



Synthese neuer Lipidanker



Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom Chemiker

im Fachbereich Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christian Bücher

geboren in Neunkirchen/Saar

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
im Arbeitskreis Materialwissenschaften

Mainz, im Mai 2009

Erklärung

Die Diplomarbeit wurde am Max-Planck-Institut für Polymerforschung im Arbeitskreis Materialwissenschaften in der Zeit von August 2008 bis Mai 2009 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Dr. Ingo Köper angefertigt.

Beginn der Diplomarbeit: 26. August 2008

Diplomarbeit beim Prüfungsausschuss eingereicht: 26. Mai 2009

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 26. Mai 2009

Christian Bücher

„Wer nichts als die Chemie versteht, versteht auch die nicht recht.“

(Georg Christoph Lichtenberg, dt. Physiker und Schriftsteller, 1742-1799)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Lipide und Biomembranen.	1
1.2 Modellmembranen.	3
1.2.1 Vesikel.	3
1.2.2 Schwarzfilmmembranen.	4
1.2.3 Festkörperunterstützte Membranmodelle.	4
1.2.3.1 Solid Supported Bilayer Membranes.	5
1.2.3.2 Tethered Bilayer Lipid Membranes.	6
1.3 Motivation.	8
2. Messmethoden	9
2.1 Analyse der Molekülstruktur und Reinigungsmethoden.	9
2.1.1 NMR-Spektroskopie	9
2.1.2 Massenspektrometrie.	11
2.1.3 Chromatographie.	12
2.2 Methoden zur Charakterisierung der Lipidmembran.	13
2.2.1 Kontaktwinkelmessung.	13
2.2.2 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie (EIS)	15
3. Synthese	22
3.1 Synthese des Precursor-Moleküls Diphytanylglycerol (DPG)	22
3.1.1 Hydrierung von Phytol.	23
3.1.2 Herstellung des Phytanbromids (Appel-Reaktion)	25
3.1.3 Synthese des geschützten Diphytanylglycerols.	27
3.1.4 Entschützen des geschützten Diphytanylglycerols.	29
3.2 Synthese der Lipide.	31
3.2.1 Veresterung des DPGs mit Adipinsäure.	32
3.2.1 a) Veresterung des DPGs mit Adipinsäure mittels DCC.	32
3.2.1 b) Veresterung des DPGs mit der Yamaguchi-Kopplung.	34
3.2.2 Synthese des DPGAT.	37
3.2.3 Veresterung der Diphytanylglyceroladipinsäure mit TEG.	38
3.2.4 Veresterung der Diphytanylglyceroladipinsäure mit 1,3-Propandiol.	39

3.2.5	Synthese von DPGL.	40
3.2.6	Synthese von DPGAL.	41
4.	Herstellung der t-BLM	42
4.1	Herstellung von ultraflachen Goldoberflächen.	42
4.1.1	Reinigung der Silicium-Wafer.	43
4.1.2	Reinigung der Glaträger.	43
4.2	Aufbau des Monolayers mittels Self-Assembly.	44
4.3	Der Bilayer.	45
4.3.1	Aufbau mittels Vesikelfusion.	45
4.3.2	Aufbau mittels Rapid Solvent Exchange (RSA)	45
4.4	Inkorporation von Valinomycin.	46
5.	Charakterisierung der Membran	47
5.1	Kontaktwinkelmessung.	47
5.1.1	DPGAT-Monolayer.	48
5.1.2	DPGAL-Monolayer.	49
5.1.3	DPGL-Monolayer.	49
5.2	Elektrochemische Impedanz-Messung (EIS)	50
5.2.1	EIS-messung der Mono-und Bilayer nach Vesikelfusion.	51
5.2.1.1	Impedanz-Spektren von DPGAT.	51
5.2.1.2	Impedanz-Spektren von DPGAL.	54
5.2.1.3	Impedanz-Spektren von DPGL.	56
5.2.2	EIS-Messungen der Mono-und Bilayer nach RSA.	58
5.2.2.1	Impedanz-Spektren von DPGAT.	58
5.2.2.2	Impedanz-Spektren von DPGAL.	60
5.2.2.3	Impedanz-Spektren von DPGL.	62
6.	Zusammenfassung und Ausblick	64
7.	Danksagung	66
8.	Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

BLM	Black Lipid Membrane
C	Kondensator
cmc	kritische Micellenkonzentration
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DPG	1,2- <i>O</i> -Diphytanylglycerol
DPhyPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPTL	2,3-Di- <i>O</i> -phytanoyl-sn-glycerin-1-tetraethylenglycol-D,L- α -liponsäureester
PE	Petroether
EIS	Elektrochemische Impedanzspektroskopie
EtOAc	Ethylacetat
FD	Field Desorption
FRA	Frequency response Analyzer
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schäfer
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
R	Widerstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSE	Rapid Solvent Exchange
RT	Raumtemperatur (T=298 K)
RV	Rotationsverdampfer
SAM	Self-Assembly Monolayer
sBLM	solid supported Bilayer Lipid Membrane
tBLM	tethered Bilayer Lipid Membrane
TEG	Tetraethylenglykol
TLC	Thin Layer Chromatographie
TSA	Template Stripped Gold
Y	Admittanz
Z	Impedanz

φ	Phase
Θ	Kontaktwinkel
ω	Kreisfrequenz

1. Einleitung

Gestützte Lipiddoppelschichtmembranen (tethered Bilayer Lipid Membranes, tBLMs) sind Modellsysteme für die Cytoplasmamembran und wertvolle Hilfsmittel für die Grundlagenforschung und biosensorische Anwendungen^[1]. Sie sind aus Lipidgruppen aufgebaut, die über modifizierte Spacer an eine Oberfläche angebunden sind. Der Spacer soll die Membran von der Oberfläche entkoppeln, eine hydrophile Schicht zwischen Membran und Substrat bilden und dadurch die funktionellen Eigenschaften des Cytosols/Cytoskeletts nachahmen^[2]. Dies führt zur Bildung einer wässrigen submembranen Phase, welche einerseits den hydrophoben Einfluss der Metalloberfläche reduziert^[3] und andererseits den funktionellen Einbau von Membranproteinen ermöglichen soll.^[4]

Der robuste Aufbau von t-BLMs auf planaren Goldsubstraten erlaubt die Anwendung elektrochemischer Analysemethoden wie die Impedanz-Spektroskopie, wodurch eine elektrische Charakterisierung des Systems möglich wird.

1.1 Lipide und Biomembranen

Lipide nehmen in unserem Körper vielfältige Aufgaben wahr. Sie dienen als Brennstoff, als Baustoff und auch als Isolatoren. Daneben erfüllen sie noch verschiedene Sonderaufgaben als Hormone, Gallensäuren und Vitamine.^[5]

Sie können sich zu hochmolekularen Verbänden zusammenlagern, ohne dabei kovalente Bindungen einzugehen. Ihre hydrophilen Kopfgruppen haben Kontakt mit Wassermolekülen, während ihre hydrophoben Schwanzteile – bedingt durch den hydrophoben Effekt – aggregieren. Diese treibende Kraft beruht auf der Tatsache, dass die Lipide Amphiphile sind. Im wässrigen Milieu orientieren sich Lipide spontan zu höheren Aggregaten zusammen um die Entropie der Umgebung zu erhöhen. Dabei bilden keilförmige Fettsäuremoleküle sphärische Micellen, während sich die röhrenförmigen Phospho- und Glykolipide zu planaren Doppelschichten, den Biomembranen, formieren^[6]. Die lipophilen Reste interagieren auf der wasserabgewandten Seite und halten den Molekülverband vor allem über hydrophobe Effekte und van-der-Waals-Kräfte zusammen. Die Kopfgruppen an den Oberflächen der Membranschichten bilden Wasserstoffbrücken und gegebenenfalls ionische Bindungen mit

dem wässrigen Medium aus.^[2] Die bei der Biomembran jeweils gegenüberliegende Lipidschicht wird als Einzelschicht bzw. „leaflet“ bezeichnet.

Zelluläre Membranen schaffen abgegrenzte Reaktionsräume, also Zellkompartimente, die besondere metabolische und synthetische Leistungen innerhalb einer Zelle übernehmen. Biologische Membranen sind im Schnitt 5-8 nm dick. Die Lipiddoppelschicht (lipid bilayer) stellt eine hochselektive Permeabilitätsschranke dar. Kleine, hydrophobe Moleküle (O_2 , N_2 , CO_2 , Benzol) oder kleine, ungeladene und polare Moleküle (H_2O , Glycerol, Ethanol) können die Membran ohne weiteres per Diffusion passieren, während große, ungeladene, polare Moleküle und Ionen die Membran nur durchqueren können, falls geeignete Transporter, Kanäle oder Ionophore (z.B. Valinomycin) vorhanden sind. Desweiteren spielen Biomembranen eine Rolle bei der Informationsverarbeitung durch Rezeptoren und sie sind Ort der Energieumwandlung^[7].

Ein wesentliches Merkmal biologischer Membranen sind ihre assoziierten Proteine. Diese Membranproteine können einseitig angelagert und mit Lipidankern in der Membran gehalten werden oder als integrale Proteine die Lipiddoppelschicht komplett durchspannen.

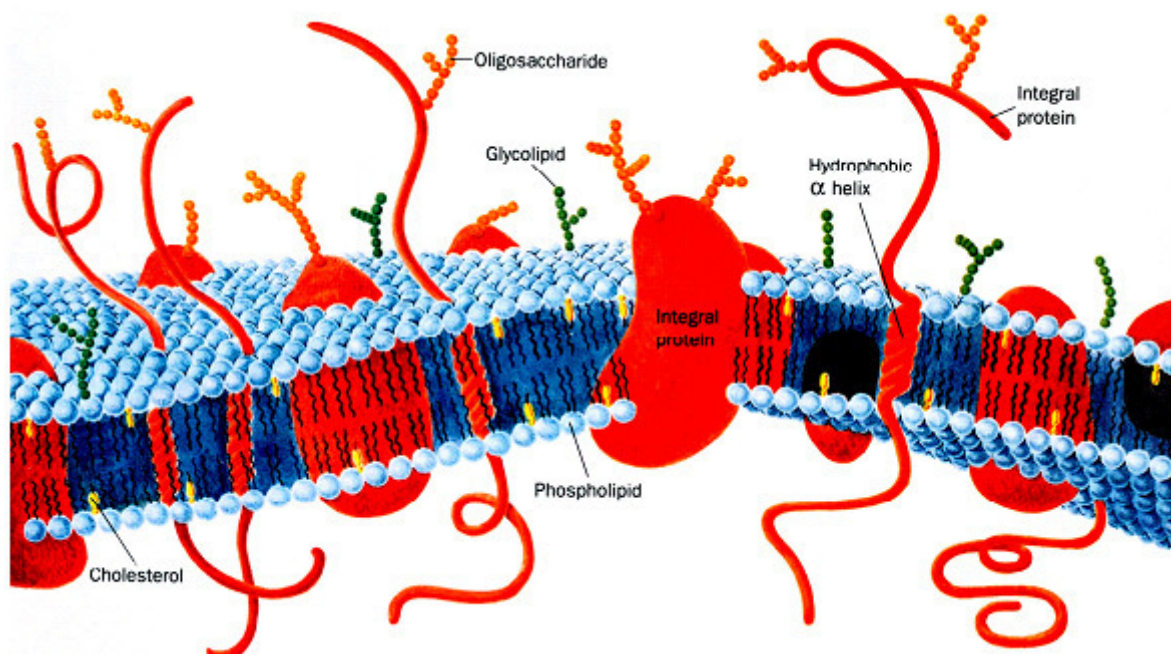


Abbildung 1: „Fluid Mosaic Model“ nach Singer und Nicolson^[8]

Biomembranen sind keine starren Gebilde, sondern dynamische und flexible Systeme mit mobilen Komponenten, und werden daher als „flüssiges Mosaik“ beschrieben (siehe Abbildung 1). Dieses Modell nach Singer und Nicolson beschreibt die Zellmembran als eine

fluide Doppelschicht aus Phospholipiden, in der lateral beweglich Proteine und Polysaccharide eingelagert sind.^[9]

Die genaue Zusammensetzung der Membran weist jedoch, je nach Umgebung und Funktion, erhebliche Unterschiede auf.

Die Ausbildung von Lipiddoppelschichten ist ein Prozess der Selbstaggregation (self-assembly). Das bedeutet, diese Struktur ist in den molekularen Eigenschaften der sie aufbauenden Lipidmoleküle festgelegt. Vor allem hydrophobe Kräfte sind für die Bildung von Lipiddoppelschichten verantwortlich. Außerdem begünstigen van-der-Waals-Anziehungskräfte zwischen den Kohlenwasserstoffschwänzen eine dichte Packung der Ketten.^[10]

Für die Untersuchung von Zellmembranen muss man ihre Komplexität herabsetzen. Hierzu werden vereinfachte, künstliche Modellmembransysteme entwickelt, die eine Vielzahl von analytischen Charakterisierungsmethoden ermöglichen.

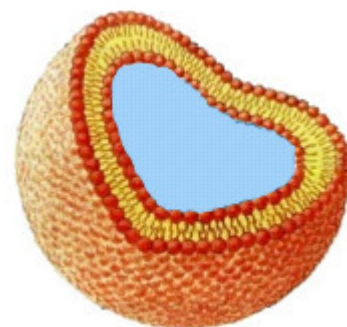
1.2 Modellmembranen

1.2.1 Vesikel

Die einfachste Form einer Modellmembran sind Vesikel.^[11]

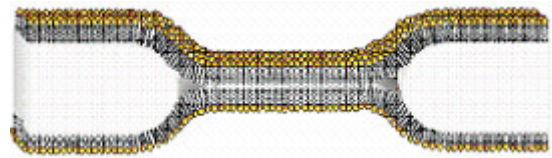
Sie entstehen in einer wässrigen Lösung von Lipiden, sobald die kritische Micellenkonzentration (critical micelle concentration, cmc) erreicht ist. Vesikel sind kugelförmige, wassergefüllte Hohlräume. Zur Herstellung unilamellarer Vesikel drückt man eine wässrige Suspension aus multilamellaren Vesikeln durch eine Membran bestimmter

Porengröße. Bei dieser sogenannten Extrusion entstehen unilamellare Vesikel in der Größenordnung der Membranporen. Der Nachteil bei Experimenten mit Vesikel ist deren kurze Haltbarkeit, da diese nach kurzer Zeit refusionieren.



1.2.2 Schwarzfilmmembranen

Schwarzfilmmembranen („Black Lipid Membranes“, BLMs) tragen ihren Namen, da sie schwarz erscheinen, wenn sie von weißem Licht beleuchtet werden. Grund hierfür ist destruktive



Interferenz, da wegen ihrer Dicke von wenigen Nanometern Doppelbrechung annähernd am selben Punkt auftritt.

Die Arbeit mit Schwarzfilmmembranen wurde bereits in den 70er Jahren entwickelt und ist bis heute ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Membranen, Membranproteinen und Kanälen. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Herstellung solcher BLMs nach Müller Rudin.^[12] Hierbei wird das Lipid in einem unpolaren, nicht flüchtigen n-Alkan gelöst und ein Tropfen dieser Lösung über ein Loch in einer Teflonwand gestrichen, die auf beiden Seiten von Pufferlösung umgeben ist. Diese Pufferlösung verdrängt das Lösemittel, bis die schwarze Bilayer-Membran entsteht.

Die erhaltene BLM ist 4-5 nm dick und eignet sich so für elektrochemische Messungen an der Membran oder an darin inkorporierten Protein^[13]. Auf diese Weise wurden erstmals Untersuchungen von Transportprozessen durch die Membranen mit Hilfe von Membranproteinen möglich.^[14] Noch heute sind sie die etablierten Plattformen für elektrochemische Einzelkanalmessungen, da nur sie eine genügend hohe elektrische Dichtigkeit besitzen. Ein großer Nachteil von BLMs ist die geringe Stabilität von nur wenigen Stunden. Sie reißen leicht – schon bei geringen Erschütterungen reißen die Lipidbilayer, dadurch sind sie zur biosensorischen Anwendung wenig geeignet. Darüber hinaus wirken sich bereits geringste Lösungsmittelreste störend aus.

1.2.3 Festkörperunterstützte Membranmodelle

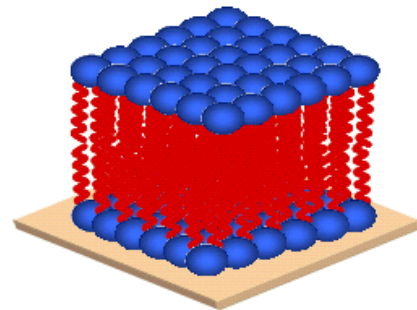
Künstliche Membransysteme lassen sich in zwei Klassen einteilen: Vesikel oder auch Liposome, die zellulären und subzellulären Strukturen als dreidimensionalen Containern nahe kommen, und planare festkörperunterstützte oder auch freitragende quasi-zweidimensionale Lipiddoppelschichten.

Festkörperunterstützte Lipidmembranen (immobilisierte Lipiddoppelschichten auf einem Substrat) finden breite Anwendung in der Biophysik, unter anderem zur Untersuchung der Membranstruktur und -dynamik, sowie von Lipid-Protein-Wechselwirkungen^[15]. Sie können auf Substraten, zum Beispiel Glas, Siliciumdioxid^[16], Indiumzinnoxid, Glimmer, Platin, Titanoxid oder Gold präpariert werden und erschließen so eine Vielzahl von technischen Anwendungen^[17, 18]. Weil festkörperunterstützte Lipidmembranen einen starken Kontakt zum Substrat ausbilden, bieten sie eine hohe Langzeit- und mechanische Stabilität. Auch ist eine laterale Beweglichkeit der Lipide gewährleistet, da sich zwischen der Lipidmembran und den hydrophilen Substraten ein dünner (1nm) Wasserfilm ausbildet.

Festkörperunterstützte Lipidmembranen vereinen die thermodynamischen Eigenschaften vesikulärer Systeme mit dem Vorteil der Zugänglichkeit für oberflächenanalytische Methoden^[19].

1.2.3.1 „Solid Supported Bilayer Membranes“

Festkörperunterstützte Membranen weisen aufgrund der Nähe zum unterstützenden Substrat eine hohe Stabilität auf. Die Membran wird durch die Aufbringung auf eine feste Oberfläche wie einem Glaträger^[20, 21] oder eine Metalloberfläche stabilisiert. Eine Herstellung dieser Membranen können sowohl durch die Langmuir-Schäfer also auch durch Langmuir-Blodgett-Technik realisiert werden^[22, 23]. Im Fall der Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Transfer) werden Lipide auf einer Wasseroberfläche gespreitet und bei einem definierten Oberflächendruck auf ein zumeist hydrophiles Substrat wie einer gereinigten Glasoberfläche vertikal durch Herausziehen des Trägers aus einer wässrigen Subphase übertragen. Auf der resultierenden, hydrophoben Oberfläche kann durch erneutes Eintauchen eine zweite Monoschicht abgeschieden werden, wobei die Kopfgruppen nun nach außen zeigen und eine Lipiddoppelschicht entsteht. Eine zweite Monoschicht auszubilden gelingt jedoch nur unter Verwendung spezieller Lipide wie der negativ geladenen Phosphatidsäure in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen oder Phosphatidylethanolamin mit gesättigten Fettsäuren.



Alternativ dazu liefert die Langmuir-Schäfer-Technik (LS-Transfer) Lipiddoppelschichten, indem das hydrophobe mit einer Lipidmonoschicht funktionalisierte Substrat zur Ausbildung einer zweiten Monoschicht horizontal auf die mit den Lipiden belegte Wasseroberfläche gelegt und dann durch diese hindurch in das Wasser gestoßen wird (siehe Abb. 2)

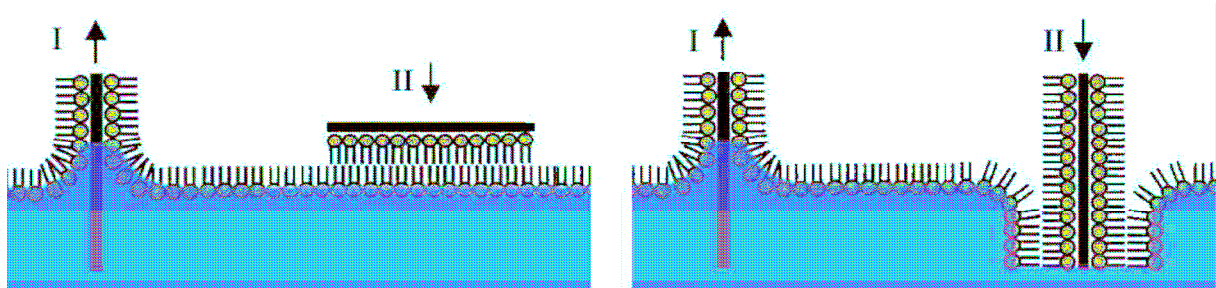
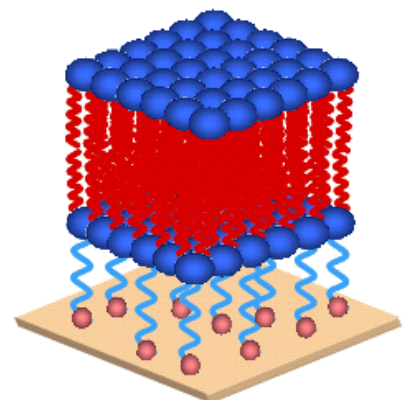


Abbildung 2: Langmuir-Schäfer (links) und Langmuir-Blodgett-Technik (rechts)^[24]

Zwar besitzen diese Membranen nun eine Lebensdauer von einigen Stunden, allerdings bringt die Bindung an eine Oberfläche auch erhebliche Nachteile mit sich. Zum einen ist die Beweglichkeit der Monoschicht eingeschränkt^[25]. Dies gilt im besonderen Maße, wenn sie durch Chemisorption^[23] quasi-kovalent an den Festkörper gebunden ist. Zum anderen behindert der geringe Abstand zwischen Substrat und Lipiddoppelschicht den Einbau von Proteinen und Peptiden in die Membran unter Erhalt ihrer Funktion^[26]. Dieses Problem kann durch das Einfügen von Abstandshaltern (Spacern) zwischen Membran und dem Festkörper gelöst werden, siehe tBLMs.

