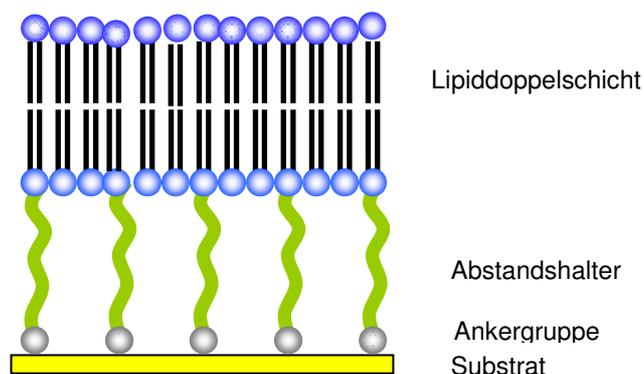
und der Membran gebildet. Dadurch gelingt auch die Inkorporation größerer Proteine unter Erhalt ihrer Funktion.<sup>[45, 46]</sup> Das Anbinden der verlängerten Lipide an das Substrat erfolgt kovalent z.B. über Phosphonat-Anker auf Aluminiumoxid<sup>[47]</sup> oder Thiol-Anker auf Gold.<sup>[48]</sup> Als Abstandshalter kommen dabei Polymerkissen, Polypeptidketten, Proteinfragmente und Amphiphile mit hydrophilen Ankergruppen in Frage.<sup>[49-52]</sup> Diese Amphiphile bilden durch Selbstorganisation (*self-assembly*) nahezu defektfreie Monoschichten aus. Der Mechanismus der Selbstorganisation ist noch nicht komplett geklärt, Poirer und Pylant schlugen 1996 einen Zweistufen-Mechanismus vor.<sup>[53]</sup> Zunächst binden die Moleküle (hier: Alkanthiole) mit einer geringen Oberflächenbedeckung an die Oberfläche (hier: Gold) an (Abb. I-9 A), ab einer kritischen Oberflächenbedeckung bilden sich gestreifte Inseln (sichtbar im Rastertunnelmikroskop), die im Equilibrium weiter anwachsen (B). Nachdem sie die gesamte Oberfläche bedecken (C), finden fest-fest-Phasenübergänge statt, bei denen sich Inseln mit hoher Packungsdichte ausbilden (D). Diese vergrößern sich so lange, bis eine homogene Monolage ausgebildet ist (E).<sup>[37]</sup>



**Abb. I-9:** Schematische Darstellung des Self-Assembly-Mechanismus von Alkanthiolen auf Au(111).<sup>[53]</sup>

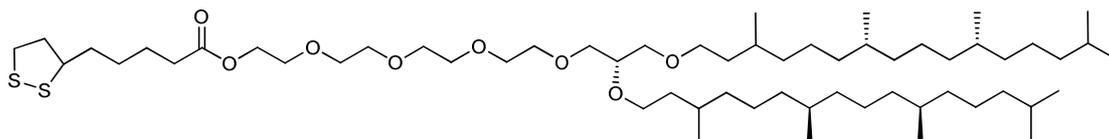
Bei der Selbstorganisation spielt der Aufbau der Moleküle eine entscheidende Rolle. Sie verfügen in der Regel über eine Kopfgruppe, die an die gewünschte Oberfläche kovalent binden kann. Außerdem müssen die Moleküle untereinander eine hohe Affinität - ausgelöst durch hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen - aufweisen.

Auf dem so gebildeten Monolayer wird der Bilayer durch Vesikel-Fusion (Kap. I.2.4.1) oder schnellen Lösungsmittelaustausch (*rapid solvent exchange*) gebildet. Bei der letztgenannten Methode wird das Lipid in Ethanol gelöst und auf den Monolayer gegeben. Nach etwa 10 min wird mit dem wässrigen Medium gespült, wobei sich der Bilayer ausgebildet hat.<sup>[54]</sup> Eine schematische Darstellung einer tBLM ist in Abb. I-10 gezeigt.



**Abb. I-10:** Schematische Darstellung einer tBLM.

Entscheidend für die Fluidität der tBLM ist der Aufbau des hydrophoben Teils der Lipide. Gesättigte, unverzweigte Kohlenwasserstoffe haben oft eine zu hohe Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ), so dass sie bei Raumtemperatur keine fluiden Membranen ausbilden können.<sup>[52, 55]</sup> Durch Verwendung verzweigter Kohlenwasserstoffketten (Isopren-Einheiten) im hydrophoben Teil des Lipids, konnten Cornell *et al.* dieses Problem lösen.<sup>[1]</sup> Diese Lipidform kommt auch in der Natur bei Archaeae-Bakterien, die unter extremen Lebensbedingungen überleben können, vor. Aufbauend darauf konnten Schiller *et al.* ein Ankerlipid (DPhyTL, Diphytanyl-glycerol-tetraethylenglycol-liponsäureester) synthetisieren, das sehr dichte, aber zugleich auch fluide Membranen ausbildet.<sup>[56]</sup> Es besteht aus einer Liponsäure als Ankergruppe, einem Tetraethylenglycol-Abstandshalter und Phytanyl-Ketten als hydrophoben Teil (Abb. I-11). Die Phytanylketten sind über Etherbindungen an das Tetraethylenglycol gebunden, um stabiler gegenüber Säuren zu sein. In tBLMs aus DPhyTL war die Inkorporation diverser Membranproteine wie z.B.  $\alpha$ -Hämolysin möglich.<sup>[45]</sup>

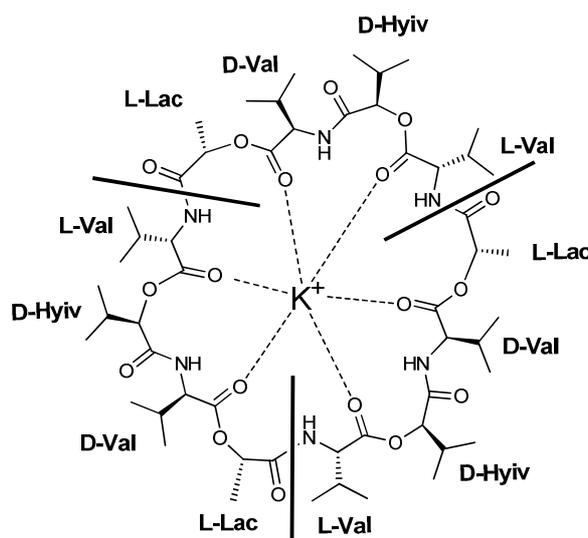


**Abb. I-11:** *DPhyTL*, Diphytanyl-glycerol-tetraethylenglycol-Liponsäureester<sup>[56]</sup>

*DPhyTL* wurde im Rahmen dieser Arbeit als Ankerlipid für alle Membranen verwendet. Der Aufbau der tBLM erfolgte dabei auf ultraflachem Gold (*Template stripped gold*), *DPhyTL* wurde über *self-assembly* transferiert und die Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion gebildet.

### I.3 Valinomycin

Das Depsipeptid Valinomycin wurde erstmals 1955 von Brockman und Schmidt-Kastner aus *Streptomyces fulvissimus*-Kulturen isoliert.<sup>[57]</sup> Die genaue Struktur des Antibiotikums konnte allerdings erst 1963 von Shemyakin *et. al.* aufgeklärt werden.<sup>[58]</sup> Valinomycin ist ein Zyklododecadepsipeptid, es besteht aus drei identischen Einheiten aus lediglich einer Aminosäure (*L*- oder *D*-Valin) und zwei  $\alpha$ -Hydroxysäuren (*D*- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure und *L*-Milchsäure, Abb. I-12).



**Abb. I-12:** Struktur von Valinomycin  $c(L\text{-Lac-D-Val-D-Hyiv-L-Val})_3$ .

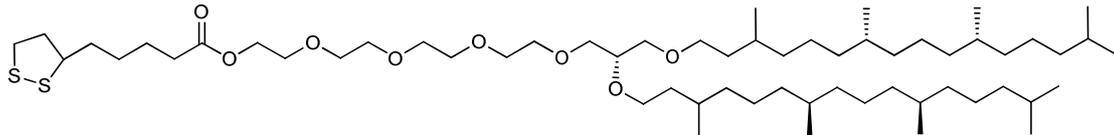
In Abwesenheit von gebundenen Kationen ist die Struktur von Valinomycin abhängig vom Lösemittel.<sup>[59]</sup> In Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen, die es selektiv binden kann, zeigen die Seitenketten der Amino- und Hydroxysäuren nach außen. Damit ist Valinomycin nach außen ein stark hydrophobes Molekül. Die sechs Carbonyl-Sauerstoff-Atome der Esterbindungen zeigen nach innen und formen eine Kavität für die Komplexierung von Ionen.<sup>[60]</sup> Durch diese Konfiguration kann Valinomycin Kalium-Ionen durch Zellmembranen hindurch transportieren. Die häufigste Verwendung findet es als Ionencarrier in Membransystemen, wie z.B. in planaren Lipidmembranen (BLMs) und festkörpergestützten Membran (tBLMs).<sup>[61-64]</sup> Dabei wird Valinomycin benutzt, um elektrochemisch die Qualität und biomimetische Funktionsweise der Membranen zu testen.<sup>[65-69]</sup> Aufgrund seiner guten Membrangängigkeit ist Valinomycin giftig, die  $LD_{50}$  liegt bei 4 mg/kg (Ratte, peroral).

Valinomycin ist ein Makrolid-Antibiotikum, d.h. es behindert bei Bakterien den Syntheseprozess von Proteinen während der Elongationsphase der Polypeptidkette. Es kann die Synthese aber nur hemmen, wenn  $K^+$ -Ionen anwesend sind. Diese werden der Bakterienzelle entzogen und somit die Proteinsynthese behindert.<sup>[70]</sup>

### I.4 Ziel dieser Arbeit

Die Fortschritte der letzten zehn Jahre auf dem Gebiet der Modellmembranen - insbesondere der festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten - stellen die ideale Grundlage dar, um diese Systeme als Sensor-Matrices zu verwenden.<sup>[3]</sup> Dabei ist vor allem der Einbau von Membranproteinen als sensorische Elemente von großem Interesse, da viele pharmazeutische Wirkstoffe mit membranständigen Ionenkanälen oder Rezeptorproteinen wechselwirken.<sup>[45]</sup> Jedoch sind biologische Membranen oft zu komplex aufgebaut, um systematische Untersuchungen zu erlauben. Um die Wechselwirkungen genauer untersuchen und optimieren zu können, müssen die Proteine in eine biomimetische Membran eingebaut werden, damit ihre Struktur und Funktion erhalten bleibt. Ein derartiges Modellsystem sind zum Beispiel tBLMs (*tethered bilayer lipid membranes*),<sup>[56]</sup> die über *Self-Assembly*

eines Ankerlipides auf einer ultraflachen Goldoberfläche und anschließender Vesikelfusion eines freien Lipides hergestellt werden können. In der vorliegenden Arbeit wird ein Ankerlipid mit Abstandshalter (DPhyTL) verwendet (Abb. I-13), da dieses den Vorteil hat, ein ausreichend großes Wasserreservoir im Zwischenraum Membran – Gold zu schaffen, sodass Membranproteine einfach inkorporiert werden können, ohne an der Goldoberfläche zu denaturieren.



**Abb. I-13:** *DPhyTL, Diphytanyl-glycerol-tetraethylenglycol-Liponsäureester*<sup>[56]</sup>

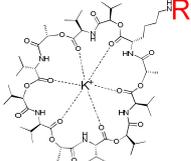
Ein weiterer Vorteil der festkörperunterstützten Membranen ist die Möglichkeit, die Messergebnisse elektronisch auszulesen. Damit lässt sich mit diesem System das Konzept des „Lab on a chip“ realisieren.

Ein häufig verwendetes, membrangängiges Peptid ist das Antibiotikum Valinomycin. Es ist ein Zyklododecadepsipeptid mit dem Aufbau  $c(L\text{-Val-}D\text{-Hyiv-}D\text{-Val-}L\text{-Lac})_3$ , das selektiv Kalium-Ionen durch Membranen transportieren kann.<sup>[60]</sup> Valinomycin behindert bei Bakterien den Syntheseprozess von Proteinen während der Elongationsphase der Polypeptidkette. Die Synthese kann aber nur gehemmt werden, wenn  $K^+$ -Ionen anwesend sind. Diese werden der Bakterienzelle entzogen und somit die Proteinsynthese behindert.<sup>[70]</sup>

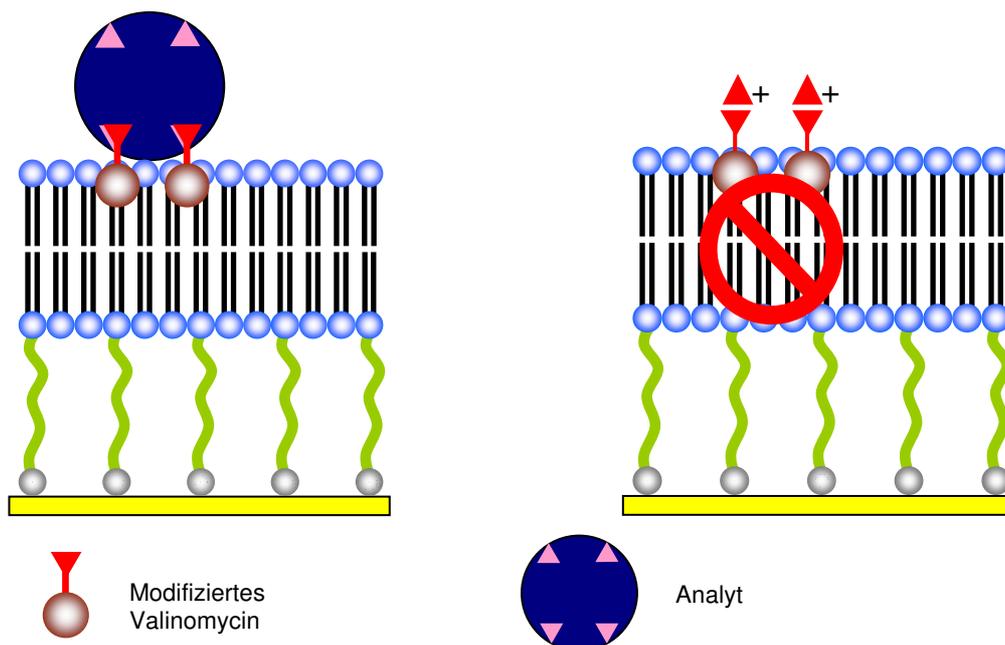
Wird Valinomycin in tBLMs inkorporiert, so sinkt in Anwesenheit von Kalium-Ionen der Widerstand der Membran drastisch. Sind keine Kalium-Ionen vorhanden, steigt er wieder an.

Durch den Austausch eines *L*-Valins durch ein *L*-Lysin, soll in dieser Arbeit eine Amin-Funktionalität in das Valinomycin-Molekül eingeführt werden, die zum Anbinden unterschiedlicher Sensormoleküle verwendet werden kann. Dabei sollen verschiedene Sensor-Konzepte wie z.B. pH-Sensor, Biosensor und Redox-Sensor mit dem modifizierten Valinomycin als Ausgangsmaterial umgesetzt werden (Tab. I-2).

**Tab. I-2:** Modifizierte Valinomycin-Derivate und deren mögliche Anwendungen.

	Sensortyp	Anwendung
		
R = H	pH-Sensor	Test des Sensorsystems
R = Proteinligand	Biosensor	Diagnostik
R = Ferrocen	Redox-Sensor	Analog Diabetes-Test

Der entscheidende Schritt hierbei ist die Blockade der Ionentransportfähigkeit des Valinomycins durch Zugabe eines Analyten. Diese Blockade kann entweder mechanisch durch Festhalten des Ionencarriers an der Oberfläche der Membran oder chemisch durch Einbringen einer Ladung am Valinomycin erfolgen, da geladene Moleküle eine Membran nicht überwinden können (Abb. I-14).



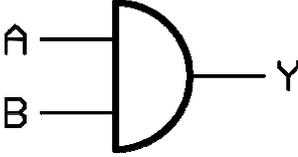
**Abb. I-14:** Eine Blockade des modifizierten Valinomycins kann mechanisch (linke Seite) oder chemisch (rechte Seite) erfolgen.

Dadurch ergibt sich ein logischer Schalter mit zwei Kanälen (Stimuli), der eine Kanal ist die Anwesenheit von Kalium-Ionen (Kanal A), der andere die Abwesenheit des Analyten (z.B. ein Protein, Protonen oder ein Oxidationsmittel, Kanal B). In Anwesenheit von Kalium-Ionen kann nur ein

Ionenfluss (Y) gemessen werden, wenn der Analyt nicht anwesend ist. Sind keine Kalium-Ionen vorhanden, kann niemals ein Ionenfluss gemessen werden (Tab. I-3).

**Tab. I-3:** In Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen kann nur bei Abwesenheit des Analyten ein Ionenfluss gemessen werden.

<b>Kanal A</b> ( $K^+$ -Ionen)	1	1	0	0
<b>Kanal B</b> (Abwesenheit des Analyten)	1	0	1	0
<b>Ionenfluss (Y)</b>	1	0	0	0



The diagram shows a standard AND gate symbol. It has two input lines on the left labeled 'A' and 'B', and one output line on the right labeled 'Y'. The gate is represented by a semi-circle on the left and a pointed right side.

Eine solche Schaltung nennt sich AND-Gatter (Boolesche Algebra).

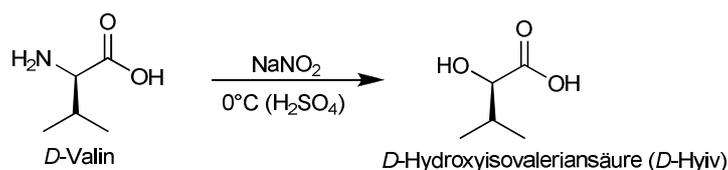
## II Theoretischer Teil

Im folgenden Teil der Arbeit wird zunächst auf die verwendeten Synthesestrategien zur Depsipeptidsynthese näher eingegangen. Danach werden die in dieser Arbeit verwendeten Sensorkonzepte näher erläutert und eine ausführliche Besprechung der Struktur und Funktionsweise des Valinomycins gegeben. Im Anschluss werden einige biophysikalische Methoden und deren Messaufbau erklärt.

### II.1 Prinzipien der Depsipeptidsynthese

Die Grundlagen für eine chemische Peptidsynthese in Lösung legten Anfang des 20. Jahrhunderts E. Fischer und T. Curtius,<sup>[71, 72]</sup> jedoch konnte erst Bergmann durch die Einführung von Urethanen als Schutzgruppen das Problem der Racemisierung überwinden.<sup>[73]</sup>

Depsipeptide verfügen nicht nur über Amidbindungen sondern auch über Esterbindungen. Zur Synthese von Depsipeptiden werden daher zusätzlich zu den Aminosäuren auch  $\alpha$ -Hydroxysäuren benötigt. Diese sind häufig nicht kommerziell erhältlich und werden daher in der Regel aus den korrespondierenden Aminosäuren durch Diazotierung hergestellt werden. Hierbei kann das Stereozentrum, wie in der Synthese von Losse und Bachmann,<sup>[74]</sup> erhalten bleiben (s. Abb. II-1) oder durch Ausnutzung des Cäsiumeffektes bei der Veresterung mit der benachbarten Aminosäure invertiert werden.<sup>[75]</sup>



**Abb. II-1:** Synthese von *D*- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure aus *D*-Valin durch Diazotierung<sup>[74]</sup>

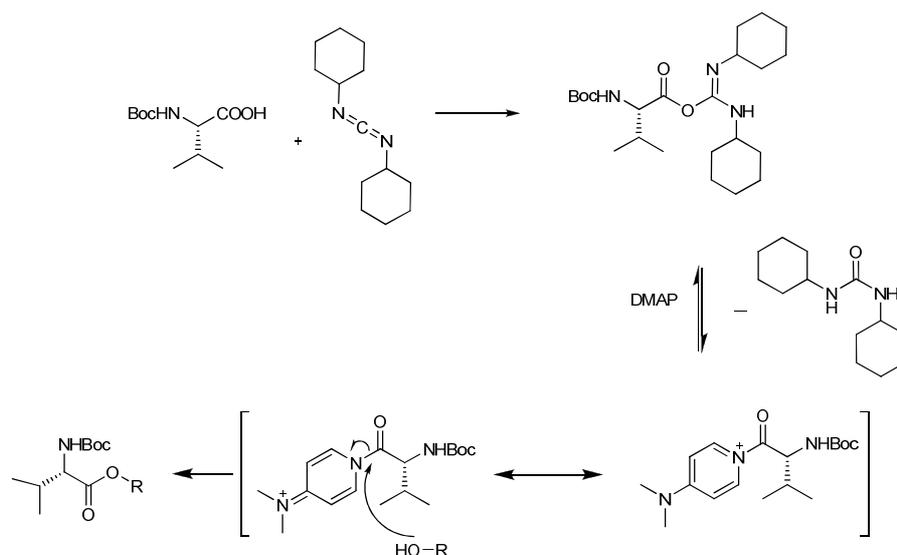
Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von  $\alpha$ -Hydroxysäuren ist die enantioselektive Reduktion von Ketonen, die meist bei hohem Wasserstoffdruck mit Hilfe eines Katalysators durchgeführt wird. Die entstehende  $\alpha$ -Hydroxysäure liegt dann als Alkylester vor.<sup>[76]</sup>

### II.1.1. Depsipeptidsynthese in Lösung

Shemyakin begann 1960 mit der Synthese diverser Depsipeptide in Lösung.<sup>[77]</sup> Er synthetisierte erstmals Valinomycin und konnte zeigen, dass das künstlich hergestellte Valinomycin mit dem natürlichen übereinstimmt, indem er IR-Spektren, Schmelzpunkte und die biologische Aktivität gegen *Candida albicans* verglich. Er synthetisierte Valinomycin mit Hilfe der Methode der gemischten Anhydride sowie der Säurechlorid-Methode.<sup>[58]</sup>

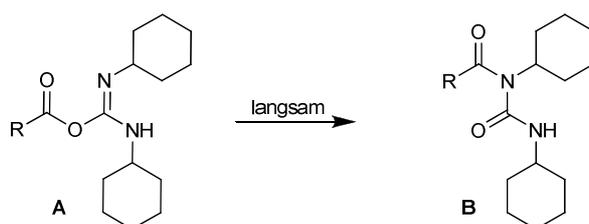
Nachdem die Struktur von natürlichem Valinomycin aufgeklärt war, konnten Rothe *et al.*<sup>[78]</sup> die Synthese dahingegen erleichtern, dass sie statt der Fragmentkondensation zunächst die Tetradepsipeptide synthetisierten und diese dann trimerisierten.

In den folgenden Jahren wurden bezüglich der Depsipeptidsynthese viele Fortschritte gemacht.<sup>[75, 79, 80]</sup> Die in dieser Arbeit verwendete Synthesestrategie wurde erstmals 1979 von Gilon *et al.* beschrieben.<sup>[81-83]</sup> Sie verwendeten *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Dimethylaminopyridin (DMAP) mit Benzylester- und Boc-Schutzgruppen (s. Abb. II-2).



**Abb. II-2:** Mechanismus zum Knüpfen einer Esterbindung mit DCC und DMAP

Diese Kupplungsmethode wurde dahingegen verbessert, dass die häufig auftretende Racemisierung der Amino- und Hydroxysäuren durch eine Reaktionsdurchführung bei tiefen Temperaturen (- 40°C) verhindert wurde.<sup>[84-87]</sup> Durch Verwendung von DMAP können auch Nebenreaktionen verhindert werden.<sup>[88]</sup> Schlechte Nucleophile reagieren mit Acylisoharnstoffen **A** teilweise so langsam, dass **A** gemäß Abb. II-3 umlagern kann. Der entstehende Acylharnstoff **B** kann nicht mehr weiterreagieren, da er kein Acylierungsmittel mehr ist.



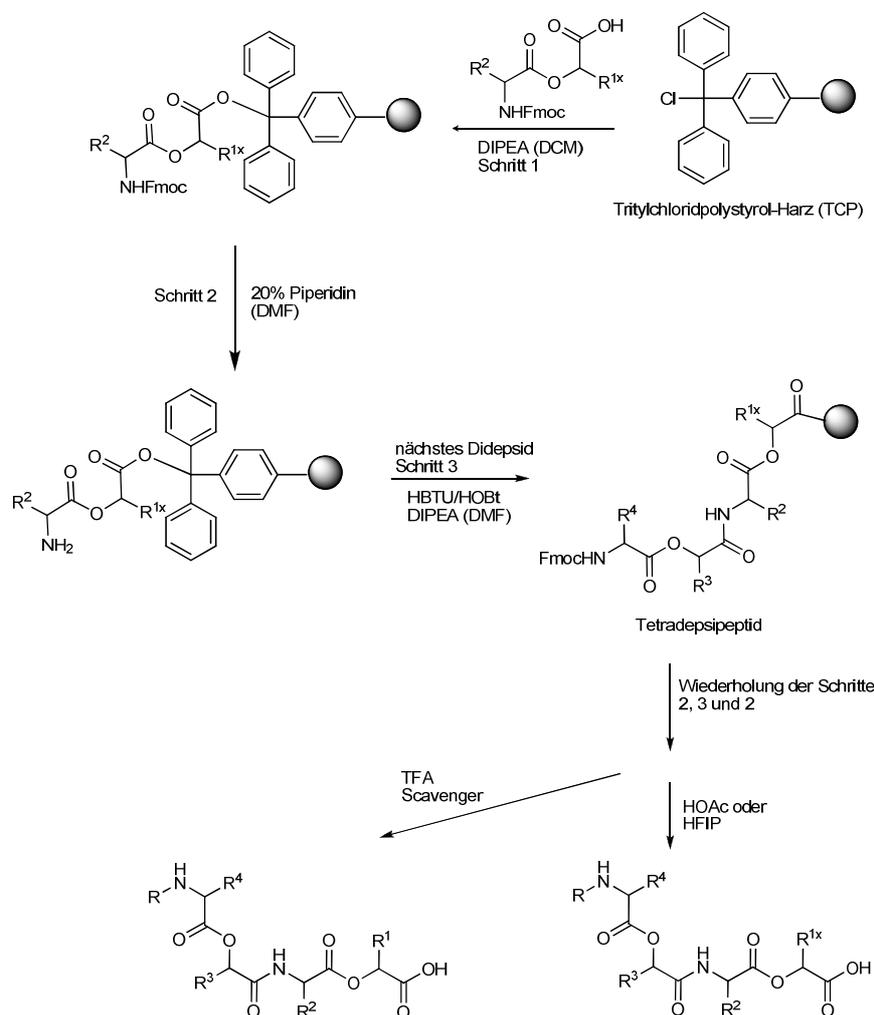
**Abb. II-3:** Mögliche Nebenreaktion bei einer DCC-Kupplung mit einem schlechten Nucleophil

### II.1.2 Festphasensynthese

#### II.1.2.1 Festphasensynthese mit Didepsidbausteinen

An der festen Phase wurde ein Depsipeptid erstmals von Semkin, Smirnova und Shchukina<sup>[89]</sup> synthetisiert. Dieses Depsipeptid war allerdings noch recht klein und enthielt lediglich eine  $\alpha$ -Hydroxysäure. Daher wird die Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen Depsipeptide u.a. nach der Gisin-Merrifield-Methode<sup>[90]</sup> durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Festphasenpeptidsynthese (SPPS) bei der die Depsipeptidkette sequenziell an einem festen Träger aufgebaut wird. Hierfür werden die Esterbindungen zunächst in Lösung geknüpft (Kap. II.1.1), da sie eine wesentlich stärkere Aktivierung benötigen als für das Knüpfen einer Amidbindung vonnöten ist.<sup>[91, 92]</sup> Die Aminogruppe der Didepside wird dabei mit einer temporären Schutzgruppe geschützt, Seitenketten mit einer permanenten Schutzgruppe. Die so erhaltenen Didepside werden an der festen Phase miteinander verknüpft. Die Vorteile dieser Methode bestehen im Wesentlichen darin, dass durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion an der festen Phase fast

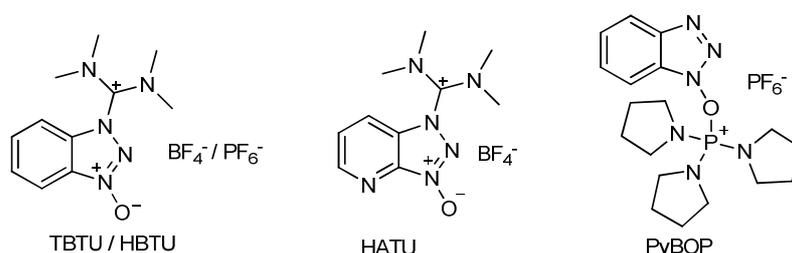
quantitativ verläuft und dass die überschüssigen Reagenzien von dem jeweiligen harzgebundenen Zielmolekül durch einfache Filtration entfernt werden können. Alle weiteren Syntheseschritte am Harz können nach der klassischen Festphasenpeptidsynthese durchgeführt werden. Dabei kommt die von Carpino *et al.* entwickelte Fmoc / *t*Bu-Schutzgruppenstrategie zum Einsatz, wie sie in Abb. II-4 dargestellt ist.<sup>[93-95]</sup> Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe kann unter milden Bedingungen mit einer 20%igen Piperidinlösung in DMF (Schritt 2) orthogonal zu den säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen und der Peptidverankerung durchgeführt werden.



**Abb. II-4:** Darstellung der Synthesestrategie von Depsipeptiden an fester Phase nach Gisin, Merrifield und Carpino unter Verwendung des Trityllinkers. Die Abspaltung des Depsipeptids vom festen Träger erfolgt entweder unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen unter schwach sauren Bedingungen (z.B. HOAc oder HFIP) oder durch simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels TFA.

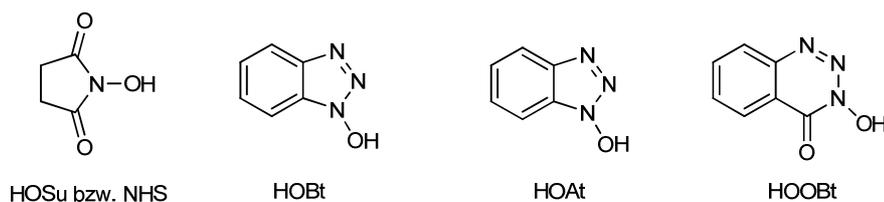
Die Verankerung des ersten Fmoc-geschützten Didepsids am Harz (Schritt 1) erfolgt über ein zu den Kupplungsbedingungen orthogonales *Linkermolekül*, dessen Bindung zum Peptid erst bei der Peptidabspaltung vom Harz gebrochen wird.

Die Aktivierung des zu kuppelnden Fmoc- und seitenkettengeschützten Didepsids erfolgt mittels schwacher organischer Basen (z.B. durch *N,N,N*-Diisopropylethylamin) und Aktivierungsreagenzien (Abb. II-5),<sup>[96-98]</sup> die *in situ* im ersten Schritt der Reaktion eine hochreaktive Acyluronium- oder -phosphonium-Spezies erzeugen.



**Abb. II-5:** Kupplungsreagenzien für die *in situ* Aktivierung von Aminosäuren<sup>[99]</sup>

Im zweiten Schritt wird die hochreaktive Acyluronium- oder -phosphonium-Spezies durch den nukleophilen Angriff von Fluorid, Bromid, HOBt oder HOAt (Abb. II-6) in das Säurehalogenid bzw. in den Aktivester umgewandelt, welches/r dann mit dem entschützten *N*-Terminus des harzgebundenen Dipeptids zum Amid reagiert (Schritt 3).

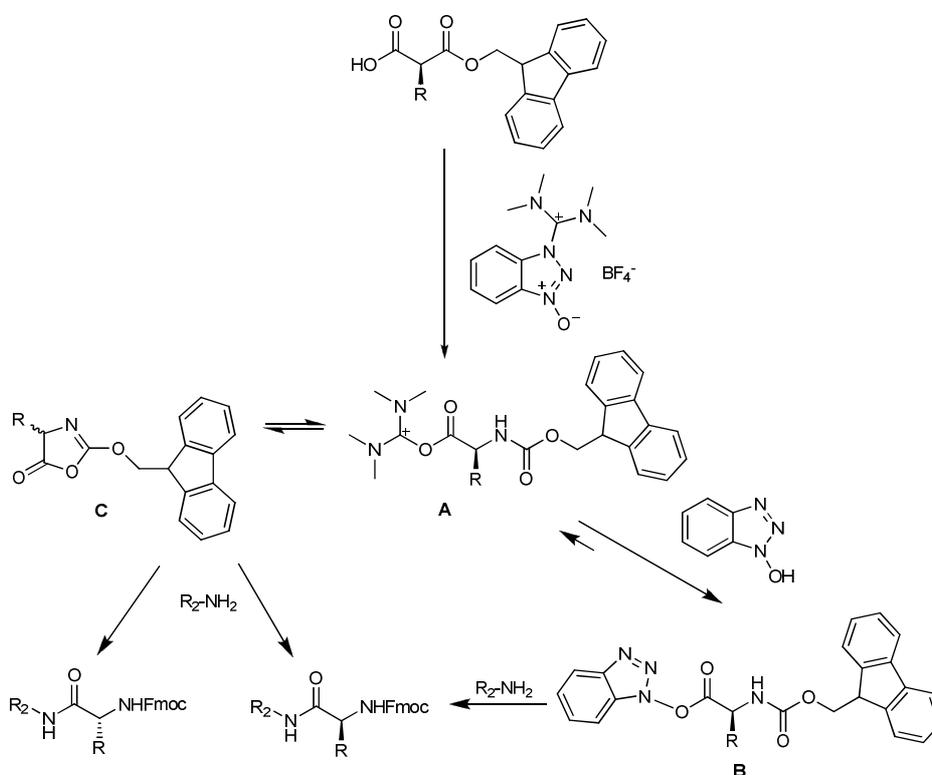


**Abb. II-6:** Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten. Die Effizienz in der Unterdrückung der Racemisierung nimmt von links nach rechts zu.

Neben den *in situ* Reagenzien, die überwiegend in der automatisierten Peptidsynthese verwendet werden, werden auch bereits voraktivierte Aminosäurederivate eingesetzt, wie z.B. symmetrische Anhydride, *N*-Carboxyanhydride, Pentafluorphenolester oder Säurehalogenide.<sup>[95, 100, 101]</sup>

Unter den verschiedenen Kupplungsreaktionen weisen OAt-Aktivester, symmetrische Anhydride und Aminosäurehalogenide die größte Reaktivität auf, während die Aminosäurefluoride ganz besonders für sterisch gehinderte Kupplungen, wie z.B. zwischen  $\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren (z.B. Aminoisobuttersäure) geeignet sind.<sup>[102-104]</sup>

Die in den ersten Reaktionsschritten der Aktivierung gebildeten Acyluronium-Verbindungen **A** racemisieren leicht, so dass diese durch den Zusatz von Additiven (Abb. II-7) in die entsprechenden, stabileren Aktivester überführt werden müssen, bzw. das Reaktionsgleichgewicht zu diesen hinverschoben werden muss.<sup>[105, 106]</sup>



**Abb. II-7:** Aktivierung einer Carbonsäure mit TBTU, die Zugabe von HOBT verhindert die Racemisierung der Acyluronium-Verbindung **A**

Gleichzeitig müssen sterisch gehinderte bzw. sehr schwache Basen wie Collidin eingesetzt werden, um unerwünschte Racemisierungen besonders von Cystein zu vermeiden.<sup>[82, 107]</sup>

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen für die Fmoc-Aminosäuren kommen folgende Schutzgruppen zum Einsatz, die fast alle TFA-labil sind:

**Tab. II-1: Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren**

Aminosäure	Schutzgruppe
Serin, Threonin	<i>tert</i> -Butylether ( <sup>t</sup> Bu)
Aspartat, Glutamat	<i>tert</i> -Butylester (O <sup>t</sup> Bu), Benzylester (OBn)
Cystein, Asparagin, Glutamin, Histidin	Triphenylmethyl (Trt)
Tryptophan	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl (Boc)
Lysin	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl (Boc), 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl (ivDde), Benzoxy carbonyl (Z)
Arginin	N $\alpha$ -(2,2,4,6,7)- Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)

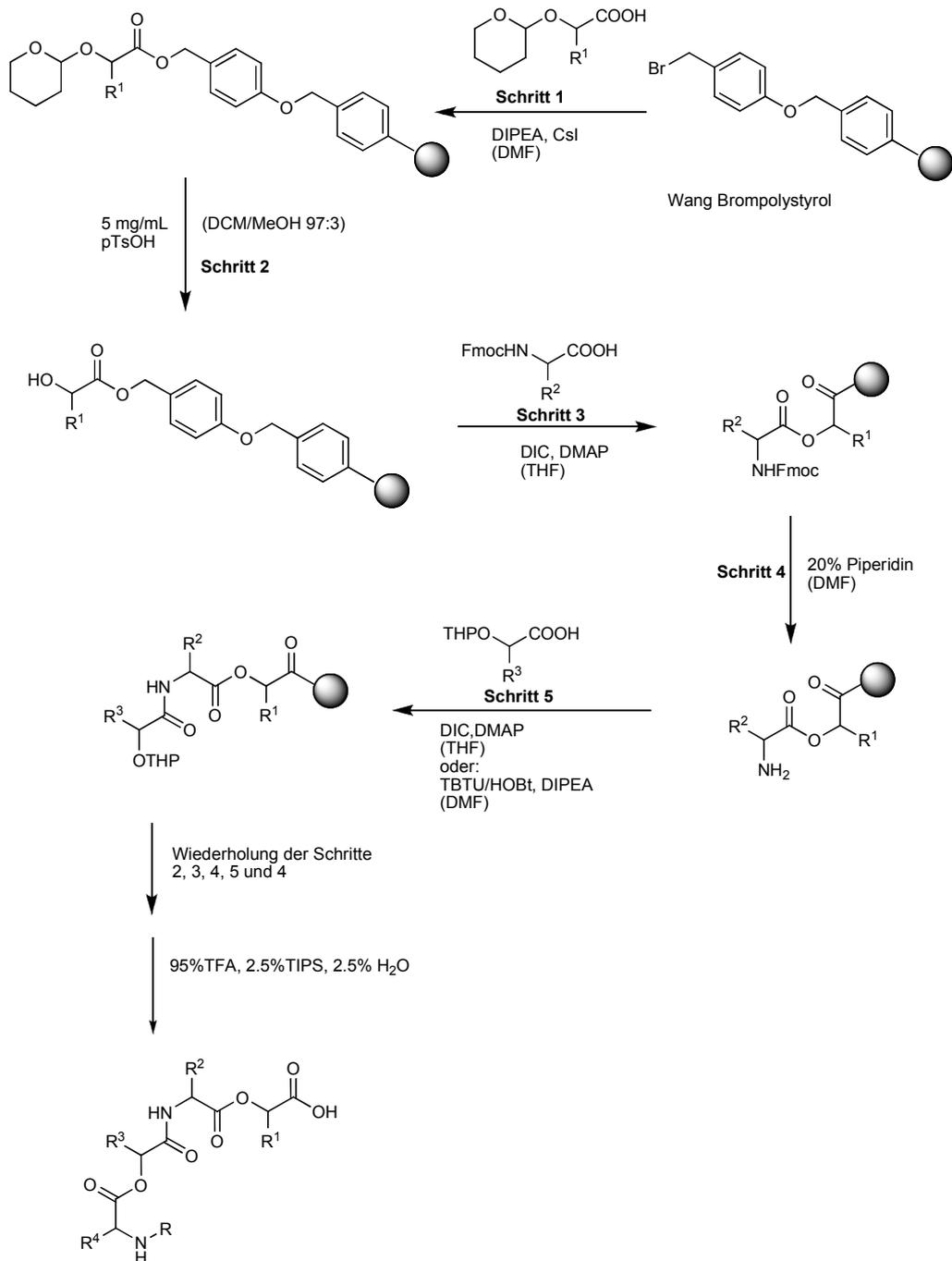
Die Peptidabspaltung vom Harz erfolgt im Fall des Trityllinkers durch Behandlung mit schwachen Säuren wie Hexafluorisopropanol (HFIP)<sup>[108]</sup> oder Essigsäure mit Trifluorethanol in Dichlormethan, wobei die Seitenkettenschutzgruppen erhalten bleiben. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger vollständiger Entschützung des Peptids verwendet man Trifluoressigsäure. Die bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entstehenden Carbokationen müssen dabei mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden, um die irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Als Abspaltmischung kommen dabei Mischungen aus TFA und unterschiedlichen Anteilen an *scavengern* wie Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.<sup>[109]</sup> Mittlerweile hat sich Triisopropylsilan (TIPS) zusammen mit geringen Mengen an Wasser in TFA als Abspaltmischung der Wahl etabliert, da es geruchlos ist und Carbokationen sehr effektiv abfängt.<sup>[110]</sup>

### II.1.2.2 Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren

Bei der Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren werden die Esterbindungen nicht in Lösung, sondern direkt am Harz geknüpft.<sup>[111]</sup> Dies hat den Vorteil, dass zeitaufwendige Lösungssynthesen wegfallen. Die Schutzgruppenstrategie aus Kapitel II.1.2.1 muss hierfür allerdings überarbeitet werden. Davies *et al.* führten für die Depsipeptidsynthese am Harz erstmals ein geeignetes Schutzgruppenpaar ein.<sup>[112]</sup> Sie verwendeten eine Kombination aus TBDMS- (*tert*-butyldimethylsilyl) für die Hydroxylgruppe der  $\alpha$ -Hydroxysäuren und der Fmoc-Schutzgruppe für die Aminogruppe der Aminosäuren. Aufgrund der Labilität der Fmoc-Gruppe gegenüber Fluoridionen und der schlechten Kontrolle der Kupplungseffektivität bei den Esterbindungen haben Kuisle *et al.* für die Hydroxylgruppen THP-Ether-Schutzgruppen eingeführt.<sup>[111]</sup> Hierfür wird allerdings keine TCP-Harz sondern Wang-Harz verwendet, da dieses weniger säurelabil ist und somit eine größere Varietät an Schutzgruppen möglich ist. In Abb. II-8 ist das Syntheschema wiedergegeben. Schritt 1 zeigt die Beladung des Wang-Harzes mit der ersten THP-geschützten  $\alpha$ -Hydroxysäure. Diese erfolgt mit Cäsiumiodid und DIPEA als Base in DMF. Anschließend wird die THP-Schutzgruppe mit *p*-Toluolsulfonsäure in DCM/MeOH (97:3) abgespalten (Schritt 2) und die Fmoc-geschützte Aminosäure mit Diisopropylcarbodiimid und DMAP in THF angebunden (Schritt 3). Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie zuvor beschrieben mit 20% Piperidin in DMF entfernt (Schritt 4). Daraufhin kann die erste Amidbindung entweder mit DIC/DMAP oder den in Kapitel II.1.2.1 beschriebenen Kupplungsreagenzien geknüpft werden. (Schritt 5)

Die Abspaltung vom Harz erfolgt nach Beendigung der Synthese mit 95% TFA, 2,5% TIPS und 2,5% Wasser. Die Zyklisierung kann wie oben beschrieben durchgeführt werden.

## II. Theoretischer Teil



**Abb. II-8:** Darstellung der Synthesestrategie von Depsipeptiden an fester Phase nach Kuisle et al. am Wang-Harz. Die Abspaltung des Depsipeptids vom festen Träger erfolgt mit 95% TFA, 2,5% TIPS und 2,5% Wasser.

### II.1.3 Zyklisierung

Für die Zyklisierung von Depsipeptiden wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Methoden veröffentlicht,<sup>[84, 112, 113]</sup> zur Synthese von Valinomycin wurden die in Tab. II-2 aufgeführten Zyklisierungsreagenzien verwendet.