1.2.3.2 „Tethered Bilayer Lipid Membranes“

„Tethered Bilayer Lipid Membranes“ (tBLMs) stellen eine Modifikation der „Solid Supported Bilayer Lipidmembrane“ dar. Auch bei ihnen resultiert die Stabilität aus der Anbindung an eine Festkörperoberfläche zum Beispiel auf Gold^[27-30] oder Siliciumoxid^[31]. Allerdings ist hier der Abstand zwischen Substrat und Bilayer aufgrund einer modifizierten verlängerten Platzhalterregion (Spacer) größer, was ein Inkorporieren größerer Transmembranproteine ermöglicht. Erreicht wird dies durch einen Spacer, bislang meist auf der Basis von Polyethylenglykol-Einheiten.



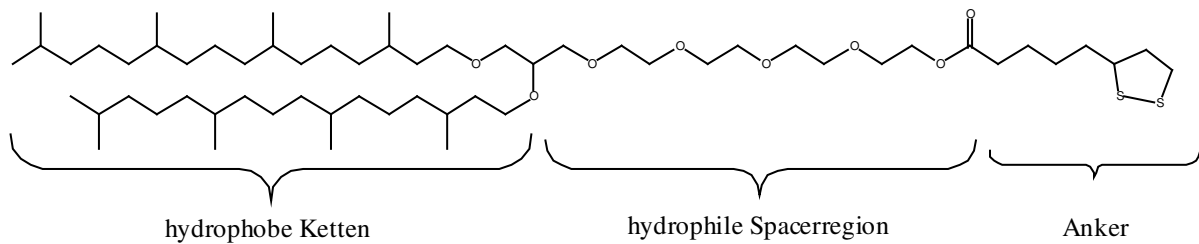


Abbildung 3: Ein herkömmliches Lipid (DPTL) zur Herstellung einer tBLM

Typischerweise können die verwendeten synthetischen Lipide in drei Bereiche unterteilt werden (siehe Abb.3). Einen Anker, zum Beispiel Thiole oder wie hier eine Liponsäuregruppe, welche eine kovalente Bindung zur Goldoberfläche herstellt, einen hydrophilen Spacer aus einer Polyethylenglykolkette, der ein Ausbilden eines Wasser- und Ionenreservoirs ermöglicht und die hydrophoben Alkylketten, welche den hydrophoben Teil des Lipids darstellen^[32].

Ein Monolayer der tBLMs lässt sich durch Selbstorganisation^[33] (Self-Assembly-Monolayer, SAM) oder Langmuir-Blodgett-Transfer herstellen. Auf die so entstandene untere Schicht einer Membran kann durch Vesikelfusion oder Lösungsmittelaustausch (Rapid Solvant Exchange, RSE) die zweite Schicht etabliert werden. Eine Vesikelfusion ist ein Abbildung 4 schematisch dargestellt:

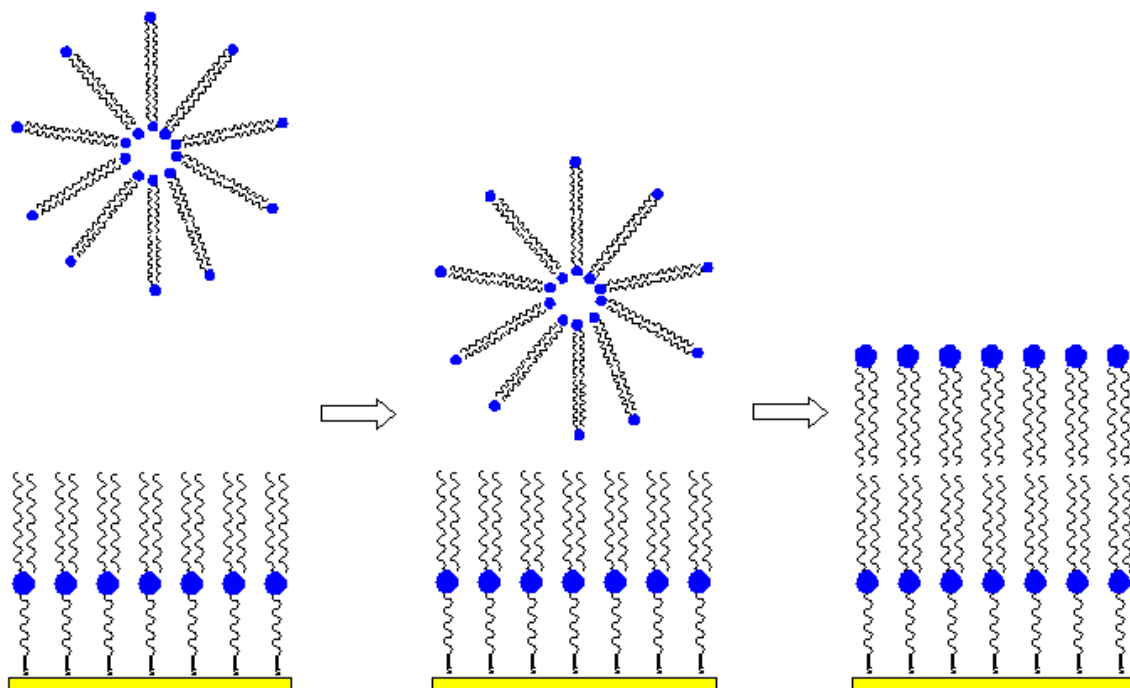


Abbildung 4: Vesikelfusion auf einem Monolayer

Die Stabilität einer solchen Membran ist über Wochen hin gewährleistet und ermöglicht eine gute Inkorporation von Proteinen und stellt so eine geeignete Plattform für Biosensoren dar^[34].

1.3 Motivation

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin neue Lipide zu synthetisieren, die zum Aufbau einer stabilen t-BLM dienen und verbesserte elektrische Eigenschaften bei der Impedanzmessung zeigen.

Der hydrophobe Teil der Lipidmoleküle soll wie bei den herkömmlichen Lipiden aus verzweigten Hydrocarboneinheiten, wie dem isoprenoiden Phytanol bestehen. Die Methyläste gewährleisten einen Phasenübergang bei niedrigen Temperaturen, verhindern eine Kristallisation der Membran und sorgen für eine optimale Fluidität bei Raumtemperatur. Es sind zwei hydrophobe Schwänze an die polare Kopfgruppe Glycerol gekoppelt. Im Falle der Ankerlipide ist die polare Kopfgruppe durch die Spacer- und Ankereinheit ersetzt. Dieser Spacer führt zur Bildung einer hydrophilen Region zwischen der Membran und der Goldoberfläche. Diese Region fungiert als Reservoir für Ionen die durch die Membran transportiert werden können^[35-37]. Das Reservoir besitzt eine gelähnliche Struktur^[38], welches für Ionen durchlässig ist. Die elektrischen Eigenschaften einer tBLM sind eng mit den Eigenschaften dieser Reservoirregion korreliert^[39].

Ein wichtiger Faktor hierbei ist der chemische Aufbau des Spacers. Krishna *et al.* verglichen den Ionenfluss durch die Membran bei tBLMs deren Spacerregionen zum einen aus Ether- und zum anderen aus Esterbindungen zusammengesetzt war. Der Ionenfluss war höher bei den Membranen, deren Spacer nur Etherbindungen enthielten. Dies lässt sich mit einer stärkeren physikalischen Adsorption der Ionen an Esterbindungen aufgrund des Chelateffektes zurückführen. Genau dieses Phänomen wollte ich bei den Synthesen neuer Lipide ausnutzen. Durch den Einbau von Esterbindungen in die Spacerkette sollen die Ionen teilweise fixiert werden, um so den Ionenfluss unterhalb der Membran herabzusetzen. Hierdurch sollen bessere Ergebnisse bei der Impedanzspektroskopie erzielt werden. Bei der Impedanzspektroskopie will man den Ionenfluss durch die Membran messen und ein zusätzlicher Ionenfluss unterhalb der Membran wirkt sich auf die Messergebnisse störend aus.

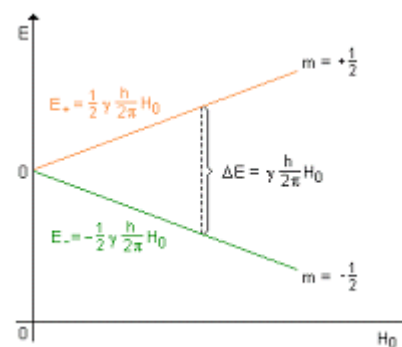
2. Messmethoden

Dieser Methodenteil lässt sich in zwei Sektionen unterteilen. Der erste Teil befasst sich mit der Aufklärung der Molekülstruktur der synthetisierten Lipide und ihrer Zwischenstufen. Hierzu zählt sowohl die Kernresonanz-Spektroskopie als auch die FD-Masse. Zudem werden wichtige Reinigungsschritte bei der Aufarbeitung der Produkte mittels Chromatographie erläutert. Im zweiten Teil wird auf die Methoden zur Charakterisierung der Lipidmembran mittels Kontaktwinkelmessung und Impedanz-Spektroskopie eingegangen.

2.1 Analyse der Molekülstruktur und Reinigungsmethoden

2.1.1 NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Die NMR-Spektroskopie ist eine der bedeutendsten Methoden zur Strukturaufklärung in der organischen Chemie, welche die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkungen mit seinen Nachbaratomen erlaubt. Diese Information ermöglicht oft die Aufklärung der Struktur und Dynamik von Molekülen. Leider sind nicht alle Isotope des Periodensystems einer NMR-spektroskopischen Untersuchung zugänglich, sondern nur solche, deren Kernspin von Null verschieden ist. Dies sind alle Isotope, die eine ungerade Nukleonen- oder Ordnungszahl besitzen.



Periodensystems einer NMR-spektroskopischen Untersuchung zugänglich, sondern nur solche, deren Kernspin von Null verschieden ist. Dies sind alle Isotope, die eine ungerade Nukleonen- oder Ordnungszahl besitzen.

Der Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt in der breiten Anwendbarkeit, da es sich hierbei um eine nicht-invasive Methode handelt und es lediglich einer sehr geringe Masse an Probenmaterial erfordert (wenige Milligramm).

Teilchen und Atomkerne, die einen Spin \bar{s} besitzen, verhalten sich im Magnetfeld als hätten sie ein magnetisches Moment, das oft mit $\bar{\mu}$ bezeichnet wird. Dieses magnetische Moment kann im äußeren Magnetfeld nicht jede beliebige sondern nur bestimmte, durch die Quantenmechanik bedingte, Orientierungen einnehmen. Die Zahl der möglichen Orientierungen wird durch den Kernspin S bestimmt und beträgt $2S + 1$, das magnetische

Moment des Wasserstoffkern kann beispielsweise aufgrund seines Kernspins von $\frac{1}{2}$ die beiden Zustände $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$ einnehmen.

Das Deuteriumatom hat dagegen einen Kernspin von 1, hier sind die Zustände +1, 0 und -1 möglich. Die (sehr kleine) Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Zuständen, $\Delta E = \hbar\omega$ mit der Larmorfrequenz ω , ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes. Aufgrund der Energiedifferenz werden die energieärmeren Zustände bevorzugt besetzt, allerdings ist diese Bevorzugung wegen der nur kleinen Energiedifferenz nur gering, daher braucht man für die NMR-Spektroskopie sehr starke Magnetfelder. Lässt man auf den Kern zusätzlich ein elektromagnetisches Wechselfeld (z.B. Radiowellen), dessen magnetischer Vektor senkrecht auf dem statischen magnetischen Feld steht, einwirken, so kann man einen Übergang in einen höherenergetischen Zustand erzwingen, wenn die eingestrahlte Frequenz der Lamorfrequenz entspricht. Wenn das System gesättigt ist, sind alle Zustände gleich besetzt, alle Kerne in den energiereichsten Zustand zu überführen ist nicht möglich (Boltzmann-Statistik). Zur Messung bringt man die Probe in ein magnetisches Feld. Die Probe wird von einer Induktionsspule umgeben, welche ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld erzeugt. Dann variiert man die Stärke des Magnetfeldes, bis der Resonanzfall eintritt (Continuous-Wave-Verfahren). Alternativ kann auch die magnetische Feldstärke konstant gehalten und die Frequenz des eingestrahlten Wechselfeldes variiert werden (Continuous-Field). Wenn der Resonanzfall eintritt, die Probe also Energie aus dem Wechselfeld aufnimmt, verändert sich die Stromstärke, welche zum Aufbau des Wechselfeldes benötigt wird. Dies kann man messen. Die Energieabstrahlung bei der Relaxation vom höheren in den energieärmeren Zustand verläuft innerhalb einer sehr kurzen Periode. Diese beträgt bei Raumtemperatur bei Protonen etwa eine halbe Sekunde. Mit einem ständig ein- und ausschaltenden Relais können Radiowellensender und Detektor jedoch kontinuierlich betrieben werden. Wenn alle H-1- oder C-13-Atome die gleiche Resonanzfrequenz hätten, wäre die Methode zur Strukturaufklärung wenig interessant. Tatsächlich hängen aber die Resonanzfrequenzen von der elektronischen Umgebung der Kerne ab. Das äußere Magnetfeld induziert in den Elektronenhüllen einen Ringstrom, welcher wiederum ein Magnetfeld erzeugt, das dem äußeren entgegen gerichtet ist und so die Stärke des Magnetfeldes am untersuchten Kern verringert (Abschirmung). Außerdem gibt es kleine Resonanz-Wechselwirkungen über Bindungen mit anderen magnetischen Kernen („chemische Kopplung“). Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Kernresonanzspektroskopie zur Strukturaufklärung von Molekülen eingesetzt.

In meinen Versuchen wurden alle NMR-Spektren mit einem Bruker 250 MHz-Spektrometer gemessen, welches die automatisierte Software ICON NMR 3.1.8 zur Spektrenaufnahme verwendet. Die weitere Auswertung wurde mit dem Programm MestreC durchgeführt.

2.1.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode zur Ermittlung von Molekulargewichten organischer Substanzen. In einem Massenspektrometer wird die Probe in einem Hochvakuum mit Elektronen beschossen. Diese schlagen eines oder mehrere Elektronen aus dem Molekül heraus, gefolgt von diversen Fragmentierungsprozessen des Moleküls. Dies führt sowohl zu ionischen als auch zu neutralen Molekülfragmenten. Die positiven Ionen verlassen die Ionisierungskammer, indem sie durch ein magnetisches oder elektrisches Feld in Richtung Detektor beschleunigt werden. Das Massenspektrum ergibt sich aus der Aufnahme der Ströme die durch das Auftreffen der Ionen auf den Detektor erzeugt werden. Das resultierende Spektrum ist eine Auftragung der Häufigkeit jeder einzelnen Ionenspezies gegen das Masse – zu Ladungsverhältnis m/z .

Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS):

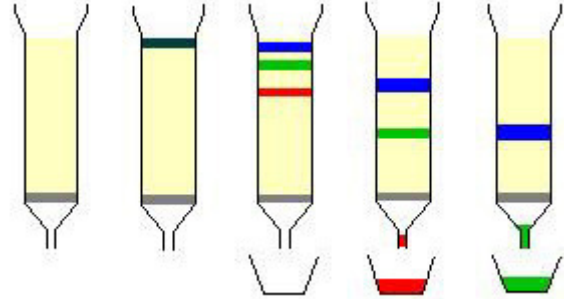
Das Prinzip der Felddesorption ist in der Literatur beschrieben^[40]. Für die Messungen wurden die Proben gewöhnlich in Dichlormethan oder Chloroform gelöst und ein Tropfen davon mit einer Hamilton-Spritze auf einen mikroskopischen Probendraht aufgetragen. Dieser Draht wird in die Ionisierungskammer eingeführt und einem Hochvakuum ausgesetzt. Es wird eine Spannung von 8 kV angelegt. Die Ionen bilden sich in der Gasphase in Anwesenheit eines elektrischen Feldes und werden mittels eines magnetischen Feldes aufgetrennt. Die Masse der jeweiligen Verbindung wird mit einem Photomultiplier detektiert.

Alle in dieser Arbeit aufgenommenen Massenspektren wurden mit dem VG ZAB2-SE-FPD Spektrometer (Spectrofield) gemessen. Mit diesem Gerät können Moleküle in der Größenordnung von 250 – 3500 g/mol detektiert werden.

2.1.3 Chromatographie

Allgemeines Prinzip der Chromatographie^[41]:

Die chromatographische Auftrennung findet in einer Zwei-Phasen-Separation statt. Hierbei befindet sich der Analyt in einem ständigen Gleichgewicht zwischen der mobilen und der stationären Phase. Es gibt eine Vielzahl chromatographischer Methoden und sie werden



nach der Art des Gleichgewichtsprozesses kategorisiert, welches durch die Wahl der mobilen und stationären Phasen bestimmt wird. Die Gleichgewichtskonstante K ist eine Funktion von zwei thermodynamischen Parametern, der Änderung der Enthalpie ΔH° und der Änderung der Entropie ΔS° und der Konzentration des Analyts in den jeweiligen Phasen, mobil C_m und stationär C_s :

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right)$$

In dieser Arbeit wurde speziell die Säulenchromatographie zur Reinigung der synthetisierten Produkte verwendet. Bei der Säulenchromatographie diente ein Glasrohr, das mit einem Trägermaterial (Kieselgel) gefüllt ist, zum Auftrennen des Stoffgemisches. Die Säulenchromatographie eignet sich besonders zum Auftrennen größerer Mengen.

Darüber hinaus wird die Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatographie, TLC) angewandt um den Verunreinigungsgrad abzuschätzen. Ein Stoffgemisch wird auf einer mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatte aufgetragen und eluiert. Hierbei lässt sich leicht der R_f -Wert, das heißt der Retentionsfaktor des Produkts bestimmen. Der R_f -Wert ergibt sich als Quotient aus Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Fließmittels vom Startpunkt aus. Er ist für jede Verbindung charakteristisch, aber vom chromatographischen System abhängig. Der R_f -Wert lässt also eine qualitative Auswertung des Chromatogramms zu.

2.2 Methoden zur Charakterisierung der Lipidmembran

2.2.1 Kontaktwinkelmessung

Die Bestimmung des Kontaktwinkels stellt nicht nur wegen ihrer einfachen experimentellen Durchführbarkeit eine sehr wichtige Methode dar. Sie liefert wichtige Informationen über die chemische und morphologische Beschaffenheit von makroskopischen Festkörperoberflächen und darauf befindlicher Molekülschichten. Sie eignet sich für die Verfolgung der Abscheidung/Assemblierung von Molekülen auf Festkörperoberflächen und der qualitativen/quantitativen Bestimmung der resultierenden Oberflächeneigenschaften.

Da die Oberflächenenergie und die Morphologie von SAMs für die Präparation von fluiden Lipiddoppelschichten von entscheidender Bedeutung sind, erlaubt die Bestimmung des Kontaktwinkels eine Abschätzung über den erwartenden Verlauf der Funktionalisierung (z.B. mittels Vesikelfusion) und späteren Oberflächeneigenschaften der Membran. Empirisch findet man, dass der Aufbau von Lipiddoppelschichten aus SAMs durch Vesikelfusion vom Kontaktwinkel abhängt. Auf hydrophoben Oberflächen (Kontaktwinkel $>80^\circ$) und auf hydrophilen Oberflächen (Kontaktwinkel $\sim 0^\circ-15^\circ$) kann meist eine spontane Vesikelfusion beobachtet werden, während auf Oberflächen mit einem mittleren Kontaktwinkel von beispielsweise 50° oft eine verstärkte Vesikeladsorption auftritt^[42].

Bei der Durchführung der Messung bestimmt man im Drei-Phasen-Kontaktpunkt (Substrat-Flüssigkeit-Luft) den Winkel zwischen der Oberfläche und einem aufgebrachtten Flüssigkeitstropfen, hier Wasser (siehe Abb. 5). Befinden sich diese drei Phasen im thermodynamischen Gleichgewicht^[43, 44], so sollte auch das chemische Potential gleich sein. Somit lässt sich die Young-Gleichung anwenden:

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cos \Theta$$

mit γ_s – Oberflächenspannung (fest); γ_{sl} – Grenzflächenspannung (fest/flüssig);
 γ_l – Oberflächenspannung (flüssig), Θ - Gleichgewichtskontaktwinkel, er wird experimentell bestimmt.

Der Kontaktwinkel Θ ist ein Maß für den hydrophilen bzw. hydrophoben Charakter einer Oberfläche (siehe Abb. 5)



Abbildung 5: Kontaktwinkel von Wasser auf einer sehr hydrophoben (links), gut benetzenden (Mitte) und einer sehr hydrophilen Oberfläche (rechts)

Auf einer sehr hydrophoben Oberfläche wird ein Wassertropfen komplett gespreitet (vollständige Benetzung) und ergibt einen Kontaktwinkel von $\Theta = 0^\circ$. Dies kommt ausschließlich bei Materialien vor, die eine sehr hohe Affinität zu Wasser aufweisen. Auf vielen hydrophilen Oberflächen nimmt der Wassertropfen einen Kontaktwinkel zwischen 10° und 30° an. Auf sehr hydrophoben Oberflächen, die stark wasserabweisend sind, lassen sich große Kontaktwinkel von $\Theta > 90^\circ$ beobachten. Ein Kontaktwinkel von $\Theta = 180^\circ$ würde eine absolute Unbenetzbarkeit bedeuten.

Zur Messung des Kontaktwinkels sollte der Tropfen so klein wie möglich gehalten werden, um den Einfluss der Schwerkraft auf die Tropfenform zu minimieren. Zudem sollte der Kontaktwinkel anhand eines initial aufgenommenen Fotos bestimmt werden um Verdunstungseffekte vernachlässigen zu können. Es gibt mehrere Methoden zur Bestimmung des Kontaktwinkels, dennoch wurde bei dieser Arbeit lediglich mit der statischen „Sessile-Drop“-Methode gearbeitet.

Hierzu wurde ein Tropfen aus $3 \mu\text{l}$ entgastem Milli-Q Wasser mit $10 \mu\text{l/s}$ aus einer Kanüle gedrückt und durch Kontakt mit der Oberfläche auf diese gesetzt. Die verwendete Software fittet automatisch nach manuellem Ermitteln der Grenzfläche zwischen Goldoberfläche und Tropfen und bestimmt dann den Kontaktwinkel.

Alle Messungen wurden an einem Krüss G1 (Goniometertyp) bei Raumtemperatur durchgeführt. Um experimentelle Fehler zu minimieren wurde an fünf verschiedenen Stellen des Substrates gemessen.