**Tab. II-2:** Zyklisierungsmethoden für Valinomycin

Valinomycin	Veröffentlichung	Methode	Ausbeute
Natürlich	Shemyakin, 1963 <sup>[58]</sup> Gisin, 1969 <sup>[90]</sup> Losse, 1971 <sup>[91]</sup>	SOCl <sub>2</sub> , Et <sub>3</sub> N, RT	10 - 51%
Natürlich	Rothe, 1973 <sup>[78]</sup>	<i>o</i> -Phenylenchlorophosphit, Et <sub>3</sub> N, 100 °C	33%
Natürlich	Zeggaf, 1989 <sup>[114]</sup>	PyBOP, TEA, RT	30%
Analoga	Dory, 1989 <sup>[84]</sup> Dory, 1996 <sup>[86]</sup> Dawson, 1996 <sup>[87]</sup>	PfpOH, DCC, DMAP, 90 °C	14 – 70%
Analoga	Dory, 1996 <sup>[85]</sup>	DPPA, Et <sub>3</sub> N, -25 °C	3%
Analoga	Kuisle, 1999 <sup>[111]</sup>	HATU, DIPEA, 4 – 25 °C	20%

Für die Zyklisierung von seitenkettengeschützten Peptiden wird häufig die Azidmethode verwendet, nach der der Ringschluss über eine Amidbildung mit Hilfe von Diphenylphosphorsäureazid (DPPA) in Kombination mit einer unlöslichen, anorganischen Base (z.B. NaHCO<sub>3</sub>) in DMF erfolgt.<sup>[113, 115]</sup>

Allen Zyklisierungsmethoden gemeinsam ist die Anwendung des Verdünnungsprinzips nach Ziegler und Ruggli,<sup>[116]</sup> wobei durch Konzentrationen von 10<sup>-3</sup> M die Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren unterdrückt werden soll. Aufgrund der Zunahme der Entropie (Zahl der Moleküle verdoppelt sich) ist die intramolekulare Amidbildung thermodynamisch bevorzugt.

## II.2 Sensorkonzepte

Es existieren sehr viele verschiedene Sensortypen, die teilweise auf sehr unterschiedlichen Konzepten beruhen, beispielsweise Gassensoren,<sup>[117]</sup> elektrochemische Sensoren<sup>[118]</sup> oder Biosensoren.<sup>[119]</sup>

Biosensoren werden von der IUPAC wie folgt definiert: „Ein Biosensor ist eine unabhängige, eingebaute Rezeptor-Empfänger-Einheit, die selektiv quantitative oder semiquantitative analytische Informationen vermittelt, indem sie ein biologisches Erkennungsprinzip benutzt.“

Man kann Biosensoren prinzipiell in drei Kategorien einteilen: (1) nach dem Rezeptortyp z.B. Immunsensor; (2) nach der Physik des Signalübertragungsweges z.B. amperometrische Sensoren; (3) nach der Anwendung z.B. medizinischer Sensor.

Für den Rezeptor-Teil wurden bereits verschiedenste Ansätze realisiert, die oft auf Bindungsprozessen auf molekularer Ebene aufbauen. In dieser Arbeit wurden verschiedene molekulare Sensorkonzepte realisiert.

### II.2.1 Biotin-Streptavidin

Biotin (Vitamin H) ist verantwortlich für das Zellwachstum und einige Zellfunktionen vieler verschiedener Zelltypen.<sup>[120]</sup> Biotinmangel kann u.a. zu Hautveränderungen, Schläfrigkeit und Haarausfall führen. Biotin ist in Enzymen wie z.B. der Pyruvatcarboxylase die prosthetische Gruppe (Cofaktor) und somit essenziell für die Funktion des gesamten Proteins. Es dient zur Übertragung von CO<sub>2</sub>, welches in Form der Carbaminsäure gebunden wird.<sup>[121]</sup>

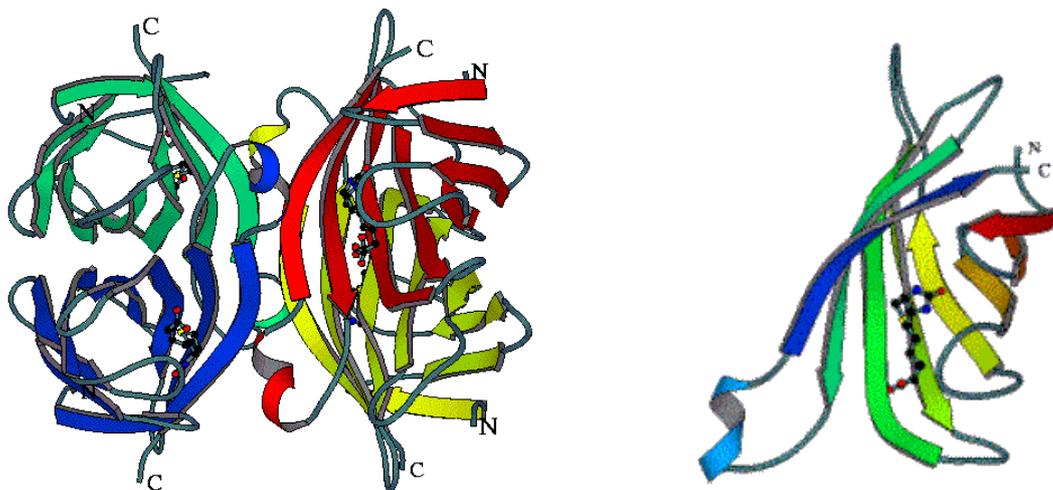
1941 wurde entdeckt, dass Ratten, die hauptsächlich mit rohem Eiweiß gefüttert werden, unter funktionellem Biotinmangel (*egg-white injury*) leiden.<sup>[122, 123]</sup> György *et al.*<sup>[122]</sup> konnten diesen Mangel auf das im Eiweiß enthaltene Avidin zurückführen, welches Biotin sehr effektiv binden kann.

Streptavidin wurde erstmals von Tausig und Wolf 1963 aus Streptomyces-Kulturen (*Streptomyces avidinii*) isoliert. Es verfügt über die gleiche Biotinbindungsfähigkeit wie Avidin,<sup>[124]</sup> ist aber kein Glykoprotein, wodurch weniger unspezifische Bindungen auftreten.

Beide Proteine sind Tetramere, die Dissoziationskonstante ( $k_D$ ) für die Wechselwirkung zwischen Avidin/Streptavidin und Biotin ist etwa  $10^{-15}$  M.<sup>[125]</sup> Eine solch starke Bindung tritt in der Natur sonst bei nur wenigen nichtkovalenten Wechselwirkungen auf.<sup>[126]</sup>

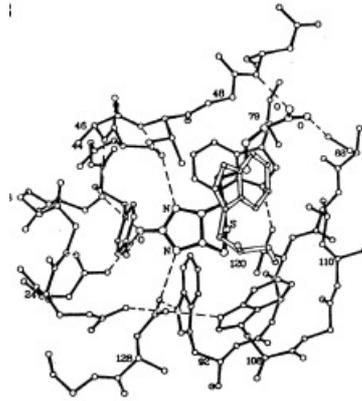
Streptavidin hat gegenüber Avidin den Vorteil, dass sein isoelektrischer Punkt (pI) nicht bei pH > 10 sondern zwischen pH = 5,5 - 6,5 liegt, es kann somit in biologischen Testsystemen gut eingesetzt werden. Außerdem ist es nicht glykosiliert und kann somit nicht an DNA oder an Zellmembranen binden.<sup>[127]</sup>

Streptavidin ist ein Homo-Tetramer mit  $D_2$ -Symmetrie, es kann somit vier Biotin-Moleküle binden. Jedes Monomer besteht aus einer  $\beta$ -Fasstruktur ( $\beta$ -barrel) mit aufgeweiteten Haarnadelschleifen (Abb. II-9). Biotin wird in das offene Ende der verdrehten Faserstruktur gebunden, wobei sich eine der Schleifen über die Bindungsstelle faltet.



**Abb. II-9:** Struktur von Streptavidin mit angebenen Biotinen (linke Seite), Struktur eines Streptavidin-Monomers mit angebenem Biotin (rechte Seite)<sup>[128]</sup>

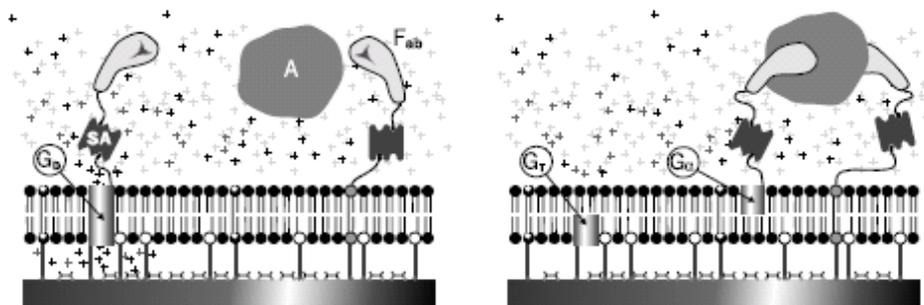
Dabei kommen hydrophobe und van-der-Waals Wechselwirkungen zum Einsatz, außerdem ein großes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[128]</sup> Dazu gehören z.B. die H-Brückenbindungen zwischen der Harnstoffgruppe des Biotins und fünf Proteinresten des Streptavidins, aber auch die Wechselwirkung zwischen dem Schwefel-Atom des Biotins und der Hydroxylgruppe des Thr<sup>90</sup> (Abb. II-10).<sup>[129]</sup> Die Summe all dieser Wechselwirkungen ist für die extrem hohe Bindungskonstante verantwortlich.



**Abb. II-10:** Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin. Einige Seitenketten wurden zur leichteren Darstellung weggelassen. Die gestrichelten Linien zeigen die H-Brückenbindungen zwischen den Heteroatomen des Biotins und den Aminosäuren des Streptavidins.<sup>[129]</sup>

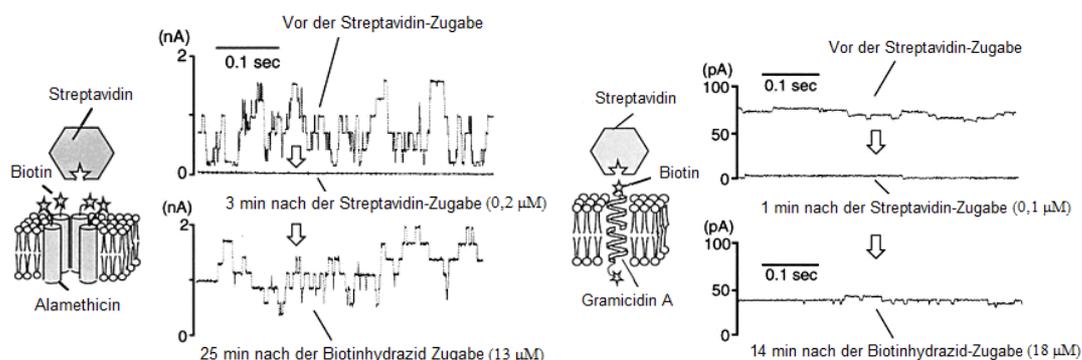
Das Biotin-Streptavidin-System wird häufig in Immuntests eingesetzt. Es kann dazu beitragen, die Empfindlichkeit dieser Tests zu erhöhen wie z.B. in den kommerziell erhältlichen Testkits für *Herpes simplex*-Viren.<sup>[130]</sup> Eine weitere Anwendung ist die Verwendung als Label in DNA-Tests (z.B. *Southern*-, *Northern*-, *Western-Blots*,...)<sup>[131]</sup>, weil Biotin einfach an DNA angebunden werden kann, ohne dabei die Hybridisierungsfähigkeit mit der Ziel-DNA zu stören.

Eine weitere Anwendung des Biotin-Streptavidin-Systems wurde beispielsweise von Cornell *et al.* publiziert, die es als Biosensor benutzten.<sup>[1]</sup> Hierfür verwendeten sie biotinylierte Gramicidin-Kanäle, an welche biotinylierte Fab-Fragmente von Antikörpern (Fab) über Streptavidin (SA) als Zwischenglied gebunden sind (Abb. II-11). Außerdem sind membran-durchspannende biotinylierte Lipide in die Membran eingebaut worden, an die ebenfalls ein Fab über ein Streptavidin gebunden ist. In Abwesenheit des Analyten A können die Gramicidin-Monomere innerhalb der Membran diffundieren und dabei Dimere bilden, durch die Ionen die Membran überwinden können. In Anwesenheit des Analyten A werden die biotinylierten Antikörper miteinander vernetzt und verhindern dadurch die Dimerisierung des Gramicidin-Kanals. Der Ionenfluss wird damit unterbrochen.



**Abb. II-11:** Cornell's Biosensor: in Anwesenheit des Analyten A wird der Ionenfluss unterdrückt, da die biotinylierten Gramicidin-Monomere durch die Vernetzung mit den membrandurchspannenden Lipiden nicht mehr dimerisieren können.<sup>[1]</sup>

Ein ähnliches Konzept verwendeten Futaki *et al.*<sup>[132]</sup> Sie synthetisierten Ionenkanäle wie Alamethicin und Gramicidin mit einem Biotinmolekül in der Nähe der Porenöffnung und konnten nach Zugabe von Streptavidin keinen Ionenfluss mehr messen (Abb. II-12). Wurde Biotinhydrazid hinzugefügt, ließ sich das ursprüngliche Signal wieder herstellen.

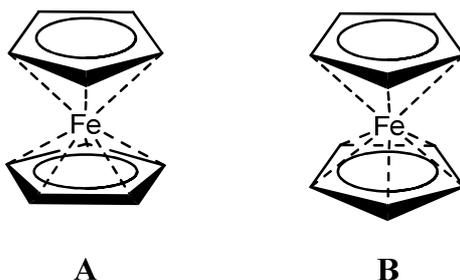


**Abb. II-12:** Biotinylierte Ionenkanäle Alamethicin und Gramicidin. Nach Zugabe von Streptavidin konnte kein Ionenfluss mehr gemessen werden. Dieser Prozess ist durch Zugabe von Biotinhydrazid reversibel.<sup>[132]</sup>

### II.2.2 Ferrocen

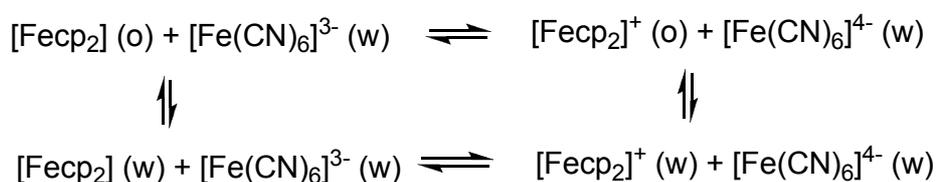
Ferrocen wurde erstmals von Kealy und Pauson unter Grignard-Bedingungen aus Cyclopentadienylmagnesiumbromid und  $\text{FeCl}_3$  hergestellt.<sup>[133]</sup> Sie publizierten allerdings noch die falsche Molekülstruktur. Wilkinson *et al.*<sup>[134]</sup> fanden heraus, dass Ferrocen diamagnetisch ist, dass es kein Dipolmoment hat und dass im IR eine C-H-Streckschwingung auftritt. Aufgrund dieser

Beobachtungen korrigierten sie die Molekülstruktur von Ferrocen und gelangten zu zwei möglichen Sandwichstrukturen (Abb. II-13). Dunitz und Orgel konnten mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass Struktur A korrekt ist.<sup>[135]</sup> Ferrocen ist ein äußerst stabiler Komplex, da  $\text{Fe}^{2+}$  ( $s^2d^4$ ) mit zwei Sechselektronenliganden ( $\text{Cp}^-$ ) über eine vollständig gefüllte Valenzschale verfügt und damit die 18-Elektronen-Regel erfüllt.



**Abb. II-13:** Mögliche Sandwichstrukturen von Ferrocen. Dunitz und Orgel fanden heraus, dass Ferrocen als Struktur A vorliegt.<sup>[135]</sup>

Das Ferrocen/Ferricinium-System ist ein Beispiel für ein hochreversibles Einelektronen-Redoxpaar.<sup>[136]</sup> Das Ferricinium-Ion (tiefblaue Farbe) zerfällt in neutraler, wässriger Lösung relativ schnell wieder in Ferrocen (gelb-orange).<sup>[137]</sup> Die Oxidation kann chemisch oder elektrochemisch erfolgen, bei der chemischen Oxidation kann z.B. Hexacyanoferrat(III) in Wasser gelöst Ferrocen - in einem organischen Lösemittel gelöst – über die Grenzfläche Wasser/organisches Lösemittel hinaus oxidieren (Abb. II-14).<sup>[138]</sup>



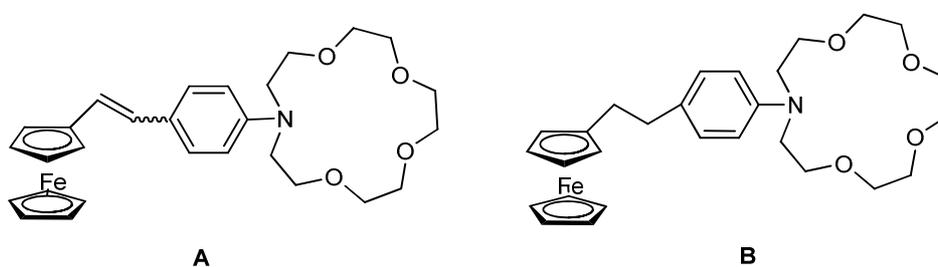
w: wässrige Phase  
o: organische Phase

**Abb. II-14:** Chemische Oxidation von Ferrocen an der Grenzfläche Wasser/organisches Lösemittel.<sup>[138]</sup>

Das Reduktionspotential von Ferrocen mit einer Kalomel-Elektrode (*saturated calomel electrode, SCE*) liegt bei 0,31 V.<sup>[137]</sup> Eine Anwendung für Ferrocen ist

u.a. der Gebrauch als Standardreferenzelektrode in nicht wässrigen Systemen, da es unempfindlich gegenüber Lösemittelwechseln ist. Hierbei wird ausgenutzt, dass ein Einelektronentransfer (wie bei Ferrocen) zwischen der ionischen und der neutralen Form nur in geringem Umfang vom Lösemittel beeinflusst wird.<sup>[139]</sup>

Ferrocen kann auch als molekularer Schalter oder Sensor eingesetzt werden. Ein Beispiel, das ähnlich dem in dieser Arbeit untersuchten Valinomycin ist, ist ein Sensor auf Basis eines Kronenethers, der analog zu Valinomycin Kalium-Ionen binden kann. Beer *et. al.* entwickelten einen Ferrocen-tragenden Kronenether, der bei Koordination eines Alkalimetalls sterische und elektronische Veränderungen auf das Eisen des Ferrocens überträgt.<sup>[140-142]</sup> Dadurch konnte die Koordination des Metalls an den Kronenether elektrochemisch überwacht werden, denn es tritt eine anodische Verschiebung des Ferrocensignals auf. Dieser Effekt ist allerdings nur messbar, wenn Ferrocen über eine olefinische Bindung an den Kronenether geknüpft ist (Abb. II-15, Struktur A). Ist der Linker zwischen Ferrocen und Kronenether gesättigt, tritt keine Veränderung im Redox-Verhalten von Ferrocen auf (Struktur B).



**Abb. II-15:** Bei Ferrocen-Kronenether A tritt bei Koordination eines Alkalimetalls eine anodische Verschiebung des Fc-Signals auf, bei B nicht, da dieser über kein konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem verfügt.<sup>[141]</sup>

### II.2.3 Sulfonamid-Carboanhydrase

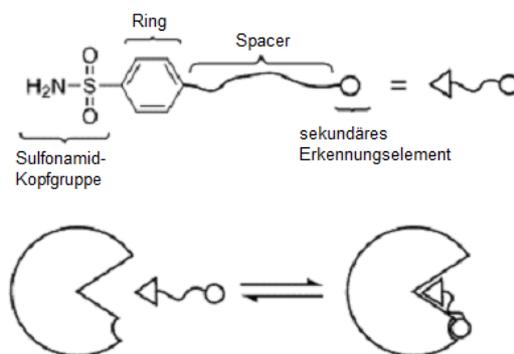
Carboanhydrasen (CA) sind Enzyme, die beliebte Targets der Wirkstoffforschung sind und die in vielen verschiedenen Bereichen, wie Biophysik und Medizinalchemie eingesetzt werden. Sie katalysieren die reversible Hydratation von Kohlendioxid zur Kohlensäure in einem Zweistufen-Mechanismus.<sup>[143]</sup> Das aktive Zentrum des Proteins besteht aus einem katalytischen  $Zn^{II}$ -Ion, das durch drei Imidazol-Gruppen von Histidinen und durch ein Hydroxid-Ion (oder ein Wassermolekül) in einer tetraedrischen Geometrie koordiniert wird.

CAs sind aus vielen Gründen vor allem für die Biophysik von großem Interesse: 1) es sind monomere Proteine mit mittlerem Molekulargewicht (~ 30 kDa) ohne Zucker- und Phosphatgruppen oder Disulfidbrücken. 2) CAs sind kostengünstig und kommerziell erhältlich; 3) sie sind recht einfach zu handhaben und aufzureinigen, da sie unter Standard-Labor-Bedingungen sehr stabil sind; 4) von fast allen bekannten CA-Isozymen sind die Aminosäuresequenzen aufgeklärt; 5) die Struktur und der katalytische Mechanismus sind bekannt; 6) die Hemmung des aktiven Zentrums durch Liganden ist relativ einfach und gut verstanden. Dies kann zum *Screening* von Inhibitoren und damit zum Testen von Theorien über Protein-Ligand-Wechselwirkungen genutzt werden. 7) Das  $Zn^{II}$ -Ion kann durch andere bivalente Ionen ersetzt werden.

Die am häufigsten verwendeten Inhibitoren der Carboanhydrasen sind Arylsulfonamide, die über einige Charakteristika verfügen, die sie für physikalisch-organische Untersuchungen der Bindungsmechanismen von Inhibitoren und in der medizinischen Wirkstoffforschung interessant machen. Arylsulfonamide sind leicht zu synthetisieren und binden mit einer hohen Affinität an CA (1  $\mu$ M bis sub-nM). Außerdem verfügen sie über ein gemeinsames Strukturmerkmal und haben eine engdefinierte Bindungsgeometrie, die einen Teil des Liganden variabel lässt, so dass dieser synthetisch modifiziert werden kann, ohne die Bindung zu stören.

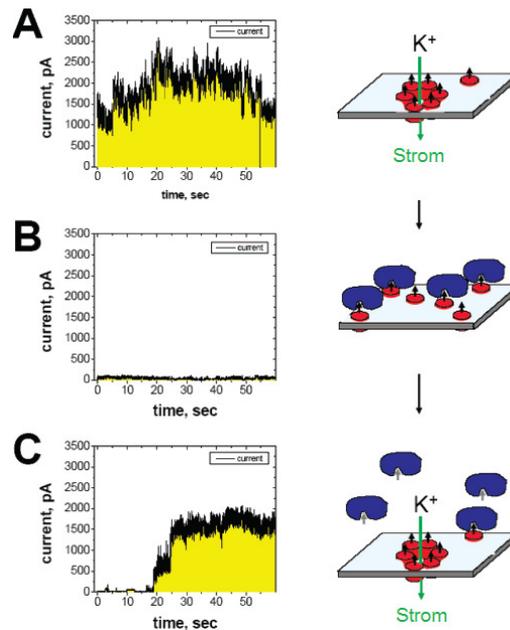
Der Aufbau der Arylsulfonamid-Inhibitoren kann dabei in vier Teile unterteilt werden (Abb. II-16): 1) Die Sulfonamid-Kopfgruppe, deren  $RSO_2NH^-$ -Anion an das  $Zn^{II}$ -Ion des aktiven Zentrums koordiniert. Die Deprotonierung der

Sulfonamid-Gruppe ist dabei unbedingt notwendig; somit spielt der  $pK_a$  der Sulfonamid-Gruppe für die Dissoziationskonstante des CA-Ligand-Komplexes eine entscheidende Rolle. 2) Der Ring kann ein aromatischer 5- oder 6-Ring sein, der auch Heteroatome enthalten kann. 3) Die Spacer-Einheit kann zwischen 1 und 100 Å lang sein; sie beeinflusst die Aktivität des Inhibitors durch Änderung seiner Löslichkeit, Flexibilität, Polarität und Biokompatibilität. Außerdem kann der Spacer als Linker zu einem sekundären Erkennungselement (SRE) genutzt werden. 4) Das SRE bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins, ein Inhibitor mit einem SRE ist somit bivalent. Hydrophile oder geladene SREs führen zu keiner Verbesserung der Bindungseigenschaften und damit zu keinem bivalenten Liganden, nur hydrophobe zeigen diesen Effekt.



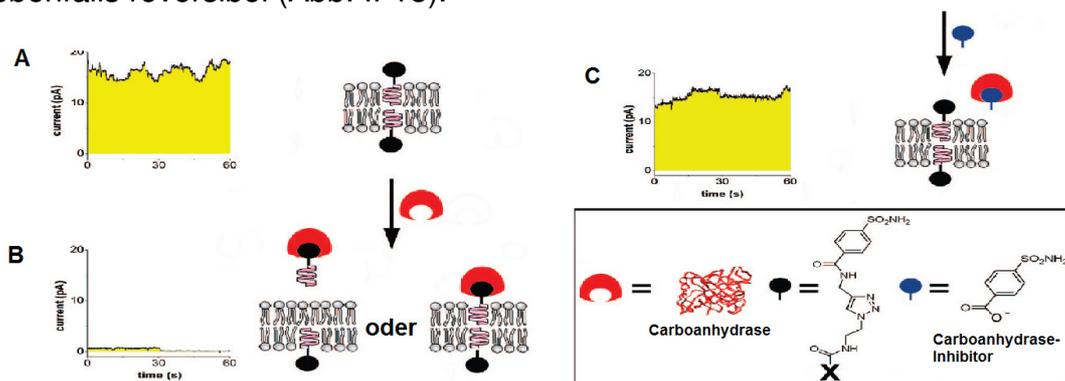
**Abb. II-16:** Anbinden eines Arylsulfonamid-Liganden an eine Carboanhydrase.

Mayer *et al.* verwendeten das Sulfonamid-Carboanhydrase-System zum Blockieren des Ionenkanals Alamethicin.<sup>[144]</sup> Sie synthetisierten Derivate von Alamethicin mit Sulfonamid-Gruppe, die in BLMs inkorporiert wurden; bei Zugabe von Carboanhydrase wurde der Ionenfluss gestoppt (Abb. II-17). Dieser Prozess war durch Zugabe von 4-Carboxylbenzolsulfonamid reversibel.



**Abb. II-17:** A) Sulfonamid-Alamethicin in BLMs, beim Anlegen eines Stroms werden  $K^+$ -Ionen transportiert. B) CA-Zugabe stoppt den Ionenfluss. C) Die Zugabe von 4-Carboxylbenzolsulfonamid gibt die blockierten Kanäle wieder frei.<sup>[144]</sup>

Blake *et al.* synthetisierten nach dem gleichen Konzept einen auf Gramicidin A basierenden Biosensor mit Phenylsulfonamid-Gruppe.<sup>[145]</sup> Auch hier wurde der Ionenfluss durch Zugabe von CA blockiert. Dieser Prozess war ebenfalls reversibel (Abb. II-18).

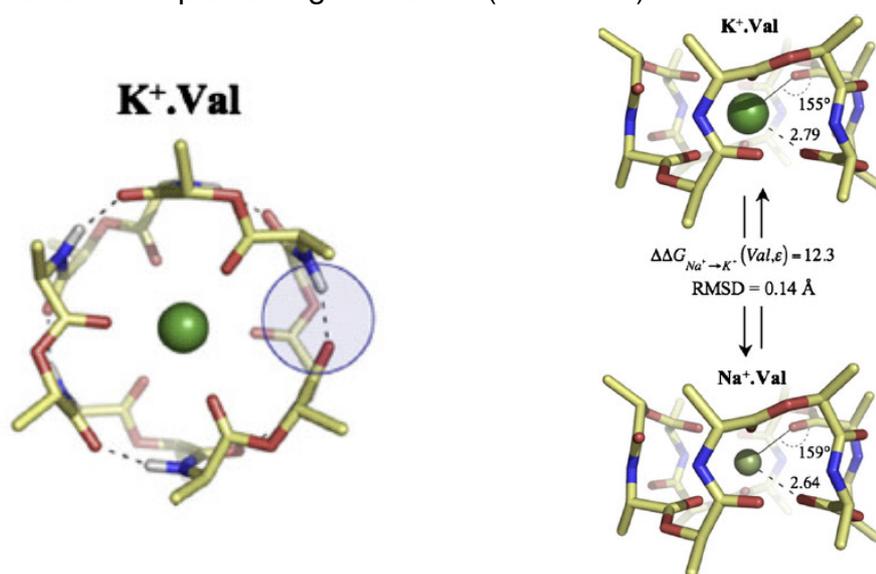


**Abb. II-18:** A) Sulfonamid-Gramicidin A formt beim Dimerisieren innerhalb einer Membran eine Pore, durch die Ionen die Membran überwinden können. B) Zugabe von CA stoppt den Ionenfluss. C) Bei Zugabe des Inhibitors wird der Ionenkanal wieder geöffnet.<sup>[145]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Sulfonamid-Carboanhydrase-System in ähnlicher Weise wie oben beschrieben als Biosensor eingesetzt werden. Bei Zugabe der Carboanhydrase soll Phenylsulfonamid-Valinomycin daran gehindert werden, die Membran zu durchdringen.

### II.3 Valinomycin

Valinomycin kann aufgrund seiner speziellen Struktur Kalium-Ionen durch Zellmembranen hindurch transportieren. In Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen zeigen die Seitenketten der Amino- und Hydroxysäuren nach außen. Damit ist Valinomycin nach außen ein stark hydrophobes Molekül. Die sechs Carbonyl-Sauerstoff-Atome der Esterbindungen zeigen nach innen und formen eine Kavität für die Komplexierung von Ionen (Abb. II-19).<sup>[60]</sup>



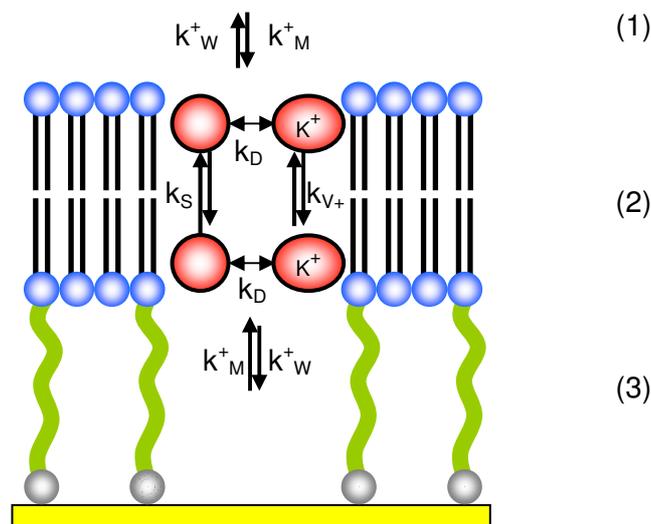
**Abb. II-19:** Valinomycin mit Kalium (linke Seite), Vergleich zwischen Valinomycin mit Kalium und Valinomycin mit Natrium (rechte Seite).<sup>[60]</sup> Die sechs Sauerstoffatome sind in einer verzerrten dreieckigen Prisma-Geometrie (nicht oktaedrisch) angeordnet. Die Ion-Sauerstoff-Abstände sind in Ångström angegeben.

Obwohl  $Na^+$  und  $K^+$  gleich geladen sind und nur einen Größenunterschied von  $0,4 \text{ \AA}$  aufweisen, ist dieser Unterschied entscheidend für die Komplexierung in Valinomycin.<sup>[146]</sup> Dies liegt vor allem daran, dass  $Na^+$  bei einer

Wechselwirkung mit sechs vollkommen flexiblen, einzähnigen Liganden einen Abstand von  $\sim 2,4 \text{ \AA}$  bevorzugt. In Valinomycin liegt dieser Abstand allerdings bei  $2,64 \text{ \AA}$ , was ideal für  $K^+$  ist. Ein Kollabieren des Depsipeptids auf die Größe des kleineren Ions ist nicht möglich, da dies von den sechs Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. II-19, linke Seite) und der spezifischen Ringgröße verhindert wird.<sup>[147]</sup>

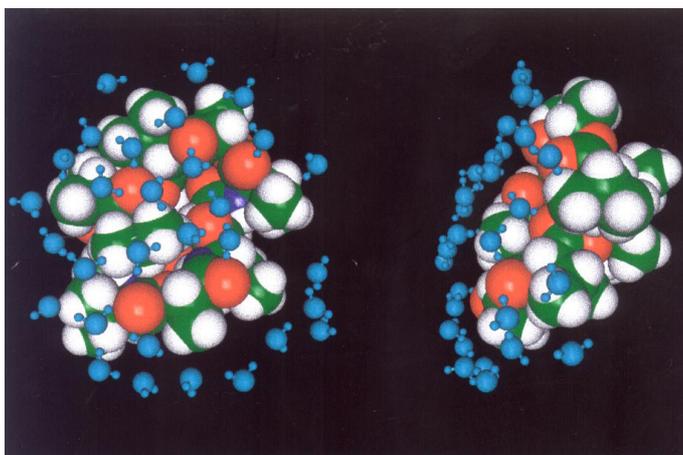
Aufgrund der hohen Selektivität von Valinomycin gegenüber Kalium hat es bereits viele Anwendungen wie z.B. als ionenselektive Komponente in Flüssigkeit-Membran-Elektroden oder als Insektizid gefunden.<sup>[148-150]</sup> Die häufigste Verwendung findet es allerdings als Ionencarrier in Membransystemen, wie z.B. in planaren Lipidmembranen (BLMs) und festkörpergestützten Membran (tBLMs).<sup>[61-64]</sup> Hier wird Valinomycin benutzt, um elektrochemisch die Qualität und biomimetische Funktionsweise der Membranen zu testen.<sup>[65-69]</sup>

Der Transportmechanismus von Valinomycin wurde erstmals 1971 von Stark *et al.* vorgeschlagen (Abb. II-20).<sup>[151]</sup> Dieser läuft in drei Schritten ab: (1) Assoziation des  $K^+$ -Ions und neutralen *Carriers*; (2) Translokation des Komplexes zur anderen Grenzfläche; (3) Dissoziation des Komplexes und Abgabe des Ions in die wässrige Phase.



**Abb. II-20:** Mechanismus des Ionentransports von Valinomycin durch eine Membran. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k^+_M$  und  $k^+_w$  beschreiben die Geschwindigkeit mit der Ionen in die Membran eindringen oder sie verlassen.

Die Größe der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{V+}$ ,  $k_D$  und  $k_S$  ist vor allem bei einer hohen Konzentration an Kalium-Ionen (1 M) fast identisch ( $\sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ ). Bei kleineren Konzentrationen ist der Assoziationsschritt geschwindigkeitsbestimmend. Diese Ergebnisse können mit Hilfe des Transportmechanismus, der 1969 von Shemyakin *et al.*<sup>[152]</sup> publiziert wurde, erklärt werden. Das stark oberflächenaktive Valinomycinmolekül adsorbiert an der Membran/Wasser-Grenzfläche, wobei die polaren Carbonylgruppen in Kontakt mit dem wässrigen Medium treten und die apolaren Teile in das Innere der Membran zeigen (Abb. II-21).



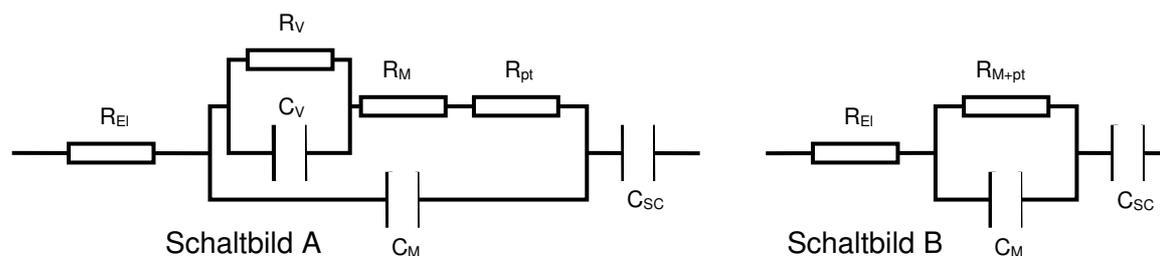
**Abb. II-21:** Unkomplexiertes Valinomycin, adsorbiert an der Grenzfläche Membran/Wasser (links: Blick von oben, rechts: Seitenansicht). Die wässrige Phase befindet sich auf der linken Seite des Bildes, die Membran (nicht eingezeichnet) rechts. Farben: blau = Wasser, dunkelgrün = C-Atom, rot = O-Atom, lila = N-Atom, weiß = H-Atom.<sup>[153]</sup>

Ein Wechsel des unkomplexierten Valinomycins auf die andere Seite der Membran würde eine relativ hohe Aktivierungsenergie benötigen, da es von der Grenzfläche desorbieren müsste. Formt der Ionencarrier allerdings einen Komplex mit  $K^+$ , geht die Oberflächenaktivität des Moleküls verloren, weil eine konformative Änderung stattfindet, die die Carbonylgruppen ins Innere des Komplexes verdreht.<sup>[154, 155]</sup> Somit kann Valinomycin leicht von der Grenzfläche desorbieren.

De Levie entwickelte 1975 ein theoretisches Modell für den Carrier-vermittelten Transport durch Lipiddoppelschichten in Anwesenheit eines Wechselstromfeldes.<sup>[156]</sup> Er machte dafür folgende Annahmen:

(1) Valinomycin und sein Komplex befinden sich immer in der Membran. Der Carrier wird als ungeladen betrachtet, der Komplex ist damit die einzige geladene Spezies innerhalb der Membran. (2) Membran und wässrige Phase sind einheitlich zusammengesetzt und die direkt angelegte Spannung ist null, so dass kein direkter Stromfluss auftritt. (3) Es treten keine Adsorptionseffekte auf, das Ionen-Carrier-Gleichgewicht wird unverzüglich aufgebaut und die Konzentration der transportierten Ionen in der wässrigen Phase ist so hoch, dass sie vom Stromfluss fast unbeeinflusst bleibt und damit konstant ist.

Die DeLevie-Theorie kann mit ein paar geänderten Randbedingungen auch auf festkörpergestützte Membranen übertragen werden. Hierfür muss vor allem beachtet werden, dass an der Membran/Elektroden-Grenzfläche der Ionenfluss durch das kleine Ionenreservoir und das Goldsubstrat begrenzt ist. Diese Randbedingungen führen zu dem Ersatzschaltbild in Abb. II-22.<sup>[68]</sup>



**Abb. II-22:** Ersatzschaltbilder für Valinomycin in festkörpergestützten Membranen. Schaltbild A ist gemäß dem theoretischen Modell von De Levie<sup>[156]</sup>, Schaltbild B ist die vereinfachte Version, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

$R_V$  und  $C_V$  sind die spezifischen Impedanzen des Carriers, die von der Konzentration an unkomplexierten Valinomycin in der Membran abhängen.  $R_{pt}$  (Phasentransfer-Widerstand) - in Serie zu  $R_M$  - ist der spezifische Widerstand, der dadurch zustande kommt, dass Ionen durch die Membran/Wasser-Grenzfläche eindringen. Die Eigenschaften der Lipiddoppelschicht werden von  $C_M$  und  $R_M$  beschrieben, die parallel geschaltet sind. Die Raumladungskapazität  $C_{SC}$  steht für die Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt und  $R_{EI}$  für den Widerstand des Elektrolyten. Da  $R_M$  und  $R_{pt}$  nicht unterscheidbar sind, können diese Widerstände zu einem zusammengefasst werden. Dieser ist aber so hoch,

dass der Einfluss von  $R_V$  und  $C_V$  vernachlässigbar ist, was zu einem vereinfachten Ersatzschaltbild führt (Abb. II-22, B). Dieser vereinfachte Schaltkreis ist aber der gleiche, der auch für eine Membran ohne Ionenkanal gilt. Er kann hier aber trotzdem verwendet werden, da  $R_{pt}$  als konstant angenommen wird und  $R_M$  somit der einzige Faktor ist, der während der Messung verändert wird.

Ein komplizierteres Modell für den Transportmechanismus von Valinomycin wurde von Nauman *et al.*<sup>[69]</sup> publiziert, die mit Hilfe von SPICE (*Simulation Program with Integrated Circuit Emphasis*) die Änderungen im Widerstand bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen simulierten. In dieser Arbeit wurde lediglich das Modell von De Levie angewandt.

### II.4 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie

Die Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie (EIS) dient der Charakterisierung und Untersuchung elektrochemischer Eigenschaften von Materialien und Grenzflächen. Außerdem kann sie genutzt werden, die Dynamik gebundener und freier Ladungen im Lösemittel oder an Grenzflächen ionischer, halbleitender, gemischt elektronisch-ionischer oder dielektrischer Materialien zu untersuchen.<sup>[157]</sup> Sie findet damit Anwendung in Untersuchungen von Korrosion, ionischen Feststoffen, festen Elektrolyten, leitfähigen Polymeren und Membranen.<sup>[158]</sup>

Gerade im Bereich der Membranen findet die EIS oft Verwendung, da sie ideal ist, um z.B. Ionenkanäle als sensorische Elemente in Lipidmembranen mit Hilfe von Elektroden<sup>[1, 159-161]</sup> zu vermessen. Die Vorteile der EIS für die Biophysik liegen darin, dass sie nicht-invasiv ist und die Messungen im natürlichen, wässrigen Medium erfolgen können.

#### II.4.1 Theorie

Um eine EIS-Messung sinnvoll auswerten zu können, muss zunächst ein geeignetes physikalisches Modell des zu untersuchenden Systems erstellt werden. Daraus wird ein Ersatzschaltbild entwickelt, das dann an das

gemessene Spektrum angefügt wird. Man erhält dadurch Werte für die Widerstände und Kondensatoren des Ersatzschaltbildes und somit des physikalischen Modells.

In der Impedanz-Spektroskopie wird ein Wechselstrom mit geringer Amplitude an eine Probe angelegt und die Frequenz des Wechselstroms variiert. Als Impedanz versteht man den komplexen Widerstand eines Stromkreises, der sich aus Widerständen, Kondensatoren und Induktoren zusammensetzt.

Die Antwort eines elektrischen Schaltkreises auf einen Wechselstrom wird bezüglich der Impedanz  $Z$  wie folgt definiert:

$$Z(f) = \frac{U(t)}{I(t)}$$

$U(t)$ : Spannung

$I(t)$ : Stromstärke

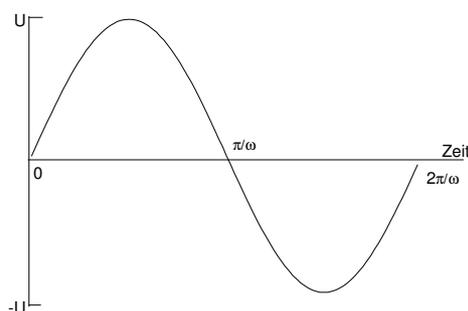
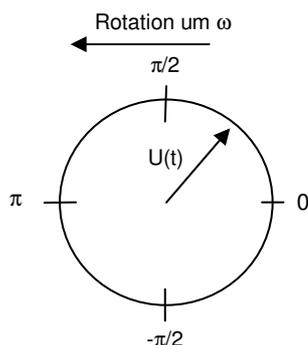
Die Messungen werden mit Hilfe einer oszillierenden, sinusförmigen Spannung  $U(t)$  durchgeführt:

$$U(t) = U_m \cdot \sin(\omega t)$$

$U_m$ : maximale Amplitude

$$U(t) = U_m e^{i\omega t}$$

$\omega$ : angelegte Frequenz



**Abb. II-23:** Vektordiagramm für eine alternierende Spannung.

Dieses sinusförmige Potenzial führt zu folgender Stromstärke:

$$I(t) = I_m \cdot \sin(\omega t + \theta)$$

$I_m$ : maximale Amplitude der Stromstärke

$\theta$ : Phasenunterschied zwischen dem

$$I(t) = I_m e^{i(\omega t + \theta)} = I_m \cdot e^{i\omega t} \cdot e^{i\theta}$$

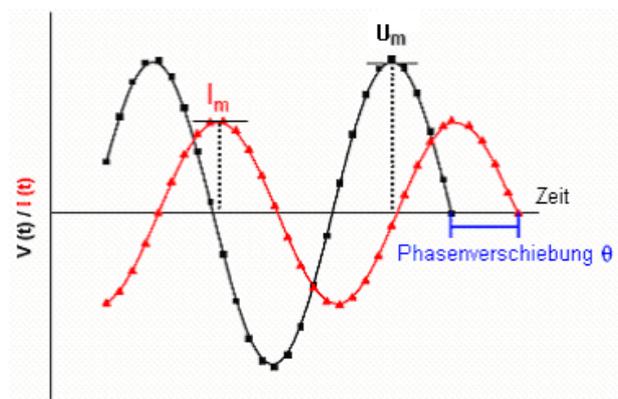
angelegten Potenzial und

der gemessenen Stromstärke

Die Amplitude der angelegten Spannung wird in der Regel in der Größenordnung der thermodynamischen Fluktuationen (10 – 25 mV) gewählt, um eine lineare Antwort des Systems zu erhalten.<sup>[157]</sup> Bei einer bestimmten Frequenz  $\omega$  ergeben sich damit folgende Polarkoordinaten der Impedanz  $Z$ :

$$|Z|(\omega) = \frac{|U|(\omega)}{|I|(\omega)} \quad \text{und} \quad \theta(\omega)$$

Das Impedanzspektrum wird durch fortlaufende Messungen von  $I(\omega)$  erhalten. Zeigt das System eine lineare Antwort auf eine angelegte Spannung, erhält man eine Sinuskurve, deren Amplitude und Phase meist vom Eingangssignal verschoben ist. Bei einem Kondensator gibt  $Z$  an, wie der Durchfluss von Ionen von dem betrachteten System verhindert wird. Bei einem idealen Kondensator ist der Phasenunterschied zwischen Spannung und Stromstärke genau  $\pi/2$ . Bei einem einfachen Widerstand tritt keine Phasenverschiebung auf,  $\theta = 0$  (Abb. II-24).