2.2.2 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie (EIS)

Die Impedanzspektroskopie (EIS) ist ein etabliertes Verfahren zur zerstörungsfreien und in-situ anwendbaren Charakterisierung elektrischer Eigenschaften zahlreicher Materialien. Anwendung findet die Impedanzspektroskopie in ganz unterschiedlichen Bereichen von Technik, Grundlagenforschung und Medizin. In den letzten Jahren fand sie verstärkten und mittlerweile weit verbreiteten Einsatz in der Biotechnologie. Die Untersuchung erfolgt dabei an der Grenzfläche von Elektroden, in meinem Falle an Goldfilmen. So findet in dieser Arbeit die Impedanzspektroskopie Anwendung in der Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von künstlichen verankerten Lipidmembransystemen^[1, 45].

Die Impedanzspektroskopie ist dabei ein wichtiges Hilfsmittel, um die verschiedenen Präparationsschritte verfolgen zu können, das heißt den durch self-assembly gebildeten Monolayer zu verifizieren und nach Vesikelfusion den Bilayer zu charakterisieren. Durch die Vesikelfusion sollte der Widerstand deutlich ansteigen, die Kapazität sollte sinken. Auch die absoluten Werte geben Auskunft über eine gelungene Präparation der Membran.

Die Impedanz ist der komplexe Widerstand eines Stromkreises, der sich aus Widerständen, Kondensatoren und Induktoren zusammensetzt. Die elektrische Impedanzspektroskopie beruht auf der Messung der Phase und Amplitude der Stromantwort, die eine Probe auf eine angelegte Wechselspannung liefert. Ist die Amplitude der Wechselspannung klein genug^[46], gilt:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi(\omega)} = |Z(\omega)| e^{i\varphi(\omega)}$$

mit $Z(\omega)$ – Komplexe elektrische Impedanz als Funktion der Frequenz; $U(\omega)$ – angelegte Spannung als Funktion der Frequenz; $I(\omega)$ – gemessener Strom als Funktion der Frequenz; ω - Kreisfrequenz gemäß $2\pi f$; U_0 – Spannungsamplitude; I_0 – Stromamplitude; i – komplexe Zahl $i^2 = -1$; t – Zeit; $\varphi(\omega)$ – Phasenverschiebung als Funktion der Frequenz; $|Z(\omega)|$ - Betrag der Impedanz

Die Umformung der komplexen Impedanz in die Kartesische Form liefert nach der Eulerschen Relation:

$$Z'' = |Z(\omega)| \cos \varphi(\omega)$$

mit $Z' = |Z(\omega)| \cos \varphi(\omega)$ als Realteil (Resistenz) der Impedanz und

$Z'' = |Z(\omega)| \sin \varphi(\omega)$ als Imaginärteil (Reaktanz) der Impedanz

Desweiteren gelten die folgenden Beziehung:

$$|Z(\omega)| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2}$$

$$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right)$$

Der Kehrwert der Impedanz ist die Admittanz Y , was einer komplexen Leitfähigkeit entspricht. Die Beziehungen zwischen dem Real- und Imaginärteil der Admittanz und Resistanz und Reaktanz sind in den folgenden Gleichung wiedergegeben:

$$\begin{aligned} Y &= Y' + iY'' = \frac{1}{Z} \\ &= \frac{1}{Z' + iZ''} = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} - \frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \\ Y' &= \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} \\ Y'' &= -\frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \end{aligned}$$

Beinhaltet der Stromkreis nur einen Widerstand, kommt es zu keiner Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom. Ein idealer Kondensator hingegen erzeugt eine Phasenverschiebung von -90° , denn für einen Kondensator im Wechselstromkreis gilt:

$Z(C) = -\frac{i}{\omega C}$. Das jeweilige Verhalten von Strom und Spannung ist in folgender Abbildung 6 gezeigt^[47]:

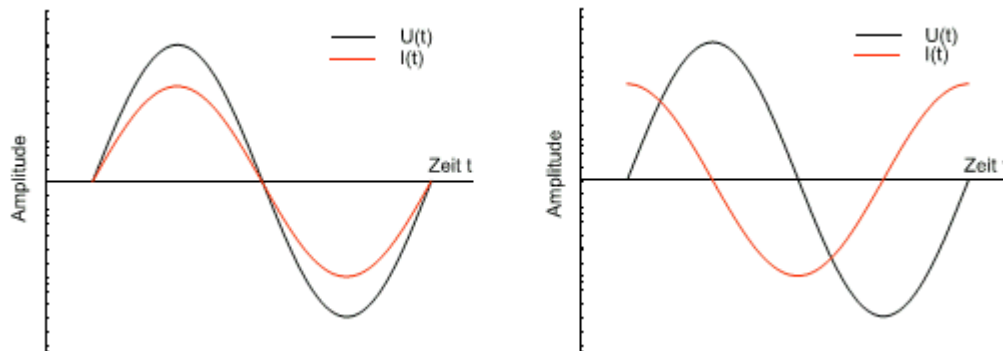


Abbildung 6: links: idealer Widerstand und rechts: idealer Kondensator

Durch Impedanzmessungen werden elektrochemische Analysen komplexer Systeme aus beliebigen Kombinationen von Widerständen (R) und Kondensatoren (C) möglich. Zur Interpretation der Impedanz-Daten wird ein zum vermessenden System passender Äquivalenzschaltkreis simuliert. Ein solcher Schaltkreis besteht aus einer Kombination von Widerständen und Kondensatoren und soll das zu untersuchende System möglichst einfach darstellen.

Für die t-BLMs ließ sich ein Modell entwickeln, das aus einem Widerstand besteht, der den Widerstand der Elektrolytlösung und der Drähte des Messgerätes symbolisiert sowie einem RC-Element, welches zur Charakterisierung des Mono- bzw. Bilayers dient und einem weiteren in Reihe geschaltetem Kondensator zur Interpretation der Oberfläche des Substrates, das heißt der Spacer-Region^[48].

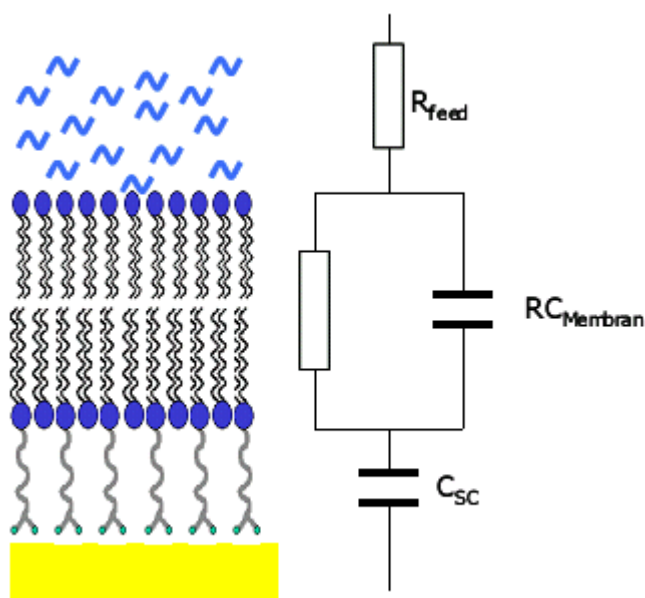


Abbildung 7: Äquivalenzschaltbild einer t-BLM

Zur exakteren Auswertung der Daten kann eine Veränderung des Schaltbildes notwendig werden, nämlich dann, wenn es zu größeren Defekten in der sonst homogenen Membran kommt oder um die Spacer-Region besser zu charakterisieren. In diesem Falle kann ein weiteres RC-Element in Reihe zu dem ersten RC-Element geschaltet werden^[48]:

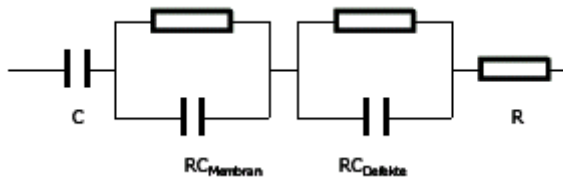


Abbildung 8: Äquivalenzschaltkreis mit zweitem RC-Element

Zur Darstellung der Messdaten wird meist der Bode-Plot und der Admittanz-Plot verwendet. Im Bode-Plot wird der Betrag der Impedanz $|Z(\omega)|$ logarithmisch als erste Ordinate und die Phasenverschiebung $\varphi(\omega)$ linear als zweite Ordinate gegen die logarithmisch aufgetragene Frequenz abgebildet:

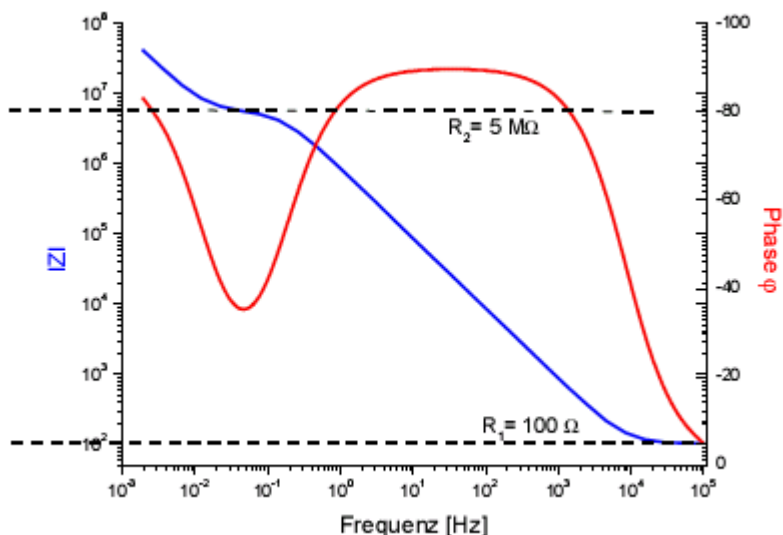


Abbildung 9: Darstellung von Impedanzdaten eines Bilayers im Bode-Plot

Bei einer Steigung des Betrages der Impedanz von null kann an der linken y-Achse ein Widerstand abgelesen werden, eine Steigung von -1 im Bode-Plot zeigt also einen idealen Kondensator. Allerdings bei dem oben gezeigten Lipidbilayer liegt der erste Widerstand im Frequenzbereich zwischen 10^4 und 10^5 Hz und hat einen Wert in 100Ω . Der zweite

Widerstand scheint bei etwa 0,05 Hz und hat einen Wert von 5 M Ω . Der erste Widerstand reflektiert die Elektrolytlösung und der zweite zeigt den Widerstand des RC-Element der Membran.

Im Admittanz-Plot trägt man den Imaginärteil gegen den Realteil der Admittanz auf:

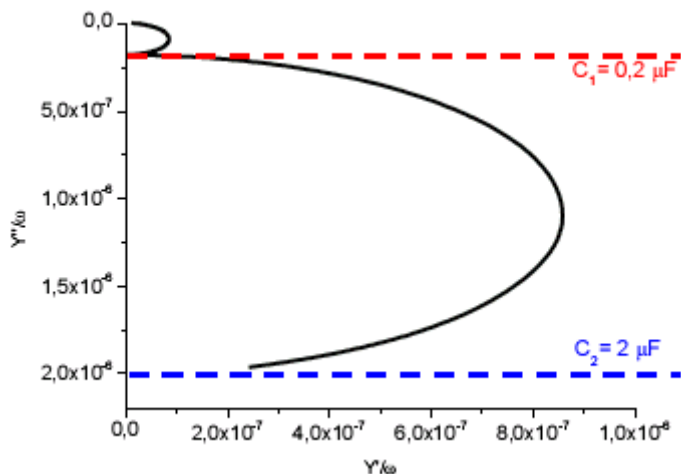


Abbildung 10: Admittanz-Plot eines Lipidbilayers

Anhand des Admittanz-Plots erfolgt eine quantitative Bestimmung der Kapazitäten. Der erste Kondensator lässt sich an der extrapolierten Schnittstelle des ersten Halbkreises des Graphen mit der y-Achse ablesen und liegt in diesem Fall bei 0,2 μF . Dieser Kondensator repräsentiert den Kondensator des RC-Elements der Membran. Der zweite Kondensator wird durch Extrapolieren des zweiten Halbkreises abgelesen und hat einen Wert von 2 μF dies stellt den Kondensator der Spacer-Region dar^[48].

Nach der Vesikelfusion auf einen Monolayer steigt der Widerstand des RC-Elements, aufgrund der dichter werdenden Schicht bei der Bildung des Bilayers. Grund hierfür ist die geringere Permeabilität der Lipiddoppelschicht. Die Werte für den Kondensator der Spacer-Region und der Widerstand der Elektrolytlösung ändern sich nicht. Gleichzeitig sinkt die Kapazität, da sie ein Maß für den inversen Abstand des Elektrolyten von der Elektrodenoberfläche ist. Dieses Verhalten ist in Abbildung 11 abgebildet:

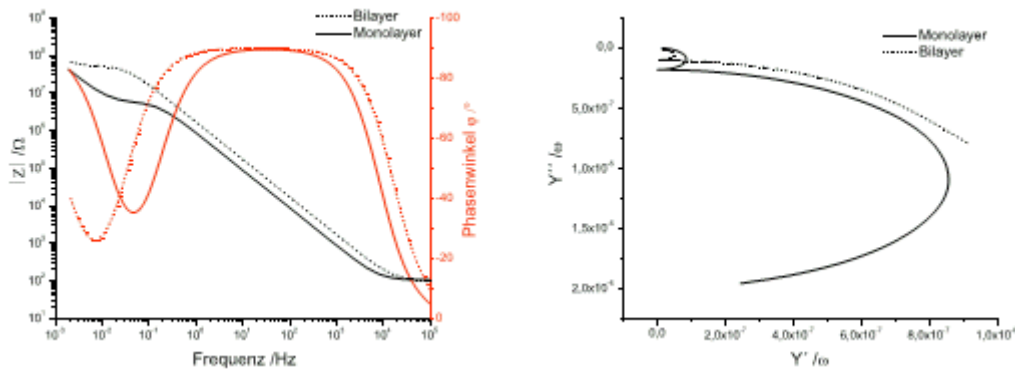


Abbildung 11: Übergang vom Mono- zum Bilayer im Bode- und Admittanz-Plot

Wie lassen sich nun die Kurvenverläufe im Bode-Plot genau erklären?

Der Widerstand der Elektrolytlösung leuchtet wegen der endlichen Leitfähigkeit der Elektrolytlösung sofort ein. Doch auch der Monolayer hat neben seiner Kapazität einen endlichen Ohmschen Widerstand, da bei angelegter Spannung immer auch Ladungen durch diese Schicht fließen. Das Kurvenverhalten im Bode-Plot kann somit folgendermaßen erklärt werden: Bei hohen Frequenzen ist der kapazitive Widerstand klein, weswegen der Strom im RC-Glied über den Kondensator fließt und R_2 keine Rolle spielt. Der Gesamtwiderstand ist dann durch R_1 gegeben. Gleichzeitig gibt es wegen des fehlenden kapazitiven Einflusses keine Phasenverschiebung. Erniedrigt man die Frequenz, so lädt sich der Kondensator auf und die Kapazität macht sich bemerkbar: Die Impedanz des Systems beginnt zu steigen, die Phasenverschiebung steigt auf 90° . In diesem Bereich kann R_1 meist vernachlässigt werden. R_2 dagegen beginnt sich erst bemerkbar zu machen, sobald der kapazitive Widerstand in die Größenordnung von R_2 kommt. Für $R_2 < R_C$ fließt der Strom über R_2 , daher steigt die Impedanz nicht weiter an, sondern geht in Sättigung. Die Phasenverschiebung geht in diesem Bereich wieder zurück^[49].

Alle Impedanzdaten dieser Arbeit wurden mit einem Potentiostat (Autolab PGSTAT 30, EcoChemie, Utrecht, Niederlande) mit Frequenzgenerator aufgezeichnet. Dieser erzeugt eine Wechselfrequenz von 10 mV in einem Frequenzbereich von 100 kHz bis 2 mHz, logarithmisch über 30 Frequenzen verteilt. Darüber hinaus wird ein Computer (Software: FRA, Wasautolabkonverter, ZView) verwendet um den Potentiostaten zu regeln und die Daten weiter zu verarbeiten. In der Messzelle, ist das Substrat direkt mit der Arbeitselektrode verbunden und steht über die Elektrolytlösung in Kontakt zur Gegen- und Referenzelektrode.

Bei den Messungen wird die Messzelle in einen Faraday-Käfig gebracht, um elektrische Hintergrundgeräusche zu minimieren.

Die Messdaten werden zur Auswertung in die Software ZView 3.0 exportiert, um sie mit dem entsprechenden Äquivalenz-Schaltkreise fitten zu können. Die Werte für die Widerstände und Kondensatoren werden auf die Fläche normiert. Bei der verwendeten Messzelle beträgt diese Fläche $0,28 \text{ cm}^2$.

3. Synthesen

Ziel der organischen Synthesen waren neue Lipide, mit modifizierten Anker- und Spacerregionen, die zum Aufbau von stabilen t-BLMs dienen. Dabei wurden Lipide mit unterschiedlichen Spacerkettenlängen sowie mit verschiedene Ankergruppen hergestellt. Die Schwierigkeit bestand darin, die Produkte äußerst rein zu synthetisieren, da geringste Verunreinigungen die Aggregation zum Membranaufbau stören können. Deshalb wurde jedes Intermediat per Säulenchromatographie aufgereinigt, sowie ein Massenspektrum und wenn möglich ein NMR-Protonenspektrum erstellt. Desweiteren wurde stets unter Argon-Schutzgasatmosphäre gearbeitet. Die Bezeichnung der Lipide entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur, sondern nach der in unserer Arbeitsgruppe gebräuchlichen oder der von mir gegebene Bezeichnung.

Alle Chemikalien wurden bei Fluka, Acros oder Sigma-Aldrich gekauft und ohne weitere Aufreinigung zur Synthese verwendet.

3.1 Synthese des Precursor-Moleküls Diphytanylglycerol (DPG)

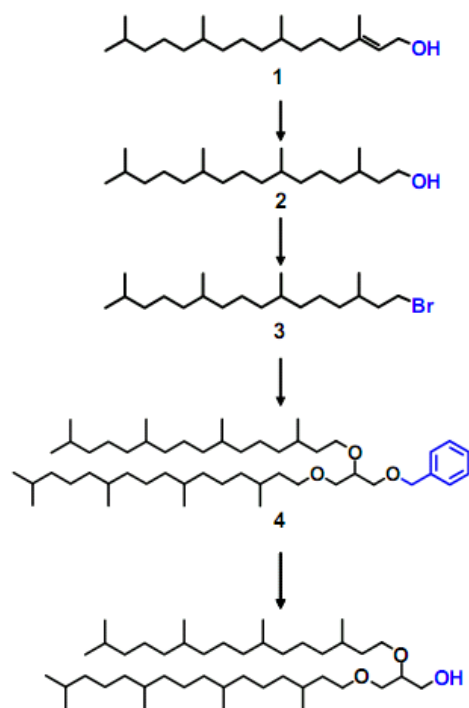
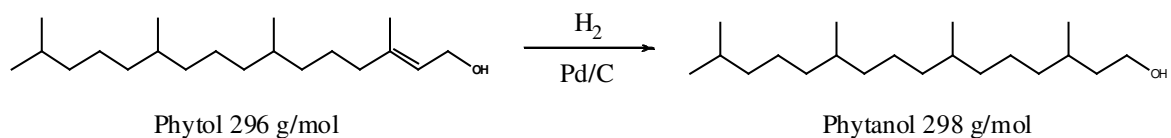


Abbildung 12: Syntheschema für Diphytanylglycerol (DPG)

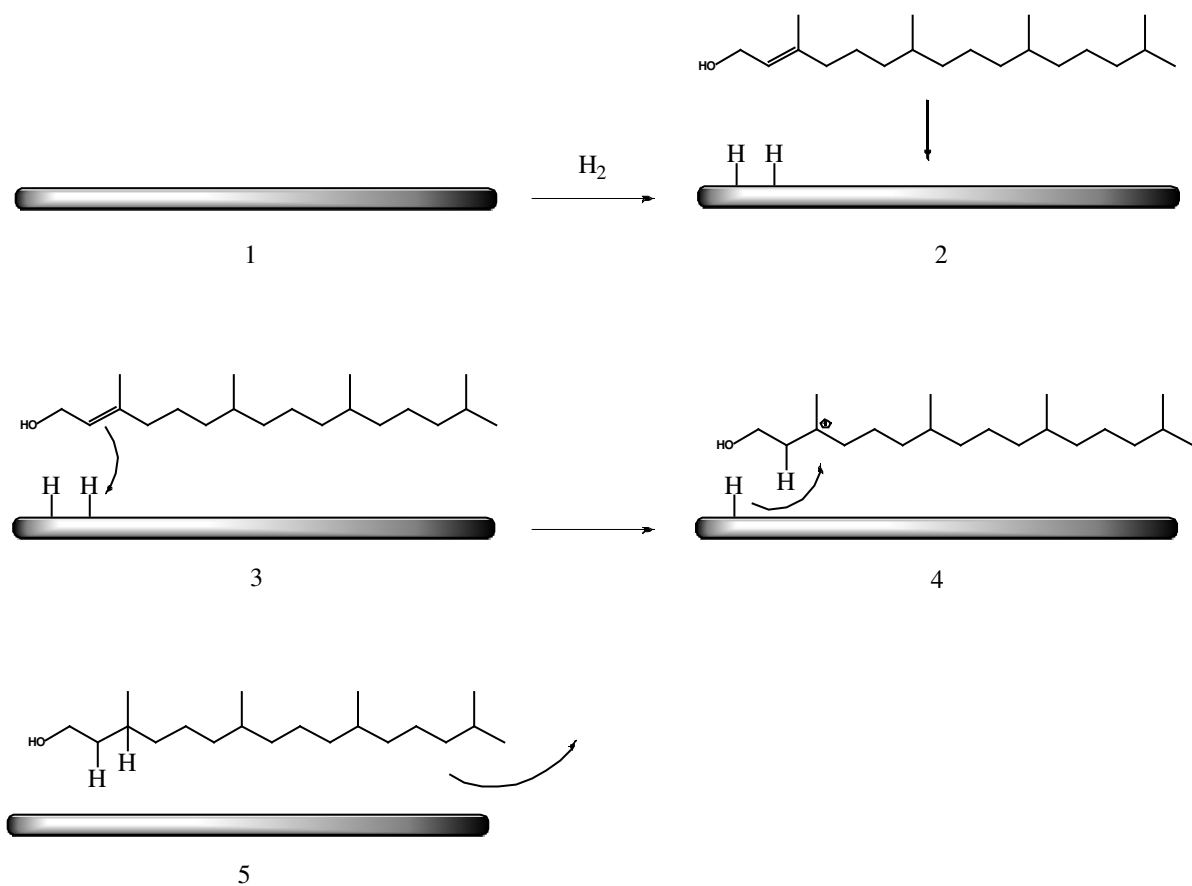
Als Grundbaustein aller synthetisierten Lipide diente das Diphytanylglycerol. Es wurde in einer 4-stufigen Synthese ausgehend von Phytol hergestellt. In einem ersten Schritt erfolgte die Hydrierung von Phytol zu Phytanol. Dieses wurde in einer Appelreaktion zum Phytanbromid umgewandelt. Phytanbromid wurde im Verhältnis 2:1 mit Benzylglycerol umgesetzt worauf das geschützte Diphytanylglycerol entstand. Nach der Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe erhielt man den Lipid-Precursor Diphytanylglycerol.

3.1.1 Hydrierung von Phytol

Reaktionsgleichung:



Mechanismus:



Bei der Hydrierung des Phytols an Palladium/Aktivkohle handelt es sich um eine heterogene katalytische Reaktion. In einem ersten Schritt adsorbiert ein Wasserstoffmolekül an die Oberfläche des katalytisch aktiven Palladiums, wobei die H-H-Bindung im H₂-Molekül gelockert wird. Auch ein Phytolmolekül diffundiert an die Metalloberfläche heran und wird an der Stelle der Doppelbindung adsorbiert. Die elektronenreiche π -Bindung greift ein positiviertes Wasserstoffatom an, wonach dieses auf das Molekül übertragen wird. Das entstehende Carbeniumion wird nun nucleophil von einem verbleibenden Hydrid-Ion der Katalysatoroberfläche angegriffen. Es wird eine neue Bindung zum Molekül geknüpft und die Hydrierung ist abgeschlossen. Das Phytanol-Molekül diffundiert von der Oberfläche weg und der Zyklus kann erneut beginnen.

Da die beiden adsorbierten Wasserstoff-Atome von einer festen Oberfläche addiert werden, erfolgen die Angriffe jeweils auf der gleichen Seite des Moleküls, so dass es sich hierbei um eine Addition mit syn-Stereochemie handelt.

Ansatz:

- Phytol, 30 g, 0,1 mol
- Palladium/Aktivkohle, 500 mg, katalytische Menge
- Methanol, 50 ml

Durchführung:

Phytol wurde in Methanol gelöst und Palladium/Aktivkohle hinzugefügt. Das Gemisch wurde in einen Autoklaven überführt und 1 Woche bei einem Druck von 80 bar Wasserstoff und 80 °C gerührt. Die Reaktion wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Sobald das Triplett bei 5,3 ppm verschwunden war, war die Reaktion vollständig und konnte beendet werden. Das Produkt wurde durch einen G4-Glasfilter von Pd/C befreit und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Es verblieb ein farbloses Öl mit charakteristischem, blumigen Duft.

Ausbeute: 25,2 g, 0,085 mol, 85 % der Theorie

Analytik:

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,7 (m, $2\text{H}_{\text{methylene}}$), 3,3 (s, $1\text{H}_{\text{hydroxyl}}$), 1,6 (m, $4\text{H}_{\text{tertiär}}$), 1,4 – 1,2 (m, $20\text{H}_{\text{methylene}}$), 0,9 ($15\text{H}_{\text{methylene}}$)

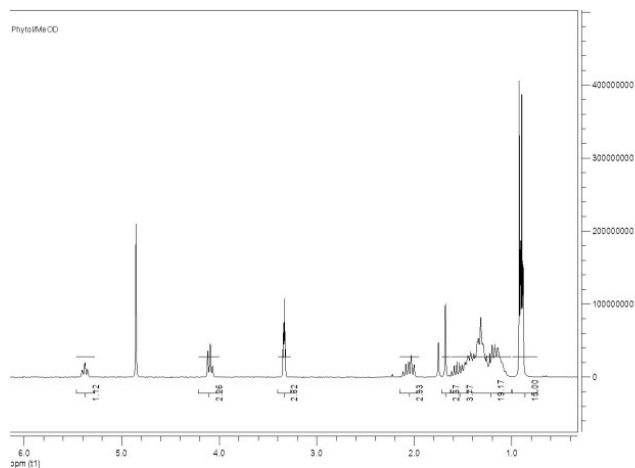


Abbildung 13: $^1\text{H-NMR}$ von Phytol in MeOD

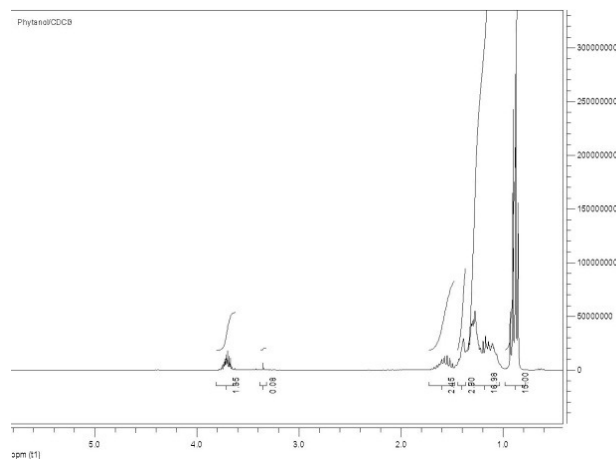
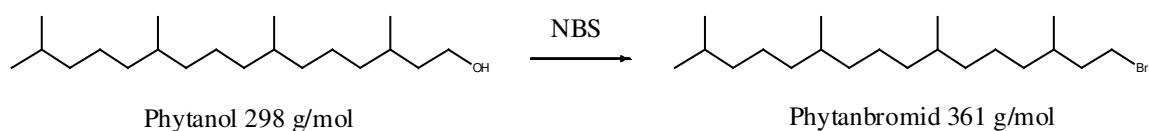


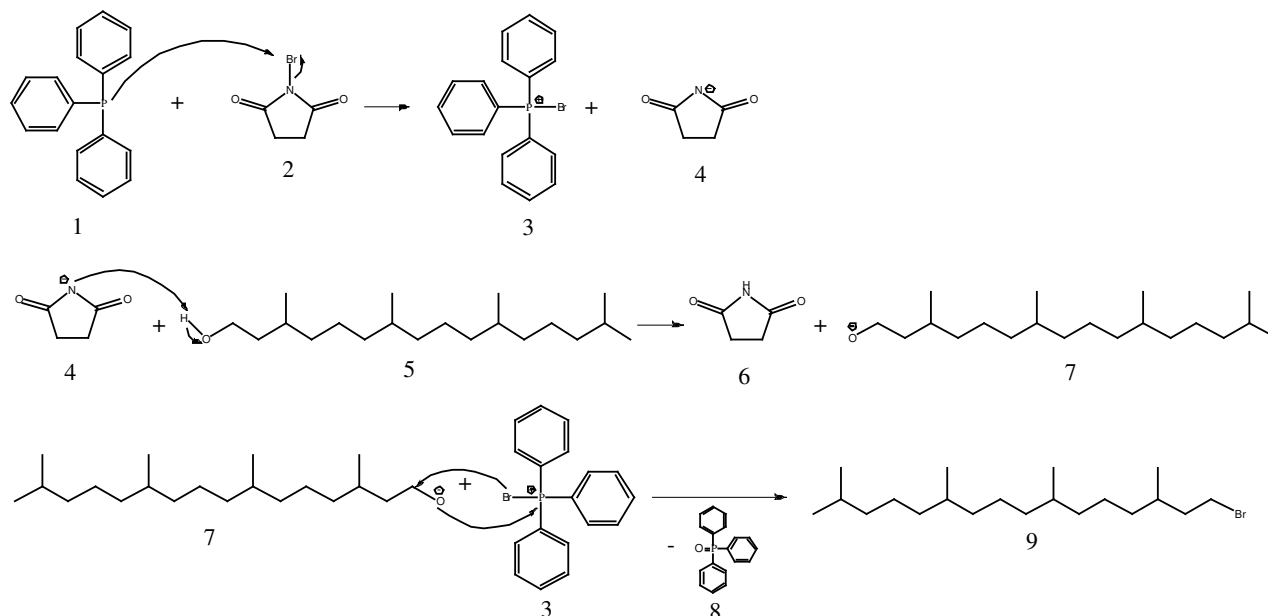
Abbildung 14: $^1\text{H-NMR}$ von Phytanol in CDCl_3

3.1.2 Herstellung des Phytanbromids (*Appel-Reaktion*)

Reaktionsgleichung:



Reaktionsmechanismus:



Die Appelreaktion^[50] ist eine Reaktion zur Überführung von Hydroxide in Bromide in Anwesenheit von Phosphenen. Die Triebkraft der Reaktion ergibt sich aus der Ausbildung einer sehr starken P=O-Doppelnbindung im letzten Schritt.

Bei diesem Mechanismus reagiert zunächst das Triphenylphosphin **1** mit dem NBS **2** (*N*-Bromsuccinimid) unter der Bildung der Ionen **3** und **4**. Das Anion **4** fungiert als starke Base und greift nun den Wasserstoff der Hydroxylgruppe des Phytanols an und es bildet sich **6** sowie das Phytanol-Anion **7**. Dieses greift nucleophil am positiven Phosphor von **3** an und es bildet sich unter Abspaltung des Triphenylphosphinoxids **8** das Produkt Phytanbromid **9**.

Ansatz:

- Phytanol, 25 g, 0,083 mol
- Triphenylphosphin, 25,25 g, 0,097 mol
- NBS, 15,8 g, 0,09 mol
- Dichlormethan, 250 ml

Durchführung:

Phytanol und Triphenylphosphin wurden in einem 2-l Dreihalskolben mit mechanischem KPG-Rührer in Dichlormethan gelöst. Die Mischung wurde mit Hilfe einer Eis/Kochsalz-Lösung auf 0 °C abgekühlt bevor portionsweise das NBS zugegeben wurde. Hierbei sollte die Temperatur 5 °C nicht übersteigen. Es wurde über Nacht bei RT gerührt.

Im Anschluss daran wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der verbleibende Feststoff mehrere Male mit Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingengt. Es verblieb eine farblose Flüssigkeit.

Ausbeute: 18,88 g, 0,052 mol, 63 % der Theorie

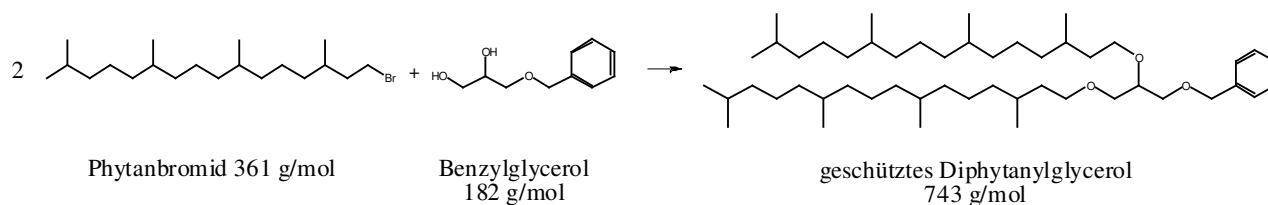
Analytik:

FD-MS: $m/z = 361 [M^+]$, $720 [720,5 2M^+]$, $1083,5 [3M^+]$, $1440,2 [4M^+]$

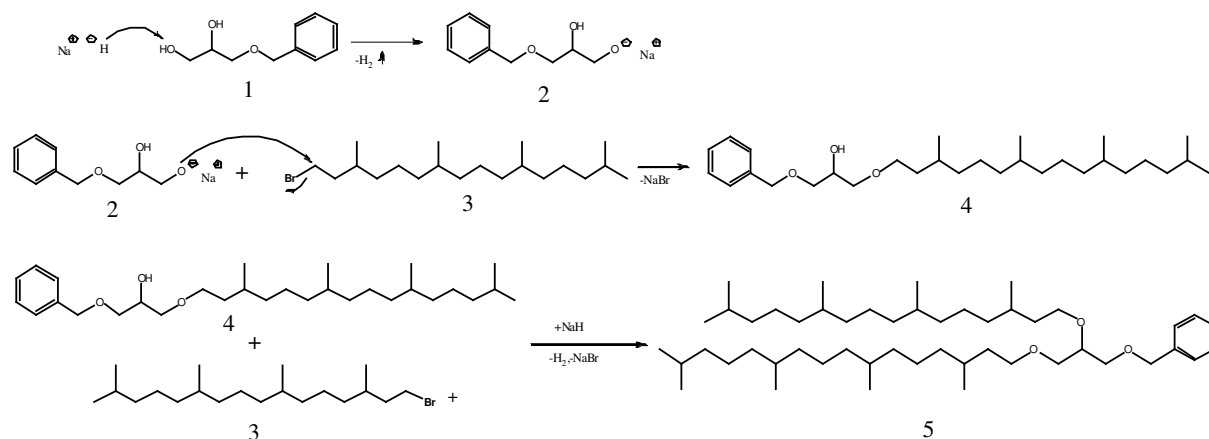
TLC: PE, $R_f = 0,89$

3.1.3 Synthese des geschützten Diphytanylglycerols

Reaktionsgleichung:



Reaktionsmechanismus:



Bei der Williamson^[51]-Ethersynthese handelt es sich um eine Umsetzung von Alkoholen mit einem Alkylhalogenid zum jeweiligen Ether.

In diesem Fall wird das Benzylglycerol **1** an der Hydroxylgruppe deprotoniert. Dazu verwendet man eine starke Base, hier NaH . Dabei entsteht Wasserstoffgas und das Alkoxid **2**. Dieses vermag das durch das Brom positiviertete C_1 -Kohlenstoffatom des Phytanbromids **3** nucleophil anzugreifen. Unter Abspaltung von Natriumbromid bildet sich das gewünschte Zwischenprodukt **4**. Ein erneuter Zyklus an der verbleibenden Hydroxylgruppe führt zum geschützten Diphytanylglycerol **5**.

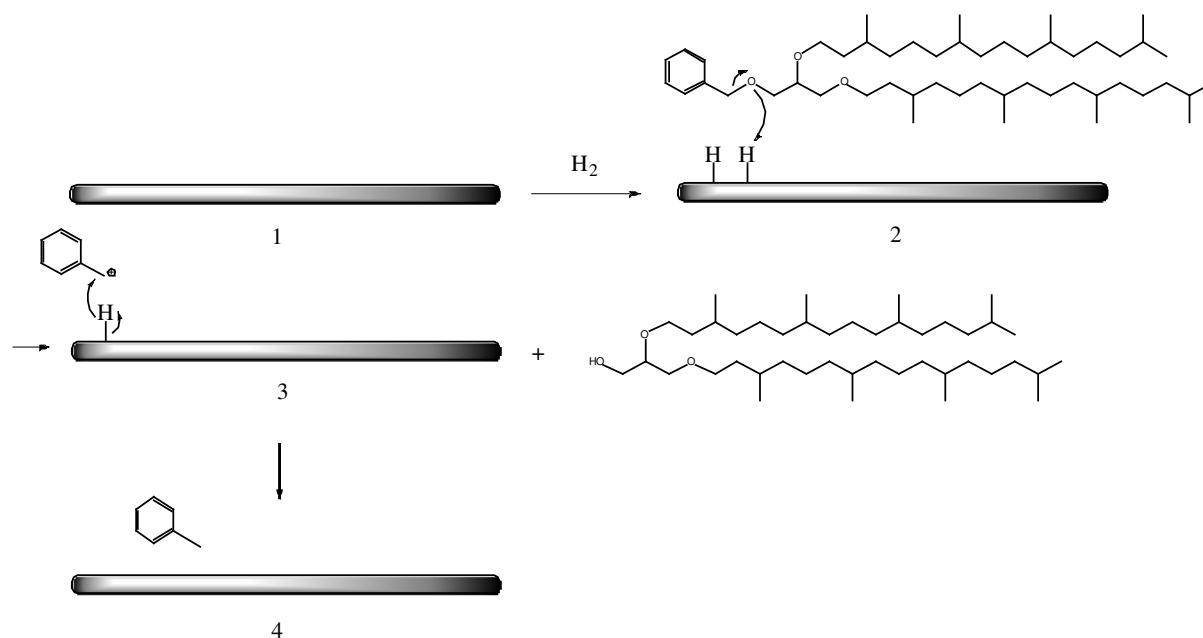
Ansatz:

- NaH , 1,63 g, 0,068 mol, im Überschuss
- Benzylglycerol, 3,36 g, 0,019 mol, 1 eq
- Phytanbromid, 20 g, 0,055 mol, 2,8 eq
- trockenes THF

Durchführung:

NaH wurde in einem 500 ml 3-Halsrundkolben mit mechanischem KPG-Rührer vorgelegt. Es wurden 200 ml THF zugegeben und die entstandene Suspension heftig gerührt. Durch wurde durch ein Septum mittels einer Spritze langsam das Benzylglycerol zugetropft. Die Lösung begann aufgrund der Wasserstoffentwicklung zu sprudeln. Nach einiger Zeit wurde die Masse

Mechanismus:



Hierbei handelt es sich um eine hydrogenolytische Schutzgruppenentfernung mit Wasserstoff an Palladium/Aktivkohle. In einem ersten Schritt adsorbiert der Wasserstoff an das Palladium was die Bindung im H-H-Molekül schwächt. Der elektronenreiche Sauerstoff der Schutzgruppe greift nucleophile an dem positiveren Wasserstoffatom an und dieses wird zur Bildung eine Hydroxylgruppe am DPG verwendet. Zurück bleibt ein Benzyl-Carbeniumion, auf welches das verbleibende Hydridion übertragen wird.

Ansatz:

- geschütztes Diphytanylglycerol, 9,5 g, 0,013 mol
- Pd/C, 500 mg
- Methanol/THF 3:1

Durchführung:

Diphytanylglycerol wurde in Methanol/THF gelöst. Über ein Septum wurde mittels einer Kanüle Wasserstoff aus einem Ballon in die Lösung eingeleitet und anschließend über Nacht gerührt. Im Anschluss daran wurde mit einem G4-Glasfilter vom Pd/C filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 8,4 g, 0,013 mol, 100 % der Theorie

Analytik:

FD-MS: $m/z = 653 [M^+]$, 1306,3 $[2M^+]$, 1959,7 $[3M^+]$, 2613,2 $[4M^+]$, 3272,2 $[5M^+]$

TLC: PE/THF (3/1), $R_f = 0,47$

3.2 Synthese der Lipide

Ausgehend von Diphytanylglycerol wurden nun Lipide hergestellt, die sowohl in ihren Ankereinheiten als auch im Aufbau und in der Länge ihrer Spacerketten variieren. In Abbildung 15 ist ein Übersichtsschema zur Synthese der Thiol- und Disulfidlipide gezeigt:

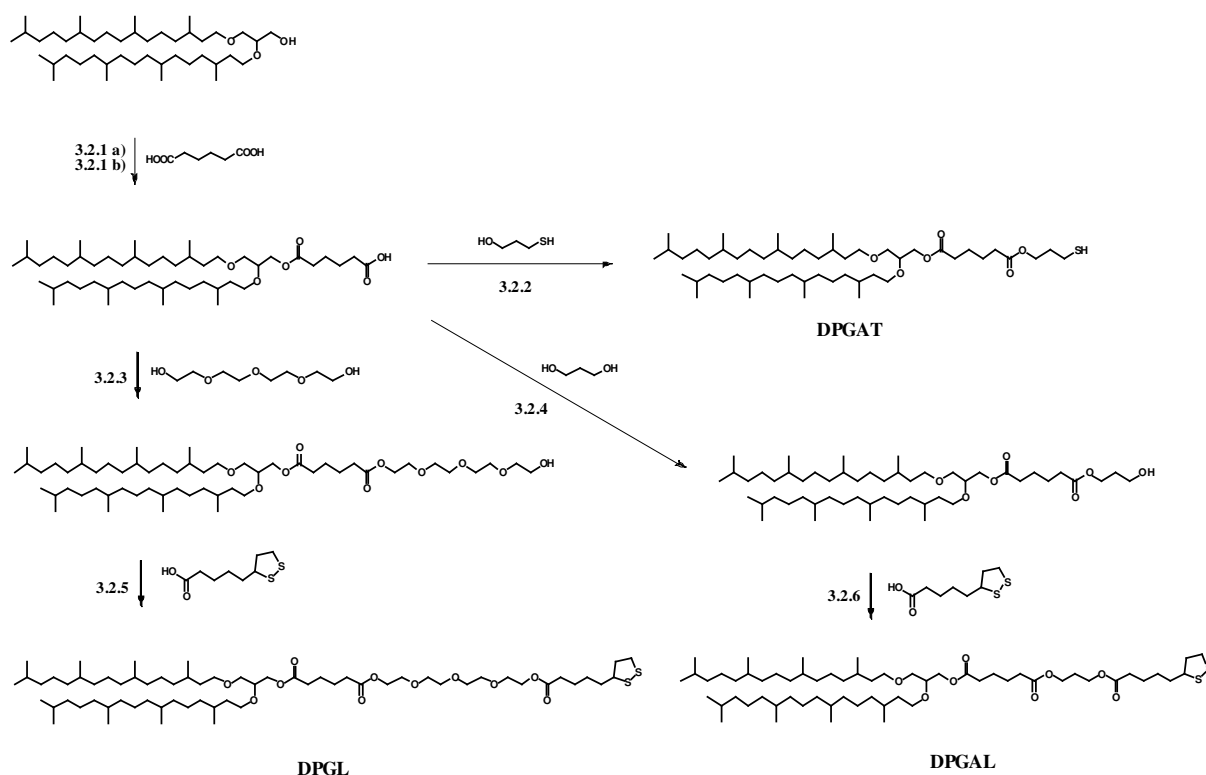


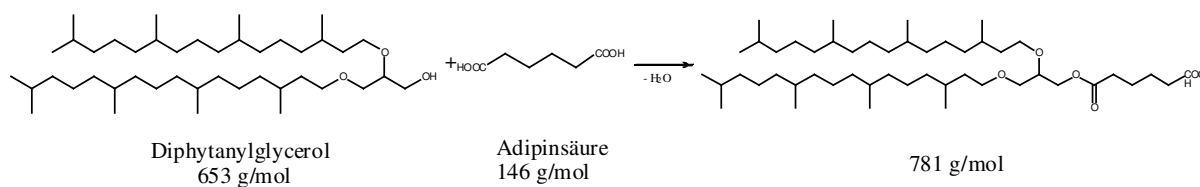
Abbildung 15: Darstellungsschema der Lipide ausgehend von Diphytanylglycerol