**Abb. II-24:** Antwort der Stromstärke auf eine Sinuswelle mit einer Phasenverschiebung von  $\pi/2$ .  $I_m$ ,  $U_m$ : maximale Amplitude der Stromstärke bzw. Spannung.

Diese Unterschiede kommen einfach gesehen dadurch zustande, dass Ladungen einen Widerstand direkt passieren können, einen Kondensator jedoch nicht. Die resultierende Stromstärke aus einer modulierten Spannung ergibt sich damit direkt aus dem Ohmschen Gesetz.

$$I(t) = \frac{U(t)}{R} = \frac{U_m e^{i\omega t}}{R}$$

$$Z_R = \frac{U}{I} = \frac{R \cdot \frac{U_m e^{i\omega t}}{R}}{\frac{U_m e^{i\omega t}}{R}} = R$$

Für einen Widerstand ist damit die Impedanz  $Z$  gleich dem Widerstand  $R$  und somit frequenzunabhängig.

Ein Kondensator besteht aus zwei Platten, welche durch einen Isolator/Dielektrikum voneinander getrennt sind. Die Stromleitung ist damit indirekt und kommt durch die anziehenden und abstoßenden Kräfte der Elektronen auf beiden Seiten der Kondensatorplatten durch deren Potentialänderungen zustande. Die Impedanz berechnet sich wie folgt:

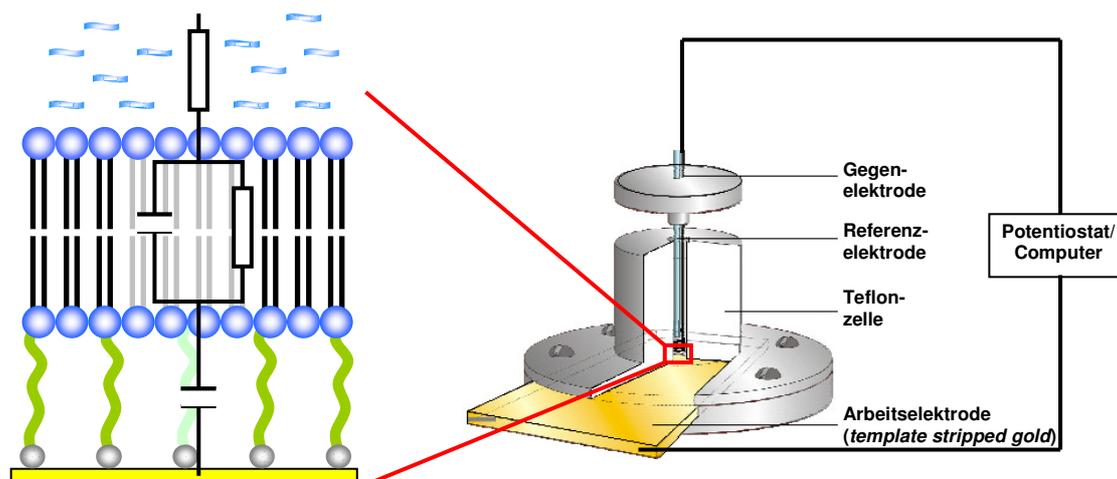
$$I(t) = C \frac{dU}{dt} = i\omega C \cdot U_m e^{i\omega t}$$
$$Z_c = \frac{U}{I} = \frac{U_m e^{i\omega t}}{i\omega C \cdot U_m e^{i\omega t}} = \frac{1}{i\omega C}$$

Die Kondensatorantwort ist frequenzabhängig und um  $90^\circ$  versetzt zu der des Widerstands. Die Gesamtimpedanz eines Systems setzt sich aus den Impedanzen der einzelnen Komponenten zusammen. Somit kann in einem realen Schaltkreis aus Widerständen und Kondensatoren die Phasenverschiebung zwischen 0 und  $\pi/2$  liegen und sie ändert sich mit der Frequenz.

Eine Impedanz-Messung ist zeitaufwändig, da die Anzahl an Frequenzen und gemessenen Zyklen pro Frequenz die Zeitauflösung zwischen zwei Spektren beschränken. Um dem System Zeit zum Equilibrieren zu geben und damit die Messgenauigkeit zu erhöhen, wird eine Zeitverzögerung von zwei Sekunden zwischen zwei verschiedenen Frequenzen eingestellt. Die in dieser Arbeit dargestellten Spektren sind alle mit einer Laufzeit von 20 bis 30 Minuten aufgenommen worden.

### II.4.2 Setup

In dieser Arbeit wurden für die Impedanz-Messungen verschiedene Potentiostaten von Metrohm (Autolab Pgstat 12 Impedanz-Spektrometer, Filderstadt, Deutschland) und Zahner Messtechnik (IM 6, Kronach, Deutschland) verwendet. Es wurde eine sinusförmige Spannung angelegt, die Stromantwort gemessen und die Impedanz in Polarkoordinaten direkt berechnet. Der Potentiostat ist mit der Messzelle, die sich in einem Faraday-Käfig befindet, verbunden und wird von einem Computer (Pentium III, Windows XP bzw. Windows 98) über die Software FRA (Frequency Response Analysis, Version 4.9) im Falle des Autolabs und Thales im Falle des Zahners gesteuert (Abb. II-25).



**Abb. II-25:** Schematischer Aufbau einer Impedanz-Zelle, die Membran ist zur besseren Veranschaulichung mit Ersatzschaltbild herausvergrößert.

Die Spektren werden mit einer Spannungsamplitude von 10 mV in einem Frequenzbereich von 100 kHz bis 2 - 3 mHz aufgenommen.

Die Messzelle besteht aus drei Teilen: a) der Boden, auf dem der TSG-Slide aufliegt, b) ein Zylinder, in dem sich ein zylinderförmiges Loch, das mit einem O-Ring den Übergang zum TSG-Slide abdichtet, mit einem Volumen von 1 mL befindet. Außerdem werden Boden und Zylinder mit vier Schrauben verbunden, was das System zusätzlich abdichten soll. c) ein Deckel in dem sich die Messelektrode (Ag/AgCl, Dri Ref 2; World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) und die Gegenelektrode (gewickeltes Pt,  $\varnothing = 0,8$  mm, 99,9% rein; Mateck, Jülich, Deutschland) befinden. Desweiteren verfügt die Messzelle über ein- und ausgehende Schläuche, durch die mit Hilfe von Spritzen das System relativ störungsfrei gespült werden kann. Die untersuchte Fläche der Arbeitselektrode ist  $0,28 \text{ cm}^2$ , die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind aber alle auf  $1 \text{ cm}^2$  normiert. Die Auswertung der aufgenommenen Spektren erfolgte über ZView (Version 2.9, Scribner Associates, NC, USA).

### II.4.3 Darstellung und Auswertung der Impedanz-Spektren

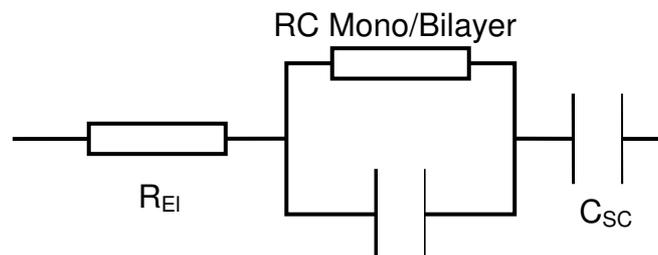
Die Darstellung und Auswertung der Impedanz-Spektren hängt stark vom vermessenen System ab. In dieser Arbeit wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse immer das gleiche physikalische System (TSG-Slide mit DPhyTL-Monolayer + DPhyPC, s. Einleitung) untersucht und

mit immer dem gleichen Äquivalenzschaltbild gefittet. Änderungen an diesem System können anhand der Impedanz  $Z(\omega)$  und der Admittanz  $Y(\omega)$  abgelesen werden.

$$Y(\omega) = \frac{1}{Z(\omega)}$$

Beide können in komplexer Form oder als Polarkoordinaten angegeben werden. Andere elektrochemische Größen wie die komplexe dielektrische Konstante  $\varepsilon(\omega)$  können aus  $Z(\omega)$  und  $Y(\omega)$  abgeleitet werden.<sup>[157]</sup>

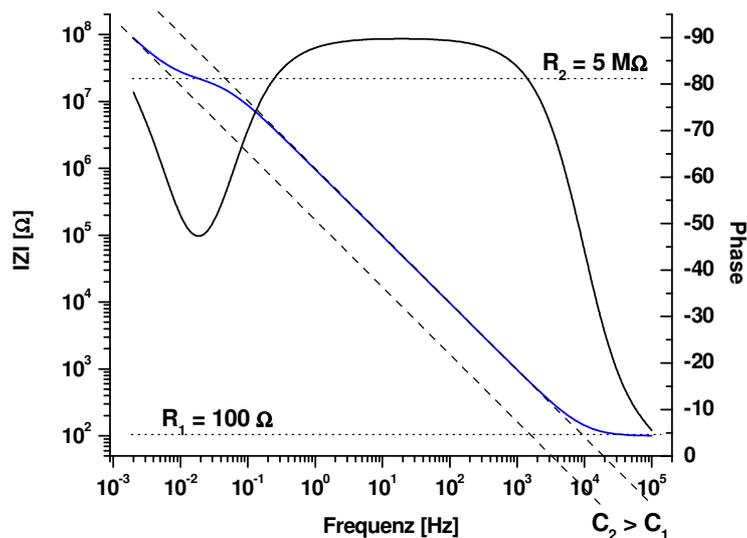
Das in dieser Arbeit verwendete Ersatzschaltbild ist in Abb. II-26 dargestellt. Es besteht aus einem Widerstand  $R_{EI}$ , der den Elektrolyten repräsentiert, zu dem ein RC-Element, das die ohmschen und kapazitiven Effekte des Mono- oder Bilayers darstellt, in Serie geschaltet ist. Außerdem noch ein in Reihe geschalteter Kondensator (*space charge capacitance*), der die elektrochemischen Effekte an der Goldelektrode und in der Spacer-Region des Lipids repräsentiert.



**Abb. II-26:** Ersatzschaltbild, das in dieser Arbeit verwendet wurde.

Impedanz-Spektren werden bei verschiedenen Frequenzen von verschiedenen Elementen des Ersatzschaltbildes dominiert, wobei  $C_{SC}$  idealerweise konstant bleibt. In den höheren Frequenzen ist der Einfluss von  $R_{EI}$  sehr hoch, in den niedrigeren dominiert der von  $R_{Mono/Bi}$ .

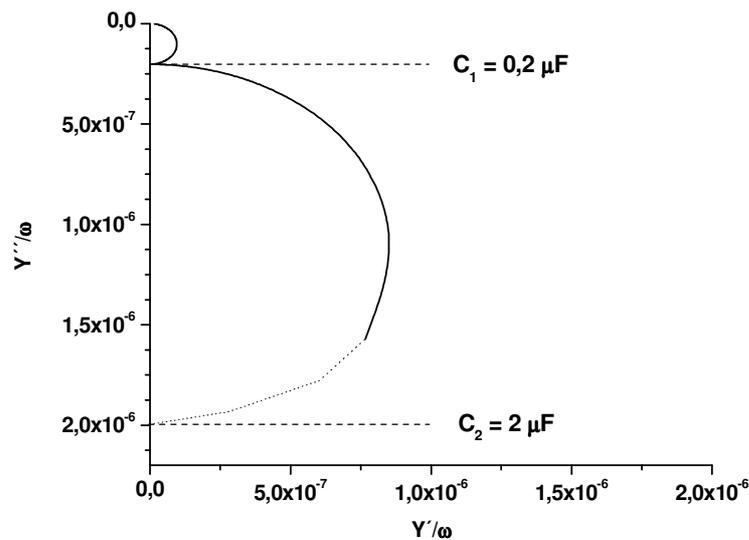
In Abb. II-27 sind die absoluten Beträge der Impedanz  $|Z|$  und die Phase  $\theta$  logarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen (Bode-Plot).



**Abb. II-27:** Bode-Plot einer Lipiddoppelschicht.

Die Impedanz (Abb. II-27, blaue Kurve) zeigt zwei Bereiche mit einer Steigung von  $-1$ . Der erste liegt zwischen  $5000$  und  $1$  Hz, der zweite im Niedrigfrequenzbereich unterhalb von  $0,01$  Hz. Die Impedanz in diesen Frequenzbereichen ist ausschließlich kapazitiv, was eine Phasenverschiebung von  $-90^\circ$  zur Folge hat. Der Kondensator  $C_2$  im Niedrigfrequenzbereich hat eine höhere Kapazität als  $C_1$ . Außerdem zeigt die Impedanzkurve zwei flache Bereiche ( $50.000$  Hz und  $0,1$  Hz) in denen die ohmschen Effekte dominieren; aus diesen Bereichen können vorläufige Werte für die Impedanz und damit für die Widerstände abgelesen werden ( $Z = R$ ). Der Widerstand für den Elektrolyten  $R_{EI}$  ( $50.000$  Hz) liegt bei  $100 \Omega$ , der für den Mono/Bilayer  $R_{Mono/Bi}$  ( $0,1$  Hz) bei  $5 M\Omega$ .

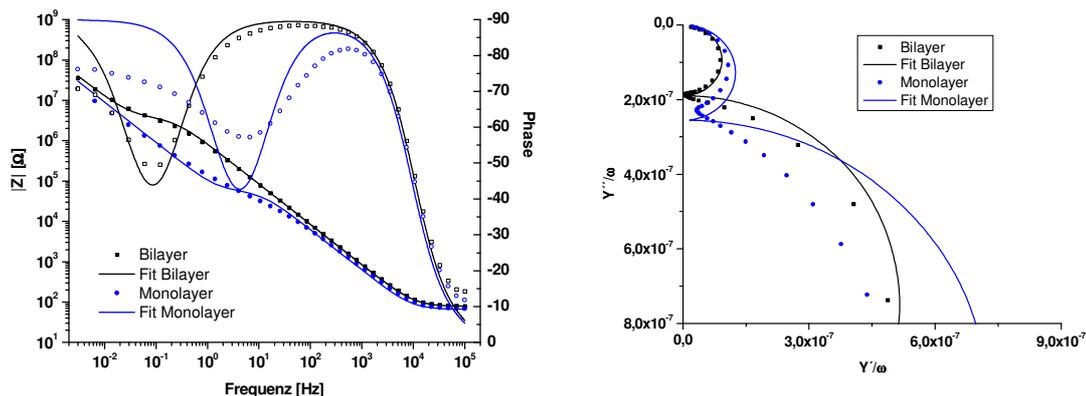
Aus dem Bode-Plot kann man somit direkt die Werte der Widerstände ablesen, die der Kondensatoren können jedoch nur im Admittanz-Plot gesehen werden. Hier wird der Imaginärteil der Impedanz dividiert durch die Frequenz gegen den entsprechenden Realteil aufgetragen. Diese Darstellung zeigt somit eine frequenzunabhängige Kapazität.



**Abb. II-28:** Admittanz-Plot eines Bilayers.

In Abb. II-28 ist der Admittanz-Plot eines Bilayers dargestellt. Er besteht aus zwei Halbkreisen, die jeweils einem Kondensator entsprechen. Der Wert des ersten Kondensators  $C_{\text{Mono/Bi}}$  kann an der extrapolierten Schnittstelle des kleineren Halbkreises mit der y-Achse abgelesen werden, er liegt bei  $0,2 \mu\text{F}$ . Der Wert des zweiten Kondensator  $C_{\text{SC}}$  wird durch Extrapolation des zweiten Halbkreises abgelesen,  $C_{\text{SC}} = 2 \mu\text{F}$ .

Beim Aufbau eines Bilayers aus einem Monolayer ändert sich die Kapazität dahingegen, dass der Wert des ersten Kondensators abnimmt. Im Bode-Plot sieht man eine Vergrößerung des Widerstandes (Abb. II-29), dies kann auf die geringere Ionendurchlässigkeit der nun dichteren Schicht zurückgeführt werden.



**Abb. II-29:** Vergleich eines Mono- und Bilayers im Bode-Plot (links) und Admittanz-Plot (rechts). Es handelt sich um experimentelle Daten.

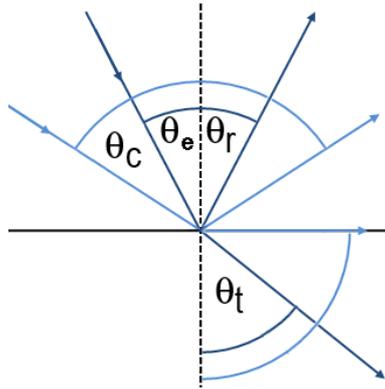
## II.5 Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie, SPR

Die Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance* SPR) wird vor allem eingesetzt, um molekulare Wechselwirkungen wie das Anbinden eines Analyten auf Sensoroberflächen zu untersuchen. Außerdem dient sie als optische, nicht invasive Methode zur Untersuchung dünner Filme oder kinetischer Prozesse, wie z.B. dem Quellen von Hydrogelen.<sup>[162-164]</sup>

### II.5.1 Theorie

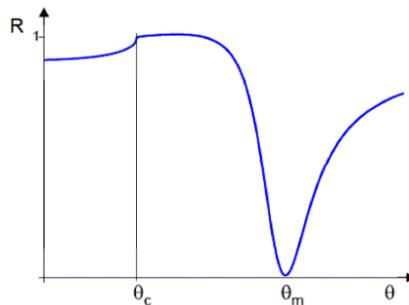
Oberflächenplasmonen können an der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex angeregt werden. Dies geschieht mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bei einem Winkel, der größer als die Totalreflexion ist. Dabei wird die Energie der Photonen an einer Metalloberfläche auf Elektronenpakete, Plasmonen, übertragen. Dieser Energietransfer tritt jedoch nur bei einer spezifischen Resonanzwellenlänge auf, bei der die Quantenenergie der Photonen genau mit dem Energieniveau der Plasmonen übereinstimmt.

Tritt ein Laserstrahl von einem optisch dichteren Medium (z.B. Glas) in ein optisch dünneres ein, ergibt sich bei einem bestimmten kritischen Winkel  $\theta_c$  Totalreflexion (Abb. II-30).



**Abb. II-30:** Reflexion und Lichtbrechung an einer Grenzfläche (optisch dichter zu optisch dünner)

Dabei entsteht durch die reflektierten Photonen ein elektrisches Feld auf der entgegengesetzten Seite der Grenzfläche.<sup>[165]</sup> Dieses klingt exponentiell ab (evaneszente Welle). Der Effekt der evaneszenten (exponentiell abfallenden) Welle kann durch Aufbringen einer dünnen Metallschicht (z.B. Gold oder Silber) verstärkt und damit nutzbar für die Spektroskopie gemacht werden.<sup>[166]</sup> Wird der Einfallswinkel genau eingestellt, überlappt das evaneszente Feld der Totalreflexion mit dem Oberflächenplasmon und es ergibt sich eine Resonanz. Wird die Reflektivität gegen den Winkel aufgetragen, ist bei diesem Winkel  $\theta_M$  ein Minimum im Spektrum sichtbar (Abb. II-31).



**Abb. II-31:** Reflektivität  $R$  gegen Strahlungswinkel  $\theta$ ; ist der Winkel größer als  $\theta_c$  sinkt die Reflektivität bis bei  $\theta_m$  die meisten Oberflächenplasmonen eingekoppelt werden.

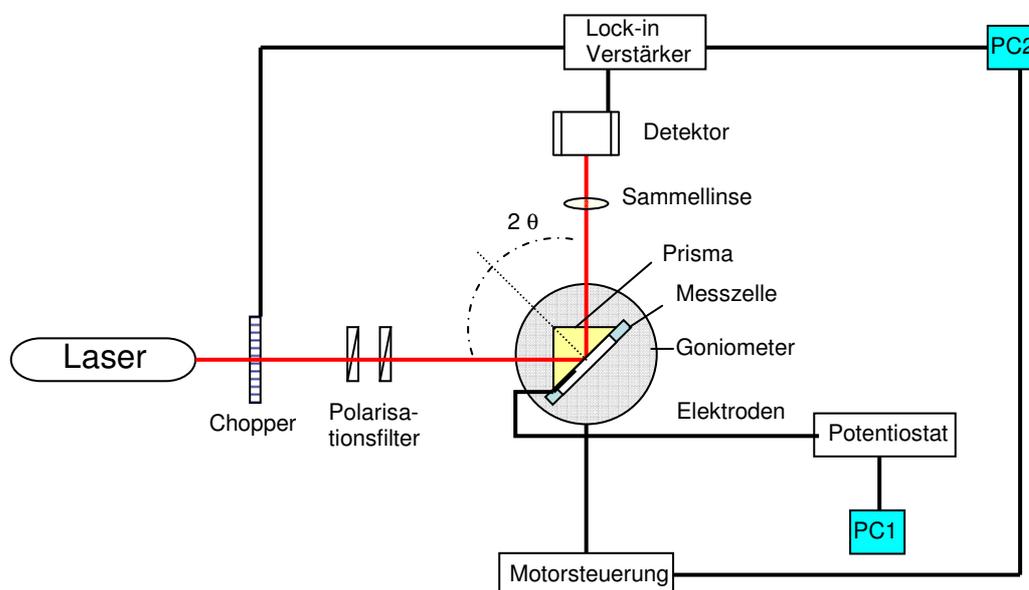
Wird die Metalloberfläche verändert z.B. durch Anbinden eines Polymers kann dies durch Verschiebung des Minimums detektiert werden. Die Schichtdicke  $d$  des adsorbierten Films kann bei bekanntem Brechungsindex  $n$  durch Veränderung des Winkels  $\Delta\theta_m$  wie folgt berechnet werden.

$$\Delta\theta_m \propto n \cdot d$$

In diesem Fall wird für die hier betrachteten biologischen Systeme ein Brechungsindex von 1,41 angenommen<sup>[167, 168]</sup>, um damit die relativen Schichtdicken berechnen zu können.

### II.5.2 Setup

In dieser Arbeit wurde eine SPR-Messung immer in Kombination mit einer EIS-Messung durchgeführt. Dafür wurde eine spezielle Messzelle verwendet, die durch Befestigung eines Prismas zur SPR-Spektroskopie genutzt werden kann und mit der gleichzeitig durch Anschluss dreier Elektroden Impedanzspektren gemessen werden können (Abb. II-32).



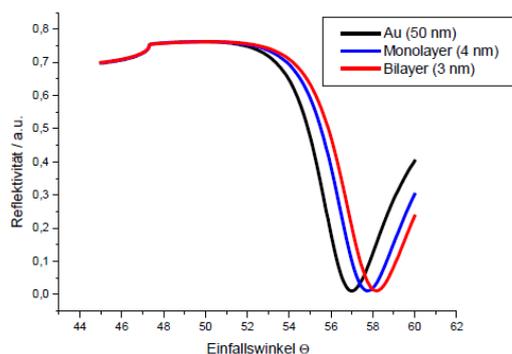
**Abb. II-32:** Aufbau eines SPR-Spektrometers in Kombination mit EIS.

Der p-polarisierte Laserstrahl (He/Ne,  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) passiert zunächst den Chopper, der zur Lock-in Detektion dient. Nach zwei Polarisationsfiltern zur Abschwächung bzw. Polarisation trifft der Strahl auf das LASFN9-Prisma, von dem er reflektiert wird und durch die Sammellinse fokussiert auf den Detektor trifft. Unterhalb des Prismas befindet sich der zu untersuchende *TSG-Slide*, der über ein Immersionsöl, das über den gleichen Brechungsindex ( $n = 1,7$ ) wie das Prisma verfügt, mit dem Prisma verbunden ist. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird in Abhängigkeit vom Winkel  $\theta$  gemessen. Detektor und Prisma mit *TSG-Slide* sind auf einem Goniometer installiert, um

verschiedene Messmethoden wie z.B. einen Scan über ein Winkelintervall (Scan-Modus) oder eine kinetische Messung bei konstantem Winkel (Kinetik-Modus) durchführen zu können.

### II.5.3 Messmethoden: Scan- und Kinetik-Modus

Im Scan-Modus werden Reflektivitätsänderungen in Abhängigkeit vom Einfallswinkel gemessen. Durch Adsorption auf der untersuchten Oberfläche ändert sich der Brechungsindex, was durch eine Verschiebung des Minimumwinkels  $\theta_m$  detektiert werden kann (Abb. II-33).



**Abb. II-33:** SPR-Scans; eine Zunahme der Schichtdicke resultiert in einer Verschiebung des Minimums zu größeren Winkeln.

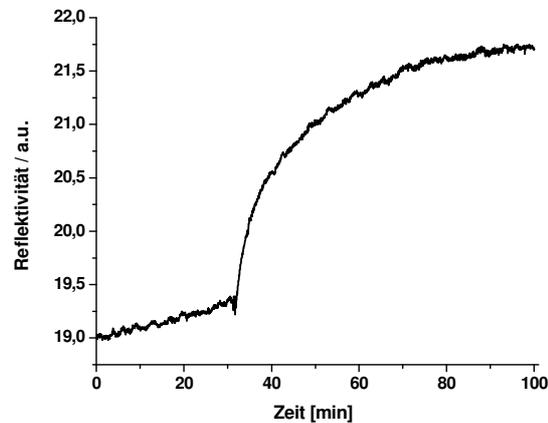
Die SPR-Scans werden mit der Software *Winspill* (MPIP Mainz, Jürgen Worm, Version 3.0) gefittet, dabei werden die in Tab. II-3 aufgeführten Werte zur Berechnung der Fits verwendet.<sup>[169]</sup>

**Tab. II-3:** Parameter zum Fitten eines SPR-Scans<sup>[169]</sup>.

Material	Schichtdicke [nm]	Brechungsindex	Adsorptionskoeffizient
Prisma (LASFN9)	$\infty$	1,845	-
Gold	50	0,18	3,45
Monolayer	4	1,5	-
Bilayer	3	1,45	-
Elektrolyt	$\infty$	1,33	-

Wird der Winkel konstant gehalten, kann im Kinetik-Modus gemessen werden. Dabei wird die Änderung der Reflektivität in Abhängigkeit von der Zeit

gemessen. Der Winkel ist dabei nicht beliebig, er sollte im linearen Bereich des zuvor gemessenen SPR-Scans bei ca. 20 – 25% der Reflektivität liegen. In diesem Bereich ändert sich die Reflektivität bei einer Änderung des Brechungsindex sehr stark, die Kinetik-Messung ist somit sehr empfindlich.



**Abb. II-34:** Kinetik-Messung einer Vesikelfusion.

Mit Hilfe einer Kinetik-Messung kann somit direkt die Assoziation, wie z.B. Vesikelfusion (Abb. II-34) oder Dissoziation von Molekülen auf der untersuchten Oberfläche detektiert werden.<sup>[170]</sup>

### II.6 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

*Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) kann zur Aufklärung der molekularen Mobilität von diffundierenden Spezies in einer zweidimensionalen Matrix wie z.B. einer Lipidmembran genutzt werden.<sup>[171]</sup> Aus den Messergebnissen können Diffusionskoeffizienten und die prozentuale Erholung nach dem Bleichen errechnet werden. Der Vorteil von FRAP gegenüber anderen Methoden wie z.B. Neutronen-Streuung liegt darin, dass die Diffusion auch über größere Strecken gemessen werden kann.

### II.6.1 Theorie

Für die Diffusion in homogenen Lipiddoppelschichten wurden zwei Theorien postuliert, ein hydrodynamisches Modell für die Diffusion von Partikeln die größer als das Lösungsmittel sind und ein volumenfreies Modell. Das erste Modell beschreibt sehr gut die Diffusion integraler Membranproteine,<sup>[172, 173]</sup> das zweite ist vor allem für die Lipiddiffusion geeignet.<sup>[174, 175]</sup>

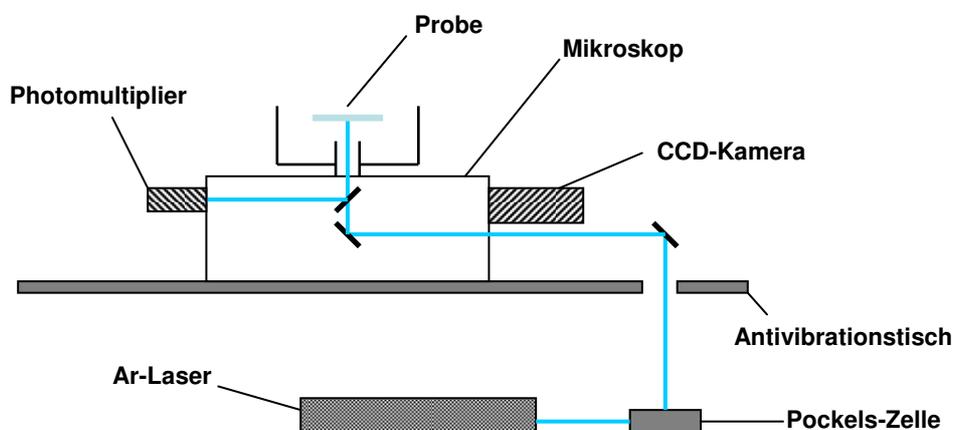
Der Diffusionskoeffizient  $D$  wird in einem homogenen, zweidimensionalen System wie folgt definiert:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt$$

$\langle r^2 \rangle$ : mittlere quadratische  
 Verschiebung  
 t: Zeit

### II.6.2 Setup und Auswertung der Messdaten

Die Messungen wurden an einem selbst zusammengestellten FRAP-Setup durchgeführt, das aus einem Olympus IX70 Mikroskop und einem Innova 90 Laser (Coherent Inc., Santa Clara, USA) besteht. Der Aufbau ist in Abb. II-35 dargestellt.<sup>[176]</sup>

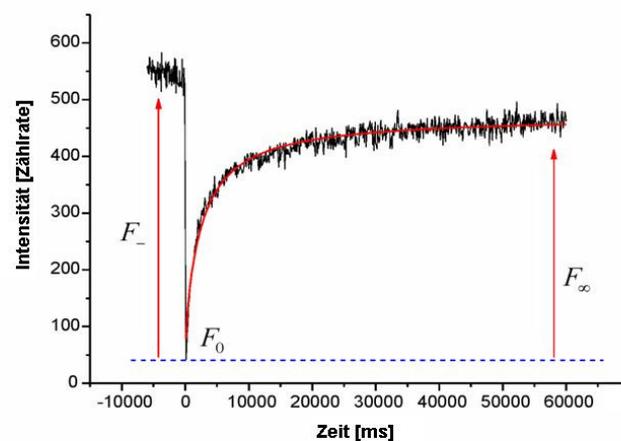


**Abb. II-35:** Aufbau eines FRAP-Setups.

Die laterale Diffusion von Molekülen kann nur in Anwesenheit von Fluorophoren ermittelt werden. Diese können z.B. an Lipide oder Membranproteine gebunden sein. Die Messungen erfolgen in dieser Arbeit an sBLMs (Kap. I.2.4.1), die durch Fusion von DPhyPC-Vesikeln auf einem Objektträger erzeugt werden. Ein kleiner Bereich der Membran ( $\varnothing = 4,5 \mu\text{m}$ )

wird mit niedriger Laserintensität ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) beleuchtet, dabei werden die Fluorophore angeregt. Die Fluoreszenz-Intensität wird dabei von einem Photomultiplier aufgenommen. Dann wird die Intensität des Lasers kurzzeitig ( $t = 60 \text{ ms}$ ) auf  $2 \text{ W}$  erhöht, was eine schnelle, irreversible Photolyse der Fluorophore (mehr als 90% werden gebleicht) hervorruft. Findet keine laterale Diffusion statt, bleibt das Fluoreszenz-Signal konstant niedrig. Findet eine Diffusion statt, kann ein Anstieg des Signals gemessen werden, da die ungebleichten Fluorophore aus der nicht photolysierten Umgebung in den gebleichten Bereich hineindiffundieren (Abb. II-36). Dabei ist die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz-Erholung proportional zu der lateralen Diffusionskonstante.

Es werden außerdem die zwei folgenden Annahmen gemacht. Während der Aufnahme des Fluoreszenz-Signals ist die Laser-Intensität so gering, dass eine vernachlässigbare Photolyse stattfindet und innerhalb einer Zeitspanne, die im Vergleich zur Diffusionszeit kurz ist, können alle Fluorophore irreversibel gebleicht werden.



**Abb. II-36:** Beispiel für eine FRAP-Messung mit Fit-Kurve (rot).

Die erhaltene Messkurve wird mit der Simplex-Methode mit Hilfe des Programms *Frapfit* (MPIP Mainz, Jürgen Worm, Version 1.5) gefittet, wodurch man die Diffusionskoeffizienten erhält.<sup>[171]</sup>

$$f(t) = F_\infty - [F_\infty - F_0] \cdot \left\{ 1 - e^{-\frac{2\tau_D}{t}} \cdot \left[ I_0\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) \right] \right\}$$

$$\tau_D = \frac{\langle r^2 \rangle}{4D}$$

$l_0, l_1$ : Bessel-Funktionen 0. und 1. Ordnung

$\tau_D$ : charakteristische Diffusionszeit

Außerdem kann die prozentuale Erholung berechnet werden (Abb. II-36):

$$\text{relative Erholung} = \frac{F_{\infty} - F_0}{F_{-} - F_0} \cdot 100 \%$$

$F_{-}$ : Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen

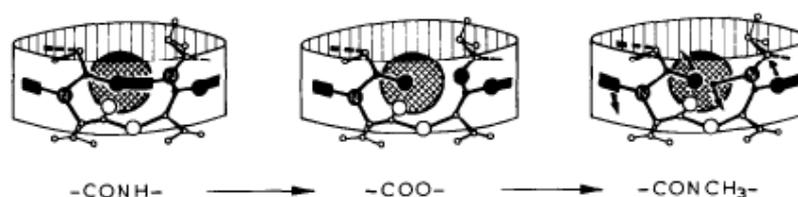
$F_0$ : Intensität direkt nach dem Bleichen

$F_{\infty}$ : regenerierte Fluoreszenz

## III Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Sensors auf Basis des Ionencarriers Valinomycin, inkorporiert in künstliche Membranen (hier: tBLMs). Dazu musste Valinomycin zunächst modifiziert werden. Das modifizierte Valinomycin muss dabei folgende Bedingungen erfüllen: 1) Fähigkeit, ausreichend stabile  $K^+$ -Komplexe zu bilden; 2) Ausreichende Abschirmung der hydrophilen Bereiche des Moleküls; 3) ausreichend hohe Lipophilie, um das Membraninnere passieren zu können.<sup>[59]</sup>

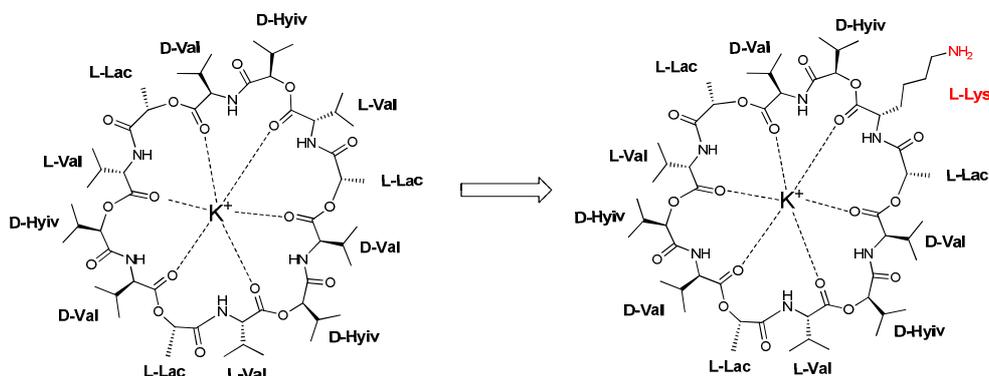
Ovchinnikov synthetisierte Valinomycin-Analoga und fand heraus, dass der Austausch einer Hydroxysäure gegen eine Aminosäure die Komplexierungsfähigkeit des Carriers enorm verringert ( $\sim$  Faktor 1000).<sup>[59]</sup> Dies ist auf den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zurückzuführen (Abb. III-1, Mitte). Wird eine Aminosäure durch eine *N*-methylierte Aminosäure ausgetauscht, geht die Komplexierungsfähigkeit komplett verloren (Faktor 100.000), da nicht nur ein Proton für die Wasserstoffbrückenbindungen fehlt, sondern auch eine sterische Hinderung der benachbarten Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt (Abb. III-1, rechte Seite).



**Abb. III-1:** Schematische Darstellung des Ersatzes einer Amidbindung (linke Seite) durch eine Esterbindung (Mitte) bzw. durch eine *N*-methylierte Amidbindung (rechte Seite) in Valinomycin. Die schwarzen dicken Balken, stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar.<sup>[59]</sup>

Der Austausch einer Aminosäure gegen eine andere führt jedoch nur zu einem geringen Rückgang der Komplexierungsfähigkeit.<sup>[59, 61, 62]</sup> In dieser Arbeit wurde daher ein *L*-Valin durch ein *L*-Lysin ausgetauscht, was die

Möglichkeit zum Anbinden unterschiedlichster Moleküle an die freie Aminogruppe eröffnet (Abb. III-2, rechte Seite).



**Abb. III-2:** Struktur von natürlichem Valinomycin (linke Seite) im Vergleich mit Lysin-Valinomycin (rechte Seite).

Der Austausch von *L*-Valin bot sich insofern an, da *L*-Aminosäuren kostengünstiger und in einer größeren Vielfalt kommerziell erhältlich sind.

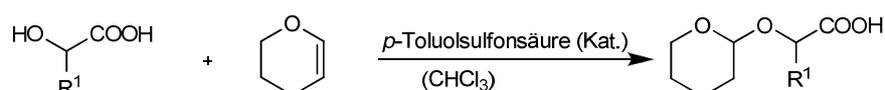
#### III.1 Synthesestrategien

Zyklische Depsipeptide wie Valinomycin können entweder durch Festphasensynthese oder durch Synthese in Lösung hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der Festphasensynthese sowie eine Lösungssynthese angewandt. Die Vorteile der Festphasensynthese sind die kurzen Reaktionszeiten, die einfache Aufreinigung der Reaktionsprodukte und quantitative Umsätze. In der Lösungssynthese muss dagegen nicht jede Aminosäure einzeln gekuppelt werden (serielle Synthese), sondern es können ganze Blöcke aneinander gebunden werden (konvergente Synthese). Im Folgenden werden die beiden Synthesestrategien genauer diskutiert und analysiert.

### III.1.1 Festphasensynthese

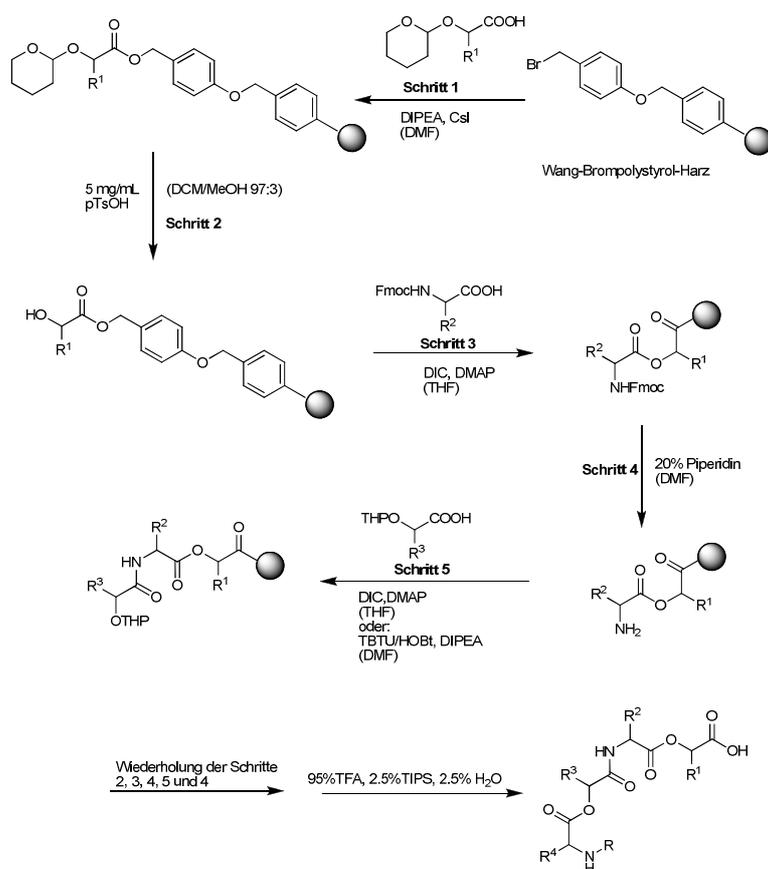
#### III.1.1.1 Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren

Die Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren erfolgte am Wang-Harz unter Verwendung der Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe (THP-Schutzgruppe) für die Hydroxylgruppen und der Fmoc-Schutzgruppe für die Aminogruppe. Die THP-geschützten Hydroxysäuren wurden nach White *et al.* mit guten Ausbeuten (60 – 80%) hergestellt (Abb. III-3).<sup>[177]</sup>



**Abb.III-3:** THP-Schützen einer Hydroxysäure.

Die Beladung des Harzes erfolgte mit 3 eq. THP-geschützter Hydroxysäure, 0,1 eq. Cäsiumiodid und 4 eq. DIPEA in DMF (Abb. III-4, Schritt 1) in einer Spritze (abgeschlossen durch eine Fritte).



**Abb. III-4:** Festphasensynthese mit einzelnen Amino- und Hydroxysäuren am Wang-Harz unter Verwendung von THP- und Fmoc-Schutzgruppen.

Nach einer Stunde Schütteln wurden die restlichen freien Benzylbromid-Gruppen mit Methanol gecappt und das Harz mehrmals mit DCM, DMF und nochmals DCM gewaschen. Die Spritze wurde über Nacht im Exsikator getrocknet und die Harzbeladung gravimetrisch bestimmt:

$$n = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(M_{Did} - M_{HBr}) \cdot m_2}$$

n: Belegungsdichte [mmol Did. / g belegtes Harz]

m<sub>1</sub>: Einwaage des unbeladenen Harzes [g]

m<sub>2</sub>: Einwaage des beladenen Harzes [g]

M<sub>Did</sub>: Molmasse des Didepsides [g/mol]

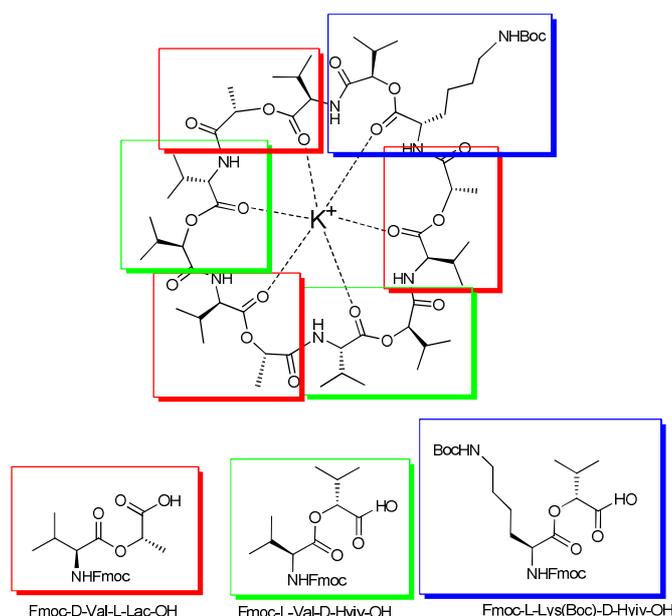
M<sub>HBr</sub>: 79,93 g/mol

Die Beladungsdichte des Harzes lag nie über 55%. Die Abspaltung der THP-Schutzgruppe erfolgte mit *p*-Toluolsulfonsäure in DCM/MeOH (97:3) (Schritt 2). Die Entschützung verlief aber nicht immer quantitativ, sie sollte kontinuierlich mit Hilfe von Testabspaltungen massenspektrometrisch überwacht werden. Wird dies nicht getan, kommt es zu Sequenzfehlern und Teilabspaltungen. Nach erfolgreicher THP-Entschützung wurde die erste Fmoc-geschützte Aminosäure mit 2 eq. DIC, 0,1 eq. DMAP in THF gekuppelt (Schritt 3). Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit 20% Piperidin in DMF (Schritt 4). Die nächste Kupplung mit der THP-geschützten Hydroxysäure funktionierte am besten mit TBTU/HOBt mit DIPEA in DMF (Schritt 5). Trotzdem waren mehrere Wiederholungen der Kupplung notwendig, da im Massenspektrum noch Edukt sichtbar war. Für jede Kupplung wurde somit das Vielfache von zwei Äquivalenten benötigt. Desweiteren waren die Testabspaltungen an dem vor Ort verfügbaren FD-Massenspektrometer nicht detektierbar und mussten extern mittels *Electrospray*-Ionisierung (ESI) charakterisiert werden. Dies war mit einem enormen Zeitaufwand verbunden und hat somit die sonst schnelle Festphasensynthese enorm verlangsamt.

Als nächste Synthesestrategie wurde versucht, im Vorfeld mittels Lösungssynthese hergestellte Didepsid-Bausteine an der festen Phase zu kuppeln, um somit die kritischere Esterknüpfung und die anschließende THP-Entschützung zu umgehen.

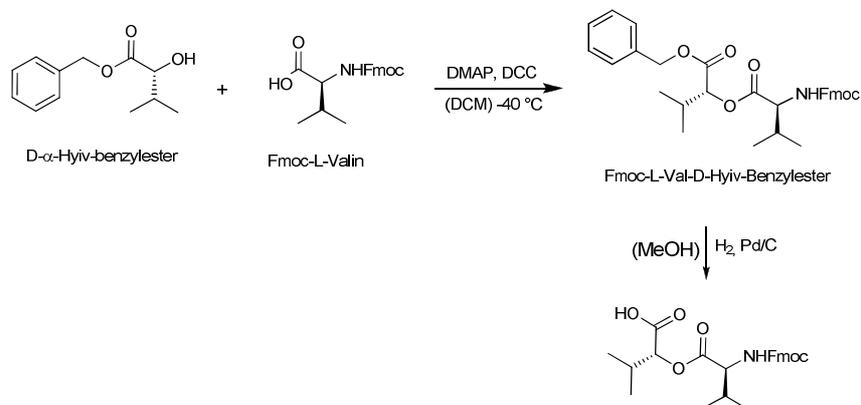
### III.1.1.2 Festphasensynthese mit Didepsidbausteinen

Die Festphasensynthese mit Didepsidbausteinen stellt eine gemischte Synthesestrategie dar, d.h. die Didepside wurden in Lösung synthetisiert und nach der Entschützung an die feste Phase gebunden. Zur Synthese von Lysin-Valinomycin werden die in Abb. III-5 dargestellten Didepsidbausteine benötigt.



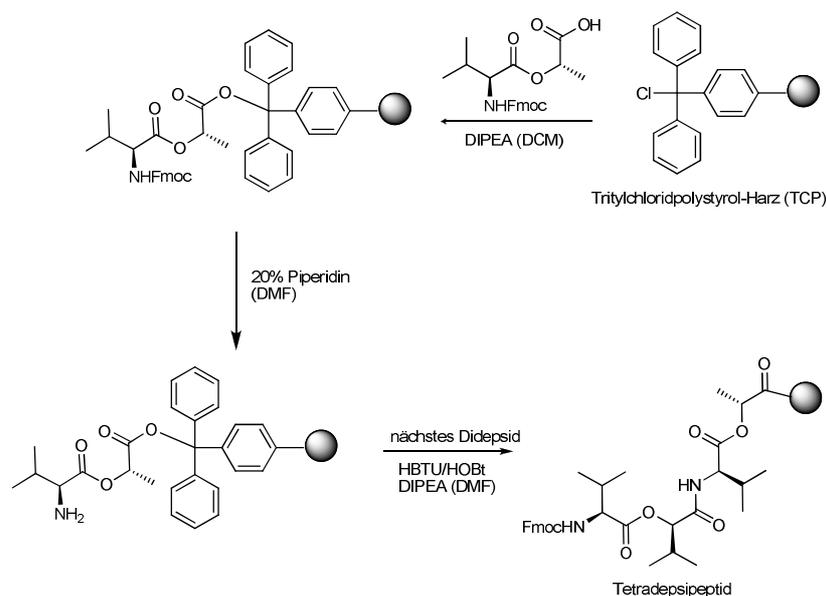
**Abb. III-5:** Didepside zur Valinomycin-Synthese an der festen Phase.

Die Synthese der Didepside erfolgte dabei nach der DCC-Methode (Kap. III.1.2). Nach dem Aufreinigen des Didepsids über Säulenchromatographie wurde die Benzyl-Schutzgruppe mit Hilfe von Pd/C und Wasserstoff abgespalten (Abb. III-6).



**Abb. III-6:** Kupplung einer Aminosäure mit einer Hydroxysäure zum Didepsid mit anschließender Benzyl-Entschützung.

Anschließend wurden die entschützten Dideptide an die feste Phase gebunden (Abb. III-7).



**Abb. III-7:** Syntheschema der Festphasensynthese am TCP-Harz mit Didepsid-Bausteinen.

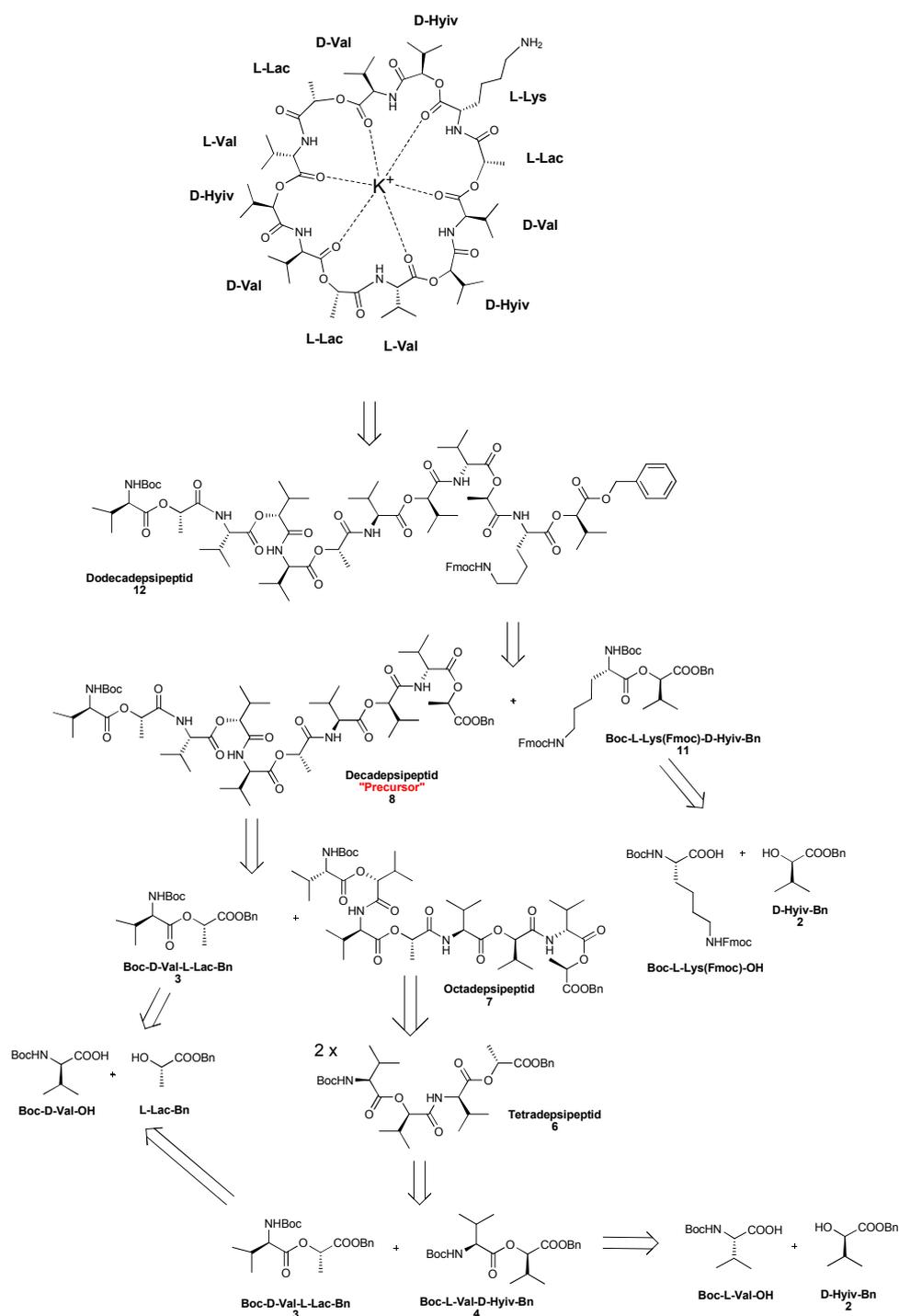
Die Fmoc-Schutzgruppe wurde gewählt, um unter den gleichen Bedingungen wie bei der Standard-Peptidsynthese arbeiten zu können.<sup>[93]</sup> Die Beladung des Harzes erfolgte mit 5,2 eq. DIPEA und 1,1 eq. Didepsid in absolutem DCM, bezogen auf 1,5 mmol Chlor / g Harz. Nach dem Cappen der restlichen freien Tritylchlorid-Gruppen mit Methanol wurde das Harz mehrmals mit DCM, DMF und nochmals DCM gewaschen. Die erreichten Belegungsdichten lagen hier bei 0,6 mmol / g Harz, was einem Umsatz von lediglich 40% der Tritylchlorid-Gruppen entspricht. Nach der Bestimmung der Harzbeladung wurde das Harz in DMF gequollen und zwei Mal für jeweils zehn Minuten mit 20% Piperidin-Lösung zur Fmoc-Abspaltung geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit DMF wurden 2 eq. Didepsid, 2 eq. HOBt, 2 eq. TBTU und 5,6 eq. DIPEA zum Harz gegeben und eine Stunde lang geschüttelt. Danach wurde in einer Testabspaltung eine kleine Menge Harz mit TFA versetzt, um eine Probe für die Massenspektrometrie zu erhalten. Hier entsprach jedoch kein Peak der erwarteten Masse. Eine Ursachenforschung ergab, dass schon die eingesetzten Dideptide nicht sauber waren. Dies lag daran, dass die  $\alpha$ -Hydroxysäuren benzyl-geschützt eingesetzt wurden. Bei der Hydrierung

jedoch kann neben der gewünschten Benzyl-Abspaltung zusätzlich die Fmoc-Gruppe abgespalten werden, was bei der anschließenden Kupplung zu unerwünschten Oligomerisierungsprodukten führt.

Von einer Weiterführung dieser Synthesestrategie wurde abgesehen, da eine Schutzgruppenumstellung dazu geführt hätte, dass nicht nur die  $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure im großen Maßstab (es sind große Überschüsse nötig) selbst hätte hergestellt werden müssen, sondern zusätzlich dazu auch die Milchsäure. Dieser hohe Materialverbrauch und die notwendige massenspektrometrische Überwachung aller Kupplungen und Entschützungen machten auch diese Synthesestrategie wenig rentabel. Sie wurde zugunsten der Synthese in Lösung aufgegeben.

#### **III.1.2 Synthese in Lösung**

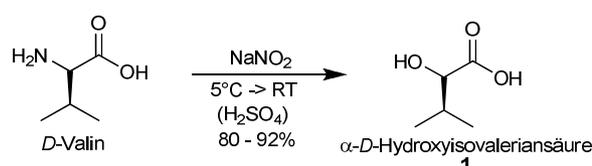
Bei der Synthese in Lösung wurden sowohl die Ester- als auch die Amidbindungen mit Hilfe von *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt. Dabei kamen fast ausschließlich Boc- und Benzyl-Schutzgruppen zum Einsatz. In Abb. III-8 ist die Retrosynthese dargestellt. Für alle in der Arbeit beschriebenen Valinomycin-Derivate wurde zunächst das Decadepsipeptid als *Precursor* hergestellt und dieser dann mit verschiedenen modifizierten Didepsiden zu den verschiedenen Valinomycin-Varianten umgesetzt.



**Abb. III-8:** Retrosynthese von Lysin-Valinomycin.

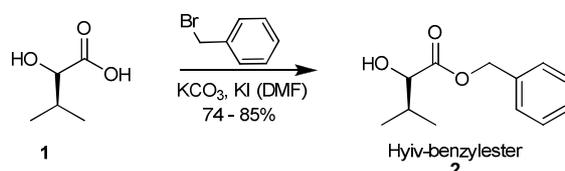
Alle Edukte bis auf die  $\alpha$ -D-Hydroxyisovaleriansäure (**1**) waren kommerziell mit den passenden Schutzgruppen erhältlich. Die  $\alpha$ -D-Hydroxyisovaleriansäure (**1**) musste aus D-Valin hergestellt und dann Benzyl-geschützt werden. Zunächst wurde die Diazotierung von D-Valin nach Zubia *et al.* durchgeführt, dieser Syntheseweg führte jedoch nur zu geringen Ausbeuten (9 – 35%).<sup>[178]</sup>

Dies lag hauptsächlich daran, dass bei dieser Methode die Reaktion bei 0 °C durchgeführt wurde, wodurch nicht alle Aminogruppen umgesetzt wurden. Wesentlich besser funktionierte die Methode nach Losse und Bachmann, mit der Ausbeuten von 80 – 92% erhalten werden konnten (Abb. III-9).<sup>[74]</sup> Dabei wurde die Natriumnitrit-Lösung bei 5 °C langsam zugegeben und die Reaktionsmischung über 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



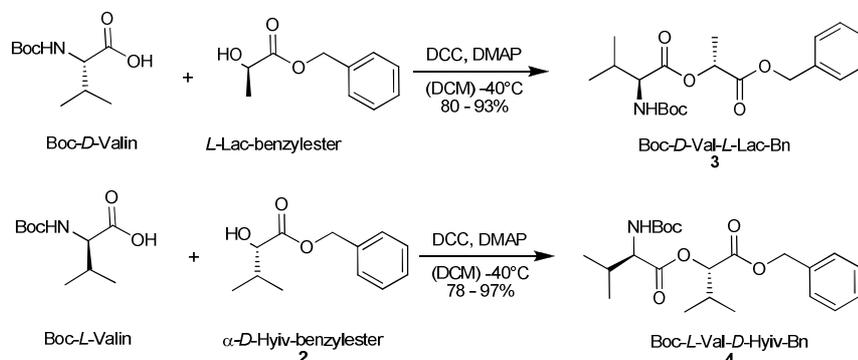
**Abb. III-9:** Synthese von  $\alpha$ -*D*-Hydroxyisovaleriansäure (**1**) nach Losse und Bachmann.<sup>[74]</sup>

Die Veresterung mit Benzylbromid zu **2** erfolgte zunächst mit Cäsiumcarbonat in MeOH/DMF mit mittelmäßigen Ausbeuten (58%).<sup>[179]</sup> Höhere Ausbeuten (74 – 85%) konnten in DMF mit Kaliumcarbonat und katalytischen Mengen an Kaliumiodid erhalten werden (Abb. III-10).



**Abb. III-10:** Synthese von Hydroxyisovaleriansäurebenzylester (**2**).

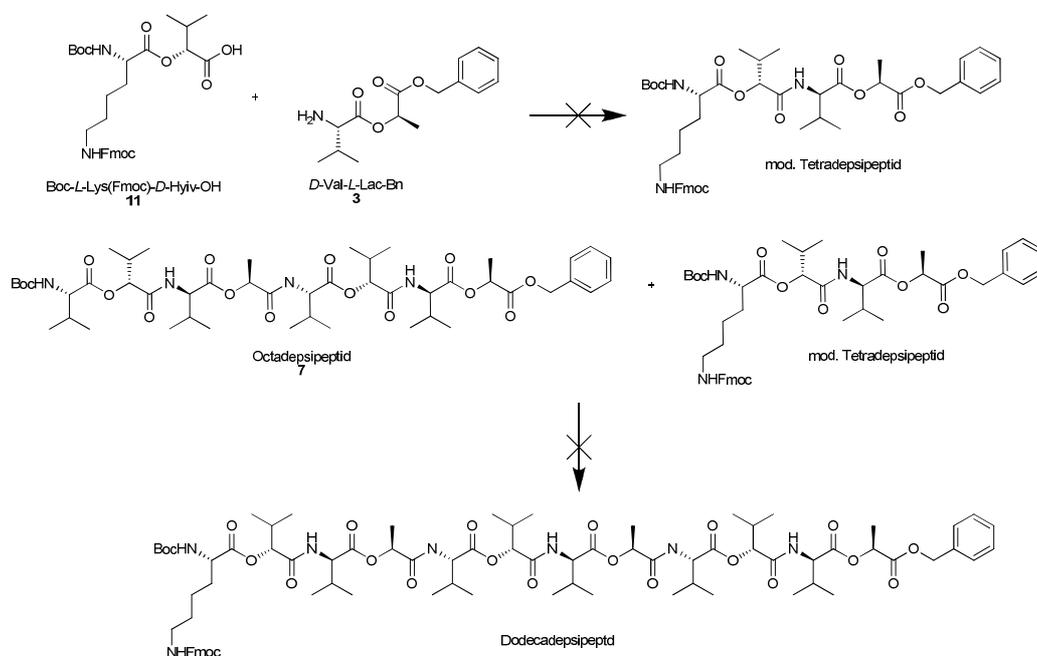
Die Synthese der nicht modifizierten Dipeptide **3** und **4** erfolgte mit DCC und katalytischen Mengen DMAP in DCM bei -40 °C, um eine Racemisierung zu vermeiden (Abb. III-11). Die Ausbeuten lagen zwischen 78 und 97%.



**Abb. III-11:** Synthese der nicht modifizierten Dipeptide.

### III. Ergebnisse und Diskussion

Das Lysin-modifizierte Didepsid (**11**) wurde nach der gleichen Methode synthetisiert. Beim Aufreinigen über Säulenchromatographie erhielt man jedoch nur gute Ausbeuten, wenn das Rohprodukt nicht im Laufmittel (Petrolether:Diethylether) sondern in DCM gelöst wurde, da es im Laufmittel selbst nur schlecht löslich ist. Nach der anschließenden Benzyl-Entschützung mit Pd/C-Katalysator und Wasserstoff in Methanol/EE (4:1) erhielt man die freie Carbonsäure **11** als weiße Kristalle, die nicht mehr in DCM löslich waren. Auch in DMF und DMSO waren sie nur schlecht löslich. Damit konnte dieses Didepsid nicht zum modifizierten Tetradepsipeptid umgesetzt werden. Der Syntheseweg über einen Octadepsipeptid-*Precursor* (**7**), an den ein mit Lysin modifiziertes Tetradepsipeptid gekuppelt wird, konnte somit nicht durchgeführt werden (Abb. III-12).

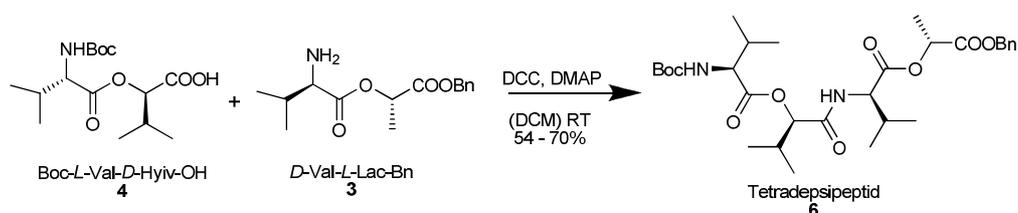


**Abb. III-12:** Synthese des Dodecadsipeptides über einen Octadepsipeptid-*Precursor* (**7**).

Daher wurde die Synthese umgestellt, indem ein Decadepsipeptid-*Precursor* (**8**) hergestellt wurde, der dann mit dem Boc-entschützten modifizierten Didepsid (**11**) gekuppelt wurde (Abb. III-8). Nach der Boc-Entschützung war der Lysin-Baustein (**11**) weiterhin in allen gängigen Lösungsmitteln löslich. Die Boc-Entschützung von **3** erfolgte zunächst in Dioxan mit HCl. Die Säure und das Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknen entfernt. Die

anschließende Kupplung mit Benzyl-entschütztem **2** mit DCC/DMAP in DCM bei Raumtemperatur führte jedoch nur zu Ausbeuten < 10%. Die Verwendung anderer Aktivester wie TBTU, NHS und Isobutylchloroformiat führte ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt. Auch die Zugabe eines zusätzlichen Äquivalentes an Base, um das Säure-Äquivalent von der Boc-Entschützung abzufangen, erhöhte die Ausbeute nicht signifikant. Es wurden daraufhin Testumsetzungen durchgeführt, um herauszufinden, ob das Amin-Didepsid oder das Säure-Didepsid keine Peptidbindung knüpfen kann. Dazu wurde in einer Testreaktion Boc-entschütztes **3** mit Boc-*L*-Valin, DCC, DMAP und 1 eq. DIPEA umgesetzt. Nach 24 Stunden Rühren war über Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie kein Produkt detektierbar. Somit war das Aminfragment ausschlaggebend für den Misserfolg der Kupplung gewesen. Die Boc-Entschützung wurde dahingegen verändert, als dass sie mit 20% TFA in DCM erfolgte und nach erfolgreicher Entschützung (Detektion über DC) das Produkt mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen wurde, um zu verhindern dass bei der nächsten Kupplung das TFA-Amid entsteht. Dies könnte der Fall sein, wenn das Carbonsäurefragment im Verhältnis zu TFA weniger aktiv ist.

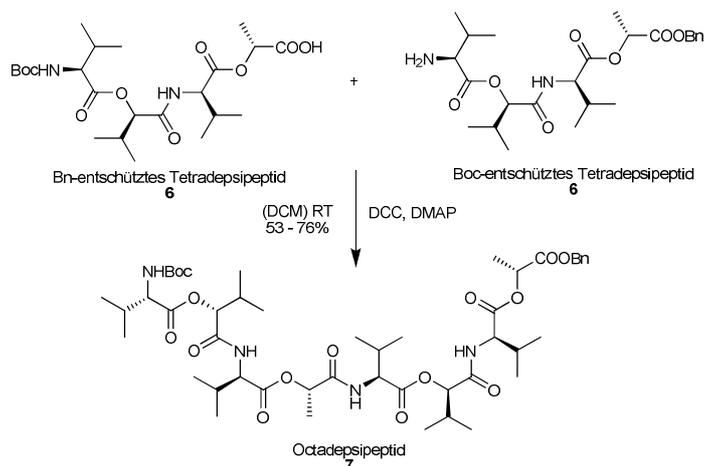
Die Kupplung zum Tetradepeptid ergab Ausbeuten zwischen 54 und 70% (Abb. III-13).



**Abb. III-13:** Synthese des Tetradepeptides (**6**).

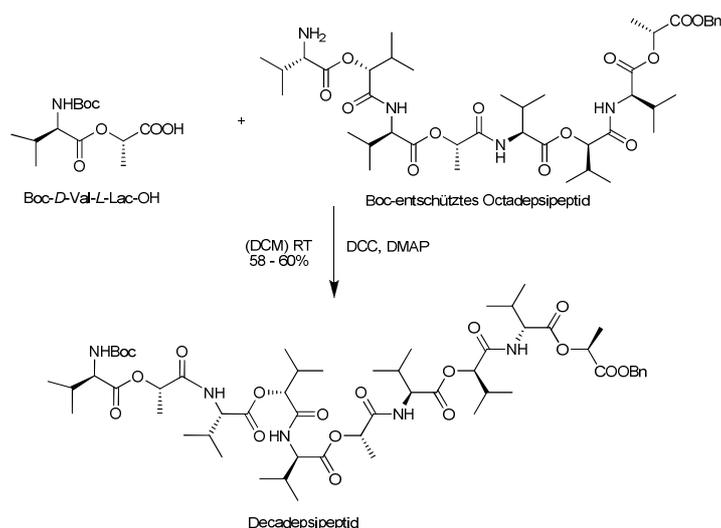
Eine Hälfte von **6** wurde Boc-entschützt, die andere Benzyl-entschützt. Die Kupplung zum Octadepeptid **7** erfolgte mit Ausbeuten zwischen 53 und 76% (Abb. III-14).

### III. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. III-14:** Synthese des Octadepsipeptides (**7**).

Boc-entschütztes **7** wurde mit Benzyl-entschütztem **3** zum Decadepsipeptid **8** umgesetzt (Abb. III-15). Die Ausbeuten lagen zwischen 58 und 60%.



**Abb. III-15:** Synthese des Decadepsipeptides (**8**, Precursor).

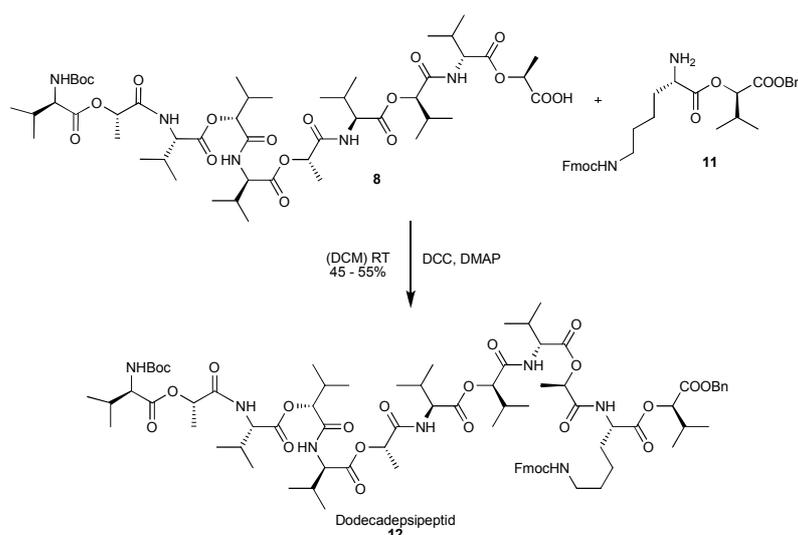
Dieses Decadepsipeptid (**8**) ist die Vorläuferverbindung für alle der in dieser Arbeit beschriebenen Valinomycin-Derivate.

## III.2 Valinomycin-Derivate

### III.2.1 Acetyl-Lysin-Valinomycin

#### III.2.1.1 Synthese

Der Decadepsipeptid-*Precursor* **8** wurde Benzyl-entschützt und mit dem Boc-entschützten Didepsid **11** zum Dodecadepsipeptid **12** umgesetzt (Abb. III-16). Die Ausbeute lag zwischen 45 und 55%.



**Abb. III-16:** Synthese des Dodecadepsipeptides (**12**).

Nach der Benzyl-Entschützung wurde die Boc-Entschützung von **12** ohne Waschen mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung durchgeführt, da in der anschließenden Zyklisierung genug Base eingesetzt wurde, um das Säure-Äquivalent abzufangen. Die Zyklisierung fand unter Hochverdünnung ( $c = 5 \cdot 10^{-3}$  M) in DMF mit 3 eq. Diphenylphosphorylazid und 5 eq. Kaliumhydrogencarbonat statt. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden konnte beobachtet werden, dass sich die anorganische Base komplett aufgelöst hatte. Die Aufreinigung des fertigen Lysin-Valinomycins erfolgte über eine semipräparative HPLC. Dabei konnte mit Hilfe von Massenspektren festgestellt werden, dass ein Großteil der Fmoc-Schutzgruppe bei der vorhergehenden Hydrierung der Benzylgruppe mit abgespalten wurde. Ohne die Fmoc-Schutzgruppe könnte die Zyklisierung an beiden freien Aminogruppen stattgefunden haben. Für eine korrekte Zyklisierung des Valinomycins sprach die Tatsache, dass das

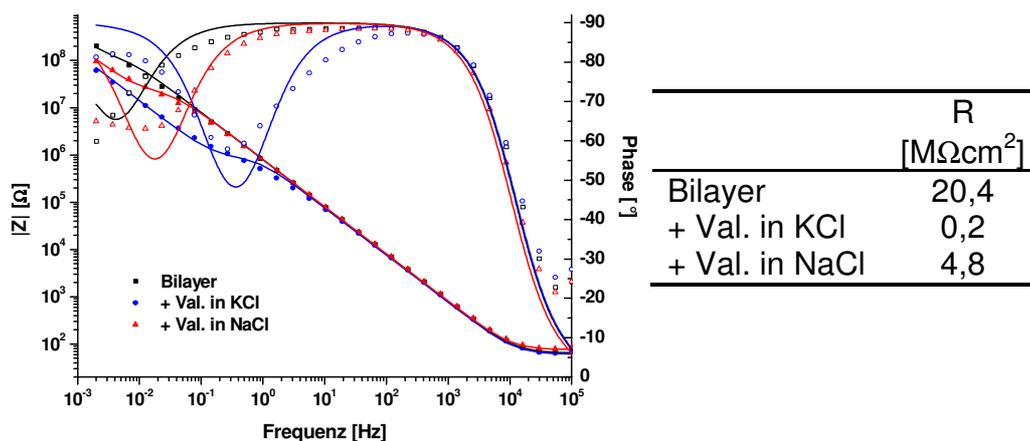


hat. Jede Störung bzw. Verzerrung der Backbone-Struktur z.B. durch racemerisierungsbedingten Einbau eines falschen Enantiomers in eines der 12 Stereozentren würde die Komplexierungsfähigkeit des Ionencarriers extrem herabsetzen.<sup>[59]</sup>

Die Acetylierung der freien Aminogruppe wurde vorgenommen, um eine ungeladene Endgruppe am Lysin zu erhalten und damit die Beweglichkeit des Valinomycins innerhalb der hydrophoben Membran zu gewährleisten.

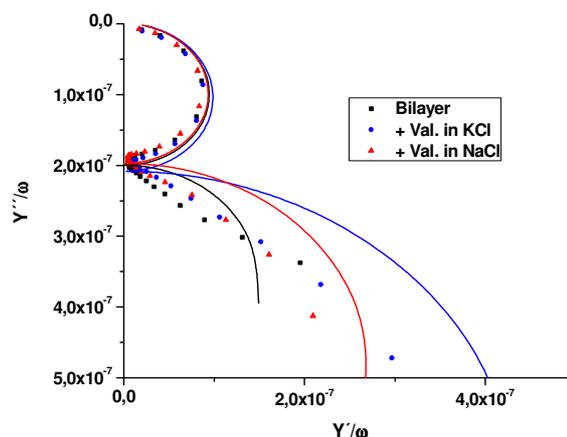
Inkorporiert wurde das Acetyl-Lysin-Valinomycin in eine tBLM, bestehend aus DPhyTL und DPhyPC.<sup>[56]</sup> Die Membran wurde durch Vesikelfusion der DPhyPC-Vesikel mit einem DPhyTL-Monolayer erhalten. Dabei wurde bei allen Messungen darauf geachtet, dass der Widerstand nach der Vesikelfusion angestiegen war und die Kapazität abgenommen hatte. Typische Werte hierbei sind 1 – 20 M $\Omega$ cm<sup>2</sup> für den Widerstand und ca. 0,8  $\mu$ Fcm<sup>-2</sup> für die Kapazität. Zugrunde liegt dabei das in Abb. II-22 gezeigte Ersatzschaltbild, das zum Fitten der Daten verwendet wurde.

Ein typisches Impedanzspektrum für eine derartige Membran mit natürlichem Valinomycin ist in Abb. III-18 gezeigt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Widerstand der Membran mit inkorporiertem Valinomycin in Anwesenheit von Kalium-Ionen (0,1 M KCl) um den Faktor 100 abnimmt, während er in 0,1 M Natriumchlorid-Lösung wieder ansteigt. Ein Erreichen des ursprünglichen Widerstandes der leeren Membran ist nicht möglich, da das restlose Entfernen der Kalium-Ionen aus dem System nur sehr schwer möglich ist. Dies kann zum Einen an der guten Kalium-Komplexierungsfähigkeit des Valinomycins liegen, zum Anderen aber auch an dem Aufbau der tBLM selbst.<sup>[180]</sup> Unterhalb der Membran im Bereich des Abstandshalter befindet sich ein Wasserreservoir, welches beim Spülen der Zelle kaum mit der Spüllösung in Kontakt kommt. Ein Herausspülen der Kalium-Ionen aus diesem Bereich ist somit so gut wie nicht möglich.



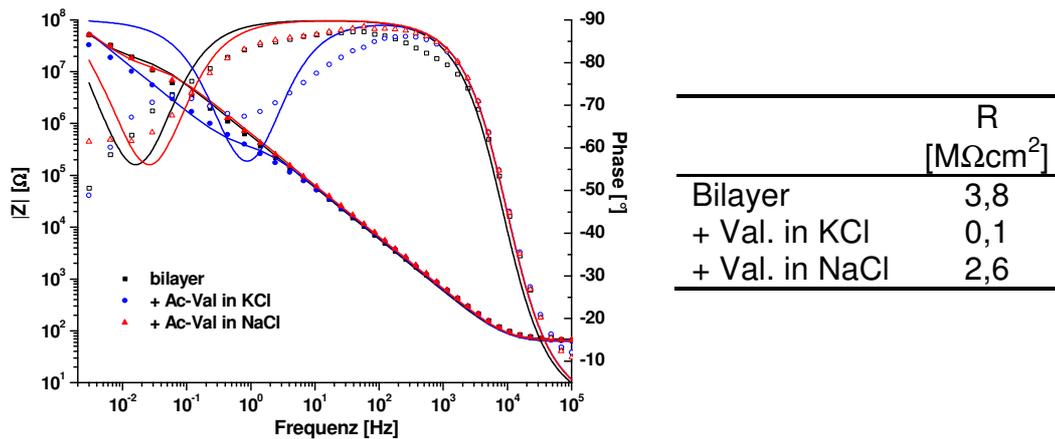
**Abb. III-18:** Impedanzspektrum einer tBLM mit natürlichem Valinomycin, die Punkte sind die Messdaten, die Linien die Fits.

Bei der Inkorporation eines Peptids oder Proteins in eine Membran sollte die Kapazität stabil bleiben. Dies ist in Abb. III-19 gezeigt.



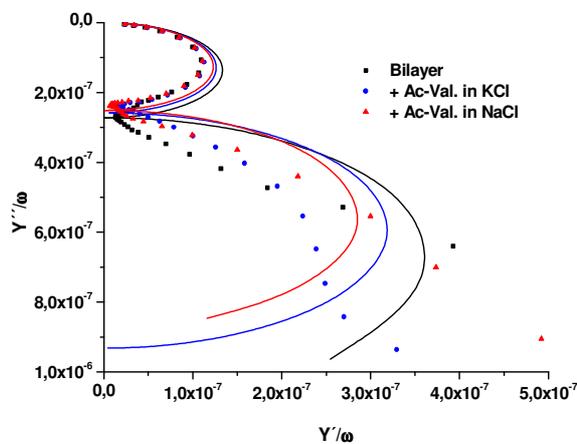
**Abb. III-19:** Admittanz-Plot eines Bilayers mit natürlichem Valinomycin.

Im Vergleich zum natürlichen Valinomycin zeigt das Acetyl-Lysin-Valinomycin das gleiche Verhalten (Abb. III-20). Der Austausch eines L-Valins durch L-Lysin führte jedoch zu einer etwas verringerten Komplexierungsfähigkeit, denn zwischen dem Widerstand des Bilayers und dem mit Acetyl-Lysin-Valinomycin besteht lediglich ein Unterschied um den Faktor 38.



**Abb. III-20:** Impedanzspektrum einer tBLM mit Acetyl-Lysin-Valinomycin. Das synthetisierte Valinomycin transportiert Kalium-Ionen durch die Membran.

Analog zum natürlichen Valinomycin bleibt die Kapazität der Membran bei Zugabe des Acetyl-Lysin-Valinomycins gleich (Abb. III-21).



**Abb. III-21:** Admittanz-Plot einer Membran mit Acetyl-Lysin-Valinomycin.

Somit konnte bewiesen werden, dass das synthetisierte Lysin-Valinomycin über nahezu identische Transporteigenschaften wie das natürliche Valinomycin verfügt und trotz einer zusätzlichen polaren Amidfunktionalität sowohl membrangängig ist als auch K<sup>+</sup>-Ionen komplexieren kann.

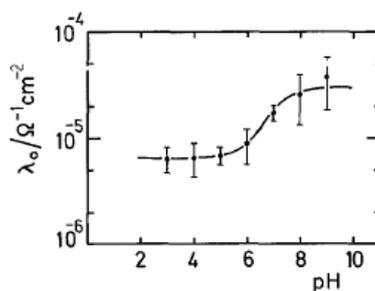
### III.2.2 Amino-Valinomycin

#### III.2.2.1 Synthese

Die Synthese des Amino-Valinomycins ist in Kapitel III.2.1.1 beschrieben. Das über HPLC gereinigte Amino-Valinomycin wurde für die Impedanzmessungen in Ethanol (1 mg/mL) gelöst.

#### III.2.2.2 pH-Sensor in tBLMs

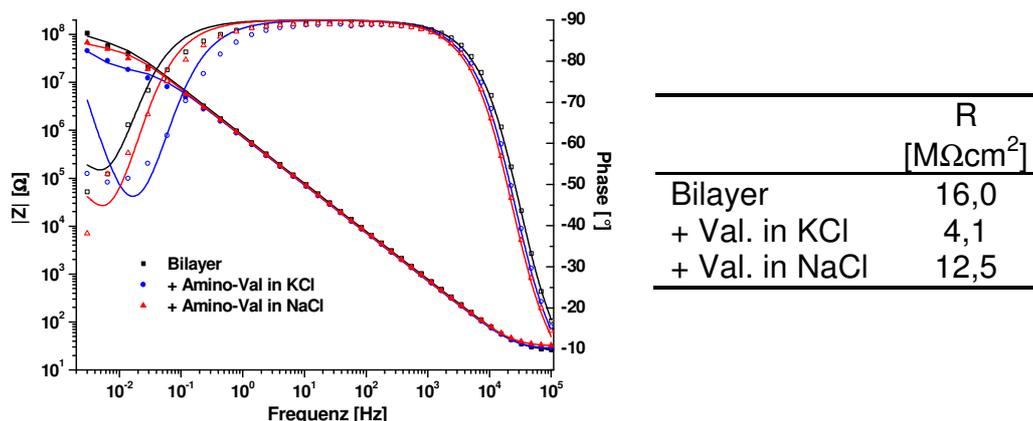
Amino-Valinomycin lässt sich wegen der protonierbaren Amino-Gruppe in Membranen als pH-Sensor verwenden. Diese Idee wurde bereits 1979 von Stark *et al.* publiziert.<sup>[62]</sup> Sie konnten eine pH-abhängige Leitfähigkeit des Valinomycins in BLMs messen (Abb. III-22).



**Abb. III-22:** Amino-Valinomycin zeigt in BLMs eine vom pH-Wert abhängige Leitfähigkeit.<sup>[62]</sup>

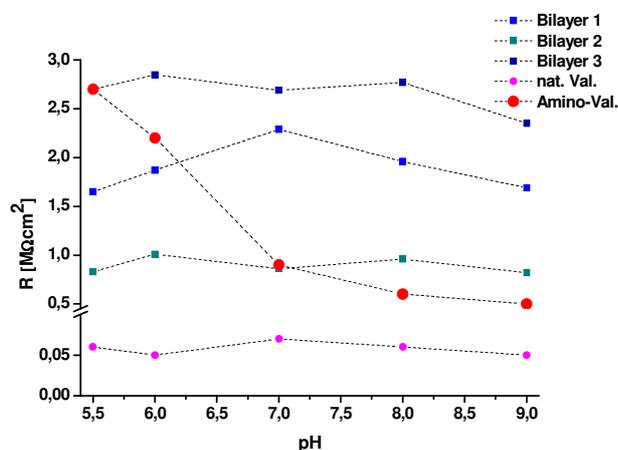
Im Sauren liegt die Aminogruppe protoniert vor, die Leitfähigkeit sinkt, da geladene Moleküle Membranen nur schlecht durchdringen können. Im Basischen ist die  $\text{NH}_2$ -Gruppe unprotoniert und damit ungeladen, der Ionencarrier kann somit die Membran problemlos passieren.

Das in dieser Arbeit synthetisierte Amino-Valinomycin reagiert in gleicher Weise. In normalen wässrigen Lösungen (das hier verwendete bidestillierte Wasser hatte einen pH-Wert von 5,5) ist die Leitfähigkeit verglichen zum natürlichen Valinomycin sehr gering (Abb. III-23).



**Abb. III-23:** Inkorporation von Amino-Valinomycin in eine tBLM. In Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen geht der Widerstand nur um einen Faktor 4 zurück.

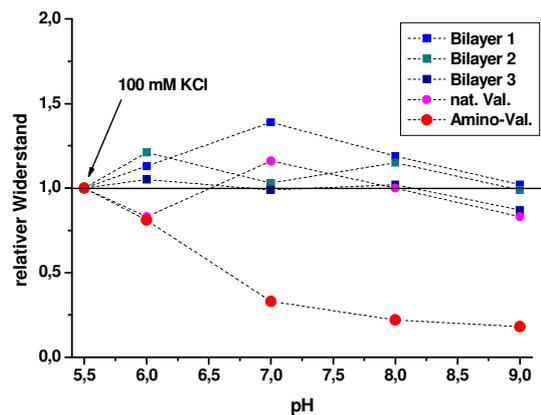
Um den Einfluss des pH-Wertes auf die tBLMs zu untersuchen, wurden mehrere Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Zum Einen wurden Membranen ohne inkorporierten Ionencarrier untersucht, zum Anderen Membranen mit eingebautem natürlichem Valinomycin, um das Transportverhalten von natürlichem Valinomycin bei unterschiedlichen pH-Werten mit dem von Amino-Valinomycin zu vergleichen (Abb. III-24).



**Abb. III-24:** pH-Wert abhängige Messungen des Widerstandes von drei Membranen ohne Valinomycin, einer Membran mit natürlichem Valinomycin und einer mit Amino-Valinomycin.

Es ist gut erkennbar, dass auch bei unterschiedlich guten Membranen (der Widerstand schwankt zwischen 1 und 3 MΩcm<sup>2</sup>) der Einfluss des pH-Wertes

auf die Membran gering ist. Die Werte für den Widerstand blieben relativ konstant. Auch natürliches Valinomycin zeigte keine pH-Wert-Abhängigkeit. Amino-Valinomycin dagegen wies bei hohen pH-Werten eine deutlich bessere Transportfähigkeit auf (der Widerstand der Membran sinkt). Um diesen Effekt anschaulicher darzustellen, wurde der pH-Wert gegen den relativen Widerstand bezogen auf 0,1 M KCl aufgetragen (Abb. III-25).