3.2.1 Veresterung des DPGs mit Adipinsäure

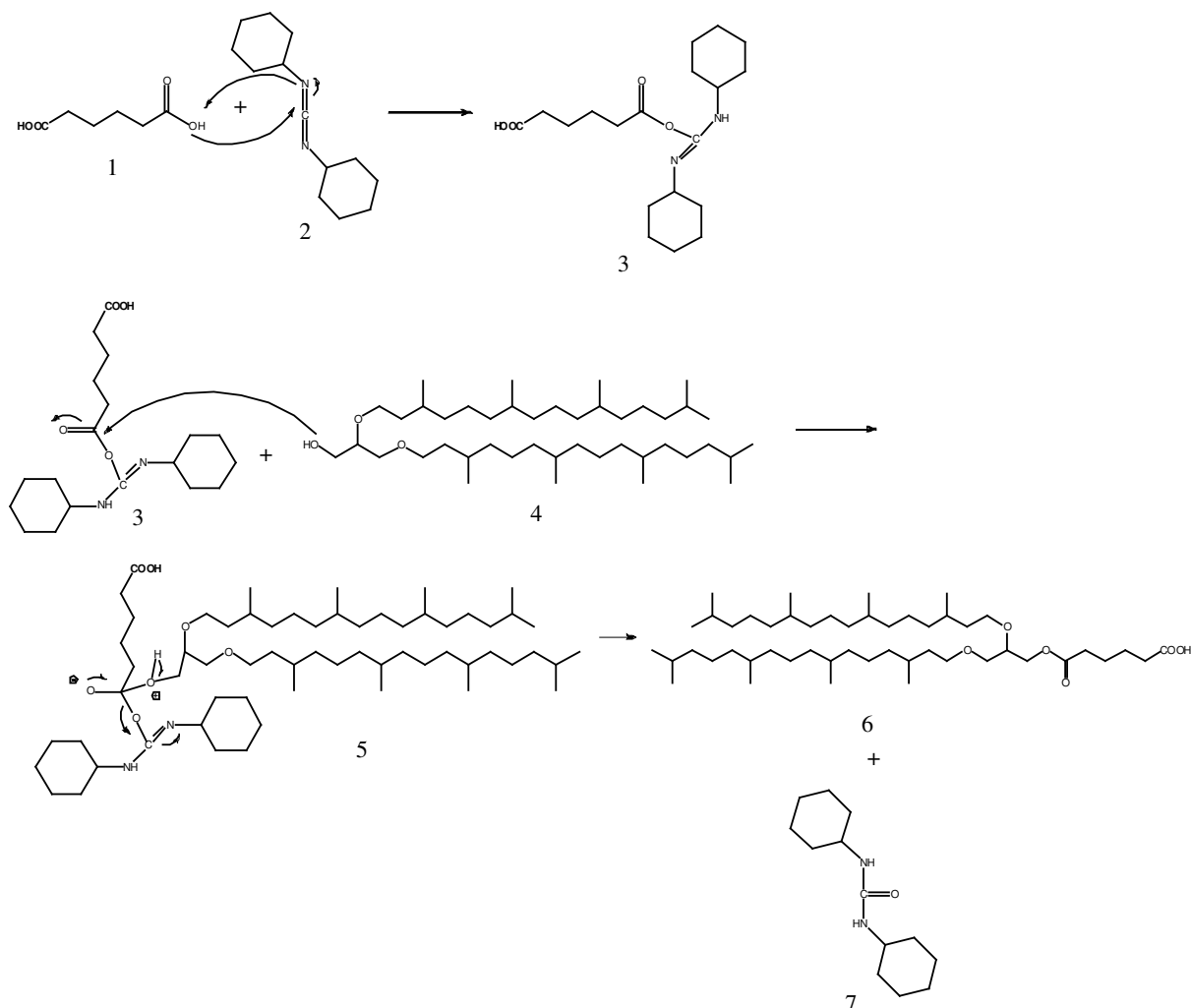
Grundlegend für alle Lipide war die Veresterung des DPGs mit der Adipinsäure. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Reaktionstypen ausprobiert. Zum einen die Veresterung mit DCC (Variante a) und zum anderen die Yamaguchi-Kopplung (Variante b) mit 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid.

3.2.1 a) Veresterung des Diphytanylglycerols mit Adipinsäure^[52, 53] mittels DCC

Reaktionsgleichung:



Mechanismus:



In einem ersten Schritt greift das Sauerstoffatom der Carboxylgruppe der Adipinsäure **1** nucleophil am zentralen Kohlenstoffatom der Dicyclohexylcarbodiimids (DCC) **2** an und es bildet sich das Zwischenprodukt **3**. Dieses besitzt ein positiviertes C-Atom in der Carboxylgruppe, welches vom Sauerstoffatom des Alkohols **4** angegriffen wird. Das entstehende Intermediat **4** zerfällt in das Produkt **6** und in das hydratisierte DCC **7**. Die Funktion des DCCs bei dieser Reaktion besteht zum einen in der Esteraktivierung der Säurecarboxylgruppe und zum anderen zum Abfangen des bei dieser Kondensationsreaktion entstehenden Wassers.

Ansatz:

- Diphytanylglycerol, 1 eq
- Adipinsäure, 5 eq

- Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 5eq
- *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP), 10 mol%
- trockenes Dichlormethan

Durchführung:

In einem 250 ml Einhalskolben wurde die Adipinsäure in Dichlormethan gelöst und das DCC hinzugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei RT gelöst bevor langsam das in Dichlormethan gelöste DPG zugetropft wurde. Nach weiteren 30 min wurde schließlich DMAP hinzugefügt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan verdünnt und mit einer gesättigten Na₂CO₃-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am RV entfernt.

Ausbeute: Dieses Produkt wurde mehrfach synthetisiert und die Ausbeuten lagen zwischen 60 – 70 % der Theorie.

Analytik:

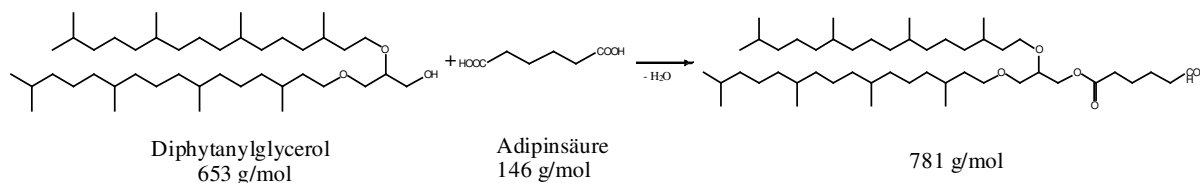
FD-MS: $m/z = 781,6 [M^+]$

TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,78$

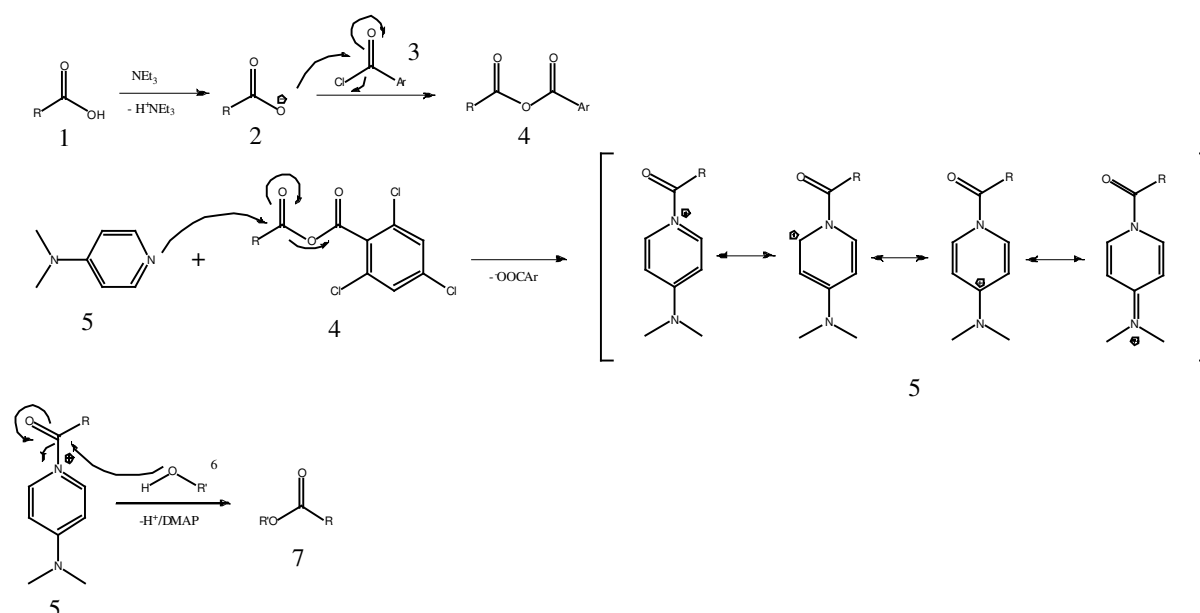
3.2.1 b) Veresterung des Diphytanylglycerols mit der Yamaguchi-Kopplung^[54]:

Eine alternative Methode zur Veresterung von Alkoholen mit Carbonsäuren stellt die Yamaguchi-Kopplung dar. Sie erlaubt eine Veresterung von hoch-funktionalisierten Estern. Nach der Bildung eines gemischten Anhydrids zwischen dem Yamaguchi-Reagenz (2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid) und der Carbonsäure, werden flüchtige Reaktionsbestandteile entfernt und die Reaktion des Anhydrids mit einem Alkohol in Gegenwart einer stöchiometrischen Menge DMAP generiert den erwünschten Ester.

Reaktionsgleichung:



Allgemeiner Mechanismus der Yamaguchi-Veresterung:



Durch Base Triethylamin wird die Carbonsäure **1** deprotoniert. Die Addition des Carboxylats **2** an das Säurechlorid **3** führt zum gemischten Anhydrid **4**. DMAP **5**, das ein „Acytransferreagenz“ ist, reagiert selektiv mit der sterisch ungehinderten Carboxylgruppe im Anhydrid **4**. Das neu gebildete Zwischenprodukt **5** ist weniger gehindert, die Acylgruppe ist polarisiert und DMAP ist eine gute Abgangsgruppe, was eine schnelle Reaktion mit dem Alkohol **6** ermöglicht.

In Reaktionen mit aliphatischen Carbonsäuren wird oftmals kein zusätzlicher Reaktionsschritt benötigt, und alle Reagenzien können simultan eingesetzt werden. Unterschiedliche Reaktivitäten führen sogar zur Ausbildung des symmetrischen, aliphatischen Anhydrides, wie in diesem vereinfachten Reaktionsverlauf beschrieben:

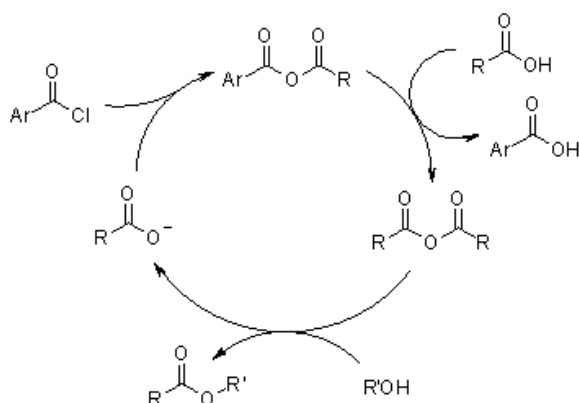


Abbildung 16: Yamaguchi-Mechanismus^[54]

Die Annahme ist, dass aliphatische Carboxylate bessere Nucleophile sind als aromatische Carboxylate und als Alkohole. Zusätzlich sind aliphatische Carboxylgruppen in den auftretenden Anhydriden elektrophiler gegenüber DMAP (nicht im Schema enthalten) und dem Alkohol^[55].

Ansatz:

- Diphythanylglycerol, 1 eq
- Adipinsäure, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 1 eq
- Triethylamin (wasserfrei), 2 eq
- DMAP, 5 mol%
- THF, trocken

Durchführung:

Die aliphatische Säure, das aromatische Säurechlorid und der Alkohol wurden in möglichst wenig THF gelöst. Langsam wird das Triethylamin zugetropft, gefolgt von der Zugabe von DMAP. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt und anschließend mit 100 ml einer 10 %igen Salzsäure gelöscht. Es wurde zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen 2 Mal mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: Diese Reaktion wurde mehrmals durchgeführt und jedes Mal eine Ausbeute von ca. 95 % der Theorie erzielt.

Analytik:

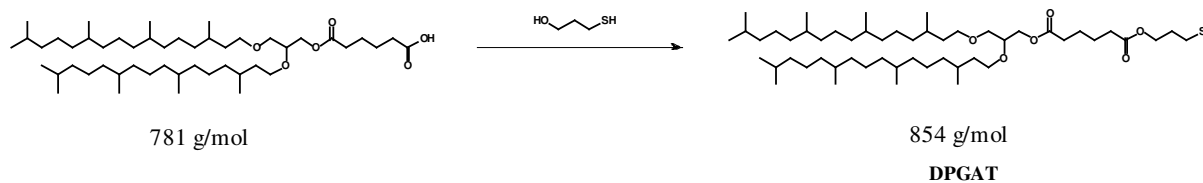
FD-MS: $m/z = 782,1 [M^+]$

TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,78$

Aufgrund der sehr guten Ausbeuten mit der Yamaguchi-Reaktion und der effektiven Reinigungsschritte wurden alle folgenden Estersynthesen ausschließlich mit dieser Variante vorgenommen.

3.2.2 Synthese von DPGAT

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

- Diphytanylglyceroladipinsäure, 1 g, 1,28 mmol, 1 eq
- 3-Mercapto-1-ol, 120 mg, 1,28 mmol, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 322 mg, 1,28 mmol, 1 eq
- Triethylamin, 260 mg, 2,56 mmol, 2 eq
- DMAP, 200 mg, 5 mol%
- THF, trocken, 100 ml

Ausbeute: 1 g, 1,2 mmol, 92 % der Theorie

Analytik:

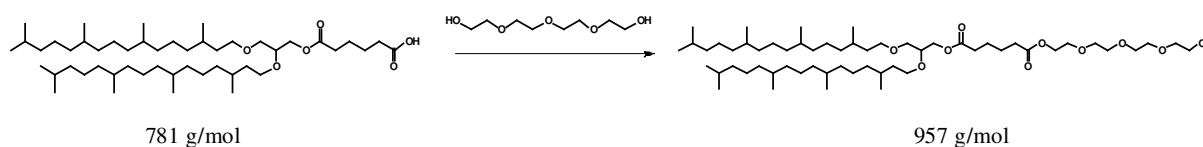
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4,2 (m, 4 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 3,5 (m, 6 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 2,5 (t, 2 $\text{H}_{\text{methylen-SH}}$), 2,2 (t, 4 $\text{H}_{\text{methylen-COO}}$), 1,9 (qui, 2 $\text{H}_{\text{methylen-CH}_2\text{-SH}}$), 1,5 (m, 12 $\text{H}_{\text{tertKette, methylen}}$), 1,4 (s, 1 H_{SH}), 1,3 (q, 4 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 1,1 (m, 36 $\text{H}_{\text{methylenKette}}$), 0,8 (t, 30 $\text{H}_{\text{methylKette}}$)

FD-MS: $m/z = 855,5$ [M^+], 1707,9 [2M^+]

TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,78$

3.2.3 Veresterung der Diphytanylglyceroladipinsäure mit Tetraethylglycol

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

- Diphytanylglyceroladipinsäure, 0,7 g, 0,9 mmol, 1 eq
- 3-Mercapto-1-ol, 175 mg, 0,9 mmol, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 220 mg, 0,9 mmol, 1 eq
- Triethylamin, 180 mg, 1,8 mmol, 2 eq
- DMAP, 150 mg, 5 mol%
- THF, trocken, 100 ml

Ausbeute: 0,8 g, 0,84 mmol, 93 % der Theorie

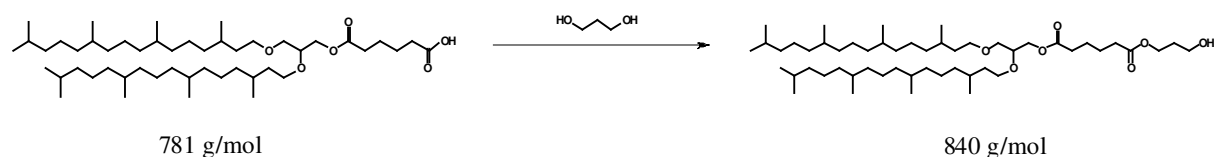
Analytik:

FD-MS: $m/z = 957,6$ [M^+], 1913, 9 [2M^+]

TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,64$

3.2.4 Veresterung der Diphytanylglyceroladipinsäure mit 1,3-Propandiol

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

- Diphytanylglyceroladipinsäure, 0,5g, 0,64 mmol, 1 eq
- 1,3-Propandiol, 50 mg, 0,64 mmol, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 156 mg, 0,64 mmol, 1 eq
- Triethylamin, 129 mg, 1,28 mmol, 2 eq
- DMAP, 100 mg, 5 mol%
- THF, trocken, 50 ml

Ausbeute: 480 mg, 0,58 mmol, 90 % der Theorie

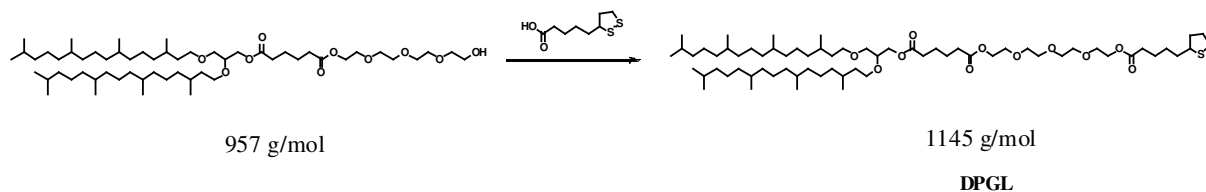
Analytik:

FD-MS: $m/z = 838,6$ [M^+]

TLC: PE/EtOac (1/1), $R_f = 0,70$

3.2.5 Synthese von DPGL

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

- DiphytanylglyceroladipinsäureTEG, 0,8g, 0,84 mmol, 1 eq
- Liponsäure, 170 mg, 0,84 mmol, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 210 mg, 0,84 mmol, 1 eq
- Triethylamin, 170 mg, 1,68 mmol, 2 eq
- DMAP, 100 mg, 5 mol%
- THF, trocken, 50 ml

Ausbeute: 300 mg, 0,026 mmol, 32 % der Theorie

Analytik:

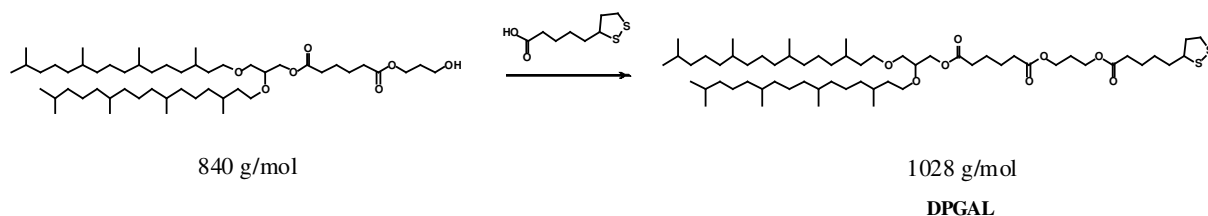
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4,2 (m, 6 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 3,5 (m, 6 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 2,4 (m, 3 $\text{H}_{\text{tert-S, methylen-CH-S}}$), 2,3 (t, 6 $\text{H}_{\text{methylen-COO}}$), 1,6 (m, 18 $\text{H}_{\text{tertKette, methylen-CH-S}}$), 1,4 (q, 4 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 1,1 (m, 38 $\text{H}_{\text{methylenKette}}$), 0,8 (t, 30 $\text{H}_{\text{methylKette}}$)

FD-MS: $m/z = 1144,4$ [M^+], 2291,3 [2M^+]

TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,82$

3.2.6 Synthese von DPGAL

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

- Edukt, 480 mg, 0,58 mmol, 1 eq
- Liponsäure, 120 mg, 0,58 mmol, 1 eq
- 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 150 mg, 0,58 mmol, 1 eq
- Triethylamin, 120 mg, 1,16 mmol, 2 eq
- DMAP, 100 mg, 5 mol%
- THF, trocken, 50 ml

Ausbeute: 150 mg, 0,15 mmol, 23 % der Theorie

Analytik:

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4,1 (t, 6 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 3,6 (d, 2 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 3,5 (t, 4 $\text{H}_{\text{methylen-O}}$), 2,5 (m, 3 $\text{H}_{\text{tertH-S, methylen-S}}$), 2,3 (t, 6 $\text{H}_{\text{methylen-COO}}$), 2,0 (qui, 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 1,7 (m, 10 $\text{H}_{\text{tertKette, methylen-CH-S}}$), 1,5 (q, 4 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 1,3 (m, 38 $\text{H}_{\text{methylenKette}}$), 0,8 (t, 30 $\text{H}_{\text{methylKette}}$)

FD-MS: $m/z = 1026,4$ [M^+]TLC: PE/EtOAc (1/1), $R_f = 0,90$

4. Herstellung der t-BLM

t-BLMs stellen, wie bereits erwähnt, eine geeignete Plattform zur Charakterisierung von Lipiddoppelschichten dar. Zur Darstellung einer t-BLM wird zunächst eine ultraglatte Goldoberfläche benötigt, um darauf per self-assembly^[56-58] einen Lipid-Monolayer zu etablieren, gefolgt von einer Vesikelfusion oder Rapid-Solvent-Exchange (RSE)^[59] zum Aufbau der Lipiddoppelschicht. Eine sehr glatte Oberfläche ist notwendig, um eine große Homogenität des Bilayers gewährleisten zu können.