**Abb. III-25:** Darstellung des relativen Widerstandes in Bezug auf 0,1 M KCl-Lösung aufgetragen gegen den pH-Wert.

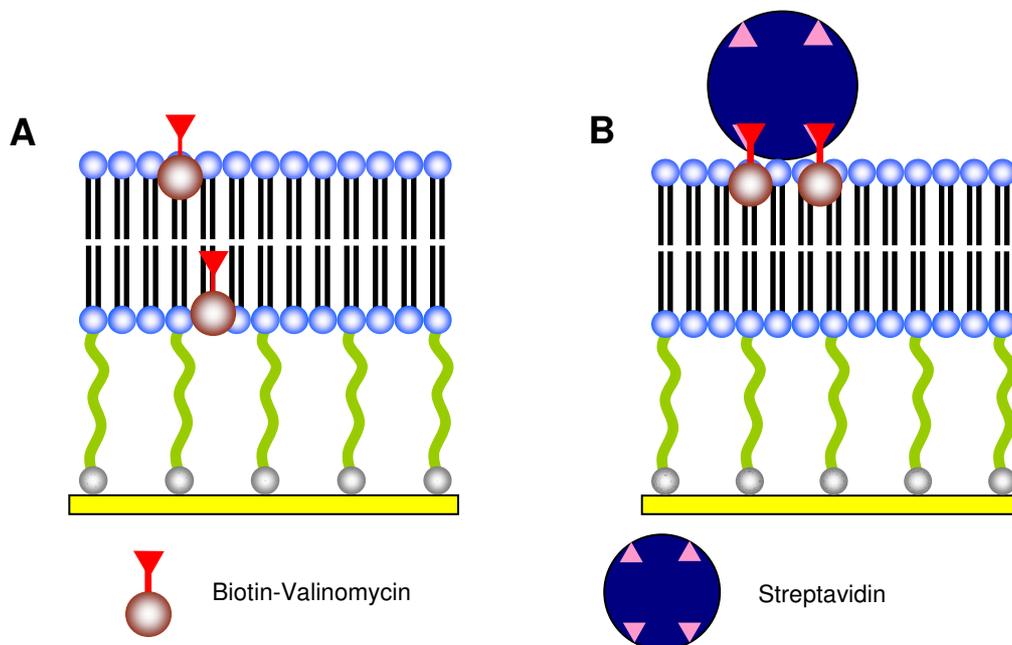
Amino-Valinomycin eignet sich somit auch als pH-Sensor in tBLMs, besonders bei Anwendungen unter physiologischen Bedingungen. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Stabilität der Membranen im sauren Bereich. Unterhalb eines pH von 4 sind diese nicht mehr ausreichend stabil, die Widerstände nehmen ab oder die Membran löst sich komplett auf.

Der beobachtbare Unterschied im Widerstand der Membran durch den pH-abhängigen Protonierungsgrad des Amino-Valinomycins demonstriert die allgemeine Anwendbarkeit des Konzeptes durch Schaltung eines modifizierten Valinomycins zwischen hydrophob (membrangängig) zu hydrophil (und damit nicht-membrangängig) einen Sensor zu konstruieren.

### III.2.3 Biotin-Valinomycin

Cornell *et al.* und Futaki *et al.* zeigten, dass sich das Biotin-Streptavidin-System zum Blockieren von Ionenkanälen nutzen lässt (Kap. II.2.1).<sup>[1, 132]</sup> Dabei verwendeten sie zwei unterschiedliche Konzepte: Cornell *et al.* verhinderten durch Zugabe von Streptavidin, dass Gramicidin dimerisieren kann. Futaki *et al.* blockierten Gramicidin und Alamethicin, indem Streptavidin an ein Biotin neben der Öffnung des Kanal angebunden wurde, wodurch der Ionenfluss gestoppt wurde.

Biotin-Valinomycin hingegen soll durch Zugabe von Streptavidin daran gehindert werden, die Membran zu durchdringen (Abb. III-26). Damit wäre auch in Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen der Widerstand der Membran hoch. Eine Zugabe von Biotin würde den Prozess reversibel machen.

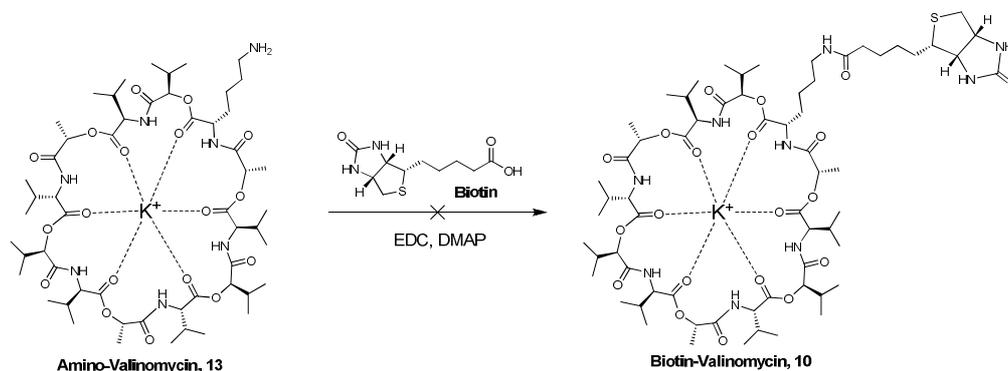


**Abb. III-26:** A) Biotin-Valinomycin in einer tBLM. B) Durch Zugabe von Streptavidin wird der Ionentransport gestoppt.

Da Streptavidin über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt, kann es theoretisch bis zu vier Biotin-Valinomycin-Moleküle blockieren. Es gilt auch herauszufinden, ob beim Spülen der Membran die Valinomycin-Streptavidin-Komplexe in der Membran verbleiben, oder ob sie herausgespült werden. Das Verbleiben des Valinomycins innerhalb der Membran ist essenziell, um den Prozess reversibel zu machen.

### III.2.3.1 Synthese

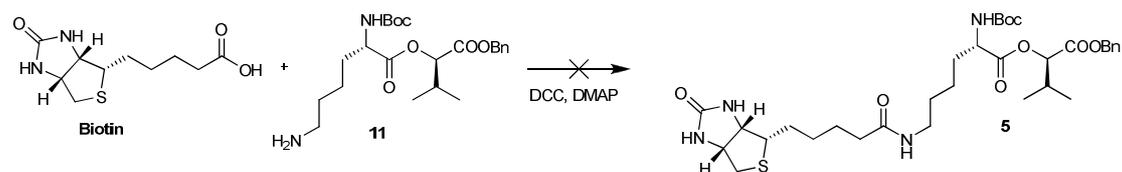
Die Synthese von Biotin-Valinomycin **10** sollte zunächst über die Biotinylierung von Amino-Valinomycin **13** verlaufen. Hierzu wurde mit EDC und DMAP Biotin an das HPLC-gereinigte Amino-Valinomycin gekuppelt (Abb. III-27). EDC wurde gewählt, um den entstehenden Harnstoff nach Beendigung der Reaktion durch einfaches Ausschütteln wieder abtrennen zu können. Biotin ist in DCM allerdings nur schwer löslich, was dazu führte, dass hauptsächlich das TFA-Amid (TFA stammt aus der vorangegangenen HPLC-Trennung und lag als Gegenion zum Kation vor) entstand. Eine Abtrennung des Biotin-Valinomycins vom TFA-Valinomycin über eine Avidin-Säule (Pierce Monomeric Avidin Kit) war nicht erfolgreich, da diese biologischen Säulen nicht für die in der präparativen organischen Chemie verwendeten Mengen (hier 3 mg Rohprodukt) ausgelegt sind. Da Valinomycin ähnlich einem Salz auf Kieselgel haften blieb und von keinem Laufmittel eluiert werden konnte, war eine Trennung mit Hilfe von präparativer Dünnschichtchromatographie ebenfalls nicht möglich.



**Abb. III-27:** Biotinylierung von Amino-Valinomycin.

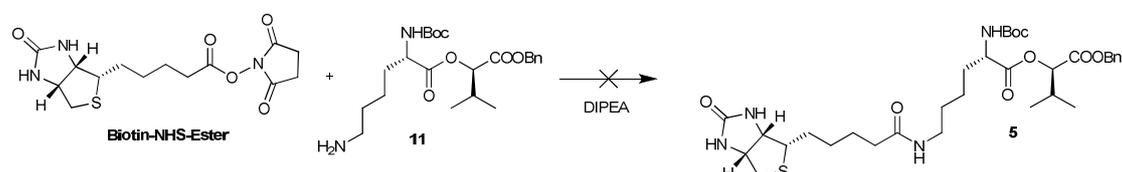
Eine alternative Synthesestrategie bestand darin, dass Fmoc-entschützte Lysin-Didepsid **11** mit Biotin umzusetzen und anschließend an den *Precursor* zu koppeln (Abb. III-28). Dies hat vor allem den Vorteil, dass die Fmoc-Schutzgruppe vor der Benzyl-Schutzgruppe mit Hilfe von 20% Piperidin in DMF abgespalten werden kann. Dadurch kann das ungewollte Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe im letzten Schritt der Synthese verhindert werden (Kap. II.2.1.1). Als Kupplungsreagenz wurde DCC mit DMAP in DCM verwendet. Bei dieser Reaktion war jedoch kein Produkt nachweisbar. Ein Wechsel des

Lösungsmittels war ebenfalls nicht erfolgreich, da Biotin in DMF im Vergleich zu DCM noch schlechter löslich ist.



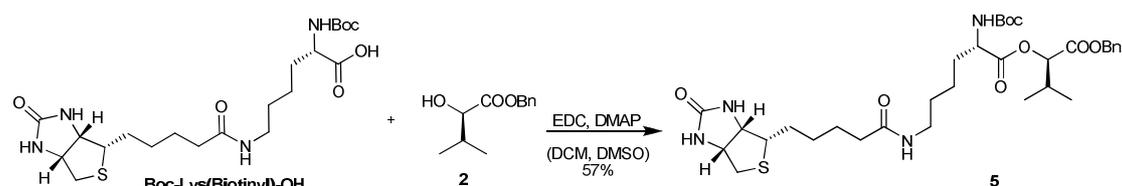
**Abb. III-28:** Kupplung von Biotin an das modifizierte Dipeptid **11**.

Daher wurde anstatt des Biotins der aktivierte Biotin-*N*-Hydroxysuccinimid-Ester in einem nächsten Versuch mit Fmoc-entschütztem **11** umgesetzt (Abb. III-29). Obwohl der Biotin-NHS-Ester in DMF gut löslich ist, konnte auch hier das gewünschte Produkt nicht nachgewiesen werden.



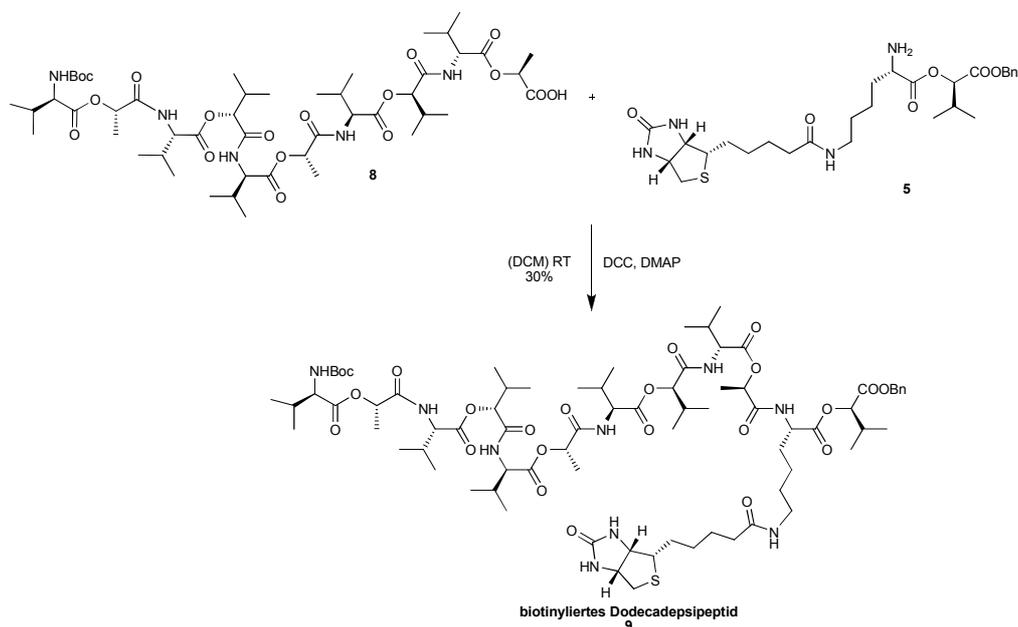
**Abb. III-29:** Biotinylierung von **11** mit Hilfe des Biotin-NHS-esters.

Erst die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Boc-Lys(Biotinyl)-OH-Bausteins führte zum Erfolg. Dieser wurde mit Bn-Hyiv **2** zum modifizierten Dipeptid **5** gekuppelt. Auch hier konnte die Reaktion mit DCC oder EDC nicht in DCM durchgeführt werden, da der Biotin-Baustein nicht löslich war. Auch in DMF war kein Produkt nachweisbar. Eine Kupplung war nur möglich, wenn das Lysin in DMSO gelöst wurde und zu der Reaktionsmischung aus **2**, EDC und DMAP in DCM hinzugegeben wurde (Abb. III-30).<sup>[181]</sup> Nach 24 h Rühren wurde mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM mit 8% MeOH) gereinigt. Man erhielt eine Ausbeute von 57%.



**Abb. III-30:** Synthese des biotinylierten Dipeptides **5**.

Nach dem Boc-Entschützen von **5** wurde es mit dem Benzyl-entschützten Decadepsipeptid **8** zum Dodecadepsipeptid **9** umgesetzt (Abb. III-31). Die Ausbeute betrug 30%.

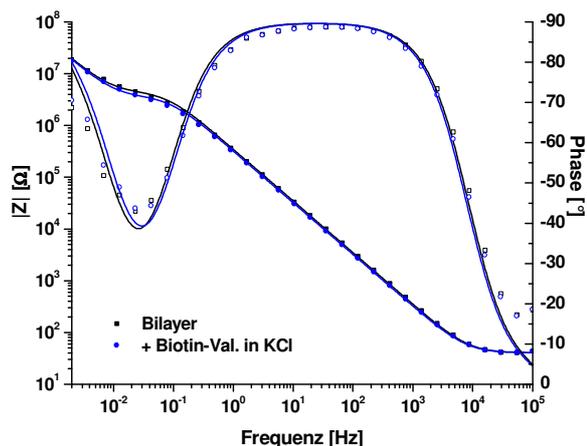


**Abb. III-31:** Synthese des biotinylierten Dodecadepsipeptides **9**.

Nach der Benzyl- und Boc-Entschützung wurde **9** mit DPPA und  $\text{KHCO}_3$  in DMF zyklisiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das DMF am Hochvakuum abdestilliert, der verbliebene Rückstand in DCM aufgenommen und mit Wasser ausgeschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte über Fällern aus Hexan; die Ausbeute betrug 87%. Für die EIS- und SPR-Messungen wurde eine ethanolische Lösung mit 1 mg/mL hergestellt.

#### III.2.3.2 EIS-Messungen

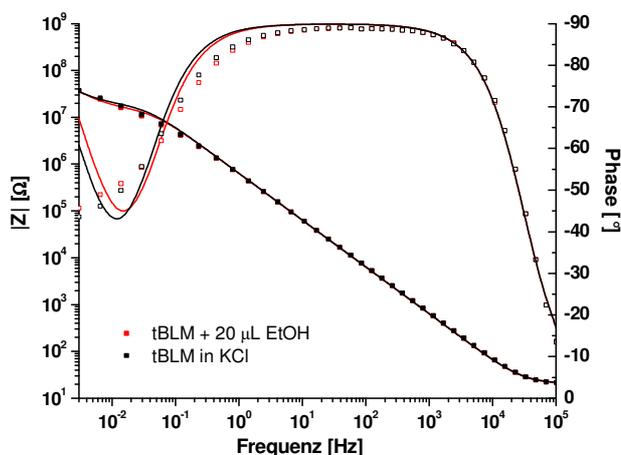
Biotin-Valinomycin kann als Biosensor in tBLMs inkorporiert werden. Voraussetzungen hierfür sind, dass Biotin-Valinomycin in die Membran eingebaut wird,  $\text{K}^+$ -Ionen komplexieren und transportieren kann. Dafür wurden 20  $\mu\text{l}$  Biotin-Valinomycin (1 mg/mL in EtOH) auf eine tBLM in 0,1 M KCl gegeben (Abb. III-32). Der Widerstand nach Zugabe ging nur wenig zurück, während die Kapazität gleich blieb.



	R [MΩcm <sup>2</sup> ]
Bilayer	3,1
+ Biotin-Val. in KCl	2,5

**Abb. III-32:** Impedanz-Spektrum von Biotin-Valinomycin in einer tBLM.

Um herauszufinden, ob der beobachtete leichte Rückgang des Widerstandes durch das Biotin-Valinomycin oder durch Einfluss des Lösungsmittels verursacht wurde, wurden 20  $\mu$ L Ethanol zu einer tBLM gegeben (Abb. III-33).



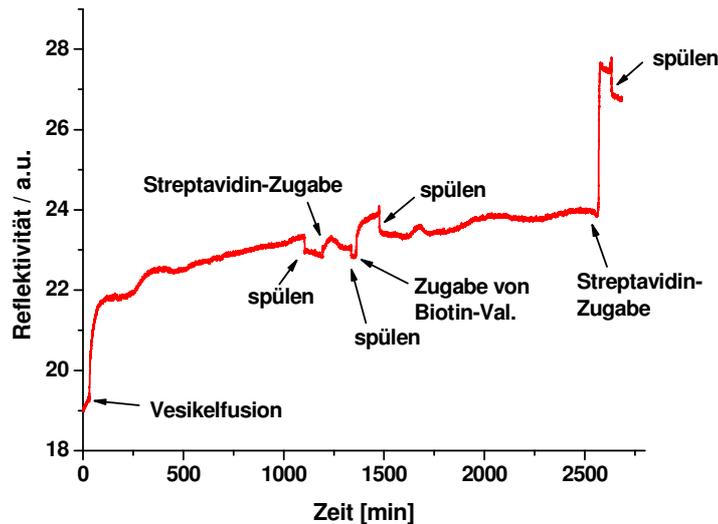
	R [MΩcm <sup>2</sup> ]
tBLM	3,9
+ 20 $\mu$ L EtOH	4,8
tBLM in KCl	4,8

**Abb. III-33:** Impedanzspektrum einer tBLM vor und nach Zugabe von 20  $\mu$ L Ethanol.

Auch hier nimmt der Widerstand leicht ab, der oben beschriebene Rückgang des Widerstandes ist somit auf das Lösungsmittel zurückzuführen. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass Biotin-Valinomycin keine  $K^+$ -Ionen transportieren kann. Die EIS-Messungen können jedoch nicht klären, ob Biotin-Valinomycin überhaupt in die Membran eingebaut wird. Dies wurde mit Hilfe von SPR-Messungen untersucht.

### III.2.3.3 SPR-Messungen

Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie kann indirekt überprüft werden, ob Biotin-Valinomycin in eine tBLM inkorporiert wird. Dies erfolgte durch Messung der Schichtdickenzunahme in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von Streptavidin. In Abb. III-34 ist eine Kinetikmessung vom Monolayer bis hin zur Zugabe von Streptavidin gezeigt.

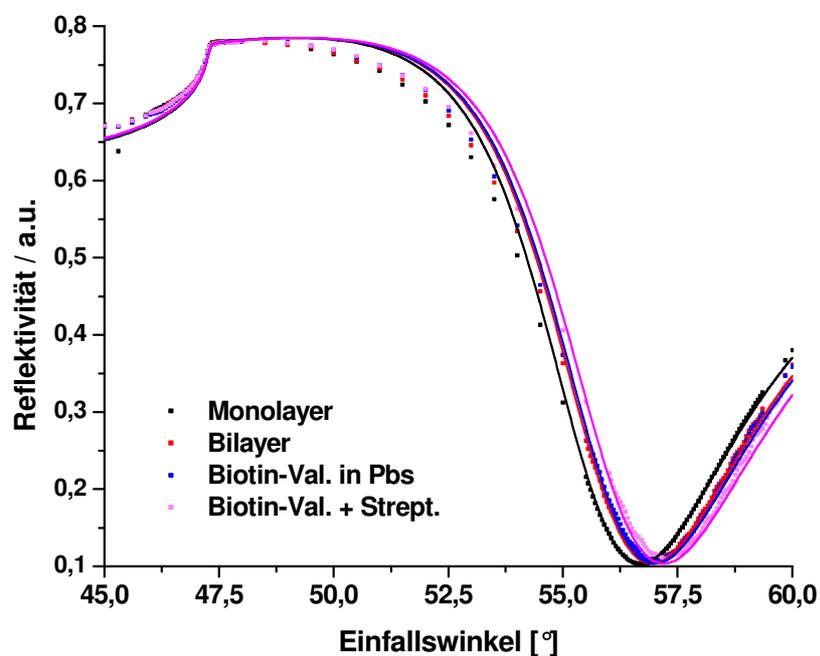


**Abb. III-34:** Kinetikmessung einer tBLM.

Nach Zugabe der Vesikel steigt die Reflektivität stark an, was auf eine Schichtdickenzunahme und damit auf die Ausbildung der Lipiddoppelschicht schließen lässt. Dies wurde parallel mit EIS-Messungen überprüft (Setup-Aufbau in Kap. II.5.2). Nach erfolgreicher Vesikelfusion wurde mit PBS-Puffer gespült und als Blindkontrolle Streptavidin auf die leere Membran gegeben. Es war lediglich ein kleiner Anstieg der Reflektivität messbar, der nach dem Spülen wieder verschwunden war, d.h. Streptavidin geht mit einer tBLM keine Wechselwirkungen ein. Bei Zugabe von Biotin-Valinomycin stieg die Reflektivität ebenfalls leicht an. Dies ist auf die Änderung des Brechungsindex der gesamten Membran bei Inkorporation eines Ionencarriers zurückzuführen. Durch Spülen konnte der Anstieg der Reflektivität nicht komplett rückgängig gemacht werden, d.h. der Großteil der Ionencarrier verblieb in der Membran. Das darauffolgende Zeitintervall von etwa 1000 min ist nicht perfekt konstant, da während der Nacht die Belüftung im Labor stark schwankt, was sich auf

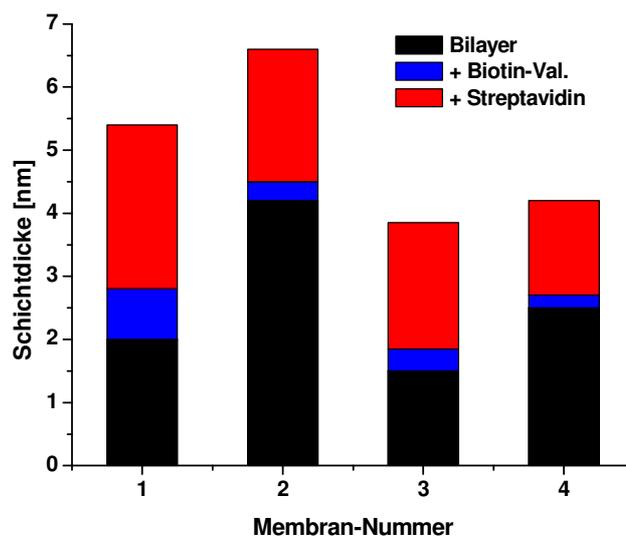
die Messung auswirkt. Eine zweite Zugabe von Streptavidin zu der Valinomycin-haltigen Membran führte nun zu einem starken Anstieg der Reflektivität, da Streptavidin an das inkorporierte Biotin-Valinomycin bindet und eine Schicht auf der Membran ausbildet. Diese wird auch durch Spülen nicht entfernt, die Wechselwirkung des Biotin-Valinomycins mit der Membran ist somit stark genug, den Biotin-Streptavidin-Komplex an der Grenzfläche auch während des Spülens festzuhalten.

Exakte Werte über den Schichtdickenzuwachs geben die SPR-Scans (Abb. III-35).



**Abb. III-35:** SPR-Scans mit Fit-Kurven.

Es wurden mehrere Membranen in der oben beschriebenen Weise vermessen; die gefitteten Schichtdickenzunahmen sind in Abb. III-36 aufgetragen.



**Abb. III-36:** Schichtdickenzunahmen von vier unterschiedlichen Membranen.

In allen Messungen konnte eine deutliche Schichtdickenzunahme (zwischen 1,3 und 1,8 nm,  $\sigma = 1,64$  nm) bei Zugabe von Streptavidin gemessen werden. Hendrickson *et al.* bestimmten die Größe von Streptavidin; es hat die Maße 5,4 x 5,8 x 4,8 nm.<sup>[182]</sup> Mit diesen Werten ergibt sich ein Bedeckungsgrad von 34% für Streptavidin auf tBLMs mit inkorporiertem Biotin-Valinomycin.

Biotin-Valinomycin wird also trotz des hydrophilen Biotins in die Membran inkorporiert. Dabei scheint das Biotin in der Wasserphase zu verbleiben, so dass das Streptavidin leicht anbinden kann.

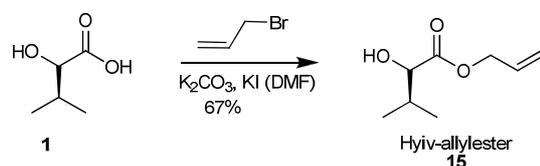
#### III.2.4 FITC-Valinomycin

Mit Hilfe von FITC-Valinomycin sollte die laterale Diffusion von Valinomycin in sBLMs untersucht werden.

##### III.2.4.1 Synthese

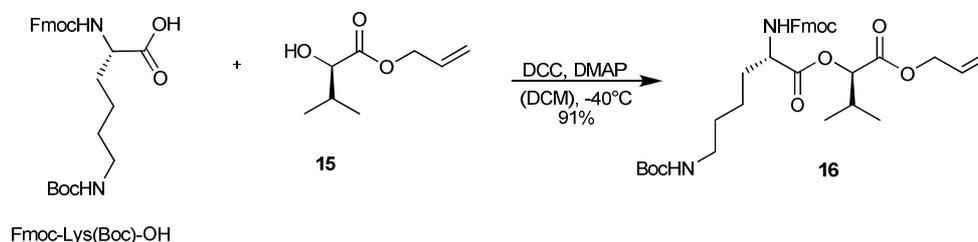
Die Synthese wurde im Vergleich zu den oben beschriebenen Valinomycin-Derivaten dahingegen verändert, als dass am modifizierten Didepsid die Benzyl- gegen eine Allyl-Schutzgruppe ausgetauscht wurde, um eine unerwünschte Fmoc-Abspaltung zu verhindern. Dafür musste zunächst die

$\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure Allyl-geschützt werden (Abb. III-37). Die Reaktion erfolgte analog zur Benzyl-Schätzung mit Allylbromid,  $K_2CO_3$  und kat. Mengen an KI in DMF mit einer Ausbeute von 67%.



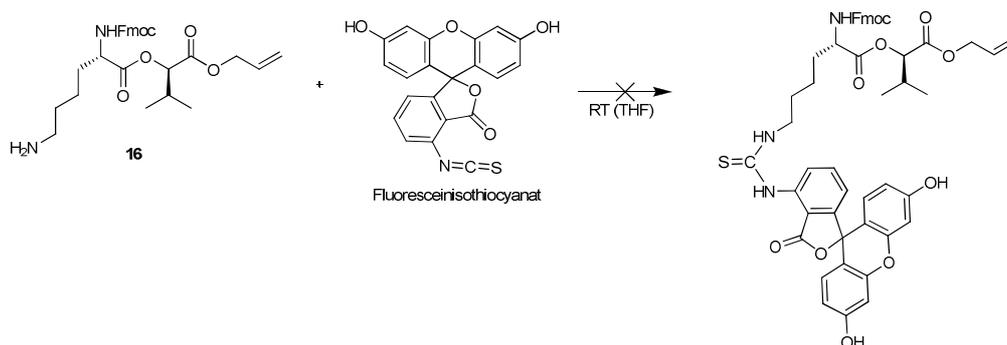
**Abb. III-37:** Synthese des Hydroxyisovaleriansäure-allylesters.

**15** wurde mit Fmoc-L-Lys(Boc)-OH mit einer Ausbeute von 91% zum modifizierten Dipeptid **16** umgesetzt (Abb. III-38).



**Abb. III-38:** Synthese von Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Hyiv-Allyl **16**.

Nach der Boc-Entschätzung wurde **16** in THF mit einem Äquivalent Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt. Dabei fiel ein orange-farbener Feststoff aus, der nicht das gewünschte Produkt war. Auch im Lösungsmittel konnte über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie kein Produkt nachgewiesen werden (Abb. III-39).



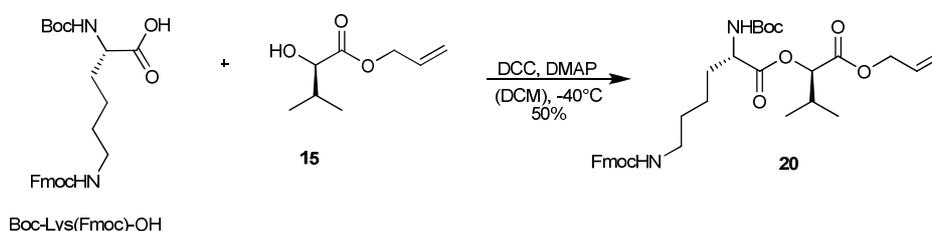
**Abb. III-39:** Reaktion von FITC mit Boc-entschütztem, modifiziertem Dipeptid **16**.

Eine weitere Synthesemöglichkeit bestand darin, zunächst das Lysin-Valinomycin herzustellen und an den fertigen Ionencarrier das FITC zu

### III. Ergebnisse und Diskussion

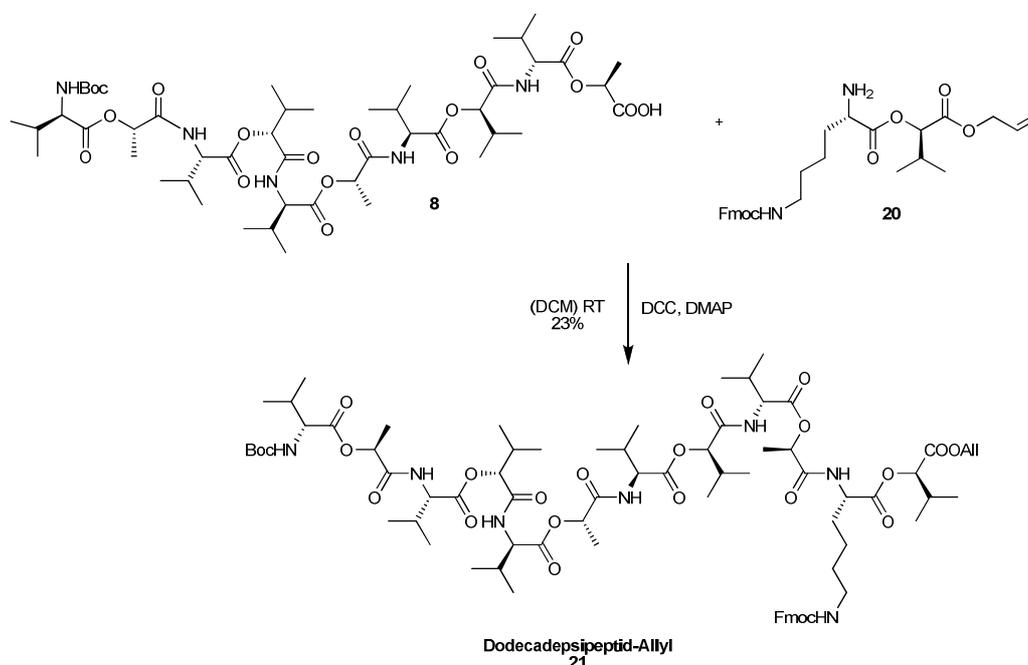
kuppeln. Hierfür wurde ein ähnliches Didepsid wie oben synthetisiert; einziger Unterschied ist die Position der Schutzgruppen. Da die Aufarbeitung nach einer Fmoc-Entschützung in der Regel recht aufwändig ist (Säulenchromatographie) und damit oft zu Ausbeuteverlusten führt, wurde die Fmoc-Gruppe für die  $\epsilon$ -Position am Lysin gewählt. Nach erfolgreicher Synthese kann sie mit 20% Piperidin in DMF abgespalten werden und das Valinomycin in Hexan oder Wasser ausgefällt werden.

Die Synthese des modifizierten Didepsids **20** erfolgte wie oben beschrieben mit einer Ausbeute von 50% (Abb. III-40).



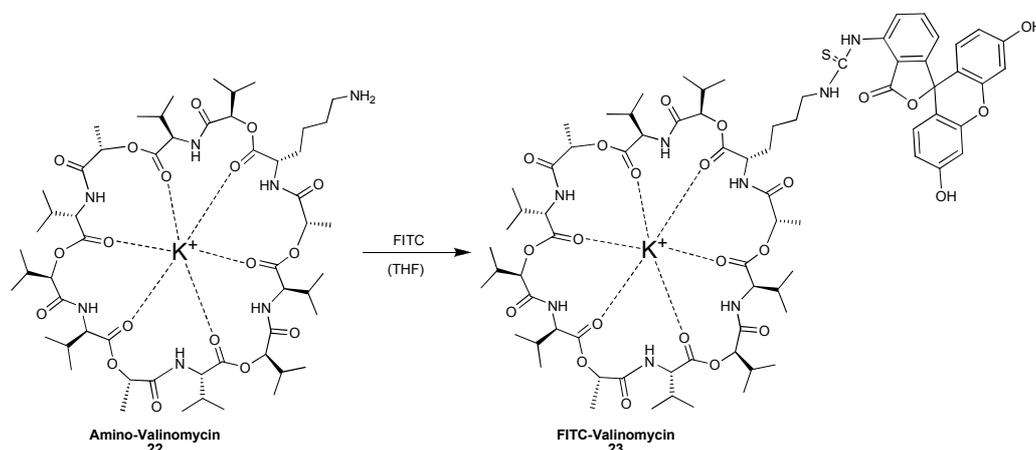
**Abb. III-40:** Synthese des modifizierten Didepsides **20**.

Nach erfolgreicher Boc-Entschützung wurde **20** an den Decadepsipeptid-Precursor **8** mit einer Ausbeute von 23% zum Dodecadepsipeptid-Allyl **21** gekuppelt (Abb. III-41).



**Abb. III-41:** Synthese des Dodecadepsipeptides **21** mit Allyl-Schutzgruppe.

Die Allyl-Entschützung erfolgte mit zwei Äquivalenten Phenylsilan und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium als Katalysator unter Argonatmosphäre in trockenem DCM. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie mit Ethylacetat und 0,5% Essigsäure gereinigt. Nach erfolgreicher Boc-Entschützung wurde das entschützte, lineare Dodecadepsipeptid **21** mit DPPA und  $\text{KHCO}_3$  unter Hochverdünnung zyklisiert. Die Fmoc-Abspaltung wurde mit 20% Piperidin in DMF durchgeführt und das Produkt durch Fällen aus Hexan aufgereinigt. Die Reaktion mit FITC erfolgte in THF bei Raumtemperatur (Abb. III-42); nach zwei Stunden wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in DCM aufgenommen und solange mit Wasser gewaschen, bis dieses nicht mehr gelb war. Das Rohprodukt wurde über präparative Dünnschichtchromatographie (DCM + 10% MeOH) gereinigt.



**Abb. III-42:** Synthese von FITC-Valinomycin **23**.

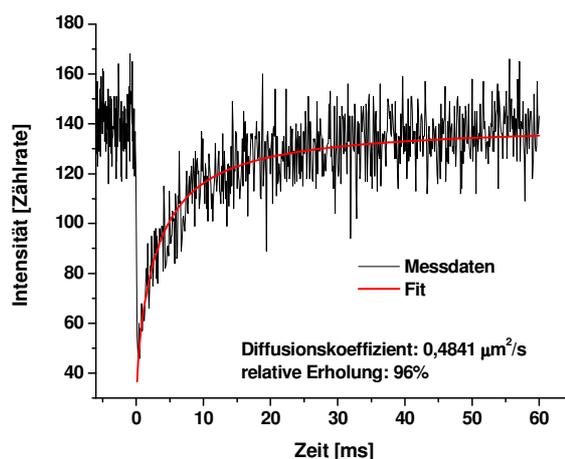
#### III.2.4.2 EIS-Messungen

Die EIS-Messungen von FITC-Valinomycin zeigten die gleichen Ergebnisse wie das in Kapitel III.2.3 beschriebene Biotin-Valinomycin. Es konnte kein Kaliumtransport durch die Membran gemessen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Fluorescein analog zu Biotin ebenfalls zu hydrophil ist, um die Membran zu überwinden. Nichtsdestotrotz kann dieses Valinomycin-Derivat zum Messen der lateralen Diffusion mit FRAP verwendet werden.

### III.2.4.3 FRAP-Messungen

Für die FRAP-Messungen konnten wegen der fluoreszenz-quencheden Goldschicht keine tBLMs verwendet werden, daher wurden die Messungen an sBLMs durchgeführt. Die sBLMs wurden durch Vesikelfusion in PBS-Puffer auf gereinigten Objektträgern hergestellt. Diese wurden unter Wasser in die Messzelle überführt.

In Abb. III-43 ist eine beispielhafte Messkurve mit Fit (rot) dargestellt.



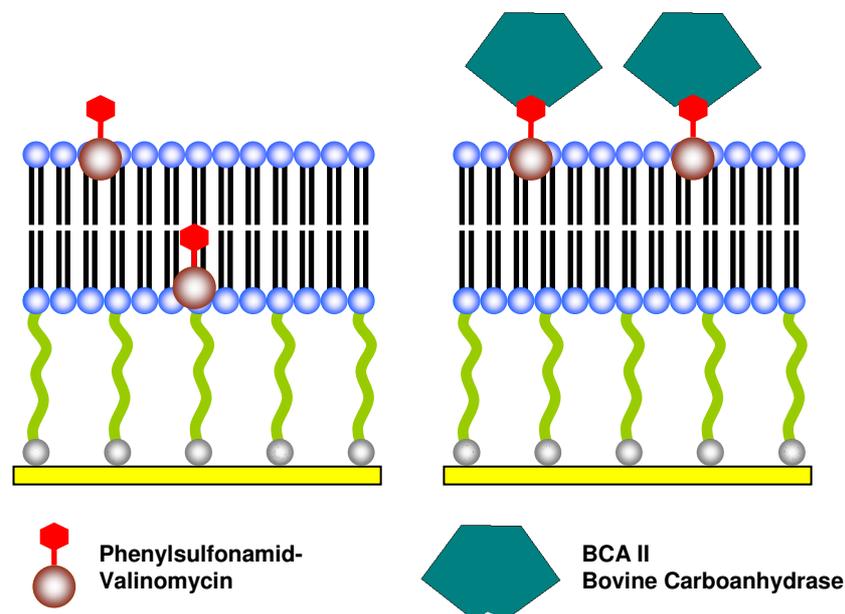
**Abb. III-43:** Beispiel für eine FRAP-Messung mit FITC-Valinomycin.

Insgesamt wurden 25 Messungen an zwei Membranen durchgeführt. Der mittlere Diffusionskoeffizient für FITC-Valinomycin lag dabei bei  $0,49 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , die relative Erholung bei  $92,1\% \pm 9,2\%$ .

Die Diffusionsgeschwindigkeit von Valinomycin ist um etwa das 10fache niedriger als bei einem freien Lipid in einer sBLM ( $3,8 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ).<sup>[183]</sup> Dies ist darauf zurückzuführen, dass Valinomycin etwas größer als ein Lipid ist und aufgrund seiner ringförmigen Struktur eine größere Fläche auf der Membran einnimmt.<sup>[184]</sup> Experimentelle Messungen zur Diffusion von Ionophoren sind in der Literatur eher selten. Diffusionskoeffizienten für Membranproteine liegen theoretisch berechnet zwischen  $0,6$  und  $6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,<sup>[185]</sup> in GUVs (*giant unilamellar vesicles*) konnte experimentell ein Wert von  $4,3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ermittelt werden.<sup>[186]</sup> Da Lipide in GUVs deutlich höhere Diffusionskoeffizienten ( $D_{\text{Lipid/GUV}} = 11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) als Lipide in sBLMs aufweisen,<sup>[187]</sup> liegt der hier ermittelte Diffusionskoeffizient von Valinomycin in sBLMs im erwarteten Rahmen.

### III.2.5 Sulfonamid-Valinomycin

Ein ähnliches Konzept zum Biotin-Valinomycin mit Streptavidin stellt das Sulfonamid-Valinomycin mit BCA II (Bovine Carboanhydrase) dar. Es ist ebenfalls ein Biosensor, bei dem durch Zugabe eines Proteins der Ionenfluss gestoppt wird. Vergleicht man die beiden Systeme, so ist deutlich, dass das Biotin-Streptavidin-System das selektivere ist; die Dissoziationskonstante ist deutlich niedriger als bei einer Carboanhydrase ( $10^{-15}$  M vs.  $< 10^{-9}$  M). Außerdem verfügt Streptavidin über vier Bindungsstellen für Biotin und kann somit den modifizierten Ionencarrier effektiver blockieren. Der große Nachteil des Biotin-Streptavidin-Systems für die Anwendung in Kombination mit Valinomycin ist aber die starke Hydrophilie des Biotins, die verhindert, dass das Valinomycin die Membran überwinden kann. Der Sulfonamid-Ligand kann jedoch so ausgewählt werden, dass er möglichst hydrophob ist und somit analog zum Ferrocen-Valinomycin die Ionentransportfähigkeit des Valinomycins nicht verloren geht. Bei Zugabe von BCA II wird der Ionenfluss gestoppt (Abb. III-44).

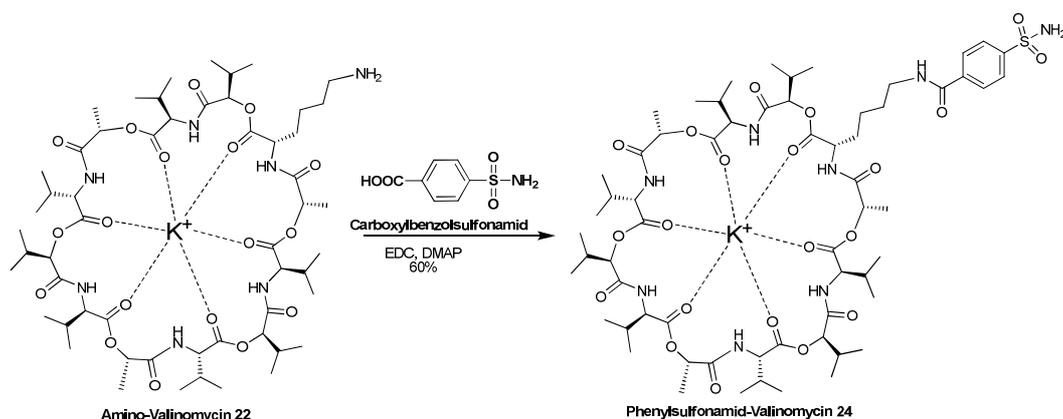


**Abb. III-44:** Phenylsulfonamid-Valinomycin wird durch Zugabe einer Carboanhydrase am Kaliumtransport gehindert.

Als Sulfonamid-Ligand wurde Carboxylbenzolsulfonamid ausgewählt, da es sich über die Carboxylfunktionalität leicht an Amino-Valinomycin kuppeln lässt und es gleichzeitig durch den Benzolring hydrophob ist.

#### III.2.5.1 Synthese

Die Synthese des Sulfonamid-Valinomycins entsprach bis zu der Stufe des Amino-Valinomycins **22** der in Kapitel III.2.4.1 beschriebenen Strategie. An **22** wurde dann im letzten Schritt Carboxylbenzolsulfonamid mit Hilfe von EDC und DMAP gekuppelt (Abb. III-45). Die Ausbeute betrug 60%.



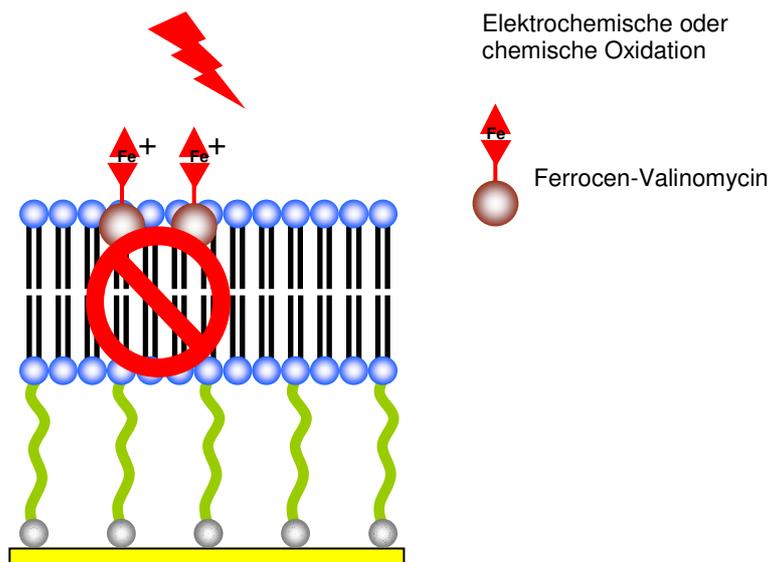
**Abb. III-45:** Synthese von Phenylsulfonamid-Valinomycin **24** aus Amino-Valinomycin **22**.

#### III.2.5.2 EIS-Messungen

Die EIS-Messungen von Sulfonamid-Valinomycin ergaben nur einen kleinen Rückgang des Widerstandes. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der Phenylsulfonamid-Ligand eine schwache Säure ist und in einem neutralen Milieu als SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup>-Ion vorliegt.<sup>[188]</sup> Aufgrund der freien negativen Ladung kann er die Membran somit nicht überwinden. Ein Absenken des pH-Wertes auf 4,5 ergab keine Verbesserung der Ionentransportfähigkeit des Sulfonamid-Valinomycins. Da die Membranen unterhalb eines pH von 4 instabil werden, wurde von weiteren Messungen abgesehen.

#### III.2.6 Ferrocen-Valinomycin

Ferrocen-Valinomycin wurde als Beispiel eines nicht biologischen Sensorkonzeptes synthetisiert. Dabei wurde der Umstand ausgenutzt, dass geladene Moleküle Membranen nicht überwinden können. Wird das Ferrocen-Valinomycin oxidiert (chemisch oder elektrochemisch), sollte es die Membran nicht mehr durchdringen können und der Widerstand auch in Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen ansteigen (Abb. III-46).



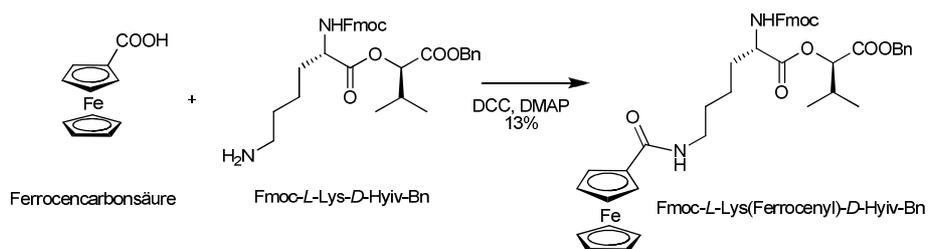
**Abb. III-46:** Sensorkonzept mit Ferrocen-Valinomycin. Nach Oxidation wird der Kaliumtransport gestoppt.

Ein Vorteil von Ferrocen im Vergleich zu Biotin oder FITC ist, dass es sehr hydrophob ist. Dadurch sollte der Ionentransport des nicht oxidierten Ferrocen-Valinomycins möglich sein.

#### III.2.5.1 Synthese

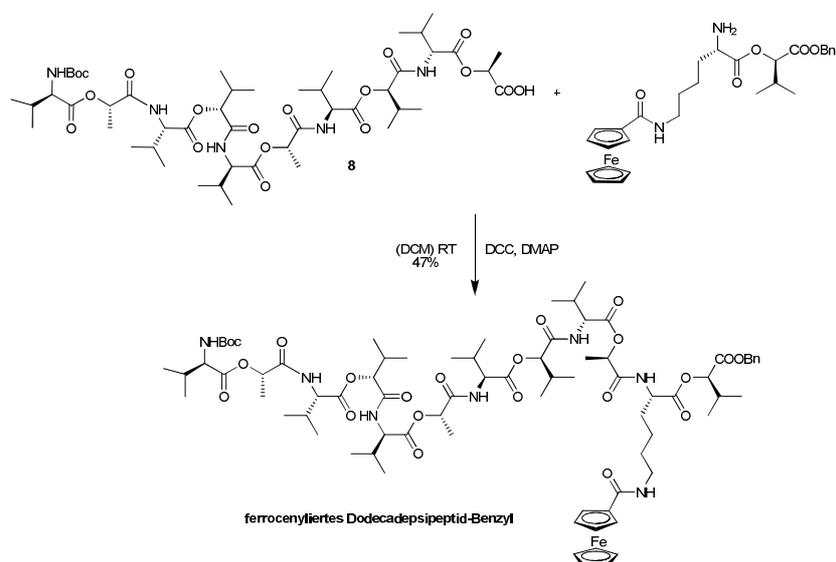
Zunächst wurde die Synthese über das modifizierte Didepsid Fmoc-Lys(Boc)-Hyiv-Bn durchgeführt (Synthese wie oben beschrieben, nicht im experimentellen Teil aufgeführt). Nach erfolgreicher Boc-Entschützung wurde Ferrocencarbonsäure mit Hilfe von DCC und DMAP an das freie Amin gekuppelt (Abb. III-47). Die Ausbeute hierbei lag jedoch nur bei 13%, was hauptsächlich auf die geringe Löslichkeit der Ferrocencarbonsäure in DCM zurückzuführen ist.

### III. Ergebnisse und Diskussion



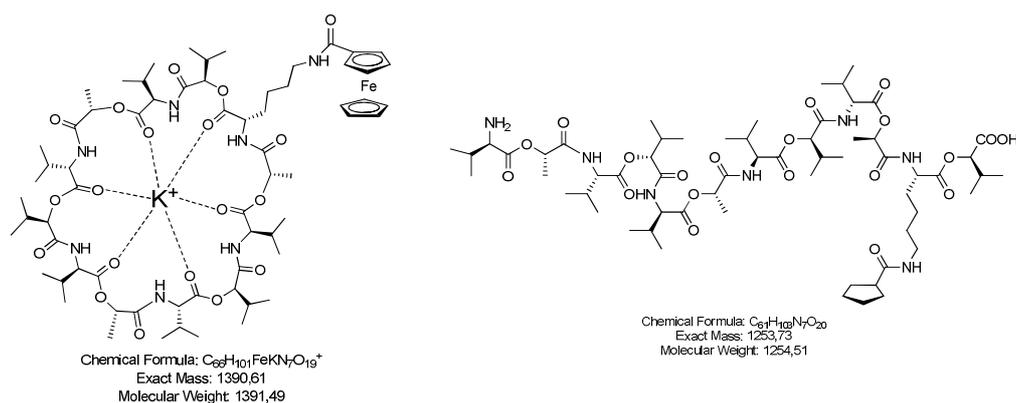
**Abb. III-47:** Synthese von Fmoc-L-Lys(ferrocenyl)-Hyiv-Bn.

Die Fmoc-Entschützung des Fc-Didepsides erfolgte mit 20% Piperidin in DMF und anschließender Aufreinigung über Säulenchromatographie. Hierbei wurde das entstandene Amin mit Methanol von der Säule gespült. Die Umsetzung mit dem Decadepsipeptid-Precursor **8** ergab eine Ausbeute von 47% (Abb. III-48).



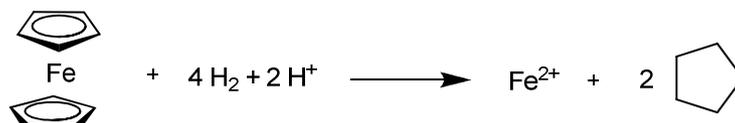
**Abb. III-48:** Synthese des ferrocenylierten Dodecadepsipeptides mit Benzyl-Schutzgruppe.

Das ferrocenylierte Dodecadepsipeptid mit Benzyl-Schutzgruppe wurde zunächst Benzyl- und dann Boc-entschützt. Die Zyklisierung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Eine massenspektrometrische Untersuchung des Rohprodukts ergab jedoch kein Produkt-Signal ( $m/z$ : 1374,6 [ $m+\text{Na}^+$ ] $^+$ ; 1390,6 [ $m+\text{K}^+$ ] $^+$ ), sondern ein Molekulargewicht von 1254,8 g/mol. Vermutlich wurde während der Hydrierung zusätzlich zur Benzyl-Schutzgruppe auch das Ferrocen hydriert (Abb. III-49) und außerdem scheint die Zyklisierung nicht erfolgreich gewesen zu sein.



**Abb. III-49:** Fc-Valinomycin und hydriertes Fc-Dodecadepsipeptid.

Die Möglichkeit Ferrocen mit Palladium und Wasserstoff zu hydrieren wurde bereits 1975 von Van Meurs *et al.* beschrieben.<sup>[189]</sup> Diese Reaktion wurde allerdings nur unter sauren Bedingungen beschrieben (Abb. III-50).



**Abb. III-50:** Hydrierung von Ferrocen im sauren Milieu.

Bei der hier beschriebenen Benzyl-Entschützung wurde jedoch keine Säure zugegeben. Dies bedeutet, dass die entstehende freie Carbonsäure die Hydrierung des Ferrocens ermöglichen muss.

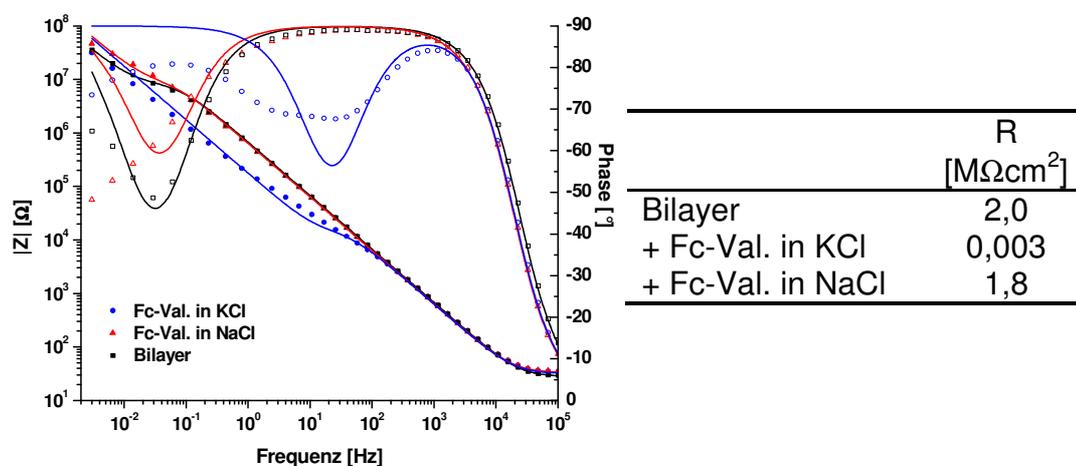
Analog zur Synthese des FITC-Valinomycins wurde nun anstatt des Benzylgeschützten Didepsids das modifizierte Didepsid **16** mit Allyl-Schutzgruppe verwendet. Nach erfolgreicher Boc-Entschützung sollte Ferrocencarbonsäure an **16** gekuppelt werden (Abb. III-47). Dazu wurden mehrere Aktivierungsmethoden wie DCC/DMAP, EDC/DMAP, Thionylchlorid und Oxalylchlorid ausprobiert. Hierbei war jedoch nur die Oxalylchlorid-Methode von Erfolg gekrönt. Dabei wurde die Ferrocencarbonsäure in Tetrachlorkohlenstoff gelöst und 2,5 Äquivalente Oxalylchlorid langsam zugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der verbliebene Rückstand in DCM aufgenommen. Das so entstandene Säurechlorid wurde dann langsam zu einer eisgekühlten Mischung aus **16**, DMAP und DIPEA zugegeben und zwei Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung über Säulenchromatographie betrug die Ausbeute 16%.

Nach der Fmoc-Entschützung von **16** wurde es mit **8** zum ferrocenylierten Dodecadepsipeptid **18** mit einer Ausbeute von 27% umgesetzt (Abb. III-48) und das so entstandene lineare Dodecadepsipeptid **18** Allyl- / Boc-entschützt und zyklisiert. Per Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Zyklisierung erfolgreich war und das Ferrocen intakt geblieben ist.

#### III.2.6.2 EIS-Messungen

Für die EIS-Messungen wurde eine Lösung mit 1 mg/mL Fc-Valinomycin in Dioxan hergestellt, da das Depsipeptid in Ethanol nur schlecht löslich ist. Der Einfluss von Dioxan auf die Membran wurde überprüft; die Membran verhielt sich wie bei Zugabe von Ethanol, d.h. es war ein leichter Rückgang des Widerstandes messbar (Kap. III.2.3.2).

Fc-Valinomycin zeigte in tBLMs eine vergleichbar gute Ionentransportfähigkeit wie natürliches Valinomycin (Abb. III-51).

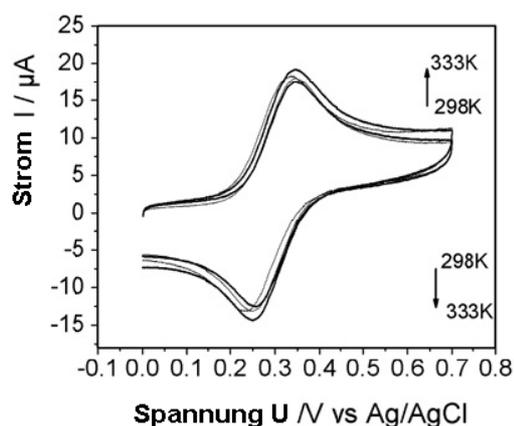


**Abb. III-51:** EIS-Messungen von Fc-Valinomycin in einer tBLM.

Ferrocen ist somit im nicht-oxidierten Zustand hydrophob genug, um Valinomycin beim Überwinden der Membran nicht zu stören. Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob es sich auch innerhalb der Membran oxidieren lässt. Dies ist die Voraussetzung für eine Anwendung als Redox-Sensor.

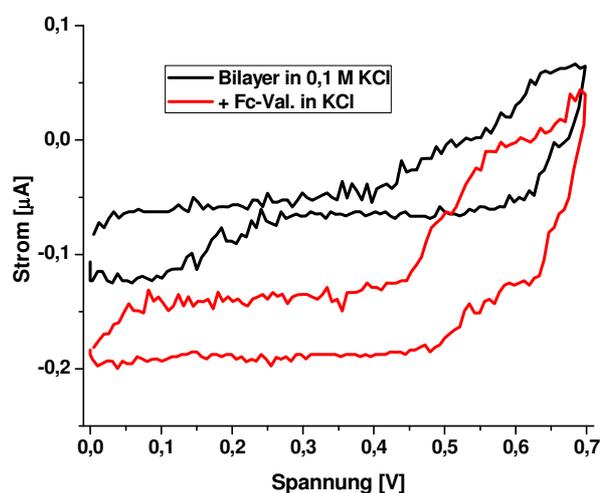
### III.2.5.3 Redox-Sensor

Ferrocen kann elektrochemisch oder chemisch oxidiert werden. Die elektrochemische Oxidation lässt sich am Besten über zyklische Voltammetrie (*cyclic voltammetry*, CV) durchführen. Dabei wird eine sägezahnförmige Spannung angelegt und die Stromantwort gemessen. Ein typisches CV-Diagramm von Ferrocen ist in Abb. III-52 dargestellt.



**Abb. III-52:** CV-Diagramm von Ferrocen.<sup>[190]</sup>

Es wurden CV-Diagramme einer tBLM in 0,1 M KCl mit und ohne Ferrocen-Valinomycin gemessen (Abb. III-53).



**Abb. III-53:** CV-Diagramm einer tBLM vor und nach Zugabe von Fc-Valinomycin.

Es ist gut erkennbar, dass bei einer Membran ohne Valinomycin und einer mit Ionencarrier fast eine identische Kurvenform im CV-Diagramm sichtbar ist, das typische Ferrocen-Signal tritt nicht auf. Die Unterschiede sind auf die Schwankungen innerhalb der Membran zurückzuführen. Zu dem in Abb. III-52 gezeigten Beispiel aus der Literatur ist in der Stromantwort außerdem ein Unterschied um den Faktor 10 sichtbar.

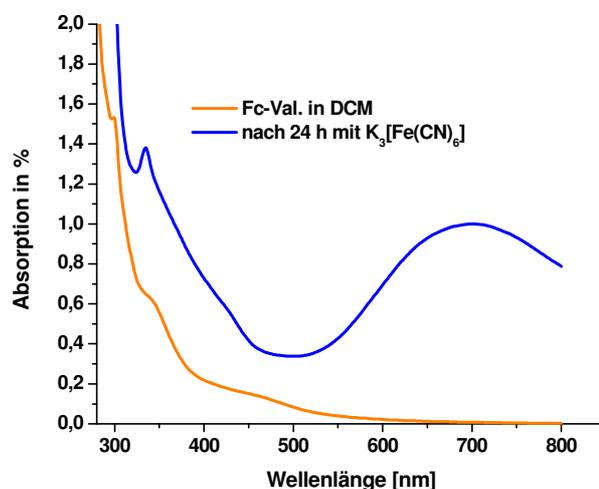
Die gemessenen CV-Diagramme entsprachen aus mehreren Gründen nicht dem klassischen Ferrocen-Signal. Zum Einen ist die Konzentration an Fc-Valinomycin innerhalb der Zelle und damit innerhalb der Membran sehr gering ( $c < 10^{-5}$  mol/l in der Messzelle). Wird ein Standard-CV von Ferrocen aufgenommen, liegt die Konzentration in der Regel zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  mol/l. Zum Anderen ist das Fc-Valinomycin nicht im Lösungsmittel gelöst, sondern in die Membran inkorporiert. Dadurch kann es sich innerhalb der Messzelle nicht frei bewegen und wird durch den Abstandshalter der Membran von der Arbeitselektrode ferngehalten. Eine Oxidation über den *Spacer* hinaus und damit über ca. 2 nm Distanz ist also nicht möglich.

Um dies zu überprüfen wurde auf eine Membran mit inkorporiertem Fc-Valinomycin eine Spannung von 0,5 V über 10 min angelegt. Dies sollte eine Oxidation des Ionencarriers bewirken. Im Impedanz-Spektrum wäre ein Anstieg des Widerstandes messbar gewesen, was jedoch nicht der Fall war. Auch eine Erhöhung der Spannung auf bis zu 1,0 V und eine Verlängerung der Dauer führten nicht zu einer messbaren Widerstandserhöhung. Dies bestätigt die Ergebnisse der CV-Messungen, nämlich dass das Fc-Valinomycin zu weit weg von der Elektrode ist, um oxidiert zu werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Hauptaugenmerk auf die chemische Oxidation des Ferrocens gelegt. Diese kann mit diversen Eisensalzen wie z.B. Eisenchlorid oder Kaliumhexacyanoferrat(III) erfolgen.

Zur leichteren Überprüfung der Redox-Eigenschaften von Ferrocen-Valinomycin wurde ein zweiphasiges System aus 0,1 M Kaliumhexacyanoferrat(III) in Wasser und Ferrocen-Valinomycin in Dichlormethan (1 mg/mL) hergestellt. Dieses wurde 24 Stunden gerührt und die organische Phase im UV/VIS-Spektrometer untersucht. Zum Vergleich wurde vor der Oxidation die Fc-Valinomycin-Lösung vermessen. Schon mit bloßem Auge konnte man

einen Farbunterschied erkennen. Die nicht-oxidierte Lösung war orange-gelb, die oxidierte blau-grün (Abb. III-54).



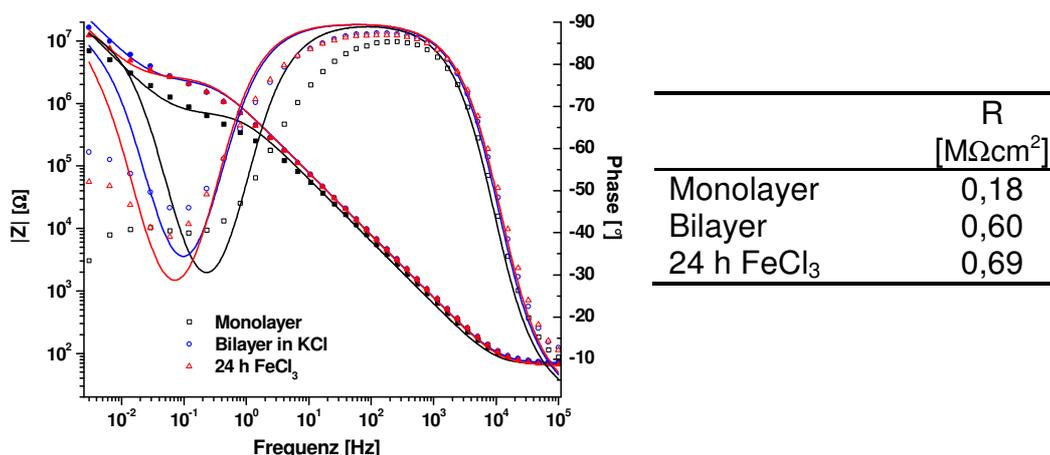
**Abb. III-54:** UV/VIS-Spektrum von Ferrocen-Valinomycin vor (orange) und nach der Oxidation mit rotem Blutlaugensalz ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ).

Auch die Reduktion mit gelbem Blutlaugensalz ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) funktionierte in diesem System. Man erhielt wieder eine orange-farbene Lösung mit der in Abb. III-54 gezeigten Absorption.

Ein solches zweiphasiges System kann als Testsystem für die Oxidation eines Ferrocen-tragenden Ionencarriers innerhalb einer Membran angesehen werden,<sup>[191]</sup> da hier ebenfalls eine Phasengrenze überschritten werden muss. Die hier gezeigten Ergebnisse geben somit erste Hinweise, dass die chemische Oxidation und Reduktion des Fc-Valinomycins innerhalb der Membran funktionieren kann. Dies wird im Folgenden mit Hilfe von EIS-Messungen näher untersucht.

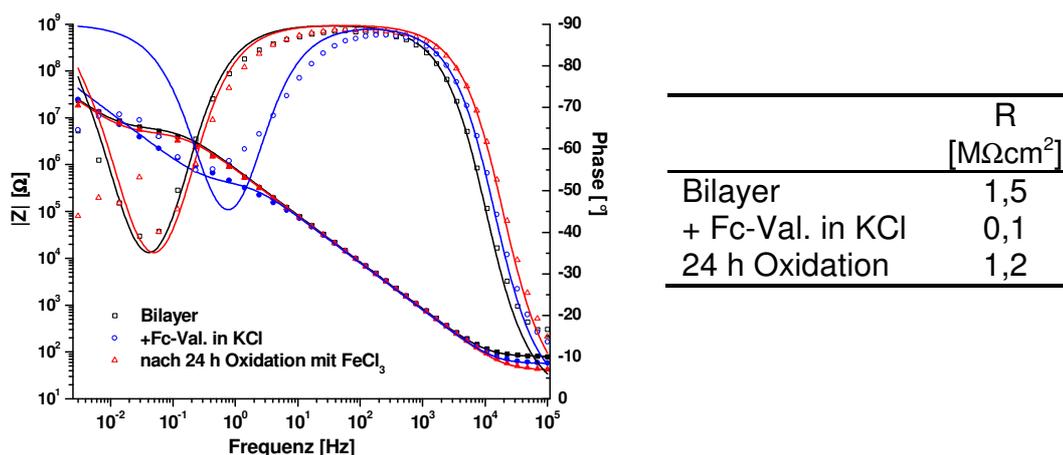
Als erstes Oxidationsmittel wurde Eisen(III)chlorid als 0,1 M Lösung getestet. Die wässrige,  $FeCl_3$ -haltige Suspension (+ 0,1 M KCl) wurde auf die Membran ohne Ionencarrier gegeben und 24 h einwirken gelassen. Danach wurde die Zelle mehrmals mit 0,1 M KCl-Lösung gespült und ein Impedanzspektrum aufgenommen. Man konnte fast keinen Unterschied zur vorherigen Messung feststellen, d.h. Eisen(III)chlorid beeinflusst die Lipidstruktur der Membran nur unwesentlich (Abb. III-55).

### III. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. III-55:** Einfluss von Eisen(III)chlorid auf eine Membran ohne Valinomycin.

Danach wurde die Messung mit einer Fc-Valinomycin-haltigen Membran wiederholt. Dabei ist eine Zugabe von KCl erforderlich, um die Beweglichkeit des Valinomycins innerhalb der Membran hoch zu halten und damit möglichst viele Ferrocen-Moleküle zu oxidieren. Nach 24 h war ein deutlicher Anstieg im Widerstand messbar (Abb. III-56). Es konnte somit bewiesen werden, dass Ferrocen-Valinomycin auch innerhalb einer Membran chemisch oxidiert werden kann.

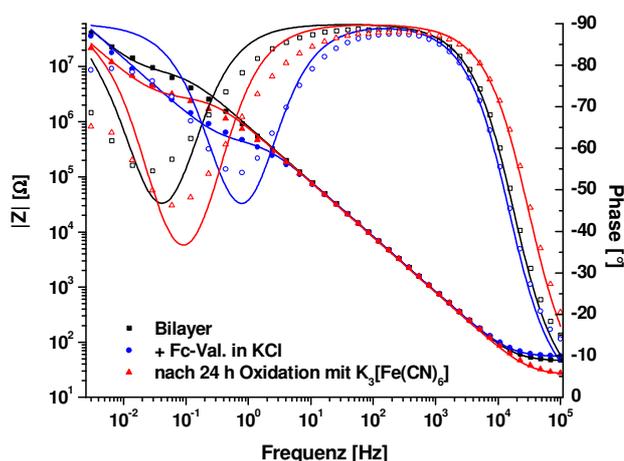


**Abb. III-56:** Oxidation von Fc-Valinomycin mit 0,1 M FeCl<sub>3</sub> (+ 0,1 M KCl).

Einziger Nachteil der Oxidation mit Eisen(III)chlorid ist die schlechte Löslichkeit des Oxidationsmittels in Wasser. Man konnte trotz intensiven

Spülens einen rot-bräunlichen Belag auf dem *TSG-Slide* erkennen. Dieser zerstörte zwar nicht die Membran, verhinderte aber unter Umständen die nachfolgende Reduktion des Fc-Valinomycins, da das Reduktionsmittel nur mit den Resten des Oxidationsmittels und nicht mit dem oxidierten Ferrocen-Valinomycin reagieren würde. Durch Verwendung eines wasserlöslicheren Oxidationsmittels sollte dieser Nachteil überwunden werden.

Ein solches Oxidationsmittel ist das rote Blutlaugensalz, das bereits in den UV/VIS-Messungen Verwendung fand. Es wurde eine 0,1 M  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung hergestellt und 24 h auf die Membran mit inkorporiertem Fc-Valinomycin einwirken gelassen (auf die leere Membran hatte es keinen Einfluss). Danach wurde intensiv mit 0,1 M KCl-Lösung gespült und eine EIS-Messung durchgeführt (Abb. III-57).



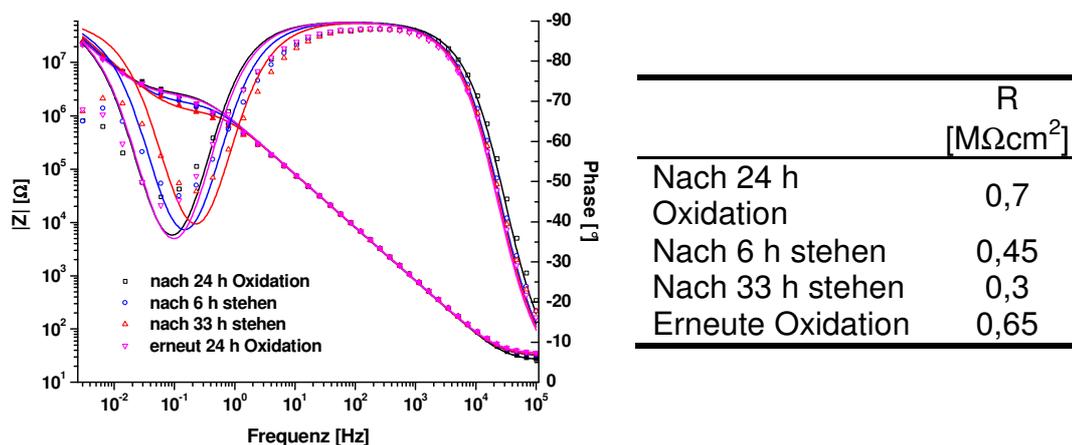
	R
	[MΩcm <sup>2</sup> ]
Bilayer	1,9
+ Fc-Val. in KCl	0,1
24 h Oxidation	0,7

**Abb. III-57:** EIS-Spektrum einer tBLM mit Fc-Valinomycin vor und nach der Oxidation mit rotem Blutlaugensalz.

Auch hier war die Oxidation erfolgreich, wenn auch nicht in so hohem Umfang wie bei Eisen(III)chlorid. Rotes Blutlaugensalz hat den Vorteil, dass es sehr gut wasserlöslich ist und sich damit leicht wieder aus der Zelle herausspülen lässt, ohne Rückstände auf der Membran zu hinterlassen. Trotzdem ist eine durch einen Spritzenfilter (0,45 μm) gefilterte 0,1 M  $FeCl_3$ -Lösung mit 0,1 M KCl als Oxidationsmittel zu bevorzugen, da Eisenchlorid ein wesentlich stärkeres Oxidationsmittel als  $K_3[Fe(CN)_6]$  ist und man damit die Unterschiede zwischen oxidierte und reduzierte Form leichter erkennen und messen kann.

### III. Ergebnisse und Diskussion

In den nach der Oxidation durchgeführten Messungen mit oxidiertem Fc-Valinomycin war auffällig, dass der Widerstand langsam wieder sank. Es fand auch ohne Reduktionsmittel eine leichte Reduktion statt (Abb. III-58), die sich durch erneute Zugabe von 0,1 M  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung über 24 h wieder rückgängig machen ließ.



**Abb. III-58:** Langsame Reduktion von oxidiertem Fc-Valinomycin ohne Reduktionsmittel.

Eine Erklärung für diesen Effekt kann die bevorzugte Rückbildung von Ferrocen aus dem Ferrocinium-Ion sein, da das ungeladene Ferrocen ein 18-Elektronen-Komplex und damit die wesentlich stabilere Form ist.

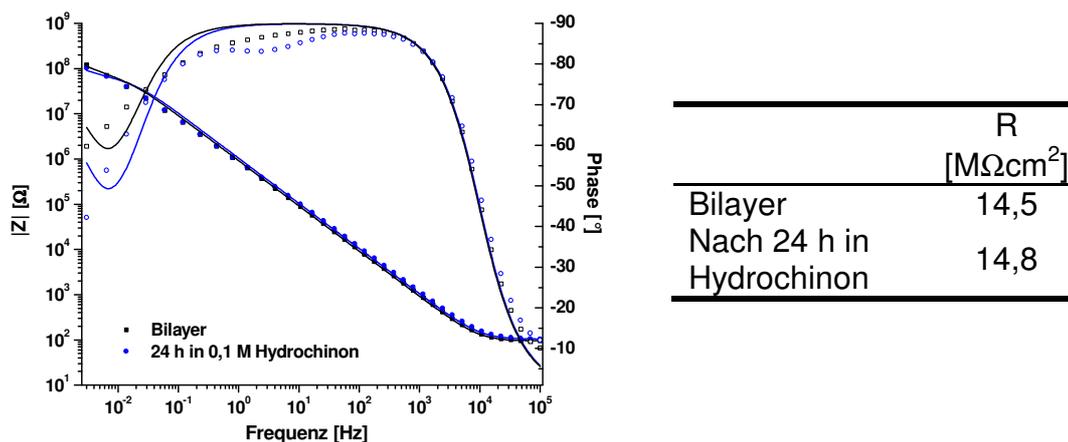
Um einen komplett reversiblen Oxidationssensor zu erhalten, sollte die Reduktion jedoch schneller möglich sein. Dies kann nur durch ein chemisches Reduktionsmittel erreicht werden.

Dafür wurden diverse Reduktionsmittel wie Mannose, Vitamin C und gelbes Blutlaugensalz ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) ausprobiert. Dabei war in Stabilitätstest, bei denen die Reduktionsmittel 24 h auf die leere Membran einwirken gelassen wurden, erkennbar, dass die Ascorbinsäure die Membran zerstört, während die anderen beiden Reduktionsmittel die Membran intakt ließen. Es konnte jedoch bei diesen Reduktionsmitteln kein Rückgang des Widerstandes gemessen werden und damit auch keine Reduktion am Fc-Valinomycin.

Stärkere Reduktionsmittel sind Hydrochinon und Natriumthiosulfat. Beide wurden als 0,1 M wässrige Lösung (+ 0,1 M KCl) verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob die beiden Reduktionsmittel die Zusammensetzung einer leeren

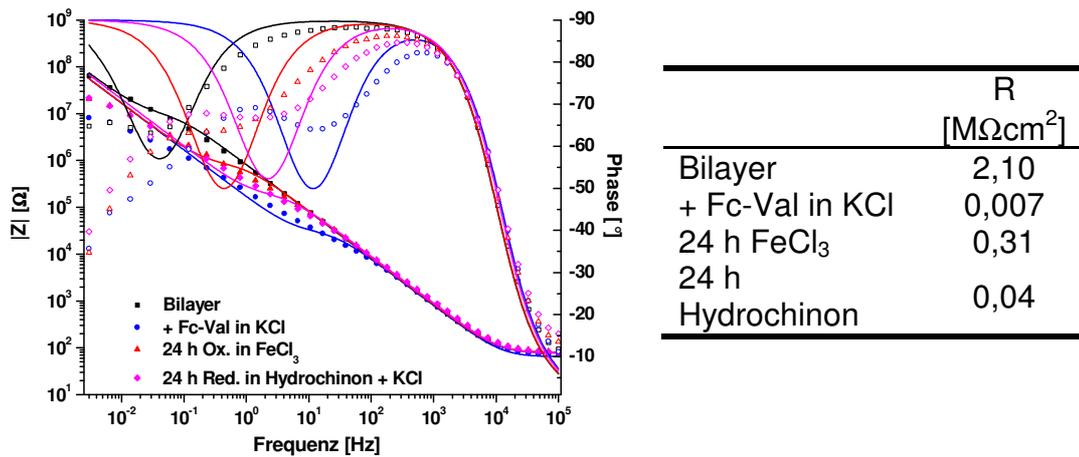
### III. Ergebnisse und Diskussion

Membran beeinflussen. Dabei konnte festgestellt werden, dass Natriumthiosulfat die Beschaffenheit der Membran derart beeinflusst, dass der Widerstand deutlich sinkt. Ein Grund hierfür könnte in der Reaktion des  $S_2O_3^{2-}$ -Anions mit der Goldoberfläche bestehen, bei der die Lipid-Ankergruppen abgelöst werden könnten. Die Hydrochinon-Lösung hat hingegen keinen starken Einfluss auf die Membran (Abb. III-59).



**Abb. III-59:** Einfluss einer 0,1 M Hydrochinon-Lösung auf eine leere Membran.

Die Oxidation des Fc-Valinomycins erfolgte mit Eisen(III)chlorid über 24 h, danach wurde gespült und drei Impedanzspektren gemessen. Für die anschließende Reduktion wurde die Reduktionslösung ebenfalls 24 h auf die Membran einwirken gelassen. Es war ein deutlicher Rückgang im Widerstand sichtbar, auch wenn dieser sich nicht bis auf den Ausgangswert wieder erholte (Abb. III-60). Eine anschließende erneute Oxidation zeigte sich in einem Widerstandanstieg (nicht in der Abb. gezeigt).



**Abb. III-60:** Reduktion von Fc-Valinomycins mit 0,1 M Hydrochinon-Lösung.

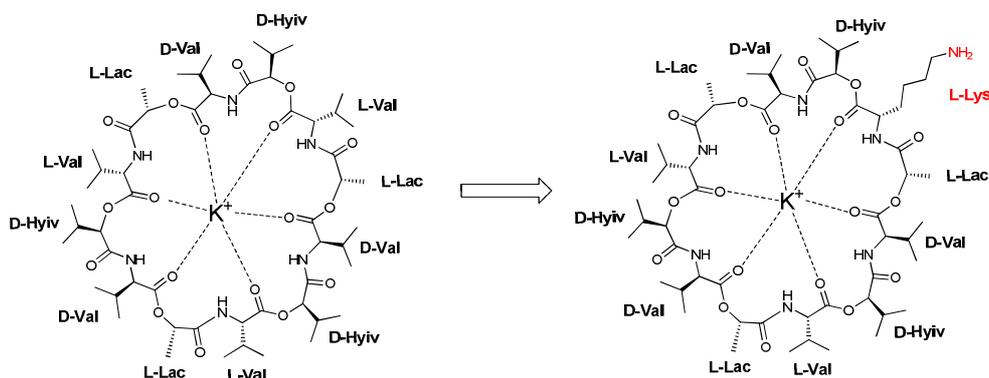
Es konnte somit gezeigt werden, dass eine chemische Oxidation und Reduktion von Fc-Valinomycin innerhalb einer Membran möglich ist. Dieses System kann somit als Redox-Sensor verwendet werden.

## IV Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Derivate des Ionentransporters Valinomycin synthetisiert und als Sensorelemente in Modellmembransysteme inkorporiert. Als Modellmembranen wurden festkörpergestützte Lipiddoppelschichten (tBLMs, *tethered bilayer lipid membranes*<sup>[56]</sup>) verwendet, die aus einem Ankerlipid mit Abstandshalter (DPhyTL) und einem freien Lipid (DPhyPC) aufgebaut wurden.

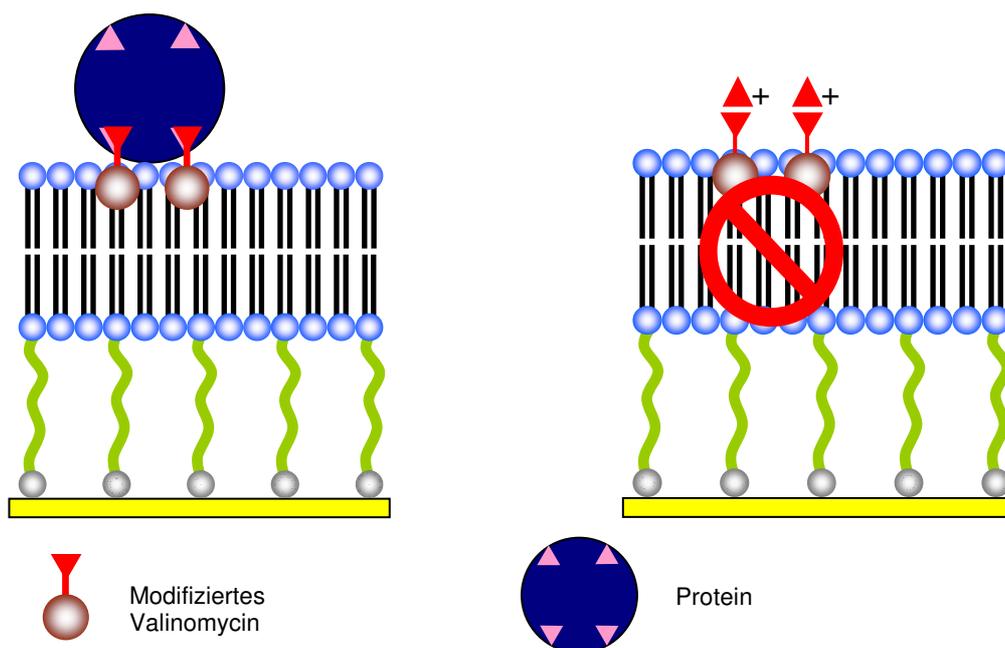
Um zu überprüfen, ob sich eine Lipidmembran – egal welcher Art - gebildet hat, wird in der Regel das Antibiotikum Valinomycin zugegeben. Es transportiert selektiv Kalium-Ionen durch Membranen, was durch einen Rückgang des Widerstandes über elektrochemische Messmethoden nachgewiesen werden kann. Valinomycin ist ein zyklisches Dodecadepsipeptid, es besteht aus zwei verschiedenen Aminosäuren (*L*- und *D*-Valin) und zwei verschiedenen  $\alpha$ -Hydroxysäuren (*L*-Milchsäure und *D*-Hydroxyisovaleriansäure).

In dieser Arbeit wurde ein Valinomycin-Derivat synthetisiert, bei dem ein *L*-Valin durch ein *L*-Lysin ausgetauscht wurde, um eine freie Aminogruppe zum Anbinden verschiedenster Liganden zu erhalten (Abb. IV-1).



**Abb. IV-1:** Struktur von natürlichem Valinomycin (linke Seite) im Vergleich mit Lysin-Valinomycin (rechte Seite).

Die Synthese erfolgte in Lösung über einen linearen Decadepsipeptid-*Precursor*, der als Ausgangssubstanz für alle hergestellten Derivate diente. Hierbei wurde hauptsächlich mit Benzyl- und Boc-Schutzgruppen gearbeitet. An den *Precursor* wurden dann unterschiedlich modifizierte Lysin-Dideptide gebunden, wobei das Lysin entweder bereits den Liganden trug oder noch über eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt war, um dann nach erfolgreicher Zyklisierung des linearen Dodecadepsipeptides einen Liganden anzubinden. Es wurden sechs verschiedene Derivate des Valinomycins synthetisiert und in tBLMs inkorporiert. Um diese als Sensoren nutzen zu können, wurde ihre Ionen-transportfähigkeit mit Hilfe des angebondenen Liganden blockiert. Diese Blockade kann entweder mechanisch durch Festhalten des Ionencarriers an der Oberfläche der Membran oder chemisch durch Einbringen einer Ladung am Valinomycin erfolgen, da geladene Moleküle eine Membran nicht überwinden können (Abb. IV-2).



**Abb. IV-2:** Eine Blockade des Valinomycinderivates kann mechanisch (linke Seite) oder chemisch (rechte Seite) erfolgen.

Acetyl-Lysin-Valinomycin wurde als Testsystem hergestellt, um herauszufinden, ob die Synthese einen funktionsfähigen Ionencarrier ergeben hatte. Jede Störung bzw. Verzerrung der Backbone-Struktur z.B. durch racemerisierungsbedingten Einbau eines falschen Enantiomers in eines der 12 Stereozentren würde die Komplexierungsfähigkeit des Ionencarriers

extrem herabsetzen.<sup>[59]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass der hier angewandte Syntheseweg einen transportfähigen Ionencarrier hervorbringt.

Im nächsten Schritt wurde Lysin-Valinomycin mit freier Aminogruppe synthetisiert und in tBLMs eingebaut, um dieses System als pH-Sensor zu nutzen und damit zu überprüfen, ob das chemische Einbringen einer Ladung am Valinomycin möglich ist und damit die Transportfähigkeit des Carriers gestört wird. Es konnte ein pH-abhängiger Kalium-Transport nachgewiesen werden, die Blockade der Ionentransportfähigkeit über eine eingebrachte Ladung ist somit möglich.

Auf dem gleichen Konzept beruht das Ferrocen-tragende Valinomycin. Wird der Ferrocen-Ligand oxidiert, liegt eine positive Ladung vor und der Ionencarrier kann die Membran nicht mehr überwinden. Eine Reduktion macht diesen Prozess reversibel. Ferrocen-Valinomycin wurde in tBLMs eingebaut und konnte chemisch oxidiert werden, die elektrochemische Oxidation war aufgrund des zu großen Abstandes des Ferrocens von der Elektrode jedoch nicht möglich. Die chemische Reduktion erfolgte mit Hydrochinon in gleicher Weise wie die chemische Oxidation. Dieses System kann somit als Redox-Sensor eingesetzt werden.

Eine mechanische Blockade des Valinomyocins liegt dem Biotin- und dem Sulfonamid-Valinomycin zugrunde. Im Falle des Biotin-Valinomyocins soll die Zugabe von Streptavidin den Ionentransport durch die Membran stoppen, im Fall des Sulfonamid-Valinomyocins die Zugabe einer Carboanhydrase. Es stellte sich heraus, dass der Biotin-Ligand zu hydrophil ist, um die Membran zu überwinden. Es erfolgte zwar ein Einbau des Ionencarriers in die Membran, aber es konnte kein Kaliumtransport gemessen werden. Ein wesentlich weniger hydrophiler Ligand ist Phenylsulfonamid, dieser konnte die Membran jedoch auch nicht überwinden, da er im neutralen Milieu negativ geladen vorliegt. Die mechanische Blockade von Valinomycin und damit die Anwendung als Biosensor konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Synthese eines fluoreszenz-markierten (FITC) Valinomyocins ergab zwar auch keinen transportfähigen Ionencarrier, aber mit diesem Derivat konnte der Diffusionskoeffizient von Valinomycin in sBLMs mit Hilfe von *Fluorescence Recovery after photobleaching* (FRAP) bestimmt werden.

### IV.1 Ausblick

Da Nervenzellen Signale mit Hilfe von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Gradienten weiterleiten, ermöglicht ein schaltbarer, membrangängiger Ionentransporter oder -Kanal eine Manipulation von Organismen auf neuronaler Ebene. Ein solches Konzept wurde bereits von Szobota *et al.* in Nervenzellkulturen und sogar *in vivo* in Zebrafischlarven eingesetzt.<sup>[192]</sup> Dabei werden durch einen photoschaltbaren Kanal Aktionspotentiale in der Nervenzelle ausgelöst, wenn dieser mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und damit aktiviert wird. Dies bewirkte, dass die Zebrafischlarve beim Berühren keinen Fluchtreflex zeigte. Wurde Licht einer anderen Wellenlänge eingestrahlt, war der Kanal deaktiviert und die Larve flüchtete bei Berührung.