4.1 Herstellung von ultraflachen Goldoberflächen mit Template-Stripped-Gold (TSG)

Mit den TSG-Verfahren^[19, 60] können Goldschichten mit einer Rauigkeit unter 0,5 nm hergestellt werden^[48]. Hierzu nutzt man die äußerst glatte Oberfläche von Silicium aus und dampft auf diese 50 nm Gold auf. Die Silicium/Gold-Platten werden danach mit einem Kleber (EpoTek 353ND4) mit der Goldfläche auf eine Glasscheibe fixiert. Beim anschließenden „Strippen“ nutzen man die stärkere Haftung von Gold an den Kleber aus und erhält somit ein System mit einer ultraglaten Goldoberfläche über dem Klebstoff auf dem Glaträger:

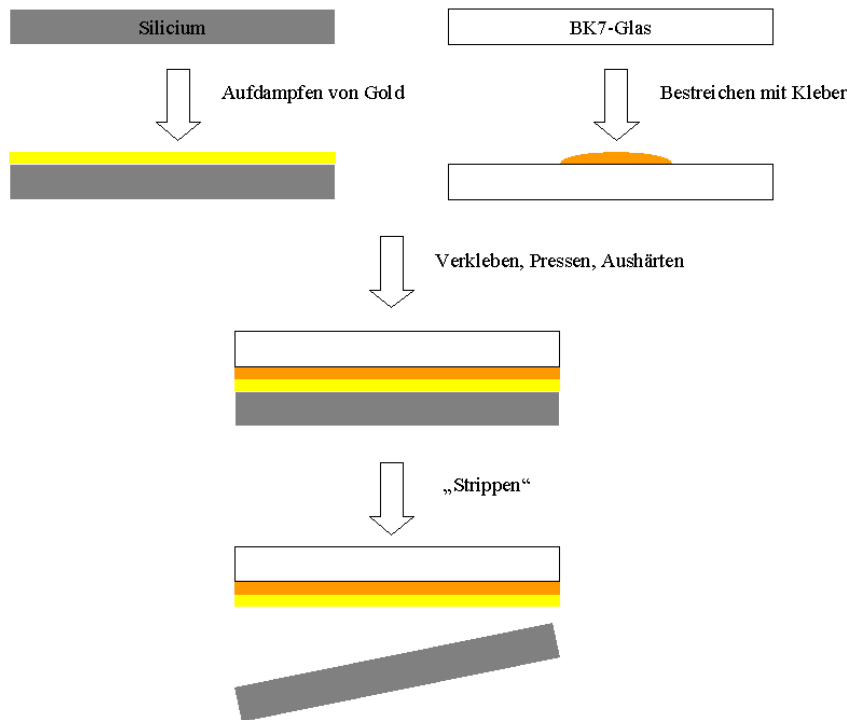


Abbildung 17: Schema der Herstellung eines Template Stripped Gold (TSG)

Zur Präparation sind zunächst zwei Reinigungsschritte notwendig. Die der Silicium-Wafer und die der Glasträger:

4.1.1 Reinigung der Silicium-Wafer

Es wurde die Schutzfolie der Silicium-Wafer (CrysTeC, Berlin, Deutschland) auf beiden Seiten abgezogen und in einer basischen Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 1:1:5) bei 75°C für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde 10 mal mit ultrareinem H_2O (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gespült. Die Lagerung der Silicium-Wafer erfolgte in reinem Ethanol (Chromasolv, Sigma, Steinheim, Deutschland).

4.1.2 Reinigung der Glasträger

Die Glasobjektträger-Plättchen (Menzel, Braunschweig, Deutschland) wurden mit einem Diamant-Glasschneider in zwei Hälften geschnitten. Diese wurden in einer 2%igen Hellmanex-Lösung (Hellma, Mühlheim, Deutschland) im Ultraschallbad für 15 min beschallt. Anschließend wurde 10 mal mit H_2O gewaschen und erneut mit H_2O für 15 min ins

Ultraschallbad gestellt. Es wurde wiederum 10 mal mit H₂O gespült und dieses mal 15 min in Ethanol beschallt. Die Lagerung erfolgte letztlich in reinem Ethanol.

Das Gold wurde in einer Aufdampfanlage (Edwards Auto 306 evaporation system, Edwards, USA) auf die Silicium-Wafer aufgebracht. Bei diesem Prozess wurde ein Vakuum mit einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ mbar angelegt und der Vorgang war beendet sobald eine Goldschichtdicke von 50 nm erreicht war.

Wie in Abbildung 17 gezeigt werden die mit Gold bedampften Silicium-Wafer auf die Glasobjektträger geklebt. Hierzu verwendete man einen Zwei-Komponenten-Kleber (EpoTek 353ND4, Polytec PT, Waldbronn, Deutschland) der im Verhältnis 10:1 gemischt wurde und eine Stunde im Hochvakuum entgast wurde. Der Kleber wurde auf den Glaträger gegeben und der Silicium-Wafer mit der Goldseite darüber fixiert. Das System wurde einige Minuten mechanisch gepresst und anschließend wurden die Ränder mit einem Teflonband umwickelt um ein Ausfließen des Klebers beim Erhärten zu verhindern. Hierzu wurden die Proben bei 150 °C für zwei Stunden im Ofen ausgeheizt.

Vor der Verwendung der TSGs mussten diese „gestripped“ werden. Darunter versteht man das Freilegen der Goldoberfläche. Mit einem Skalpell wurde das Glas/Gold-System von der Siliciumschicht gelockert bis dieses sich ablöste. Die Goldoberfläche wurde unter einem Stickstoffstrom von Verunreinigungen befreit und sofort für die Membranpräparation weiterverarbeitet.

4.2 Aufbau des Monolayers mittels Self-Assembly

Der erste Schritt beim Aufbau einer t-BLM ist die Etablierung eines Monolayers. Es ist wichtig eine „guten“ Monolayer zu erhalten, das heißt einen möglichst dicht gepackten, um im Anschluss daran einen möglichst perfekten Bilayer formieren zu können. Denn nur ein entsprechend hydrophober Monolayer erlaubt die Vesikelfusion. Das Prinzip der Selbstorganisation, bzw. Self-Assembly ist nicht im Detail aufgeklärt, beruht allerdings auf der spontanen Ausrichtung und Aggregation von Molekülen auf dem Substrat in Abhängigkeit unterschiedlicher Wechselwirkungen. In diesem Fall dominiert die starke Bindung der Thiol- bzw. Disulfidankergruppen mit der Goldoberfläche sowie hydrophobe Kräfte zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Lipidschwänze.

Für die Herstellung der SAMs (Self Assembled Monolayers) wurde zunächst das entsprechende Thiol/Disulfid-Lipid in Chloroform mit einer Konzentration von $c = 0,2 \text{ mg/ml}$ gelöst. Der frisch hergestellte Goldträger wurde sofort in der Lipidlösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach sollte sich eine einheitliche Lipidmonolage gebildet haben und der Träger wurde mit Chloroform gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Die so hergestellten Lipidmonolayer waren trocken bei Raumtemperatur über Wochen haltbar.

4.3 Der Bilayer

4.3.1 Aufbau mittels Vesikelfusion

Als zweites erfolgte die Präparation des Bilayers. Hierzu wurde in dieser Arbeit unter anderem die Methode der Vesikelfusion mit 1,2-Di-O-phytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhyPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA, siehe Abb. 18) angewandt.

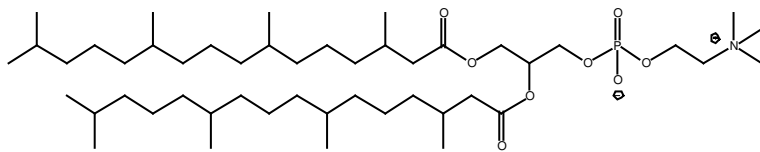


Abbildung 18: 1,2-Di-O-phytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhyPC)

Zur Herstellung der Vesikel, wurde DPhyPC in ultrareinem Wasser suspendiert. Hierzu wurde eine Konzentration des Lipids von $c = 2 \text{ mg/ml}$ eingestellt und die Mischung bei $75 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Stunde mit gelegentlichem Durchmischen erhitzt und nach Beendigung im Kühlschrank gelagert. Diese Suspension wurde daraufhin 21 mal durch eine Polycarbonatmembran der Porengröße 50 nm extrudiert. Dabei entstanden unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm. Diese waren nur weniger Tage haltbar, da sie refusionieren. Zur Messung der Vesikelfusion per EIS wurden $25 \text{ } \mu\text{l}$ der Vesikelsuspension in die Messzelle pipettiert.

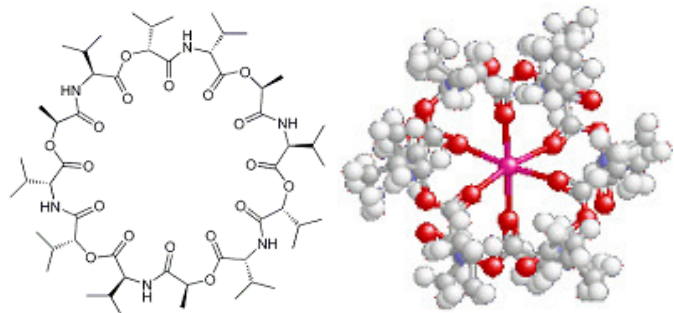
4.3.2 Aufbau mittels Rapid Solvent Exchange (RSA)^[59]

Eine alternative Möglichkeit zum Aufbau unseres Membransystem bietet die Methode Rapid Solvent Exchange, welche erstmals von Miller et al^[61] verwendet wurde. Sie beruht auf dem

Self-Assembly-Prozess von Lipiden auf einer hydrophoben Oberfläche während eines Austausches des Lösemittel von Ethanol gegen eine wässrige Lösung. So wurde nach der Impedanzmessung des Monolayers die Elektrolytlösung entfernt und 30 μ l einer ethanolischen DPhyPC-Lösung (mit $c = 5$ mg/ml) über den Monolayer verteilt. Nach 10 min erfolgte spontan die Ausbildung des Bilayers indem die Ethanolösung in der Messzelle durch zügiges (daher: „rapid“) Spülen mit der Elektrolytlösung verdrängt wurde. Nach ca. 60 min sollte im Impedanzspektrum ein stationärer Zustand erreicht worden sein.

4.4 Inkorporation von Valinomycin

Ein Hauptmerkmal einer künstlichen tBLM ist die Fähigkeit Proteine oder auch das Depsipeptid Valinomycin, inkorporieren zu können. Auf diese Art und Weise kann Valinomycin als ein Indikator für eine ausgebildete Lipiddoppelschicht bei der Impedanzmessung dienen.^[62]



Valinomycin ist ein Cyclodecadepsipeptid und zählt zu den Makrolid-Antibiotika. Es wird von mehreren Arten von *Streptomyceten* (z. B. *Streptomyces fulvissimus*) produziert. Es ist ein Ionophor, das selektiv Kalium-Ionen transportiert^[63]. Dabei wird K^+ in einer käfigartigen Struktur komplexiert und so durch die Zellmembran transportiert. Die Komplexbildungskonstante für den Kalium-Valinomycin-Komplex beträgt 10^6 , während sie für den Natrium-Valinomycin-Komplex lediglich bei 10 liegt. Der Grund hierin liegt in der höheren Dehydratisierungsenergie des kleineren Natriumions, da für das Passieren des Ionophors die Hydrathülle der Ionen abgestreift werden muss.

In meinen Versuchen wurden nach den EIS-Messungen des Bilayers 20 μ l einer ethanolischen Valinomycin-Lösung ($c = 1$ mg/ml) in die Messzelle pipettiert. Valinomycin inkorporierte spontan in die Membran und machte diese für Kaliumionen permeabel^[63]. Führte man nun die Impedanzmessung in einer KCl-Elektrolytlösung durch, so war eine Erniedrigung des Widerstandes in Abhängigkeit der Kaliumkonzentration zu erwarten. Bei Messungen in NaCl-Lösungen hingegen sollten aufgrund der hohen Spezifität des Valinomycins nur geringe abweichende Effekte gegenüber einer Membran ohne Valinomycin zu beobachten sein.

5. Charakterisierung der Membran

Zuerst wurden die Monolayer aus den eigens synthetisierten Lipiden mittels Kontaktwinkelmessung charakterisiert. Anschließend wurde der Aufbau des Doppelschichtmembransystems durch Vesikelfusion und RSA per Impedanz-Spektroskopie verfolgt.

5.1 Kontaktwinkelmessung

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 erwähnt, wird die Kontaktwinkelmessung zur Abschätzung verwendet, ob der Lipid-Monolayer (SAM) nach dem „Self-Assembly“ auf der Goldoberfläche die zur Vesikelfusion erforderliche Hydrophobizität ($\Theta > 80^\circ$) besitzt^[24].

Dazu wurden die SAMs der drei Thiol- und Disulfidlipide und die Goldoberfläche als Referenz (siehe Abb. 19) vermessen.

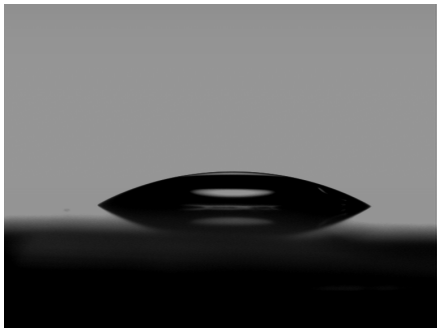


Abbildung 19: Au-Oberfläche mit $\theta = 32^\circ \pm 3^\circ$

Für dieses Liponlipid wurde ein Kontaktwinkel von $\theta = 92^\circ \pm 2^\circ$ gemessen. Der Wert liegt deutlich unterhalb derer von DPGAT und DPGAL. Der Grund hierin liegt wohl in der durch Tetraethylenglykol verlängerten Spacerkette. Der Aufbau der Monolage war offenbar weniger homogen, weniger dicht gepackt als dies bei den anderen beiden Lipiden der Fall zu sein schien. Dennoch lag der Wert für θ mit $92^\circ \pm 2^\circ$ weit oberhalb von 80° wonach auch diese Lipidmonolage für den Aufbau eines Bilayer-Systems verwendet werden konnte.

5.2 Elektrochemische Impedanz-Messung (EIS)

Mit dieser elektrochemischen Spektroskopiemethode sollte der Aufbau des tBLM-Systems verfolgt werden. Hierzu wurde zunächst eine Messung des Monolayers in einer 0,1 M NaCl-Lösung gestartet. Für die Etablierung des Bilayers wurde im Anschluss daran 25 μ l einer frisch hergestellten DPhyPC-Vesikel-Emulsion mit einer Konzentration von 2 mg/ml in die Messzelle pipettiert. Es wurde ein Messprogramm gestartet, das in regelmäßigen Zeitabständen Messungen initiierte. Die Vesikelfusion wurde so über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden verfolgt. Danach wurde die Zelle mit der NaCl-Lösung gespült um eventuell überschüssige Vesikel zu verdrängen und es wurden erneut drei Messungen gestartet. Danach wurden 20 μ l einer ethanolischen Valinomycinlösung mit $c = 1$ mg/ml hinzu pipettiert und drei Messungen gestartet. Im Anschluss daran wurde die Elektrolytlösung gegen eine 0,1 M KCl Lösung gewechselt und wiederum drei Messungen gestartet. Schließlich wurde die Salzlösung erneut gegen die 0,1 M NaCl-Lösung getauscht und die letzten drei Messungen generiert.

Der einzige Unterschied bei den Messungen mit RSA ist der Aufbau des Bilayers. So wurde nach der Messung des Monolayers, dieser mit einer ethanolische DPhyPC-Lösung ($c = 5$ mg/ml) überschichtet und nach ca. 10 Minuten die Messzelle mit der NaCl-Elektrolytlösung gespült und die ersten Messungen des Bilayers gestartet.

Was man bei den Impedanzmessungen erwartete, ist eine Zunahme des Widerstandes des RC-Elements bei der Formation des Bilayers bei einer gleichzeitigen Abnahme der Kapazität. Nach der Zugabe von Valinomycin sollte bei der Messung in der KCl-Lösung ein signifikanter Rückgang des Widerstandes zu beobachten sein. Im Idealfall sollten sich die Messergebnisse mit der Membran mit Valinomycin im NaCl-Puffer mit den Messergebnissen des Bilayers ohne Valinomycin decken.

5.2.1 EIS-Messung der Monolayer und der Bilayer nach Vesikelfusion

Die folgenden Messergebnisse wurden alle mit einem Äquivalenzschaltkreis bestehend aus einem Widerstand der Elektrolytlösung und einem dazu in Serie geschalteten RC-Elements, welches die Membran beschreibt, gefittet^[48].

Die erhaltenen Messergebnisse weisen teilweise ein komplexes Verhalten auf, das nicht mit einem einfachen Ersatzschaltbild erklärt werden kann. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde aber auf die Benutzung komplizierter Schaltkreise, beispielsweise mit „Constant-Phase-Element“ oder WARBURG Impedanzen verzichtet.

5.2.1.1 Impedanz-Spektren von DPGAT

In Abbildung 23 ist der Bodeplot und in Abbildung 24 der Admittanzplot aus den Messungen mit dem DPGAT-Lipid gezeigt. Die Werte für Kapazitäten und Widerstände in Tabelle 1 wurden aus den Fitkurven errechnet.

Der Bodeplot zeigt den frequenzabhängigen Verlauf des Betrages der Impedanz als gefüllte und das Phasenverhalten der Stromantwort als leere Quadrate. Die Linien stellen den Fit an die Daten dar. Zu sehen ist der hochfrequente Widerstand der Elektrolytlösung als horizontaler Abschnitt der Impedanzbeträge mit kleiner Phasenverschiebung. Im mittleren Frequenzbereich dominiert die Kapazität der Membran das elektrochemische Verhalten. Die Impedanzkurve zeigt eine Steigung von annähernd -1 und die Phasenverschiebung liegt bei annähernd 90° . Das Plateau der Impedanzkurve bei niedrigen Frequenzen ist dem Widerstand der Membran zuzuordnen. Wie für ein resistives Verhalten zu erwarten, fällt die Phasenverschiebung in diesem Frequenzbereich wieder auf niedrige Werte.

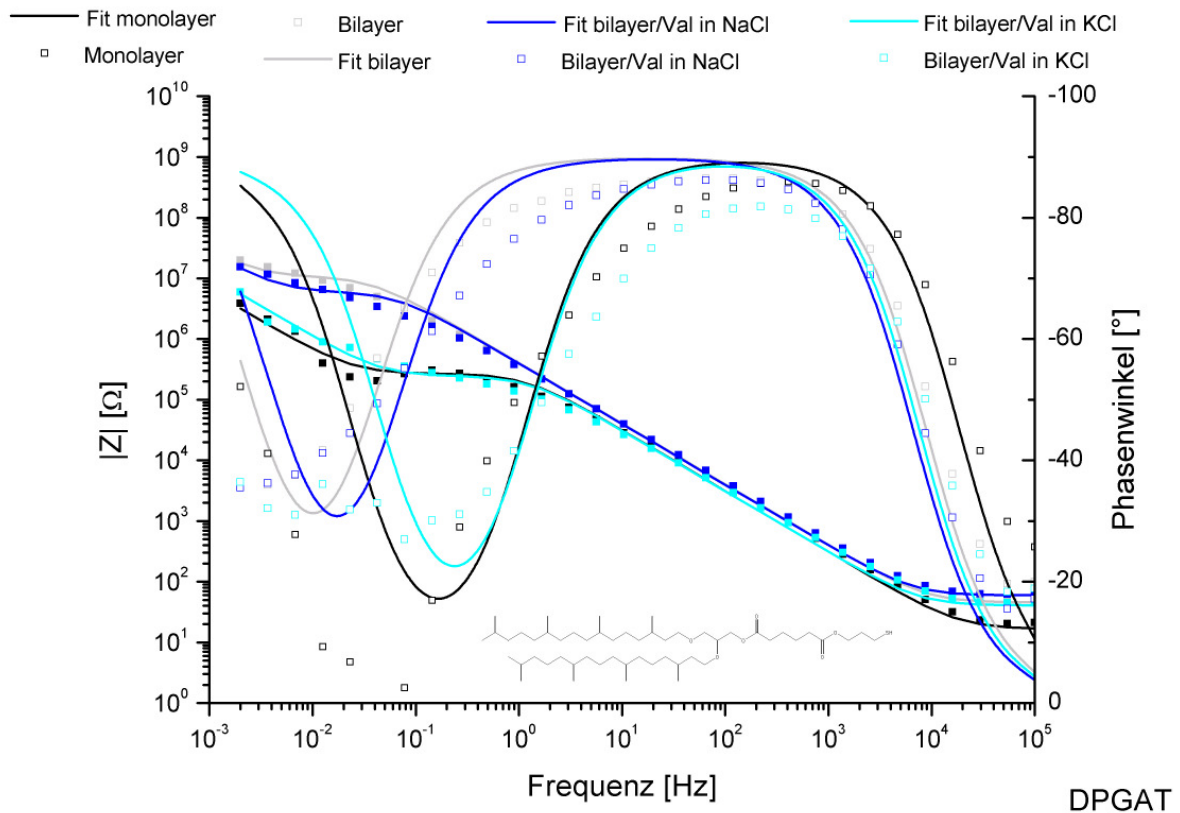


Abbildung 23: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGAT mit Vesikelfusion und Valinomycininkorporation

Der Admittanz-Plot in Abbildung 24 ist eine Auftragung des Realteils gegen den Imaginärteil der Admittanz. Deutlich zu erkennen ist der typische Halbkreis eines RC-Elements, aus dessen extrapolierten Schnittpunkt mit der y-Achse sich die Kapazität der Membran ablesen lässt.