In ähnlicher Weise könnte ein schaltbares Valinomycin eingesetzt werden. Es erfüllt die Voraussetzung membrangängig zu sein und transportiert außerdem selektiv Kalium-Ionen. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Beispiel hat Valinomycin den Vorteil, dass es gezielt in den verschiedensten Varianten synthetisiert werden kann. Damit fällt die aufwändige rekombinante Erzeugung eines mutierten Ionenkanals weg und es kann auf jegliche Arten von Zellen gegeben werden. Eine erste Variante dieses Valinomyocins mit Lichtschalter wurde von Christian Pett im Rahmen seiner Diplomarbeit synthetisiert.<sup>[193]</sup> Ein photosensibles Valinomycin hat außerdem den Vorteil, dass es als Antibiotikum zytotoxische Wirkung hat, welche man dann je nach Bedarf ein- und ausschalten könnte (zielgerichtete Therapie).

Für die Anwendung des Valinomyocins als Biosensor sind die Möglichkeiten begrenzt, da die Proteinliganden oft zu sperrig oder zu hydrophil sind, um gemeinsam mit dem Valinomycin die Membran durchdringen zu können. Dagegen ist die Kombination von Valinomycin mit Ferrocen ein vielversprechendes Konzept, eine Anwendung könnte hierbei der Einsatz als Glukose-Sensor für Diabetiker sein. Der Vorteil zu Teststreifen mit Farbreaktion (Glukose-Oxidase-Test, GOD) wäre die elektronische Auslesung des Signals, denn das System aus festkörperunterstützter Membran und Valinomycin ist eine Schnittstelle zwischen chemischem und elektronischem Signal. Die Daten könnten direkt ausgewertet und gespeichert werden.

## V Experimenteller Teil

### V.1 Material und Methoden, Membranen

#### V.1.1 Chemikalien

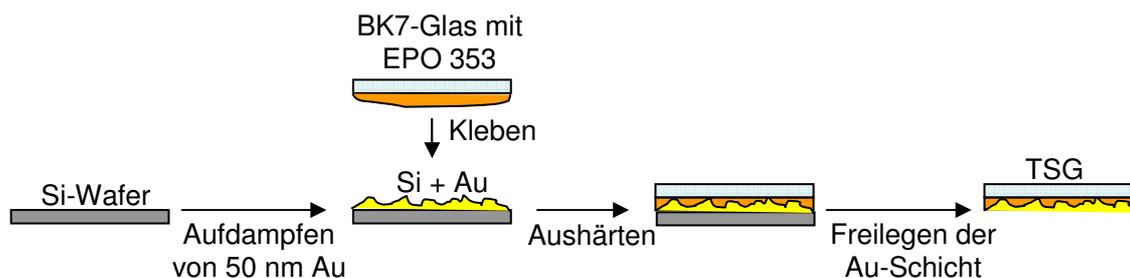
Als Ankerlipid wurde DPhyTL (2,3-di-*O*-Phytanyl-glycerol-1-tetraethylene glycol-*D,L*-Liponsäureester) verwendet, das gemäß Schiller et al.<sup>[56]</sup> synthetisiert worden ist. Als freies Lipid wurde DPhyPC (1,2-di-*O*-Phytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) eingesetzt, das kommerziell erhältlich ist (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL, USA).

Pufferlösungen (0,1 M) wurden aus KCl oder NaCl (*Acros organics*, Geel, Belgien) und Wasser, das über ein Millipore-Aufreinigungsanlage (*Millipore GmbH*, Eschborn, Deutschland) gereinigt wurde (spezifischer Widerstand  $>18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ), hergestellt. PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) wurde von *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, USA) bezogen und KCl zugesetzt, um eine Konzentration von 0,1 M KCl zu erreichen. Gelbes und rotes Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanoferrat,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) wurden ebenfalls von *Sigma-Aldrich* erworben und als 0,1 M Lösung verwendet.

Messungen mit Streptavidin (*Serva Electrophoresis*, Heidelberg, Deutschland) und Carboanhydrase (BCA II, *Sigma-Aldrich*) wurden alle in mit KCl angereichertem Pbs-Puffer durchgeführt. Natürliches Valinomycin wurde von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen.

#### V.1.2 Substrate

Die für die EIS-Messungen benötigten Monolayer wurden auf *Template Stripped Gold* (TSG) aufgebracht. TSG, das gemäß Naumann et al.<sup>[48]</sup> hergestellt wurde, verfügt über eine ultraflache Goldoberfläche<sup>[194, 195]</sup>, die zur Herstellung von tBLMs benötigt wird (Abb. V-1).



**Abb. V-1:** Herstellung von *Template Stripped Gold*

Zunächst wurde auf zuvor gereinigte Si-Wafer (*CrysTec*, Berlin, Deutschland) ca. 50 nm Gold elektrothermisch (*Edwards Auto 306 evaporation system*, Edwards, USA) aufgedampft. Auf ebenfalls zuvor gereinigte Objektträger (BK7, *Menzel GmbH*, Braunschweig, Deutschland) wurde je ein Tropfen Epoxy-Kleber von *EpoTek* (Epoxy Technology, USA) gegeben. Diese Träger wurden auf die mit Gold bedampften Si-Wafer geklebt und eine Stunde bei 150 °C erhitzt.

Die so erhaltenen *TSG-Slides* können ohne Qualitätsverluste wochenlang gelagert werden. Nach dem Freilegen der Goldoberfläche durch *Stripping* wurden sie für 24 Stunden in die *Selfassembly*-Lösung gegeben.

### V.1.3 Lipidmonolage

Es wurde eine *Selfassembly*-Lösung<sup>[196-198]</sup> aus 0,2 mg/mL DPhyTL in Ethanol hergestellt, in welcher der frische *TSG-Slide* für 24 Stunden inkubiert wurde. Danach wurde der Träger mit Ethanol gespült und mit Stickstoff trocken geblasen; er kann ohne erkennbare Einbußen für die EIS-Messungen über Wochen gelagert werden.

### V.1.4 Lipiddoppelschicht

Der Aufbau des Bilayers erfolgte über Vesikelfusion. Hierfür wurde DPhyPC in Reinstwasser ( $R > 18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ) mit einer Konzentration von 2 mg/mL suspendiert und eine Stunde bei 75 °C erwärmt. Währenddessen wurde die Suspension ca. alle 10 Minuten mit einem Vortexer durchmischt. Die Herstellung der Vesikel erfolgte durch 21-faches Extrudieren durch eine Polycarbonatmembran (Porendurchmesser: 50 nm). Von dieser klaren

Lösungen wurden 25 µl zum Monolayer pipettiert, wodurch man in der Messzelle (Zellvolumen: 1 mL) eine Lipidkonzentration von 0,05 mg/mL erhielt. Nach 14 Stunden war die Vesikelfusion abgeschlossen.

### **V.1.5 Inkorporation von Valinomycin**

1 mg Valinomycin wurden in 1 mL Ethanol ( $c = 9 \cdot 10^{-4}$  mol/l) bzw. im Fall des Ferrocen-Valinomycin und Phenylsulfonamid-Valinomycins in 1 mL Dioxan ( $c = 9 \cdot 10^{-4}$  mol/l) gelöst. Von dieser Lösung wurden 20 µl in die EIS-Messzelle pipettiert. Um den Einfluss des Ethanols/Dioxans auf die Membran möglichst gering zu halten, wurden auch höher konzentrierte Lösungen der modifizierten Valinomycine hergestellt. Hier lag die Konzentration bei  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, weshalb lediglich 10 µl zugegeben wurden.

## V.2 Material und Methoden, Synthese

Die verwendeten **Reagenzien** wurden von den Firmen *ABCR* (Karlsruhe, Deutschland), *Alfa-Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *IRIS Biotech* (Marktrechwitz, Deutschland), *NovaBiochem* (*Merck*, Darmstadt, Deutschland), *Riedel-de Haën* (Seelze, Deutschland) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen und entsprachen mindestens der Qualität „zur Synthese“. TCP- und WANG-Harz wurden von der Firma *NovaBiochem* bezogen.

Die **Festphasensynthesen** wurden in Kunststoffspritzen (10 mL) mit PE-Fritten der Firma *Vetter-Laborbedarf* durchgeführt. Die Durchmischung der Harze erfolgte durch Schütteln der Spritzen auf Geräten der Firma IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland).

**Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen** wurden auf mit Kieselgel der Korngröße 0,2 mm (ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>) beschichteten Aluminiumplatten der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Detektion der einzelnen Substanzflecke wurde anhand der UV-Absorption bei 254 nm vorgenommen oder durch ein Einfärbereagenz (0,2% Resorcinmonomethylether in Methanol und 12% konzentrierte Schwefelsäure in Methanol 1/1) vorgenommen.

**Flashsäulenchromatographische Trennungen** wurden mit 50 - 100 fachem Überschuss an Kieselgel 60 A (Korngröße 0,035 - 0,070 mm) der Firma *Acros Organics* (Geel, Belgien) durchgeführt. Die Trennungen erfolgten bei 0,5 bis 1,0 bar Überdruck.

Semipräparative **HPLC** wurde an einer Pharmacia Basic 100 F, Pumpensystem P-900, Detektionssystem UV-900, Steuerungssoftware: Unicorn, Version 3.00; Säulenmaterial: YMC-ODSA 120 10-C18 (10 µm, 250 µm, 20 mm) durchgeführt. Als Eluenten dienten Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1% TFA) und ACN / Wasser (90% ACN / 10% bidest.

Wasser + 0,1% TFA). Die Flussrate betrug 8 mL/min. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

Analytische **HPLC** (HPLC 1) wurde an einer Agilent 1100, Detektor DAD 1200, Säulenmaterial: Merck Purospher RP18e 125/4/5 durchgeführt. Als Eluenten dienen Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1% TFA) und ACN bzw. MeOH (+ 0,1% TFA). Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260,4 nm.

**Massenspektren** wurden an einem VG ZAB2-SE-FPD durch FG-MS oder an einem LCT-Spektrometer Q-TOF Ultima 3 der Firma *Micromass* (Eschborn, Deutschland) durch ESI-MS erhalten.

**HPLC-ESI-MS** Untersuchungen (HPLC 2) wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ ggf. in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard* HP 1100 (Säulenmaterial: *YMC ODS-A 120-3C18* (3  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 2 mm), Flussrate 0,3 mL/min) durchgeführt. Als Eluenten dienen Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1% Ameisensäure) und ACN (+ 0,1% Ameisensäure) im linearen Gradientenbetrieb (15 Minuten).

**NMR**-Spektren wurden mit dem Gerät Avance 250/300/500/700 MHz der Firma *Bruker* bei 300 K in deuterierten Lösungsmitteln ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  oder  $\text{DMSO-d}_6$ ) aufgenommen. Interner Standard für chemische Verschiebungen von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  waren die Lösungsmittelsignale von  $\text{DMSO}$  für  $^1\text{H}$  ( $\delta^1\text{H} = 2,49$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 39,52$  ppm),  $\text{CHCl}_3$  für  $^1\text{H}$  ( $\delta^1\text{H} = 7,26$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 77,16$  ppm) oder TMS ( $\delta^1\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C} = 0$  ppm) und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  für  $^1\text{H}$  ( $\delta^1\text{H} = 5,23$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 54,00$  ppm).

### V.2.1 Liste der synthetisierten Verbindungen

$\alpha$ -D-Hydroxyisovaleriansäure	1
Benzyl-D-Hydroxyisovaleriansäure; ( <b>D-Hyiv-Bn</b> )	2
Boc-D-Val-L-Lac-Bn	3
Boc-L-Val-D-Hyiv-Bn	4
Boc-L-Lys(biotinyl)-D-Hyiv-Bn	5
Boc-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn; ( <b>Tetradepsipeptid</b> )	6
Boc-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn; ( <b>Octadepsipeptid</b> )	7
Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn; ( <b>Decadepsipeptid</b> )	8
Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(Biotinyl)-D-Hyiv-Bn; ( <b>biotinyliertes Dodecadepsipeptid</b> )	9
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(Biotinyl)-D-Hyiv-); ( <b>Biotin-Valinomycin</b> )	10
Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Bn	11
Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Bn; ( <b>Dodecadepsipeptid-Bn</b> )	12
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys-D- Hyiv-); ( <b>Amino-Valinomycin</b> )	13
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(Acetyl)-D-Hyiv-); ( <b>Acetyl-Lysin-Valinomycin</b> )	14
Allyl-D-Hydroxyisovaleriansäure; ( <b>D-Hyiv-Allyl</b> )	15
Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Hyiv-Allyl	16
Fmoc-L-Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-Allyl	17
Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-Allyl; ( <b>ferrocenyliertes Dodecadepsipeptid</b> )	18
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-); ( <b>Ferrocen-Valinomycin</b> )	19
Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Allyl	20
Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L- Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Allyl; ( <b>Dodecadepsipeptid-Allyl</b> )	21

c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-); ( <b>Fmoc-Lysin-Valinomycin</b> )	<b>22</b>
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(FITC)-D-Hyiv-); ( <b>FITC-Valinomycin</b> )	<b>23</b>
c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(sulfamoylbenzamid)-D-Hyiv-); ( <b>Phenylsulfonamid-Valinomycin</b> )	<b>24</b>

## V.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### AAV 1 Synthese eines Dipeptides in Lösung mit Hilfe von DCC

Jeweils 1 eq. der Boc-geschützten Aminosäure und 1 eq. der Benzyl-geschützten  $\alpha$ -Hydroxysäure werden mit 0,1 eq. DMAP in DCM gelöst. Die Zugabe von 1,1 eq. DCC in DCM erfolgt bei  $-40^{\circ}\text{C}$ . Bei dieser Temperatur wird die Reaktion 16 h lang gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

### AAV 2 Synthese eines Dipeptides in Lösung mit Hilfe von DCC

Jeweils 1 eq. des Carbonsäurefragmentes und 1 eq. des Aminfragmentes werden mit 0,1 eq. DMAP in DCM gelöst. Die Zugabe von 1,1 eq. DCC in DCM erfolgt bei RT, es wird 16 h lang gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

### AAV 3 Abspalten der Boc-Schutzgruppe in Lösung

Das Boc-geschützte Fragment wird 2 h bei RT in DCM / TFA (4:1) gerührt, wobei der Reaktionsfortschritt über Dünnschichtchromatographie detektiert wird. Nach Zugabe von Toluol werden die Lösungsmittel abdestilliert, der verbleibende Rückstand mit EE aufgenommen und mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeengt.

### AAV 4 Abspalten der Bn-Schutzgruppe in Lösung

Das Bn-geschützte Fragment wird in Methanol gelöst und unter  $\text{Ar}$ -Atmosphäre eine Spatelspitze Pd / C-Katalysator (5% Pd / C) zugesetzt. Die Suspension wird 4 h unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre gerührt, der Katalysator über eine Fritte (Porengröße 4) abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

### AAV 5 Zyklisierung

Das lineare Dipeptid wird in hoher Verdünnung ( $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) in DMF gelöst, nach Zugabe von 3 eq. DPPA und 5 eq.  $\text{KHCO}_3$  als feste Base wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird bei  $40^{\circ}\text{C}$  im

Hochvakuum stark eingeengt, in Wasser ausgefällt und zentrifugiert. Der verbleibende Rückstand wird in Dioxan aufgenommen und gefriergetrocknet.

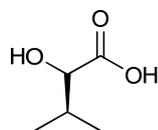
### **AAV 6 Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe in Lösung**

Das Fmoc-geschützte Fragment wird 2 h bei RT in DMF / Piperidin (4:1) gerührt, wobei der Reaktionsfortschritt über Dünnschichtchromatographie detektiert wird. Das Lösungsmittel wird am Hochvakuum abdestilliert, der verbleibende Rückstand in EE aufgenommen und säulenchromatographisch (Laufmittel Hexan : EE 1:1 → DCM + 5% MeOH) gereinigt.

### **AAV 7 Entschützung von Allyl-geschützten Carbonsäuren**

Das Allyl-geschützte Fragment wird unter Ar-Atmosphäre in wasserfreiem DCM mit 2 eq. Phenylsilan gelöst und 0,1 eq. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium – ebenfalls in trockenem DCM gelöst - langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren wird das Lösungsmittel abdestilliert und der verbleibende Rückstand über Säulenchromatographie (Laufmittel EE + 0 - 0,5% AcOH) gereinigt.

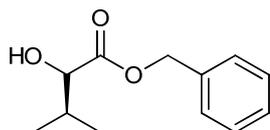
## V.2.3 Arbeitsvorschriften

 **$\alpha$ -D-Hydroxyisovaleriansäure (1)**

Chemical Formula: C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>  
 Exact Mass: 118,06  
 Molecular Weight: 118,13

10,00 g *D*-Valin (86 mmol) wurden in 172 mL 1 M Schwefelsäure (172 mmol) bei 0°C gelöst und zwei Stunden gerührt. Dann wurden 23,74 g Natriumnitrit (172 mmol) in Wasser gelöst und langsam zutropft. Die Reaktionsmischung wurde 16 h gerührt, dabei langsam auf RT erwärmt und anschließend 15 min auf 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde mehrmals mit Diethylether ausgeschüttelt, die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Man erhielt 8,1 g eines hellgelben Öls, die Ausbeute betrug 80%.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,1 - 4,7 (bs, 1H, -COOH); 4,14 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3,50 Hz, -CH-OH); 2,12 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,99 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6,75 Hz, -CH<sub>3</sub>); 0,85 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 7,00 Hz, -CH<sub>3</sub>).

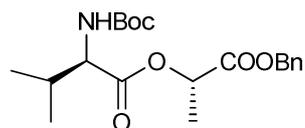
**Benzyl-D-Hydroxyisovaleriansäure (2)**

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>  
 Exact Mass: 208,11  
 Molecular Weight: 208,25

4,35 g **1** (37,0 mmol), 7,00 g Benzylbromid (41,0 mmol), 5,10 g Kaliumcarbonat (37,0 mmol) und 0,60 g Kaliumiodid (3,7 mmol) wurden 24 h in DMF gerührt. Das entstandene Kaliumbromid wurde abzentrifugiert und das DMF am Hochvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit Hexan / EE (8:1, R<sub>f</sub> = 0,35) als Eluent chromatographisch getrennt. Man erhielt 6,55 g (85%) eines farblosen Öles.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,30 (ps, 5H, -Ph); 5,15 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 3,25 Hz, CH<sub>2</sub>-Ph); 4,01 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3,25 Hz, -CH-OH); 2,02 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,93 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6,75 Hz, -CH<sub>3</sub>); 0,74 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6,75 Hz, -CH<sub>3</sub>).

**Boc-*D*-Val-*L*-Lac-Bn (3)**



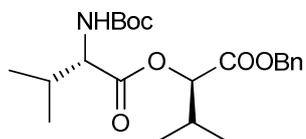
Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>  
 Exact Mass: 379,20  
 Molecular Weight: 379,45

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 mit 3,5 g (16,1 mol) Boc-*D*-Valin und 2,9 g (16,1 mmol) Benzyl-*L*-Lactat. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel PE : Ether 3:1, R<sub>f</sub> = 0,37). Die Ausbeute betrug 93%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,28 (ps, 5H, -Ph); 5,10 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 3,25 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph); 4,89 (pd, 1H, -CH-O-); 4,21 (m, 1H, -CH-N-); 2,09 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,43 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 7,00 Hz, -CH<sub>3</sub>); 1,39 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 0,89 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6,75 Hz, -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 0,82 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6,75 Hz, -CH<sub>3</sub><sup>Val</sup>)

**FD-MS** (m/z): 380,6 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 760,1 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1139,7 [3m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-*L*-Val-*D*-Hyiv-Bn (4)**

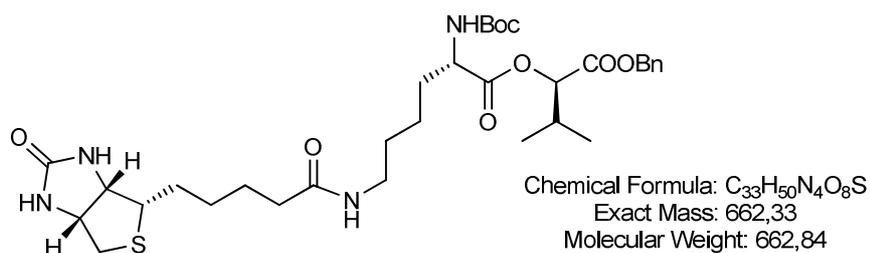


Chemical Formula: C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>6</sub>  
 Exact Mass: 407,23  
 Molecular Weight: 407,50

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 mit 3,0 g (13,8 mmol) Boc-*L*-Valin und 2,9 g (13,8 mmol) Benzyl-*L*-Hydroxyisovaleriansäure. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel PE : Ether 3:1, R<sub>f</sub> = 0,50). Die Ausbeute betrug 97%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,28 (ps, 5H, -Ph); 5,10 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6,00 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph); 4,83 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4,25 Hz, -CH-O-); 4,25 (m, 1H, -CH-N-); 2,15 (m, 2H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,38 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 0,82 (m, 12H, 4 x -CH<sub>3</sub>)

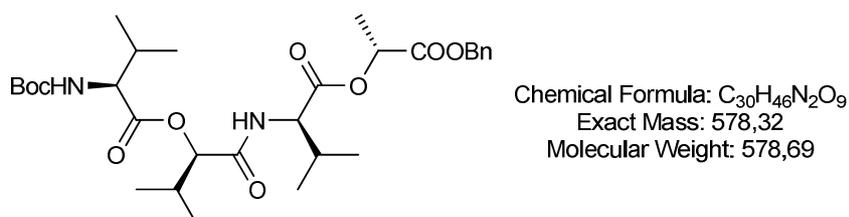
**FD-MS** (m/z): 407,6 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 816,7 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1224,4 [3m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-L-Lys(biotinyl)-D-Hyiv-Bn (5)**

174 mg Benzyl-L-Hydroxyisovaleriansäure (0,84 mmol) wurden in 8 mL DCM gelöst und 400 mg Boc-L-Lysin(biotinyl)-OH (0,84 mmol) in 1,6 mL DMSO sowie 194 mg EDC (1,01 mmol) in 8 mL DCM wurden zugegeben. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von 11 mg DMAP (0,08 mmol). Die Reaktionsmischung wurde nach 48 h mit  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen, die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Rohprodukt über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel DCM mit 7 - 10% MeOH, mit 10% MeOH  $R_f = 0,50$ ). Die Ausbeute betrug 57%.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,28 (ps, 5H, -Ph); 6,85 (m, 1H,  $\text{NH}^{\text{Biotin}}$ ); 6,35 (ps, 1H,  $\text{NH}^{\text{Biotin}}$ ); 5,12 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-Ph}$ ); 4,86 (d, 1H,  $^3J = 4,25$  Hz,  $-\text{CH-O-}$ ); 4,37 (m, 1H,  $-\text{CH-N}^{\text{Biotin}}$ ); 4,28 (m, 1H,  $-\text{CH-NH}^{\text{Biotin}}$ ); 3,79 (m, 1H,  $-\text{CH-N}^{\text{Lys}}$ ); 3,34 (m, 5H,  $-\text{CH-N}^{\text{Val}}$ ); 3,04 (m, 3H,  $-\text{CH-S}^{\text{Biotin}}$  und  $-\text{CH}_2\text{-S}^{\text{Biotin}}$ ); 2,78 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-NH}^{\text{Lys}}$ ); 2,65 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,18 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CO}^{\text{Biotin}}$ ); 1,95 (m, 2H,  $-\text{C}\beta\text{H}_2^{\text{Lys}}$ ); 1,49 (m, 8H, 2 x  $-\text{CH}_2^{\text{Lys}}$ ; 2 x  $-\text{CH}_2^{\text{Biotin}}$ ); 0,85 (m, 6H, 2 x  $-\text{CH}_3$ )

**FD-MS** (m/z): 563,8 [ $m\text{-Boc}+\text{H}^+$ ] $^+$ ; 589,9 [ $m\text{-Boc}+\text{Na}^+$ ] $^+$ ; 663,5 [ $m+\text{H}^+$ ] $^+$ ; 686,6 [ $m+\text{Na}^+$ ] $^+$ ; 1327,2 [ $2m+\text{H}^+$ ] $^+$ ; 1989,5 [ $3m+\text{H}^+$ ] $^+$ ; 2652,9 [ $4m+\text{H}^+$ ] $^+$ .

**Boc-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn; (Tetradepsipeptid), (6)**

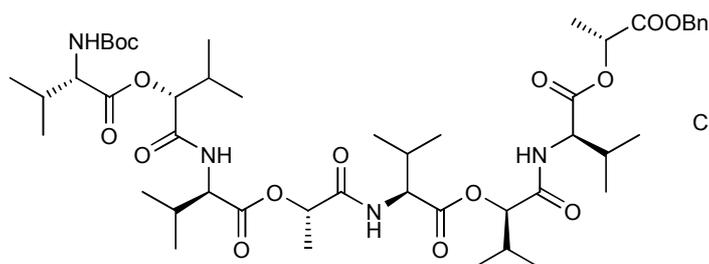
Die Boc-Entschützung von **3** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von **4** nach AAV 4. Die Kupplung von 3,0 g (10,7 mmol) Boc-entschütztem **3** und

3,4 g (10,7 mmol) Bn-entschütztem **4** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel PE : Ether 2:1,  $R_f = 0,44$ ). Die Ausbeute betrug 70%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8,06$  (d, 1H,  $^3J = 7,50$  Hz, NHCO); 7,18 (ps, 5H, -Ph); 7,07 (d, 1H,  $^3J = 7,75$  Hz, NHBoc); 4,98 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 4,92 (d, 1H,  $^3J = 7,00$  Hz, -CH-O-); 4,61 (d, 1H,  $^3J = 5,50$  Hz, -CH-O-); 4,08 (m, 1H, -CH-N-); 3,72 (m, 1H, -CH-N-); 1,93 (m, 3H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,23 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 1,21 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>); 0,75 (m, 18H, 6 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**FD-MS** (m/z): 580,7 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1159,7 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn;**  
(Octadepsipeptid), (**7**)



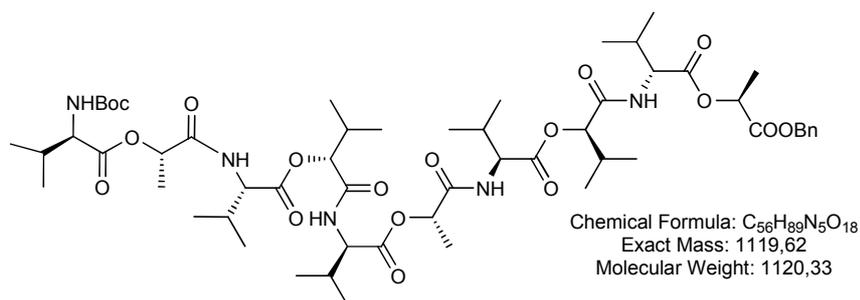
Chemical Formula: C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>  
Exact Mass: 948,53  
Molecular Weight: 949,13

Die Boc-Entschützung von 2,0 g (3,46 mmol) von **6** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von weiteren 2,0 g (3,46 mmol) von **6** nach AAV 4. Die Kupplung der entschützten Tetradepsipeptide wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel PE : EE 2:1,  $R_f = 0,34$ ). Die Ausbeute betrug 76%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8,31$  (m, 3H, 3 x NHCO); 7,34 (ps, 5H, -Ph); 7,22 (d, 1H,  $^3J = 7,75$  Hz, NHBoc); 5,14 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 5,08 (m, 2H, 2 x -CH-O-); 4,77 (d, 2H,  $^3J = 5,50$  Hz, 2 x -CH-O-); 4,22 (m, 3H, -CH-N-); 3,85-(m, 1H, -CH-N-); 2,05 (m, 6H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,37 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 1,27-(m, 6H, 2 x -CH<sub>3</sub>); 0,88 (m, 36H, 12 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**FD-MS** (m/z): 950,9 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1898,8 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-Bn;**  
**(Decadepsipeptid), (8)**

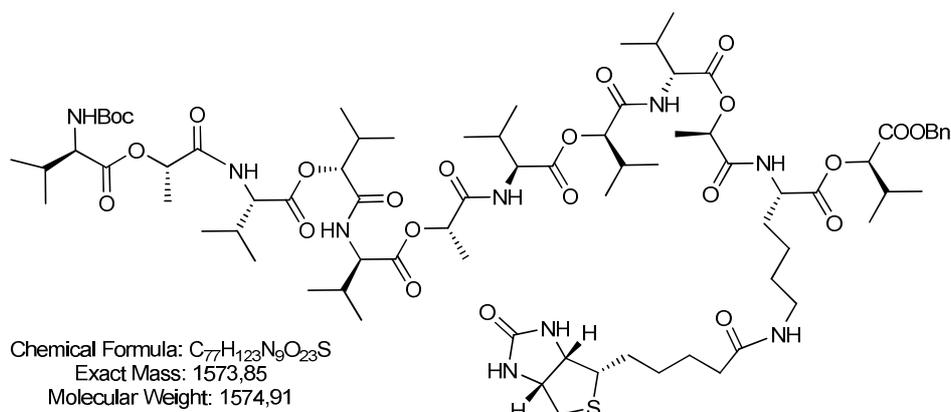


Die Boc-Entschützung von **7** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von **3** nach AAV 4. Die Kupplung von 2,0 g (2,42 mmol) Boc-entschütztem **7** mit 0,7 g (2,42 mmol) Bn-entschütztem **3** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel PE : Ether 1:2, R<sub>f</sub> = 0,59). Die Ausbeute betrug 60%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ = 7,60 (m, 4H, 4 x NHCO); 7,26 (ps, 5H, -Ph); 5,23 (m, 2H, 2 x -CH-O-); 5,06 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 5,00 (m, 2H, 2 x -CH-O-); 4,90 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3,50 Hz, -CH-O-); 4,21 (m, 1H, -CH-N-); 3,85 (m, 3H, 3 x -CH-N-); 2,17 (m, 6H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,94 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,34 (m, 18H, NCOO<sup>t</sup>Bu; 3 x -CH<sub>3</sub>); 0,88 (m, 42H, 14 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**FD-MS** (m/z): 1021,1 [m-Boc+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1120,9 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1143,5 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-**  
**Lys(Biotinyl)-D-Hyiv-Bn; (biotinyliertes Dodecadepsipeptid), (9)**

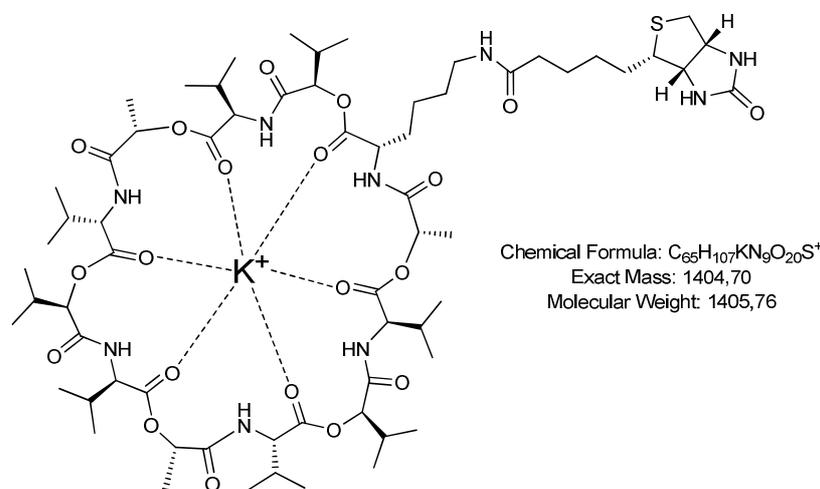


Die Boc-Entschützung von **5** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von **8** nach AAV 4. Die Kupplung von 68 mg (0,12 mmol) Boc-entschütztem **5** mit

124 mg (0,12 mmol) Bn-entschütztem **8** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel DCM mit 5 - 10% MeOH, mit 5% MeOH  $R_f = 0,27$ ). Die Ausbeute betrug 30%.

**FD-MS** (m/z): 1475,7 [m-Boc+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1497,3 [m-Boc+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1575,7 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1597,8 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 3157,1 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(Biotinyl)-D-Hyiv-); (Biotin-Valinomycin), (10)**

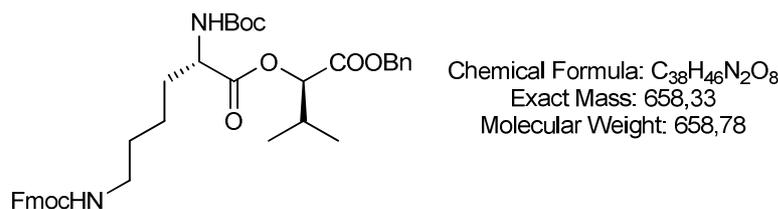


Die Bn-Entschützung von 105 mg (66,7 μmol) **9** erfolgte nach AAV 4, danach wurde die Boc-Entschützung von **9** nach AAV 3 ohne Ausschütteln durchgeführt. Die Zyklisierung nach AAV 5 ergab eine Ausbeute von 87%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (700 MHz, DMSO): δ = 8,40 (m, 3H, 3 x NHCO); 8,30 (m, 1H, NHCO<sup>Lys</sup>); 8,26 (pd, 1H, NHCO); 8,23 (pd, 1H, NHCO); 7,06 (m, 2H, 2 x NH<sup>Biotin</sup>); 5,00 (m, 3H, 3 x -CH-O<sup>Lac</sup>); 4,61 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3,50 Hz, -CH-O<sup>Hyiv</sup>); 4,58 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3,50 Hz, -CH-O<sup>Hyiv</sup>); 4,54 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4,20 Hz, -CH-O<sup>Hyiv</sup>); 4,46 (m, 1H, -CH-N<sup>Biotin</sup>); 4,28 (m, 1H, -CH-NH<sup>Biotin</sup>); 4,18 (m, 1H, -CH-N<sup>Lys</sup>); 3,83 (m, 5H, -CH-N<sup>Val</sup>); 3,30 (m, 1H, -CH-S<sup>Biotin</sup>); 3,13 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-S<sup>Biotin</sup>); 2,88 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sup>Lys</sup>); 2,35 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,18 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO<sup>Biotin</sup>); 1,88 (m, 2H, -CβH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>); 1,41 (m, 15H, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>, -CH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>, 2 x -CH<sub>2</sub><sup>Biotin</sup>); 0,96 (m, 52H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>, -CH<sub>2</sub><sup>Biotin</sup>, -CH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>)

**ESI-MS** (m/z): 1388,8 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1404,7 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Bn (11)**

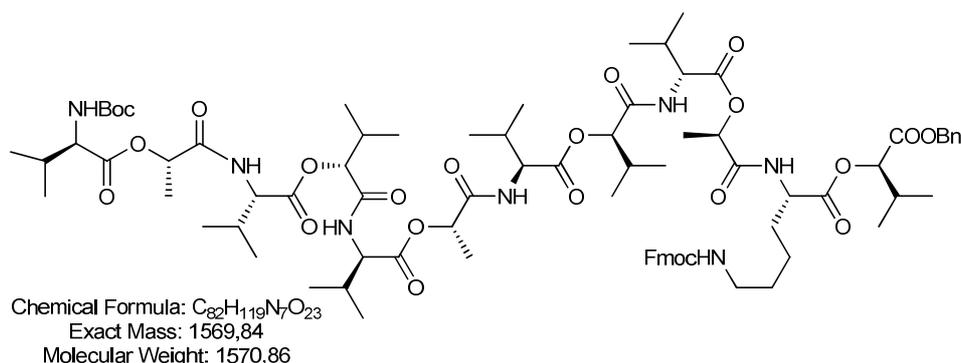


Die Synthese erfolgte nach AAV 1 mit 0,8 g (1,71 mmol) Boc-L-Lys(Fmoc)-OH und 0,36 g (1,71 mmol) Benzyl-L-Hydroxyisovaleriansäure. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel PE : Ether 1:1; Aufbringen des Rohprodukts auf die Säule in DCM, da es in Ether nur schlecht löslich ist,  $R_f = 0,29$ ). Die Ausbeute betrug 86%.

**$^1H$ -NMR** (250 MHz, DMSO):  $\delta = 7,67$  (d, 2H,  $^3J = 7,25$  Hz, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,51 (d, 2H,  $^3J = 7,25$  Hz, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,20 (m, 9H, Ar-H<sup>Fmoc</sup>, Ar-H<sup>Bn</sup>); 5,13 (d, 2H,  $^3J = 3,25$  Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph); 5,02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Fmoc</sup>); 4,83 (d, 1H,  $^3J = 4,25$  Hz, -CH-O-); 4,30 (d, 1H,  $^3J = 6,75$  Hz, -CH-N-); 4,14 (m, 1H, -CH-<sup>Fmoc</sup>); 3,07 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 2,19 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,44 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,37 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 0,77 (m, 8H, 2 x -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>)

**FD-MS** (m/z): 659,1 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1318,9 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Bn; (Dodecadepsipeptid-Bn), (12)**

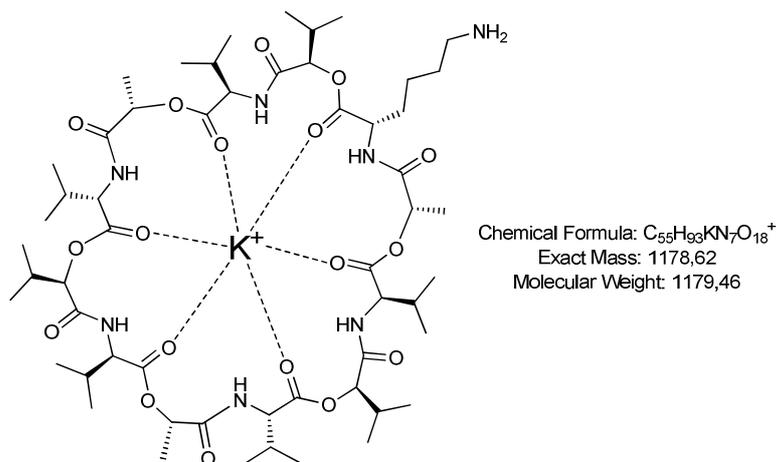


Die Boc-Entschützung von **11** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von **8** nach AAV 4. Die Kupplung von 60 mg (0,19 mmol) Boc-entschütztem **11** mit 0,25 g (0,19 mmol) Bn-entschütztem **8** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die

Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel PE : Ether 1:3,  $R_f = 0,38$ ).  
Die Ausbeute betrug 45%.

**ESI-MS** (m/z): 1592,8 [ $m+\text{Na}^+$ ]<sup>+</sup>; 3164,6 [ $2m+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys-D-Hyiv-); (Amino-Valinomycin), (13)**



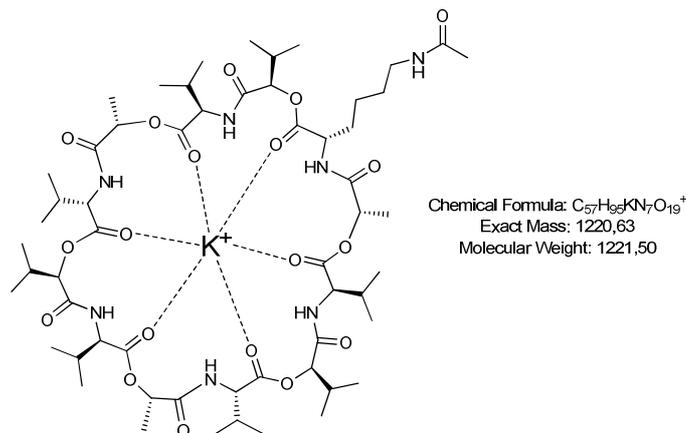
Die Bn-Entschützung von 135 mg (86,0  $\mu\text{mol}$ ) **12** erfolgte nach AAV 4, danach wurde die Boc-Entschützung von **12** nach AAV 3 ohne Ausschütteln durchgeführt. Nach der Zyklisierung gemäß AAV 5 wurde das Produkt über eine HPLC aufgereinigt.

**HPLC 2** (50-100%, 30 min):  $t_R = 8,75$  min

**<sup>1</sup>H-NMR** (700 MHz, DMSO):  $\delta = 8,23$  (m, 2H, 2 x NHCO); 8,14 (d, 1H,  $^3J = 4,90$  Hz, NHCO<sup>Lys</sup>); 8,10 (d, 1H,  $^3J = 4,20$  Hz, NHCO); 8,03 (m, 2H, NHCO); 4,96 (m, 3H, 3 x -CH-O<sup>Lac</sup>); 4,66 (d, 1H,  $^3J = 2,80$  Hz, -CH-O<sup>Hyiv</sup>); 4,62 (m, 2H, -CH-O<sup>Hyiv</sup>); 4,19 (m, 1H, -CH-N<sup>Lys</sup>); 3,82 (m, 5H, -CH-N<sup>Val</sup>); 2,95 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sup>Lys</sup>); 2,22 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,98 (m, 2H, -C $\beta$ H<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,53 (m, 9H, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 1,14 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 0,97 (m, 48H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**ESI-MS** (m/z): 1140,7 [ $m+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>; 1178,6 [ $m+\text{K}^+$ ]<sup>+</sup>.

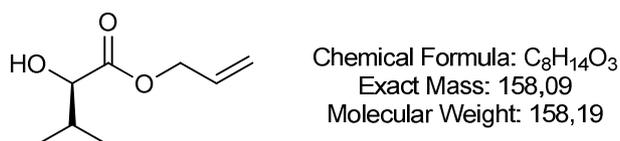
**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(Acetyl)-D-Hyiv-); (Acetyl-Lysin-Valinomycin), (14)**



4,0 mg Lysin-Valinomycin (3,51  $\mu\text{mol}$ ), 0,7 mg Acetanhydrid (7,0  $\mu\text{mol}$ ) und 2,3 mg DIPEA (17,6  $\mu\text{mol}$ ) wurden eine halbe Stunde bei RT in DCM gerührt. Nach dem Abdestillieren des Lösemittels wurde der verbliebene Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 99%.

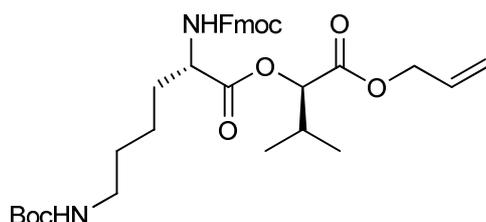
**ESI-MS** (m/z): 1204,8 [ $m+\text{Na}^+$ ]<sup>+</sup>; 1220,8 [ $m+\text{K}^+$ ]<sup>+</sup>.

**Allyl-D-Hydroxyisovaleriansäure (15)**



3,0 g **1** (25,0 mmol), 3,36 g Allylbromid (27,5 mmol), 3,5 g Kaliumcarbonat (25,0 mmol) und 0,42 g Kaliumiodid (2,5 mmol) wurden 24 h in DMF gerührt. Das entstandene Kaliumbromid wurde abzentrifugiert und das DMF am Hochvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit Hexan / EE (7:1,  $R_f = 0,48$ ) als Eluent chromatographisch getrennt. Man erhielt 2,65 g (67%) eines farblosen Öles.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,81$  (m, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ );  $5,25$  (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ );  $4,61$  (m, 2H, Allyl  $-\text{CH}_2$ );  $4,00$  (d, 1H,  $^3J = 3,5$  Hz,  $-\text{CH}-\text{OH}$ );  $2,03$  (m, 1H,  $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ );  $0,95$  (d, 3H,  $^3J = 6,75$  Hz,  $-\text{CH}_3$ );  $0,79$  (d, 3H,  $^3J = 7,00$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ).