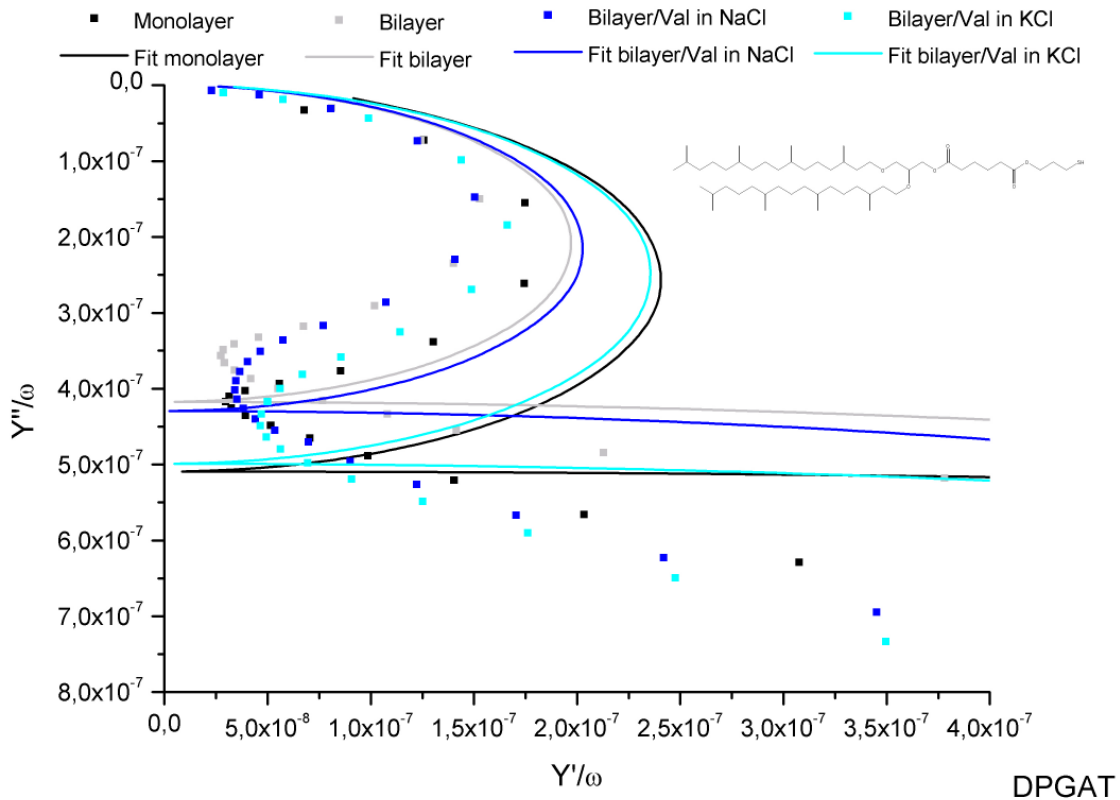


Abbildung 24: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGAT mit Vesikelfusion und Valinomycininkorporation

DPGAT	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val NaCl	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	737 ± 88	$1,4 \cdot 10^3 \pm 138$	$2,1 \cdot 10^3 \pm 230$	583 ± 72
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$

Tabelle 1: Gefittete Werte des DPGAT-Monolayers und der tBLM

Der Widerstand der Membran verdoppelte sich nach der Vesikelfusion von $737 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ auf $1,4 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. Die deutliche Widerstandszunahme deutete auf eine erfolgreiche Vesikelfusion unter Ausbildung einer Doppelschicht hin. Charakteristisch für die Bildung einer Membran ist neben der Widerstandserhöhung eine Abnahme der Kapazität, die durch die Zunahme der Schichtdicke hervorgerufen wird. Wie im Admittanz-Plot zu sehen ist, nimmt die Kapazität der Membran im Vergleich zum Lipidmonolayer ab. Die aus den Fitkurven ermittelten Kapazitätswerte bestätigten einen Kapazitätsverlust von $1,9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ des Monolayers auf $1,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ der Doppelschichtmembran.

Nach der Inkorporation von Valinomycin fiel aufgrund der höheren Membranpermeabilität für Kaliumionen der Widerstand im KCl-Puffer auf $580 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ von $2,1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ im NaCl-Puffer ab. Die Kapazitäten folgen nicht dem idealen Trend. Erwarten sollte man eine gleichbleibende Kapazität der Bilayer mit und ohne Valinomycin, anstattdessen wurden hier leicht erhöhte Werte der Membran mit Valinomycin gegenüber der Membran ohne das Depsipeptid gefunden.

5.2.1.2 Impedanz-Spektren von DPGAL

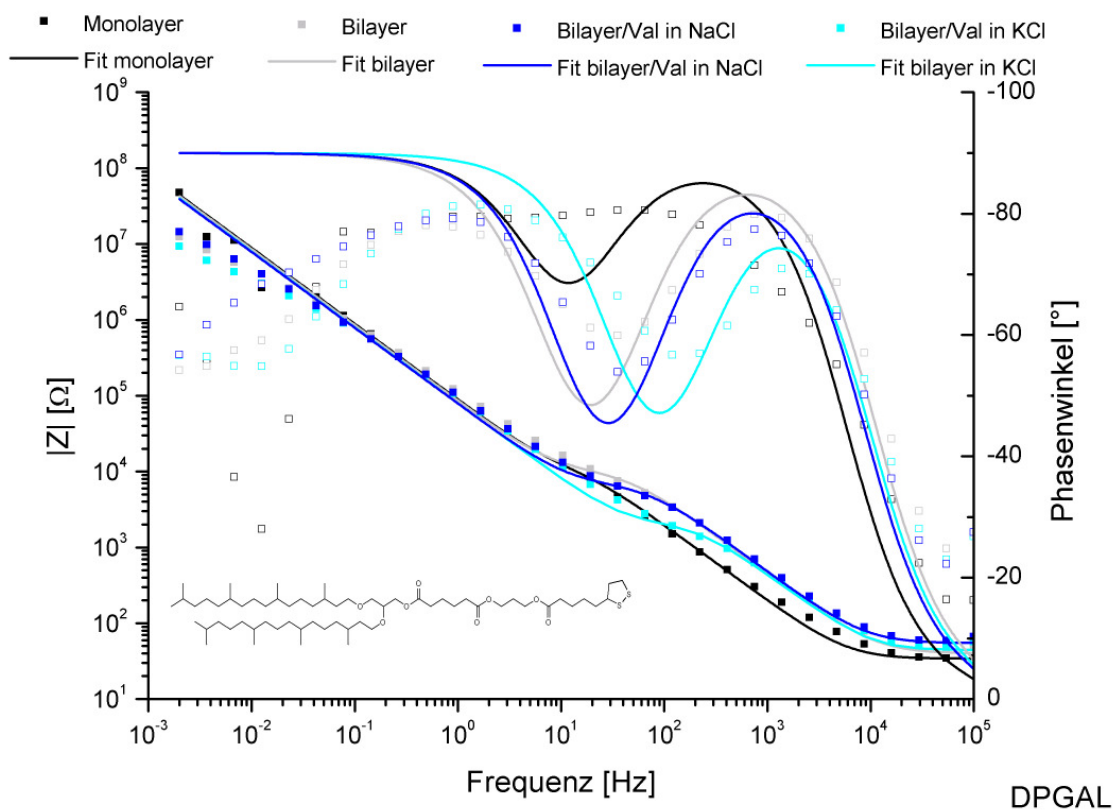


Abbildung 25: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGAL mit Vesikelfusion und Valinomycininkorporation

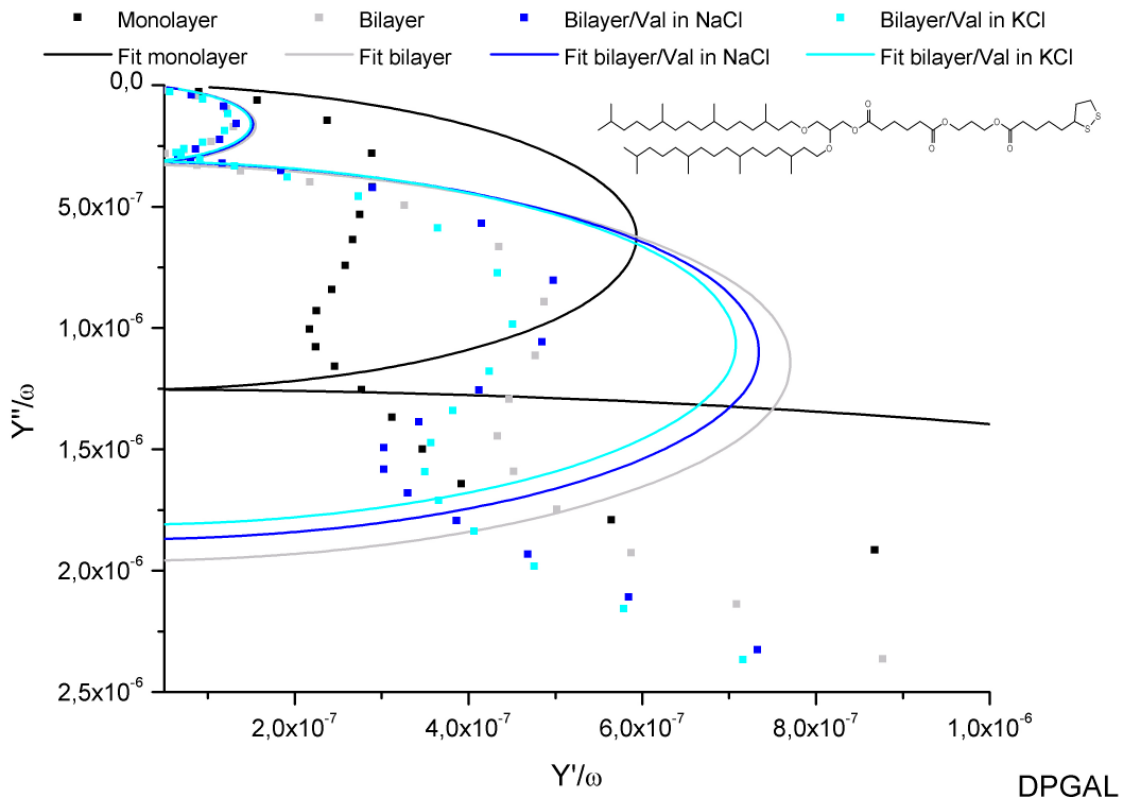


Abbildung 26: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGAL mit Vesikelfusion und Valinomycin-korporation

DPGAL	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val NaCl	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$1,7 \pm 0,7$	$4,8 \pm 1,0$	$1,6 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$5,2 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$

Tabelle 2: Gefittete Werte des DPGAL-Monolayers und der tBLM

Bei den Impedanzmessungen mit dem DPGAL-Lipid folgten die ermittelten Werte dem erwarteten Trend. Die Vesikelfusion führte zu einer Erhöhung des Widerstandes von $1,7 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ auf $4,8 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ und zu einer Erniedrigung der Kapazität. Sie fiel von $5,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ab. Auch bei diesem Lipid ließ sich Valinomycin in die Membran einlagern, infolgedessen war eine Widerstandserniedrigung von $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ im NaCl-Puffer auf $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ im KCl-Puffer zu beobachten. Die Kapazitäten der Membran mit Valinomycin lagen idealerweise in der Größenordnung der Membran ohne Valinomycin.

Es zeigte sich aber insbesondere im niedrigen Frequenzbereich eine Abweichung der Messdaten vom idealisierten Verlauf. Dies deutet auf Inhomogenität oder komplexere Strukturen der Lipid-Doppelschicht hin.

5.2.1.3 Impedanz-Spektren von DPGL

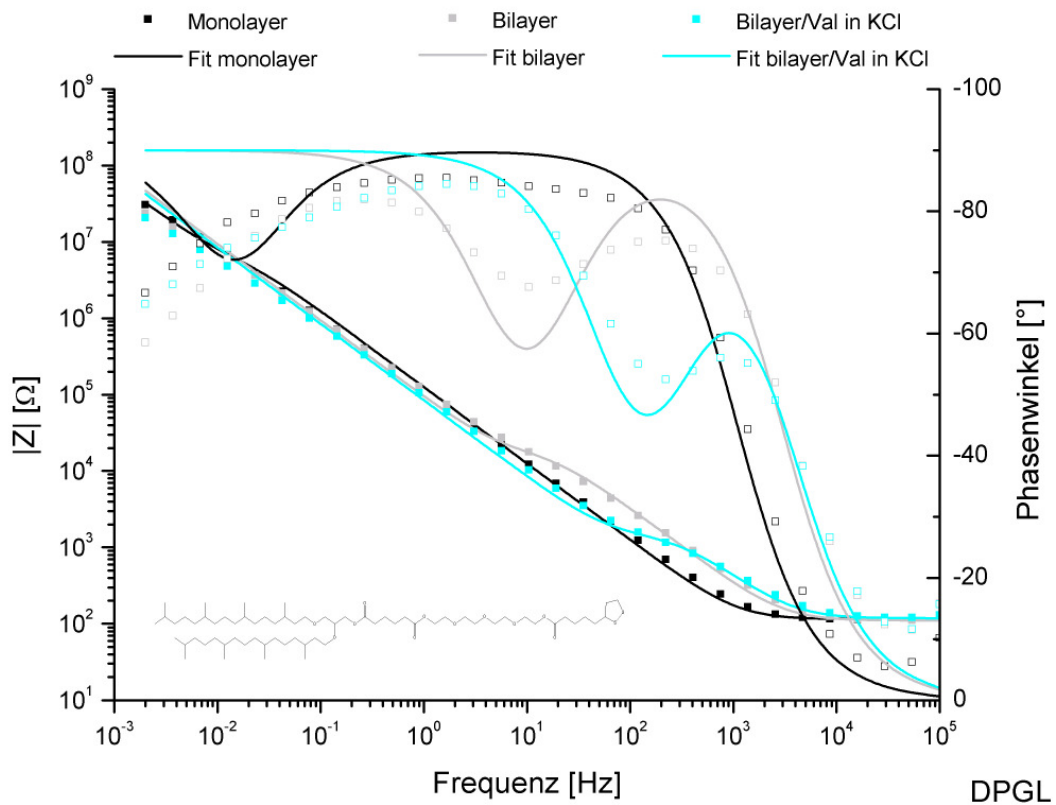


Abbildung 27: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGL mit Vesikelfusion und Valinomycininkorporation

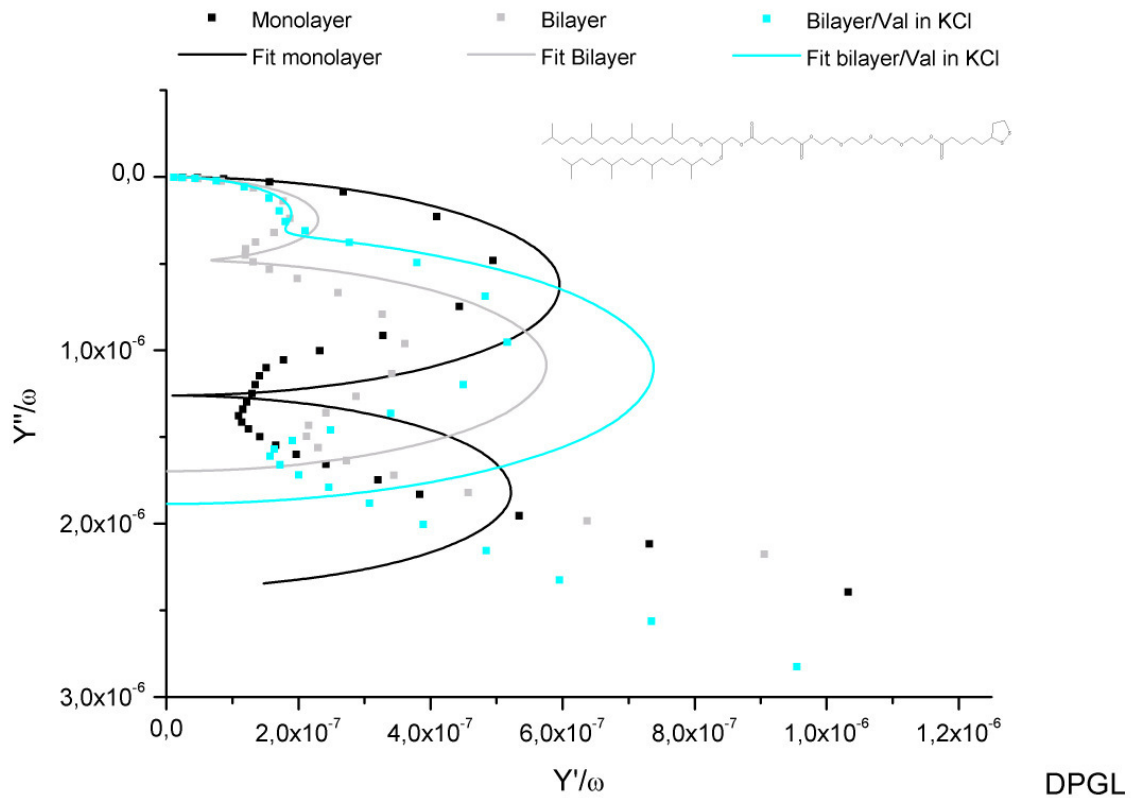


Abbildung 28: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGL mit Vesikelfusion und Valinomycininkorporation

DPGL	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	847 ± 218	$4,7 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,1$
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$9,3 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,28$	$1,7 \pm 0,2$

Tabelle 3: Gefittete Werte des DPGL-Monolayers und der tBLM

Bei der Betrachtung des Admittanz-Plot (Abb. 28) fiel auf, dass der Fit an die Daten mit dem verwendeten Model kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte. Auch die Widerstandswerte des Mono- und des Bilayers in Tabelle 3 deuten auf ein für diesen Fall ungeeignetes Fitmodell hin. Man erkennt vielmehr ein zusätzliches Element bei höheren Frequenzen, das der Lipid-Doppelschicht entsprechen könnte.

Die Kapazitätsabnahme von $9,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ des Monolayers auf $2,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ der Lipiddoppelschicht verwiesen bereits auf das Ausbilden einer Doppelmembran. Auch der Einbau von Valinomycin schien erfolgreich, was eine signifikante Erniedrigung des

Widerstandes von $4,7 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ des Bilayers auf $0,3 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ des Bilayers mit Valinomycin in KCl belegt.

5.2.2 EIS-Messung der Monolayer und der Bilayer nach *Rapid Solvant Exchange* (RSA)

In dieser Versuchsreihe wurden die Impedanzmessungen an Bilayern durchgeführt, die diesmal nicht durch Vesikelfusion, sondern durch den in Kapitel 4.3.2 beschriebenen *Rapid Solvant Exchange* zu Stande kamen. Man erhoffte sich durch die höhere DPhyPC-Konzentration während der Bilayerformation ein besseres Ergebnis, das heißt, eine dichter gepackte Membran.

5.2.2.1 Impedanz-Spektren von DPGAT

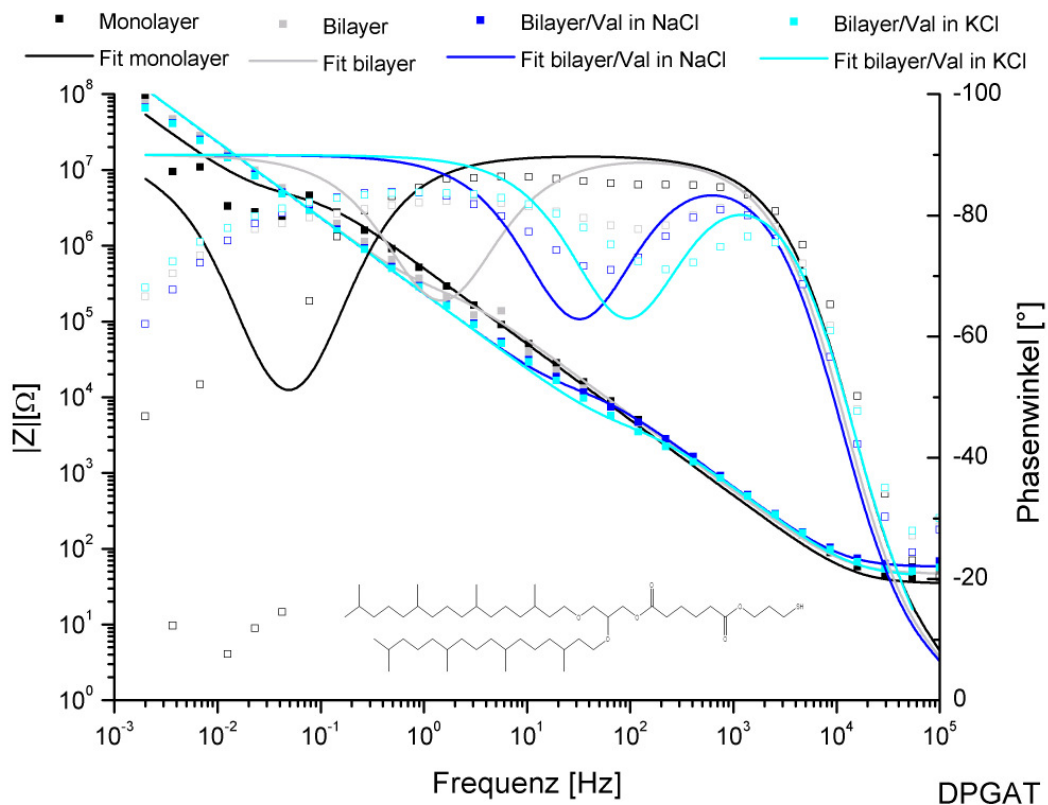


Abbildung 29: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGAT mit RSA und Valinomycininkorporation

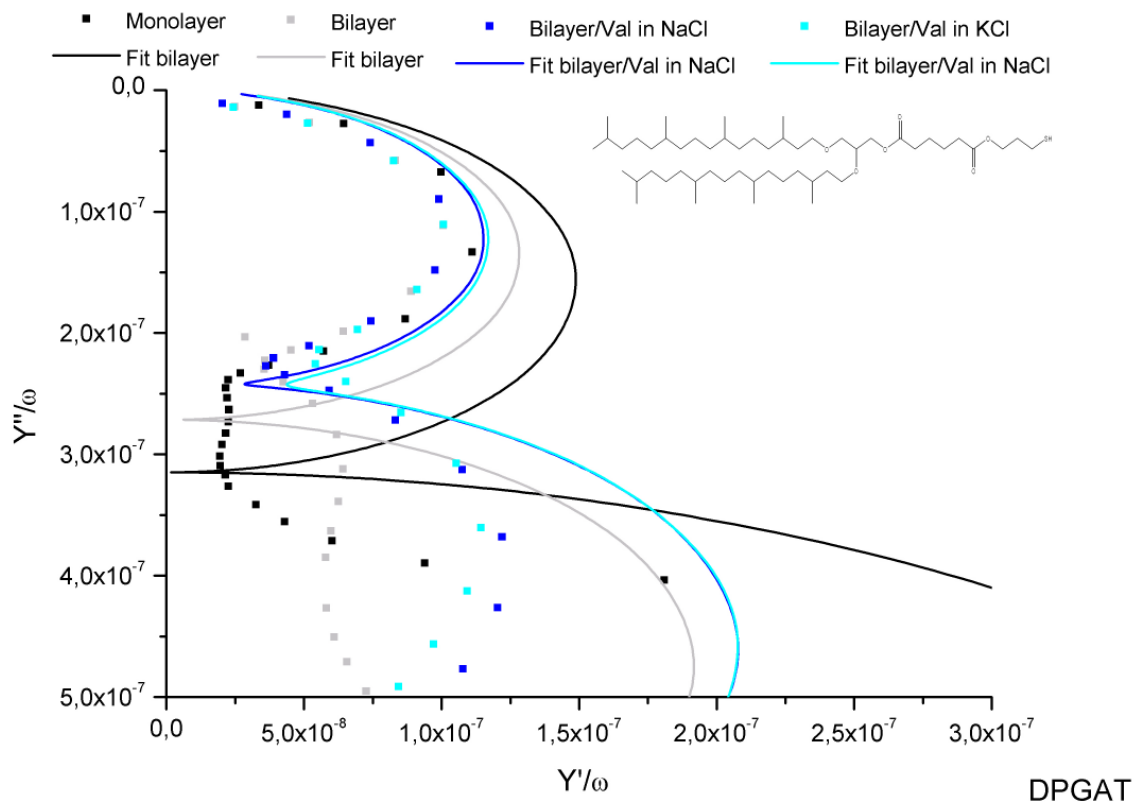


Abbildung 30: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGAT mit RSA und Valinomycininkorporation

DPGAT	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val NaCl	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$1,0 \cdot 10^3 \pm 277$	$42,2 \pm 5$	$2,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$

Tabelle 4: Gefittete Werte des DPGAT-Monolayers und der tBLM

Der Verlauf der Originalmessdaten des Monolayers im Admittanz-Plot (Abb. 30) deuteten auf eine Inhomogenität hin. Darüber hinaus eignete sich auch hier das gewählte Äquivalenzschaltbild für den Rohdatenfit nicht. Für das Ausbilden einer Lipiddoppelmembran sprach zum einen der Verlauf der Kapazitäten von $1,9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ des Monolayers auf $1,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ des Bilayers, zum anderen aber auch die deutliche Abnahme des Widerstands beim Wechsel von NaCl-Puffer und KCl-Puffer. So lag der Wert des Bilayers mit Valinomycin in KCl-Lösung mit $0,7 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ bei knapp einem Drittel des Wertes für den Bilayer mit Valinomycin in NaCl-Puffer.