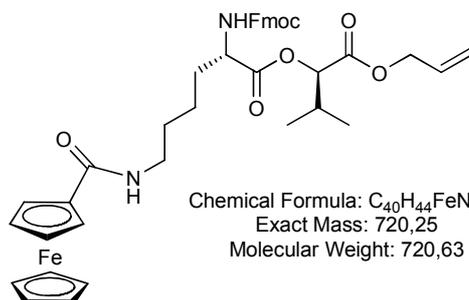
**Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Hyiv-Allyl (16)**

Chemical Formula: C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 Exact Mass: 608,31  
 Molecular Weight: 608,72

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 mit 1,8 g (3,85 mmol) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH und 0,6 g (3,85 mmol) Allyl-L-Hydroxyisovaleriansäure. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel PE : Ether 3:2 → 2:3; Aufbringen des Rohprodukts auf die Säule in DCM, da es in Ether nur schlecht löslich ist, mit PE : Ether 1:1 R<sub>f</sub> = 0,70). Die Ausbeute betrug 91%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO): δ = 7,68 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7,00 Hz, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,52 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7,25 Hz, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,20 (m, 4H, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 5,77 (m, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,29 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,20 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Fmoc</sup>); 4,82 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4,50 Hz, -CH-O-); 4,61 (m, 2H, Allyl -CH<sub>2</sub>); 4,32 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7,00 Hz, -CH-N-); 4,15 (m, 1H, -CH-<sup>Fmoc</sup>); 3,04 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 2,19 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,42 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>Lys</sup>); 1,36 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 1,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>); 0,77 (m, 6H, 2 x -CH<sub>3</sub>)

**FD-MS** (m/z): 607,6 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1215,5 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1825,3 [3m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Fmoc-L-Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-Allyl (17)**

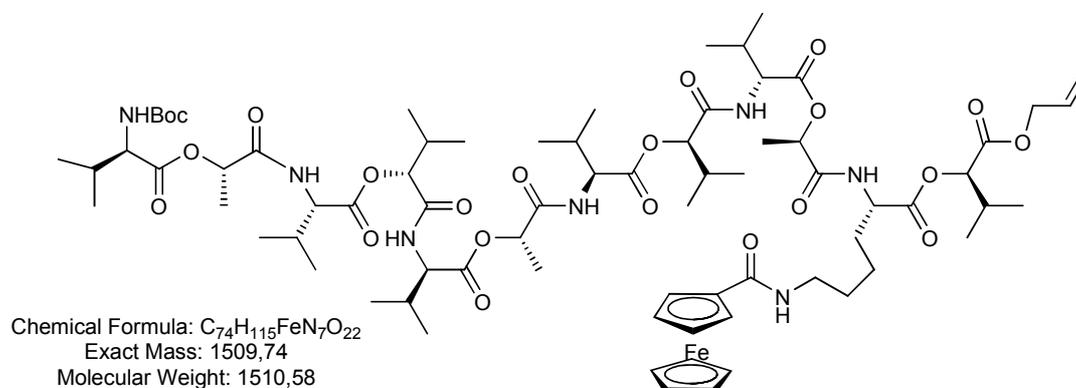
Chemical Formula: C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
 Exact Mass: 720,25  
 Molecular Weight: 720,63

Parallel zur Boc-Entschützung von **16** nach AAV 3 wurden 0,5 g Ferrocencarbonsäure (2,17 mmol) in Tetrachlorkohlenstoff gelöst und 0,5 mL Oxalylchlorid (5,43 mmol) langsam zugetropft. Nach zwei Stunden Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der verbleibende rote Feststoff in DCM aufgenommen. Diese Lösung wurde langsam einer eisgekühlten

Reaktionsmischung aus 0,79 g Boc-entschütztem **16** (1,56 mmol), 19,0 mg DMAP (0,16 mmol) und 0,54 mL DIPEA (3,12 mmol) zugetropft und zwei Stunden bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel DCM : Aceton 25:1 → 5:1, mit DCM : Aceton 10:1  $R_f = 0,31$ ). Die Ausbeute betrug 16%.

**FD-MS** (m/z): 719,5 [ $m+H^+$ ]<sup>+</sup>; 1439,0 [ $2m+H^+$ ]<sup>+</sup>; 2157,9 [ $3m+H^+$ ]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-Allyl; (ferrocenyliertes Dodecadepeptid), (18)**

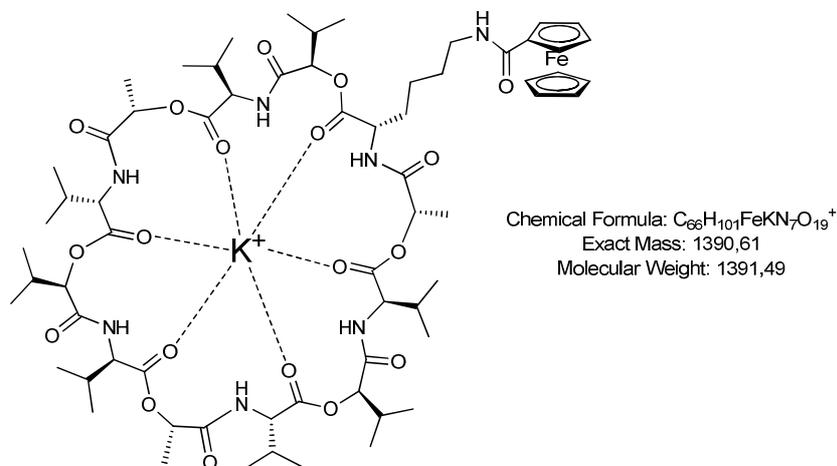


Die Fmoc-Entschützung von **17** erfolgte nach AAV 6, die Bn-Entschützung von **8** nach AAV 4. Die Kupplung von 30 mg (60,0  $\mu$ mol) Fmoc-entschütztem **17** mit 62 mg (60,0  $\mu$ mol) Bn-entschütztem **8** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel DCM : Aceton 8:1 → 3:1,  $R_f = 0,57$ ). Die Ausbeute betrug 27%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7,75$  (m, 3H, 3 x NHCO); 7,42 (m, 3H, 3 x NHCO); 6,18 (m, 1H, NHferr); 5,76 (m, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,33 (m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>); 5,27 – 4,99 (m, 7H, 5 x -CH-O-, Allyl -CH<sub>2</sub>); 4,77 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4,25 Hz, -CH-O-); 4,64 (m, 2H, CHferr); 4,55 (m, 2H, CHferr); 4,23 (m, 2H, 2 x -CH-N-); 4,12 (s, 5H, CHferr); 3,92 (m, 4H, 4 x -CH-N-); 3,36 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-Lys); 2,18 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,93 (m, 4H, 2 x -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,40 (m, 9H, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 1,36 (s, 9H, NCOO<sup>t</sup>Bu); 0,93 (m, 48H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**FD-MS** (m/z): 1508,2 [ $m+H^+$ ]<sup>+</sup>.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(ferrocenyl)-D-Hyiv-); (Ferrocen-Valinomycin), (19)**



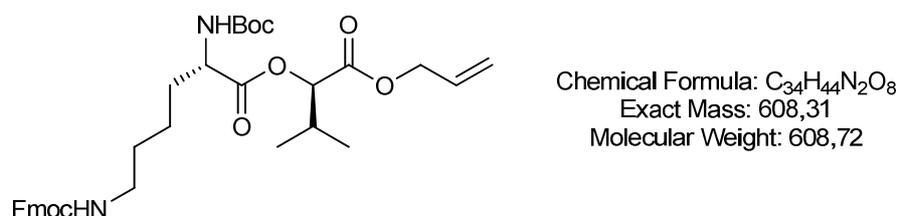
Die Allyl-Entschützung von 25 mg (16,6  $\mu$ mol) **18** erfolgte nach AAV 7, danach wurde die Boc-Entschützung von **18** nach AAV 3 ohne Ausschütteln durchgeführt. Die Zyklisierung erfolgte nach AAV 5 mit einer Ausbeute von 95%.

**HPLC 1** (60 -100%, 10 min):  $t_R = 15,5$  min

**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta = 8,00 - 7,27$  (m, 6H, 6 x NHCO); 5,24 – 4,95 (m, 6H, 6 x -CH-O-); 4,59 (m, 2H, CHferr); 4,24 (m, 2H, CHferr); 4,10 (s, 5H, CHferr); 3,76 – 4,09 (m, 6H, 6 x -CH-N-); 3,23 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sup>Lys</sup>); 2,20 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,94 (m, 4H, 2 x -CH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>); 1,52 (m, 2H, -CH<sub>2</sub><sup>Lys</sup>); 1,37 (m, 9H, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 0,89 (m, 48H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**ESI-MS** (m/z): 1374,6 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1390,6 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-Allyl, (20)**



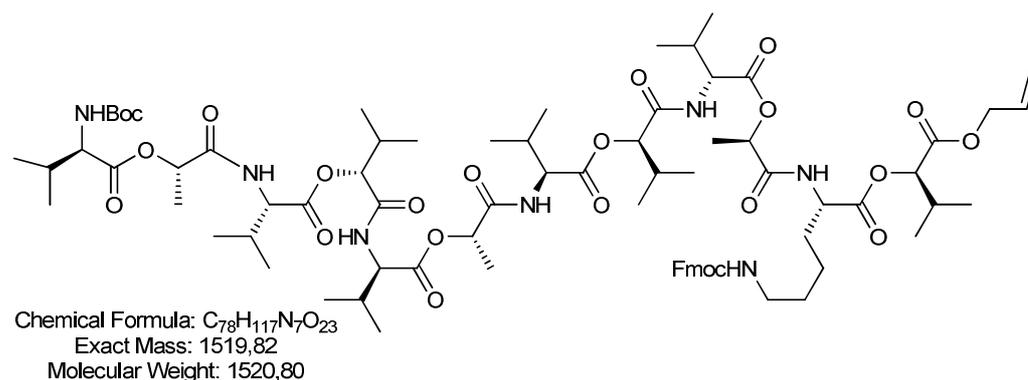
Die Synthese erfolgte nach AAV 1 mit 0,9 g (1,9 mmol) Boc-L-Lys(Fmoc)-OH und 0,3 g (1,9 mmol) Allyl-L-Hydroxyisovaleriansäure. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel PE : Ether 1:1; Aufbringen

des Rohprodukts auf die Säule in DCM, da es in Ether nur schlecht löslich ist,  $R_f = 0,40$ ). Die Ausbeute betrug 50%.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,73$  (d, 2H,  $^3J = 7,50$  Hz, Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 7,56 (d, 2H,  $^3J = 7,20$  Hz, Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 7,29 (m, 4H, Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 5,84 (m, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,19 (m, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,02 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$ ); 4,87 (m, 1H,  $-\text{CH-O-}$ ); 4,62 (m, 2H, Allyl  $-\text{CH}_2$ ); 4,35 (m, 1H,  $-\text{CH-N-}$ ); 4,18 (m, 1H,  $-\text{CH}^{\text{Fmoc}}$ ); 3,18 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Lys}}$ ); 2,24 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1,85 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Lys}}$ ); 1,70 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Lys}}$ ); 1,41 (s, 9H,  $\text{NCOO}^t\text{Bu}$ ); 1,18 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Lys}}$ ); 0,94 (m, 6H, 2 x  $-\text{CH}_3$ )

**FD-MS** (m/z): 609,2  $[\text{m}+\text{H}^+]^+$ ; 1217,8  $[2\text{m}+\text{H}^+]^+$ .

**Boc-*D*-Val-*L*-Lac-*L*-Val-*D*-Hyiv-*D*-Val-*L*-Lac-*L*-Val-*D*-Hyiv-*D*-Val-*L*-Lac-*L*-Lys(Fmoc)-*D*-Hyiv-Allyl; (Dodecadepsipeptid-Allyl), (21)**



Die Boc-Entschützung von **20** erfolgte nach AAV 3, die Bn-Entschützung von **8** nach AAV 4. Die Kupplung von 0,25 g (0,29 mmol) Boc-entschütztem **20** mit 0,3 g (0,29 mmol) Bn-entschütztem **8** wurde nach AAV 2 durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte chromatographisch (Laufmittel PE : EE 3:2  $\rightarrow$  1:1,  $R_f = 0,33$ ). Die Ausbeute betrug 23%.

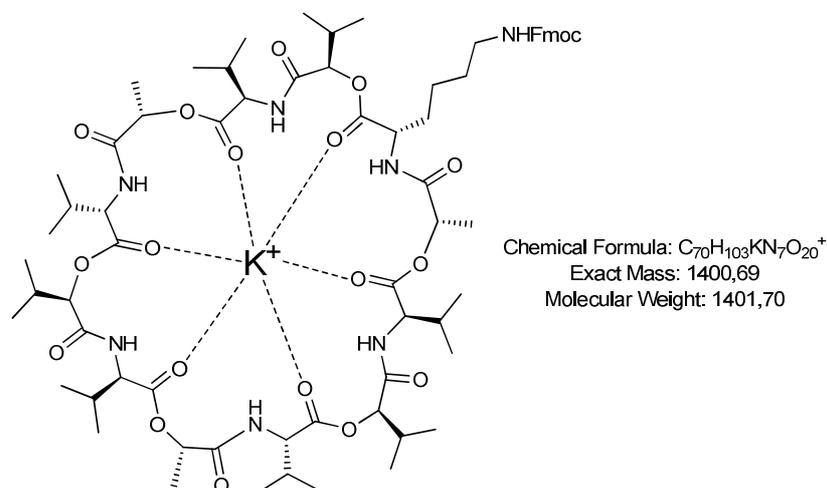
**HPLC 1** (70-100%, 10 min):  $t_R = 10,7$  min

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta = 7,72$  (m, 5H, 3 x  $\text{NHCO}$ , 2 x Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 7,52 (d, 2H,  $^3J = 7,25$  Hz, Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 7,32 (m, 2H, 2 x  $\text{NHCO}$ ); 7,29 (m, 5H, 1 x  $\text{NHCO}$ , 4 x Ar- $\text{H}^{\text{Fmoc}}$ ); 5,76 (m, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{NH}^{\text{Fmoc}}$ ); 5,33 (m, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,21 – 4,99 (m, 5H, 5 x  $-\text{CH-O-}$ ); 4,99 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$ ); 4,72 (d,

1H,  $^3J = 4,5$  Hz, -CH-O-); 4,52 (m, 2H, Allyl -CH<sub>2</sub>); 4,24 (m, 2H, -CH-N-); 4,17 (m, 1H, -CH-Fmoc); 4,01 - 3,86 (m, 4H, 4 x -CH-N-); 3,09 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-Lys); 2,19 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,83 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,34 (m, 18H, NCOO<sup>t</sup>Bu, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 1,18 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 0,88 (m, 48H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**FD-MS** (m/z): 1420,5 [m-Boc+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1519,9 [m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1558,9 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 3041,2 [2m+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(Fmoc)-D-Hyiv-); (Fmoc-Lysin-Valinomycin), (22)**



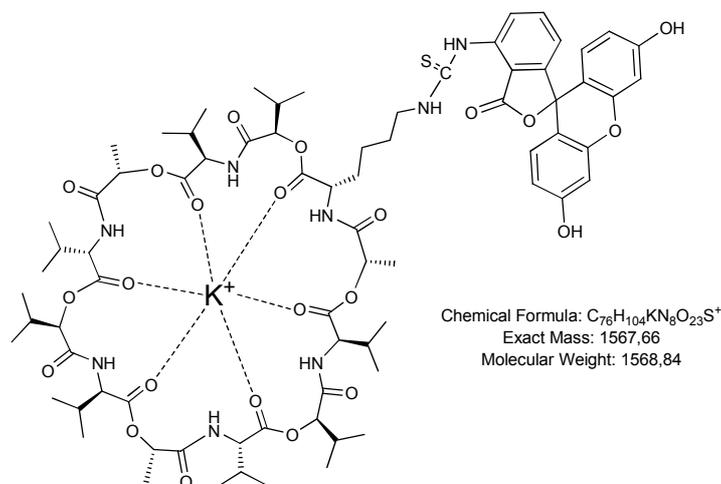
Die Allyl-Entschützung von 0,1 g (66,0 μmol) **21** erfolgte nach AAV 7, danach wurde die Boc-Entschützung von **21** nach AAV 3 ohne Ausschütteln durchgeführt. Die Zyklisierung wurde nach AAV 5 durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über HPLC.

**HPLC 1** (70-100%, 10 min): t<sub>R</sub> = 11,6 min

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ = 8,23 (m, 6H, NHCO); 7,68 (m, 2H, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,52 (m, 2H, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 7,23 (m, 4H, Ar-H<sup>Fmoc</sup>); 5,12 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Fmoc); 4,96 - 4,78 (m, 6H, 6 x -CH-O-); 4,48 (m, 1H, -CH-Fmoc); 4,28 - 3,76 (m, 6H, 6 x -CH-N-); 3,07 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-Lys); 2,20 (m, 8H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,55 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 1,37 (m, 9H, 3 x -CH<sub>3</sub><sup>Lac</sup>); 1,05 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Lys); 0,87 (m, 48H, 16 x -CH<sub>3</sub><sup>Val, Hyiv</sup>)

**ESI-MS** (m/z): 1384,7 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1400,7 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(FITC)-D-Hyiv-); (FITC-Valinomycin), (23)**

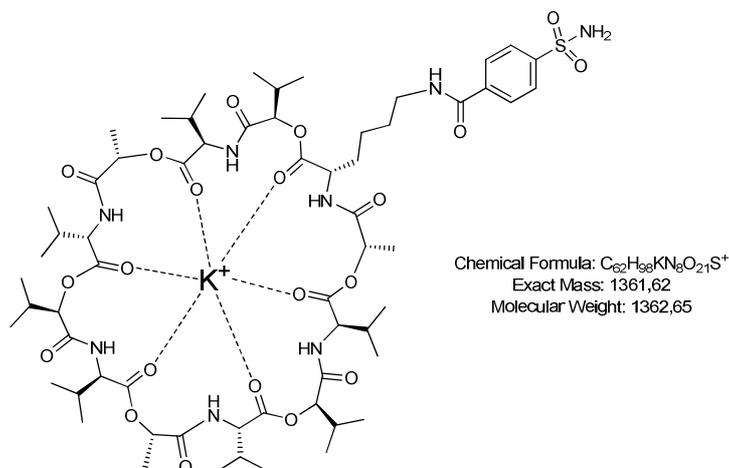


Die Fmoc-Entschützung von **22** erfolgte nach AAV 6, das Produkt wurde allerdings nicht säulenchromatographisch gereinigt, sondern in DCM aufgenommen und aus Hexan ausgefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der weiße Niederschlag (4,5 mg, 4,8  $\mu$ mol) in THF gelöst und in THF gelöstes FITC (2,0 mg, 4,8  $\mu$ mol) hinzugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde das Lösemittel abdestilliert, der verbliebene Rückstand in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde nicht über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, sondern das Lösemittel direkt abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie (Laufmittel DCM mit 15% MeOH, R<sub>f</sub> = 0,9).

**ESI-MS** (m/z): 1551,7 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1567,7 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>

**HPLC 1** (70-100%, 10 min): t<sub>R</sub> = 7,8 min.

**c(-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Lys(sulfamoylbenzamid)-D-Hyiv-); (Phenylsulfonamid-Valinomycin), (24)**



Die Fmoc-Entschützung von **22** erfolgte nach AAV 6, das Produkt wurde allerdings nicht säulenchromatographisch gereinigt, sondern in DCM aufgenommen und aus Hexan ausgefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der weiße Niederschlag (16 mg, 11,4 µmol) in DMF gelöst, 2 mg EDC (13,7 µmol), 1 mg DMAP (1,1 µmol) und 3 mg 4-Carboxylbenzolsulfonamid (13,7 µmol) hinzugegeben. Nach 24 h Rühren wurde das DMF am Hochvakuum abdestilliert, der verbliebene Rückstand in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und das Lösemittel abdestilliert. Die Ausbeute betrug 60%.

**ESI-MS** (m/z): 1345,6 [m+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1361,6 [m+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>.

## VI Literatur

- [1] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, *387*, 580-583.
- [2] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [3] C. Steinem, A. Janshoff, *Chemie in unserer Zeit* **2008**, *42*, 116-127.
- [4] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, **1990**.
- [5] R. Lipowski, E. Sackmann, *Handbook of Biol. Physics*, Elsevier, **1995**.
- [6] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- [7] C. R. Woese, G. E. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5088-5090.
- [8] E. E. Meyer, K. J. Rosenberg, J. Israelachvili, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 15739-15746.
- [9] C. Tanford, *The hydrophobic effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley & Sons, Inc., **1980**.
- [10] J. Israelachvili, S. Marcelja, R. G. Horn, *Quarterly Rev. of Biophysics* **1980**, *13*, 121-200.
- [11] I. Köper, S. M. Schiller, F. Giess, R. Naumann, W. Knoll, *Adv. in Planar Lipid Bilayers* **2006**, *3*, 37-53.
- [12] D. Papahadjopoulos, J. C. Watkins, *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1967**, *135(4)*, 639-652.
- [13] R. C. MacDonald, I. R. MacDonald, B. P. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L.-R. Hu, *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1991**, *1061(2)*, 297-303.
- [14] A. Sévin-Landais, P. Rigler, S. Tzartos, F. Hucho, R. Hovius, H. Vogel, *Biophysical Chem.* **2000**, *85*, 141-152.
- [15] A. Graneli, J. Rydström, B. Kasemo, F. Höök, *Langmuir* **2003**, *19*, 842-850.
- [16] R. E. Pagano, *Ann. Review of Biophysics and Bioengineering* **1978**, *7*, 435-468.
- [17] R. A. Schwendener, P. A. Lagocki, Y. E. Rahman, *Biochimica et Biophysica Acta* **1984**, *772*, 93-101.
- [18] P. Müller, D. O. Rudin, *Nature* **1967**, *213*, 603-604.
- [19] T. Hianik, *Acta phys. slov.* **2006**, *56(6)*, 687-805.
- [20] M. Montal, *Methods in Enzymology* **1974**, *32*, 545-554.
- [21] M. Winterhalter, *Curr. Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5*, 250-255.
- [22] W. I. Gruszecki, A. Wardak, W. Maksymiec, *J. of Photochemistry and Photobiology* **1997**, *39*, 265-268.
- [23] G. Belmonte, L. Cescatti, B. Ferrari, T. Nicolussi, M. Ropele, G. Menestrina, *Eur. Biophys. J.* **1987**, *14*, 349-358.
- [24] T.-J. Jeon, N. Malmstadt, J. L. Poulos, J. J. Schmidt, *Biointerphases* **2008**, *3*, FA96-100.
- [25] H. Bayley, B. Cronin, A. Heron, M. A. Holden, W. L. Hwang, R. Syeda, J. Thompson, M. Wallace, *Molecular BioSystems* **2008**, *4*, 1191-1208.
- [26] R. Syeda, M. A. Holden, W. L. Hwang, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130(46)*, 15543-15548.

- [27] W. J. Galush, S. A. Shelby, M. J. Mulvihill, A. Tao, P. D. Yang, J. T. Groves, *Nano Letters* **2009**, 9(5), 2077-2082.
- [28] H. Hillebrandt, M. Tanaka, E. Sackmann, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106(2), 477-486.
- [29] S. Merino, O. Domenech, I. Diez-Perez, F. Sanz, M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell, *Colloids and Surfaces B - Biotinterfaces* **2005**, 44(2-3), 93-98.
- [30] A. Devadoss, M. S. Palencsar, D. C. Jiang, M. L. Honkonen, J. D. Burgess, *Anal. Chem.* **2005**, 77(22), 7393-7398.
- [31] M. H. Chen, M. Li, C. L. Brosseau, J. Lipkowski, *Langmuir* **2009**, 25(2), 1028-1037.
- [32] J. T. Groves, N. Ulman, S. G. Boxer, *Science* **1997**, 275(5300), 651-653.
- [33] R. Tero, T. Ujihara, T. Urisut, *Langmuir* **2008**, 24(20), 22567-11576.
- [34] E. Sackmann, M. Tanaka, *Trends in Biotechnology* **2000**, 18, 58-64.
- [35] T. H. Anderson, Y. Min, K. Weirich, H. Zeng, D. Fygenson, J. Israelachvili, *Langmuir* **2009**, 25(12), 6997-7005.
- [36] R. P. Richter, R. Berat, A. R. Brisson, *Langmuir* **2006**, 22, 3497-3505.
- [37] I. K. Vockenroth, C. Rossi, M. R. Shah, I. Köper, *Biointerphases* **2009**, 4(2), 19-26.
- [38] H. Schönherr, J. M. Johnson, P. Lenz, C. W. Frank, S. G. Boxer, *Langmuir* **2004**, 20, 11600-11606.
- [39] E. Reimhult, F. Höök, B. Kasemo, *Langmuir* **2003**, 19, 1681-1691.
- [40] P. Nollert, H. Kiefer, F. Jähnig, *Biophys. J.* **1995**, 69, 1447-1455.
- [41] J. Rädler, H. Strey, E. Sackmann, *Langmuir* **1995**, 11, 4539-4548.
- [42] B. Seantier, B. Kasemo, *Langmuir* **2009**, 25(10), 5767-5772.
- [43] L. K. Tamm, H. M. McConnell, *Biophys. J.* **1985**, 47, 105-113.
- [44] A. A. Brian, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 6159-6163.
- [45] I. K. Vockenroth, P. P. Atanasova, A. T. A. Jenkins, I. Köper, *Langmuir* **2008**, 24, 496-502.
- [46] I. K. Vockenroth, P. P. Atanasova, J. R. Long, A. T. A. Jenkins, W. Knoll, I. Köper, *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1768, 1114-1120.
- [47] R. F. Roskamp, I. K. Vockenroth, N. Eisenmenger, J. Braunagel, I. Köper, *ChemPhysChem* **2008**, 9(13), 1920-1924.
- [48] R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübben, K. Vasilev, W. Knoll, *Langmuir* **2003**, 19, 5435-5443.
- [49] J. Spinke, J. Yang, H. Wolf, M. Liley, H. Ringsdorf, W. Knoll, *Biophys. J.* **1992**, 63, 1667-1671.
- [50] F. Giess, M. G. Friedrich, J. Heberle, R. Naumann, W. Knoll, *Biophys. J.* **2004**, 87, 3213-3220.
- [51] C. Peggion, F. Formaggio, c. Toniolo, *Langmuir* **2001**, 17(21), 6585-6592.
- [52] J. C. Munro, C. W. Frank, *Langmuir* **2004**, 20(24), 10567-10575.
- [53] G. E. Poirier, E. D. Pylant, *Science* **1996**, 272(5265), 1145.
- [54] J. T. Buboltz, G. W. Feigenson, *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1999**, 1417(2), 232-245.

- [55] P. Kryszynski, A. Zebrowska, A. Michota, J. Bukowska, L. Becucci, M. R. Moncelli, *Langmuir* **2001**, *17*(13), 3852-3857.
- [56] S. M. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, W. Knoll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*(2), 208-211.
- [57] H. Brockmann, G. Schmidt-Kastner, *Chem. Ber.* **1955**, *88*(1), 57-61.
- [58] M. Shemyakin, N. A. Aldanova, E. I. Vinogradova, M. Y. Feigina, *Tetr. Letters* **1963**, *4*(28), 1921-1925.
- [59] Y. A. Ovchinnikov, *FEBS Letters* **1974**, *44*(1), 1-21.
- [60] S. Varma, D. Sabo, S. B. Rempe, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*(1), 13-22.
- [61] G. W. Pohl, W. Knoll, B. F. Gisin, G. Stark, *Biophys. Struct. Mech.* **1976**, *2*, 119-137.
- [62] G. Stark, B. F. Gisin, *Biophys. Struct. Mech.* **1979**, *6*, 39-56.
- [63] P. Läuger, *Science* **1972**, *178*(4056), 24-30.
- [64] G. Stark, R. Benz, *J. Membrane Biol.* **1971**, *5*, 133-153.
- [65] G. Favero, L. Campanella, A. D'Annibale, R. Santucci, T. Ferri, *Microchemical Journal* **2003**, *74*, 141-148.
- [66] B. Raguse, V. L. B. Braach-Maksvytis, B. A. Cornell, L. G. King, P. D. J. Osman, R. J. Pace, L. Wiczorek, *Langmuir* **1998**, *14*, 648-659.
- [67] C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, *Langmuir* **2001**, *17*, 6586-6592.
- [68] C. Steinem, A. Janshoff, K. von dem Bruch, K. Reihls, J. Goossens, H. J. Galla, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1998**, *45*, 17-26.
- [69] R. Naumann, D. Walz, S. M. Schiller, W. Knoll, *J. Electroanalytical Chemistry* **2003**, *550-551*, 241-252.
- [70] H.-D. Hölzje, *Pharmazie in unserer Zeit* **1977**, *6*(4), 123-128.
- [71] E. Fischer, E. Fourneau, *Chem. Ber.* **1901**, *34*(2), 2868-2877.
- [72] T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1904**, *70*(1), 57-72.
- [73] M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*(7), 1192-1201.
- [74] G. Losse, G. Bachmann, *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 2671-2679.
- [75] H. G. Lerchen, H. Kunz, *Tetr. Letters* **1985**, *26*(43), 5257-5260.
- [76] S. Itsuno, *Org. Reactions* **1998**, *52*.
- [77] M. M. Shemyakin, *Angew. Chem.* **1960**, *72*(10), 342-345.
- [78] M. Rothe, W. Kreiss, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1973**, *12*(12), 1012-1013.
- [79] H. A. Staab, W. Rohr, A. Mannschreck, *Angew. Chem.* **1961**, *73*(4), 143-143.
- [80] C. H. Hassall, T. G. Martin, J. A. Schofield, J. O. Thomas, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 997-1003.
- [81] C. Gilon, Y. Klausner, A. Hassner, *Tetr. Letters* **1979**, *20*(40), 3811-3814.
- [82] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*(7), 2024-2033.
- [83] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*(7), 522-524.
- [84] Y. L. Dory, J. M. Mellor, J. F. McAleer, *Tetr. Letters* **1989**, *30*(13), 1695-1698.
- [85] Y. L. Dory, J. M. Mellor, J. F. McAleer, *Tetrahedron* **1996**, *52*(4), 1343-1360.
- [86] Y. L. Dory, J. M. Mellor, J. F. McAleer, *Tetrahedron* **1996**, *52*(4), 1379-1388.
- [87] J. R. Dawson, Y. L. Dory, J. M. Mellor, J. F. McAleer, *Tetrahedron* **1996**, *52*(4), 1361-1378.

- [88] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [89] E. P. Semkin, A. P. Smirnova, L. A. Shchukina, *J. Gen. Chem. USSR* **1967**, 37(5), 1108-1169.
- [90] B. F. Gisin, R. B. Merrifield, D. C. Tosteson, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91(10), 2691-2695.
- [91] G. Losse, H. Klengel, *Tetrahedron* **1971**, 27, 1423-1434.
- [92] B. F. Gisin, A. R. Dhundale, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, 14, 356-363.
- [93] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37(22), 3404-3409.
- [94] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35(3), 161-214.
- [95] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112(26), 9651-9652.
- [96] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, 97(6), 2243-2266.
- [97] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, 63(26), 9678-9683.
- [98] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers* **2000**, 55(3), 217-226.
- [99] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60(11), 2447-2467.
- [100] J. N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetr. Letters* **1991**, 32(10), 1303-1306.
- [101] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. of chem. Res.* **1996**, 29(6), 268-274.
- [102] Y. M. Angell, C. Garcia-Echeverria, D. H. Rich, *Tetr. Letters* **1994**, 35(33), 5981-5984.
- [103] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L. A. Carpino, *Tetr. Letters* **1996**, 37(31), 5483-5486.
- [104] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, P. Henklein, H. Wenschuh, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetr. Letters* **1998**, 39(3-4), 241-244.
- [105] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(10), 4397-4398.
- [106] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetr. Letters* **1994**, 35(15), 2279-2282.
- [107] Y. X. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62(13), 4307-4312.
- [108] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, 22, 2559-2560.
- [109] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, 57(20), 5399-5403.
- [110] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetr. Letters* **1989**, 30(21), 2739-2742.
- [111] O. Kuisle, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8063-8075.
- [112] J. S. Davies, J. Howe, J. Jayatilake, T. Riley, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4(4-6), 441-445.
- [113] S. Zimmer, E. Hoffmann, G. Jung, H. Kessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 497-501.
- [114] C. Zeggaf, J. Poncet, P. Jouin, M.-N. Dufour, B. Castro, *Tetrahedron* **1989**, 45(16), 5039-5050.
- [115] T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94(17), 6203-6205.
- [116] A. Lüttringhaus, K. Ziegler, *Liebigs Ann. Chem.* **1937**, 528(1), 155-161.

- [117] L. Gajdosik, *Encyclopedia of Sensors* **2006**, *10*, 361-373.
- [118] E. Bakker, Y. Qin, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3965-3983.
- [119] L. Nicu, T. Leichlé, *J. Appl. Physics* **2008**, *104*(11), 111101/111101-111101-111116.
- [120] D. M. Considine, *Encyclopedia of Chemistry*, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne, **1984**.
- [121] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.
- [122] P. György, C. S. Rose, R. E. Eakin, E. E. Snell, R. J. Williams, *Science* **1941**, *93*(2419), 477-478.
- [123] R. E. Eakin, E. E. Snell, R. J. Williams, *J. Biol. Chem.* **1941**, *140*, 535-542.
- [124] F. Tausig, F. J. Wolf, *Biochem. and Biophys. Res. Com.* **1963**, *14*(3), 205-209.
- [125] H. F. Launer, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 125-132.
- [126] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85-133.
- [127] R. M. Buckland, *Nature* **1986**, *320*, 557-558.
- [128] S. Freitag, I. Le Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Protein Science* **1997**, *6*, 1157-1166.
- [129] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*(4887), 85-88.
- [130] L. S. Nerurkar, M. Namba, G. Brashears, A. J. Jacob, Y. J. Lee, J. L. Sever, *J. Clin. Microbiol.* **1984**, *20*(1), 109-114.
- [131] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clinical Chemistry* **1991**, *37*(5), 625-636.
- [132] S. Futaki, Z. Youjun, Y. Sugiura, *Tetr. Letters* **2001**, *42*(8), 1563-1565.
- [133] T. J. Kealy, P. L. Pauson, *Nature* **1951**, *168*(4285), 1039-1040.
- [134] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*(8), 2125-2126.
- [135] J. D. Dunitz, L. E. Orgel, *Nature* **1953**, *171*(4342), 121-122.
- [136] S. P. Gubin, S. A. Smirnova, L. I. Denisovich, A. A. Lubovich, *J. Org. Chem.* **1971**, *30*, 243-255.
- [137] J. A. Page, G. Wilkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*(23), 6149-6150.
- [138] J. Hanzlík, Z. Samec, J. Hovorka, *J. Electroanalytical Chemistry* **1987**, *216*, 303-308.
- [139] A. M. Bond, E. A. McLennan, R. S. Stojanovic, F. G. Thomas, *Anal. Chem.* **1987**, *59*(24), 2853-2860.
- [140] P. D. Beer, H. Sikanyika, *Polyhedron* **1990**, *9*(8), 1091-1094.
- [141] P. D. Beer, C. Blackburn, J. F. McAleer, H. Sikanyika, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 378-381.
- [142] E. C. Constable, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*(4), 407-408.
- [143] V. M. Krishnamurthy, G. Kaufmann, A. R. Urbach, I. Gitlin, K. L. Gudiksen, D. B. Weibel, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2008**, *108*(3), 946-1051.
- [144] M. Mayer, V. Semetey, I. Gitlin, J. Yang, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(4), 1453-1465.
- [145] S. Blake, R. Capone, M. Mayer, J. Yang, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*(8), 1614-1624.
- [146] R. A. Masut, J. N. Kushick, *J. Computational Chem.* **1985**, *6*(2), 148-155.

- [147] T. Dudev, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(23), 8092-8101.
- [148] M. Dobler, *Ionophores and Their Structures*, John Wiley and Sons, Inc., **1981**.
- [149] D. E. Moreland, W. P. Novitzky, *Chemico-Biological Interactions* **1984**, *48*(2), 153-168.
- [150] R. M. Heisey, J. Huang, S. K. Mishra, J. E. Keller, J. R. Miller, A. R. Putnam, T. D'Silva, *J. Agricultural and Food Chemistry* **1988**, *36*(6), 1283-1286.
- [151] G. Stark, B. Ketterer, R. Benz, P. Lauger, *Biophysical J.* **1971**, *11*, 981-994.
- [152] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. K. Antonov, E. I. Vinogradova, A. M. Shkrob, G. G. Malenkov, A. V. Evstratov, I. A. Laine, E. I. Melnik, I. D. Ryabova, *J. Membrane Biol.* **1969**, *1*, 402-430.
- [153] T. R. Forester, W. Smith, J. H. R. Clarke, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, *93*(4), 613-619.
- [154] W. L. Duax, J. F. Griffin, D. A. Langs, G. D. Smith, P. Grochulski, V. Pletnev, V. Ivanov, *Biopolymers (Peptide Science)* **1996**, *40*, 141-155.
- [155] T. R. Forester, W. Smith, J. H. R. Clarke, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14418-14423.
- [156] R. De Levie, *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1975**, *58*(1), 203-216.
- [157] E. Barsoukov, J. R. MacDonald, *Impedance Spectroscopy - Theory, Experiment and Applications.*, John Wiley & Sons., New Jersey, **2005**.
- [158] C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, *Electrochemistry*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [159] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43-48.
- [160] M. Stelzle, G. Weissmuller, E. Sackmann, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2974-2981.
- [161] C. Steinem, A. Janshoff, W.-P. Ulrich, M. Sieber, H.-J. Galla, *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, *1279*, 169-180.
- [162] W. Knoll, *Ann. Review of Physics and Chemistry* **1998**, *49*, 569-638.
- [163] D. K. Kambhampati, W. Knoll, *Curr. Opinion in Colloid & Interface Science* **1999**, *4*, 273-280.
- [164] J. Dostalek, R. F. Roskamp, W. Knoll, *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2009**, *139*(1), 9-12.
- [165] D. Axelrod, *J. of Luminescence* **1984**, *31*, 881-884.
- [166] E. Kretschmann, *Z. Physik* **1971**, *241*, 313-324.
- [167] P. M. Nellen, W. Lukosz, *Biosensors & Bioelectronics* **1991**, *6*(6).
- [168] H. Arwin, *Appl. Spectroscopy* **1986**, *40*(3), 313-318.
- [169] G. Kovacs, *Electromagnetic Surface Modes*, John Wiley & Sons, New York, **1982**.
- [170] S. Kienle, S. Lingler, W. Kraas, O. A., W. Knoll, G. Jung, *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, *12*(8), 779-786.
- [171] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1976**, *16*(9), 1055-1069.
- [172] E. Evans, E. Sackmann, *J. of Fluid Mechanics* **1988**, *194*, 553-561.
- [173] B. D. Hughes, B. A. Pailthorpe, L. R. White, *J. of Fluid Mechanics* **1981**, *110*, 349-372.

- [174] P. F. F. Almeida, W. L. C. Vaz, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1992**, 31(29), 6737-6747.
- [175] M. H. Cohen, D. Turnbull, *J. Chem. Phys.* **1959**, 31(5), 1164-1170.
- [176] T. Baumgart, A. Offenhäuser, *Langmuir* **2003**, 19(5), 1730-1737.
- [177] J. D. White, J. Hong, L. A. Robarge, *J. Org. Chem.* **1999**, 64(22), 6206-6216.
- [178] A. Zubia, L. Mendoza, S. Vivanco, E. Aldaba, T. Carrascal, B. Lecea, A. Arrieta, T. Zimmerman, F. Vidal-Vanaclocha, F. P. Cossio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2903-2907.
- [179] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(11), 2534-2543.
- [180] L. Becucci, R. Guidelli, *Soft Matter* **2009**, 5(11), 2294-2301.
- [181] N. Nesnas, R. R. Rando, K. Nakanishi, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6577-6584.
- [182] W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86, 2190-2194.
- [183] L. K. Tamm, *Biochemistry* **1988**, 27, 1450-1457.
- [184] L. K. Tamm, *Biochimica et Biophysica Acta - Rev. on Biomembranes* **1991**, 1071(2), 123-148.
- [185] D. Chorvát, P. Svec, *SPIE, Laser Appl. in Life Sciences* **1990**, 1403, 659-666.
- [186] S. Ramadurai, A. Holt, V. Krasnikov, G. van den Bogaart, J. A. Killian, B. Poolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131(35), 12650-12656.
- [187] M. Przybylo, J. Skora, J. Humpolckov, A. Benda, A. Zan, M. Hof, *Langmuir* **2006**, 22(22), 9096-9099.
- [188] M. Remko, C.-W. von der Lieth, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12(20), 5395-5403.
- [189] F. Van Meurs, F. W. Metselaar, A. J. A. Post, J. Van Rossum, A. M. Van Wijk, H. Van Bekkum, *J. of Organometallic Chemistry* **1975**, 84(2), C22-C24.
- [190] G. Feng, Y. Xiong, H. Wang, Y. Yang, *Electrochimica Acta* **2008**, 53(28), 8253-8257.
- [191] G. D. Santis, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, A. Monichino, P. Pallavicini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 2219-2224.
- [192] S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D. L. Fortin, K. D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H. L. Aaron, E. K. Scott, R. H. Kramer, J. Flannery, H. Baier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Neuron* **2007**, 54, 535-545.
- [193] C. Pett, Johannes-Gutenberg Universität (Mainz), **2009**.
- [194] H.-J. Butt, T. Müller, H. Gross, *J. of Structural Biology* **1993**, 110, 127-132.
- [195] I. K. Vockenroth, Dissertation (Mainz), **2007**.
- [196] P. Tecilla, R. P. Dixon, G. Slobodkin, D. S. Alavi, D. H. Waldeck, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112(25), 9408-9410.
- [197] J. S. Lindsey, *New Journal of Chemistry* **1991**, 15(2-3), 153-180.
- [198] F. Schreiber, *Progress in Surface Science* **2000**, 65(5-8), 151-256.

## VII Anhang

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten

---

Name: Julia Braunagel  
Geburtsdatum und -ort: 01.10.1981, Kirchheimbolanden  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Ausbildung

---

Aug. 1988 – Jul. 1992 Grundschule, Saarlouis  
Aug. 1992 – Jul. 2001 Robert-Schuman Gymnasium, Saarlouis  
Jul. 2001 Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6  
Okt. 2001 – Nov. 2006 Chemie-Studium an der Technischen Universität München (Vordiplom mit der Note 2,1)  
Mai. 2006 – Nov. 2006 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Horst Kessler, TU München, über *“Synthesen auf dem Gebiet von RGD-Peptiden und deren Mimetika”*  
Nov. 2006 Diplom mit der Note 2,2, Vertiefungsfach: Makromolekulare Chemie  
Seit Jan. 2007 – Dez. 2009 Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Knoll (jetzt: *Material Science Group*) am MPI für Polymerforschung, Mainz, betreut von Dr. Ingo Köper über *“Derivate des Ionentransporters Valinomycin; Synthese und Sensor-Anwendung”*

#### Veröffentlichungen

---

Roskamp, R.; Vockenroth, I.; Eisenmenger, N.; Braunagel, J.; Köper, I.  
Functional tethered bilayer lipid membranes on aluminum oxide.  
*ChemPhysChem* (2008), 9 (13), 1920-4.

Köper, I.; Braunagel, J.; Sensing with peptides.  
Abstracts of Papers, 236th ACS National Meeting, 2008, Philadelphia, USA

### Konferenzen und Kongresse

---

2003 – 2006	Wiederholte Teilnahme am <i>“Perspektiv-Forum”</i> der Daimler AG und der <i>Stiftung Jugend forscht e.V.</i>
2003 – 2008	Wiederholte Teilnahme am <i>“Jungforscher-Congress”</i> des <i>juFORUM e.V.</i> (Kongress für naturwissenschaftlich interessierte junge Menschen)
Mär. 2005 Mai 2007	Organisation des <i>“Jungforscher-Congresses”</i> in München <i>International Max-Planck Research School (IMPRS)</i> <i>“Membranes on surfaces”</i> in Spanien, Posterpräsentation
Aug. 2007	<i>Summer school “Biosensing with channels”</i> in Frankreich, Posterpräsentation und Vortrag
Jun. 2008	Internationales Kolloquium <i>BIOINTERFACE</i> in den Niederlanden, Posterpräsentation
Sep. 2008	Organisation des 9 <sup>th</sup> <i>Minerva Symposiums “Molecules as Sensors”</i> in Israel, Posterpräsentation
Jun. 2009	436 <sup>th</sup> <i>WE Heraeus Seminar, “Biosensing with channels”</i> , Jacobs Universität Bremen, Posterpräsentation
Jul. 2009	Europäischer Biophysik-Kongress in Italien ( <i>EBSA 2009</i> ), Posterpräsentation

### Auszeichnungen

---

1996 - 2000	Wiederholte erfolgreiche Teilnahme an <i>“Jugend forscht”</i> , beste Platzierung: Sonderpreis auf Bundesebene 1999 (Teilnahme am <i>“London International Youth Science Forum”</i> )
2001	Preis des Fördervereins des Robert-Schuman Gymnasiums für das beste Chemie-Abitur