5.2.2.2 Impedanz-Spektren von DPGAL

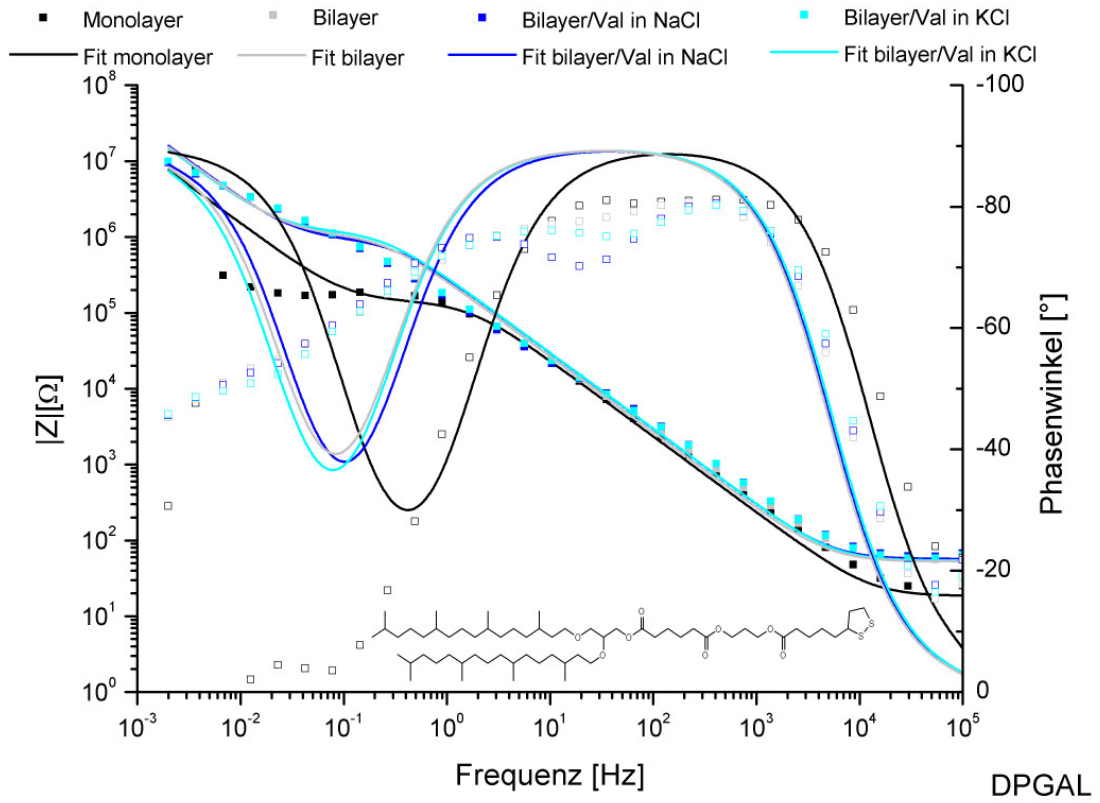


Abbildung 31: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGAL mit RSA und Valinomycininkorporation

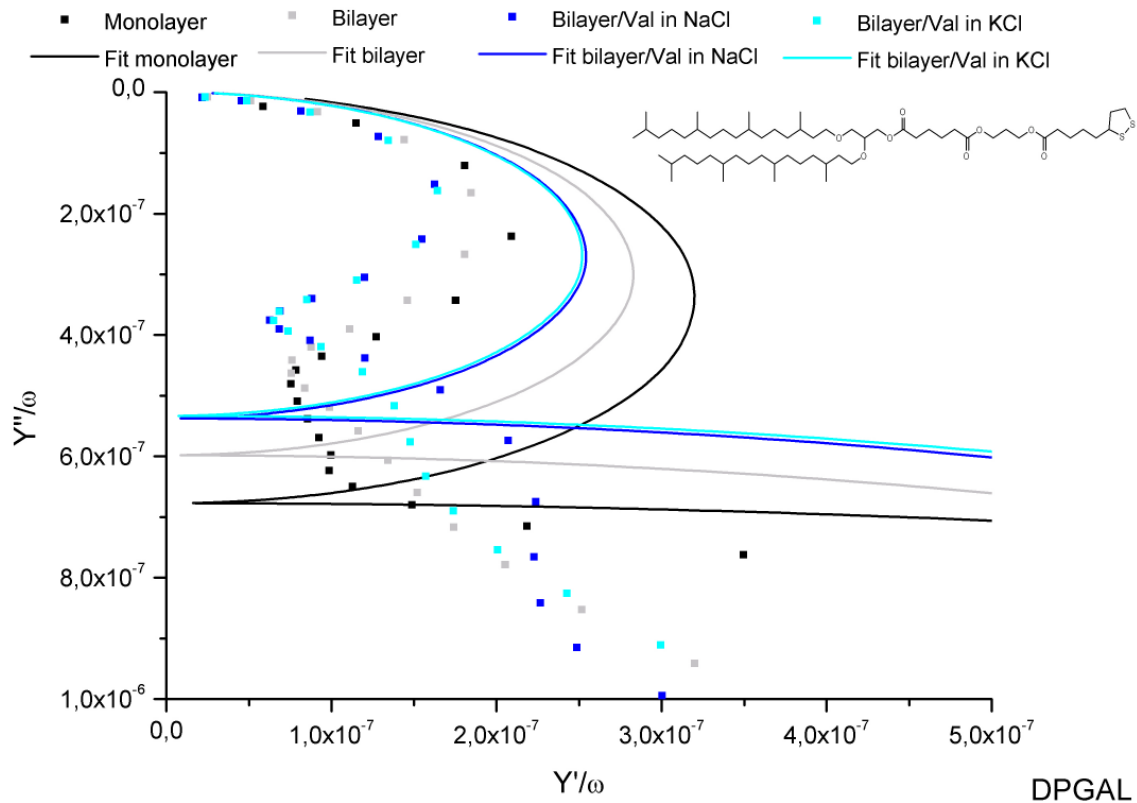


Abbildung 32: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGAL mit RSA und Valinomycininkorporation

DPGAL	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val NaCl	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$16,0 \pm 3$	406 ± 61	259 ± 50	252 ± 50
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$3,8 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$

Tabelle 5: Gefittete Werte des DPGAL-Monolayers und der tBLM

Mit dem DPGAL-Lipid ließ sich ein Doppelmembransystem etablieren. Der Beweis hierfür ließ sich neben den Kurvenverläufen in Bode- und Admittanz-Plot unter anderem Tabelle 5 entnehmen. Es war ein deutlicher Anstieg des Widerstandes von $16 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ für den Monolayer auf $403 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ für den Bilayer erkennbar. Die Kapazität fiel ebenfalls trendgemäß von $3,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $2,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Bei diese Membran konnte sich offenbar kein Valinomycin einlagern. Die beiden Werte für den Widerstand unterscheiden sich mit $259 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ und $252 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ kaum vom Widerstand des reinen Bilayers mit rund $400 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$.

5.2.2.3 Impedanz-Spektren von DPGL

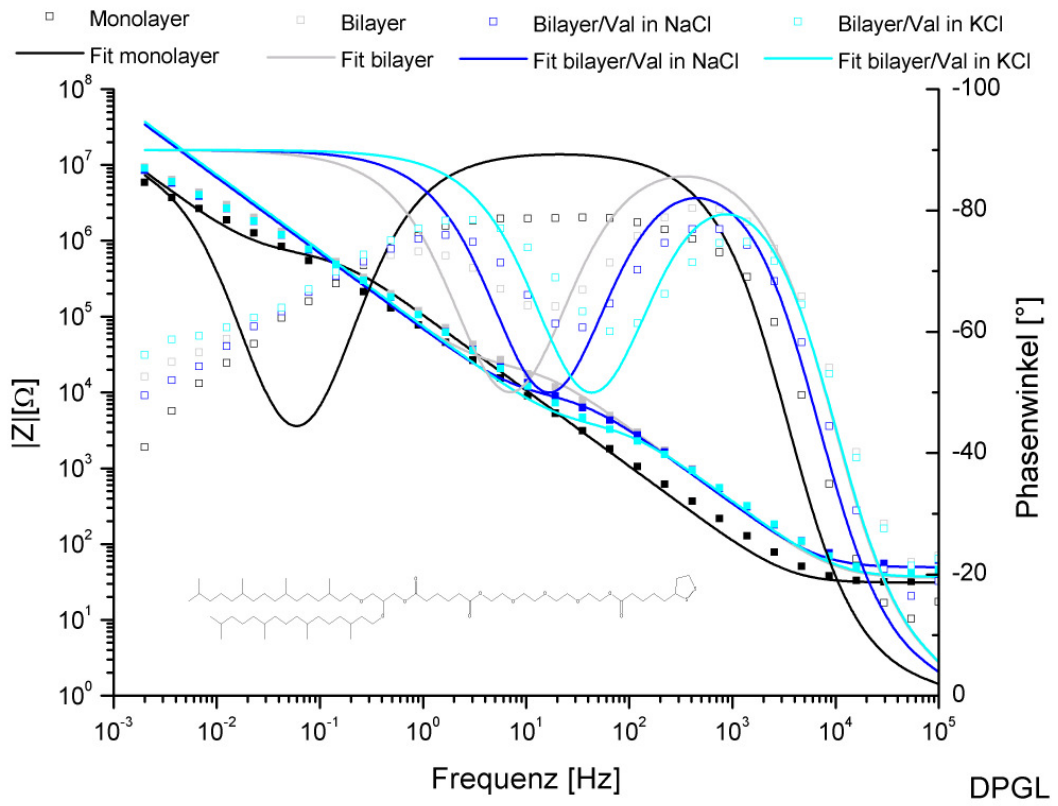


Abbildung 33: Bode-Plot der EIS-Messungen von DPGL mit RSA und Valinomycininkorporation

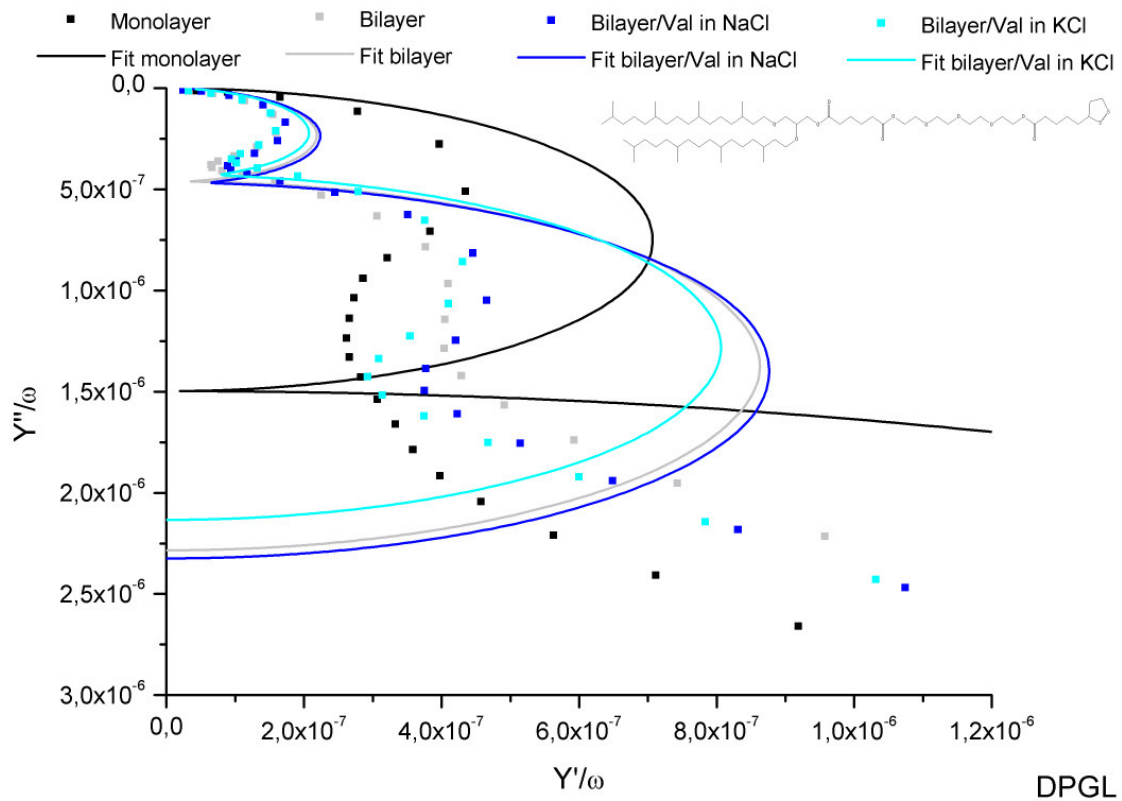


Abbildung 34: Admittanz-Plot der EIS-Messungen von DPGL mit RSA und Valinomycininkorporation

DPGL	Monolayer	Bilayer	Bilayer/Val NaCl	Bilayer/Val KCl
$R_{\text{Mono-/Bilayer}}/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	166 ± 34	$4,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
$C_{\text{Mono-/Bilayer}}/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$6,3 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$

Tabelle 6: Gefittete Werte des DPGL-Monolayers und der tBLM

Bei der Auswertung der Messdaten des DPGL-Lipids spielte wiederum das Modelproblem für den Datenfit des Monolayers eine Rolle, was bereits beim Vergleich der Widerstandswerte von Mono- und Bilayer in Tabelle 6 auffiel. Die Kapazitäten hingegen sprachen schon für einen erfolgreichen Aufbau des Bilayers. Sie sanken von $6,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ beim Monolayer auf $2,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ beim Bilayer. Auch die Kapazitäten der Membran mit Valinomycin stimmten mit der des reinen Bilayers überein. Die Widerstände der Valinomycin/Bilayer-Membran bestätigten ebenfalls den Einbau des Ionophors mit einer Abnahme auf $0,9 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ im KCl-Puffer und $2,0 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ im NaCl-Puffer verglichen mit $4,9 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ der Membran ohne Valinomycin.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten neue Lipide mit modifizierten Anker- und Spacerregionen synthetisiert werden, die zum Aufbau von t-BLM-Systemen dienen.

Bei den organischen Synthesen dieser Lipide konnte mit der Yamaguchi-Kopplung eine effiziente Veresterungsmethode mit hohen Ausbeuten und effektiven Reinigungsschritten angewandt werden. Die so hergestellten Lipide weisen alle die zum Self-Assembly notwendige Reinheit auf. Der Aufbau der Lipidmonolage wurde zunächst eindeutig mit der Kontaktwinkelmethode verifiziert. Sowohl für DPGAT, DPGAL und auch DPGL konnten hier Kontaktwinkel weit oberhalb von $\theta = 80^\circ$ gefunden werden. Auch die Impedanzmessungen der Lipidmonolayer bestätigten die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen.

Für den Aufbau der Lipidbilayer sowohl mittels Vesikelfusion als auch mit dem Rapid Solvent Exchange zeigte sich ein etwas differenzierteres Bild für die drei Lipide. Zwar konnte bei allen drei Lipiden ein zu Stande kommen des Bilayers nachgewiesen werden, allerdings zeigten nur die Impedanzkurven des Bilayers mit DPGATs aus der Vesikelfusion die charakteristischen Kurvenverläufe. Bei allen anderen Messungen traten eine Abweichungen des RC-Schaltbildes auf, was zum einen auf einen porösen Bilayer und auf Vesikeladsorption an die Doppelschicht hindeutet. Der Grund für die Porösität könnte in einem bereits „löchrigen“ Monolayer zu finden sein, was mit sterischen Hinderungen der großen Sauerstoffmoleküle in den Spacern zu erklären wäre und zudem bei DPGL in der zu langen Spacerkette begründet sein könnte.

Die hergestellten Lipiddoppelschichten waren bis auf DPGAL mit RSA geeignet um Valinomycin in die Membran zu inkorporieren. Im Allgemeinen konnte der erwartete Trend für die Werte der Widerstände und Kapazitäten beim Aufbau des Doppelschichtsystems und beim Einbau des Ionophors nachvollzogen werden, wenn auch der verwendete Äquivalenzschaltkreis zum Fitten der Messdaten nicht immer zu einem optimalen Ergebnis geführt hat.

Die elektrochemischen Messungen zeigten komplexe Daten, die sich in der Regel nicht durch einfache Ersatzschaltbilder beschreiben ließen. So war es nicht möglich, einen signifikanten Unterschied in der Leitfähigkeit einzelner Membranteile, zum Beispiel der Spacerregion zu detektieren.

Die neu synthetisierten Ankerlipide sind trotzdem eine interessante Erweiterung des bestehenden Baukastensystems^[64].

Eine detaillierte Analyse der Impedanzdaten, komplementäre optische Messungen und eventuell eine Optimierung des Membranaufbaus, zum Beispiel Assemblierungszeit und –konzentration kann zu einem genaueren Verständnis der Membranarchitektur führen. Dies war aus Zeitgründen leider nicht mehr möglich.

Weiterhin wäre es interessant, die Esterbindungen in den Spacerketten durch Peptidbindungen zu ersetzen. Durch die so stärkeren Wechselwirkungen zwischen den Ketten aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen ist ein dichter gepackter Monolayer und eventuell auch ein homogenerer Bilayer für die tethered bilayers membranes zu erwarten.

7. Danksagung

Als erstes danke ich meinem Projektleiter Dr. Ingo Köper, der es mir ermöglichte, diese Arbeit am Max-Planck-Institut in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die angenehme Betreuung und die hervorragende Unterstützung während der Zeit meiner Diplomarbeit.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei Mathieu Jung für die anfänglichen Ideen und Hilfestellungen, sowie bei Julia Braunagel für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr für meine Fragen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Ann Falk für ihre Tipps und ihr Engagement bei meinen Impedanzmessungen.

Einen freundschaftlichen Dank richte ich an Jennifer Kroth, die mir mit ihrer humorvollen Art während des gesamten Studiums eine moralische Stütze war. Ich danke ihr für diese tolle Zeit.

Einen ganz besonderen Dank schenke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und die zu jedem Zeitpunkt meines Lebens für mich da waren und sind. Ohne sie wäre diese Arbeit wohl nie zustande gekommen.

Und Maria, ich danke dir für deine Unterstützung in allen Lagen und für deine einzigartige Liebe, die mir täglich die Kraft gibt, die Herausforderungen des Lebens zu meistern.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Sackmann E., *Science* **1996**, 271, 43-48.
- [2] Schiller S., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz H. und Knoll, W., *Angewandte Chemie* **2003**, 115(2), 219-222.
- [3] Miller A., *Langmuir* **1997**, 13, 7106.
- [4] Naumann R., Jonczyk A., Fendler K., Kadenbach B., Liebermann T., Offenhäuser A., Knoll W., *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 651.
- [5] Horn F., *Biochemie des Menschen*, Vol. 3. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [6] Winter, Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner-Verlag, Stuttgart, **1998**.
- [7] Berg M.-J., Tymoczko, J. L., Stryer, L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, **2003**.
- [8] Singer S. J., Nicolson, G.L., *Science* **1972**, 175, 720-731.
- [9] Müller-Esterl W., *Vol. 1. Auflage*, Elsevier-Verlag, München, **2004**.
- [10] Berg M.-J., Tymoczko, J. L., Stryer, L., *Biochemie*, Heidelberg, Berlin, **2003**.
- [11] Nardin C., Widmer, J., Winterhalter, M. und Meier, W., *European Physical Journal E4* **2001**, 403-410.
- [12] Müller P, Rudin, D. O., Tien, H. T., und Wescott, W. C., *Nature* **1962**, 194(4832), 979-980.
- [13] Müller P, Rudin, D. O., *Nature* **1967**, 213, 603-604.
- [14] Müller P., Rudin, D. O., Tien, H. T., und Wescott, W. C., *Journal of Physical Chemistry* **1963**, 67(2), 534-535.
- [15] Schmitt E.K., Vrouenraets, Steinem C., *Biophysical Journal* **2006**, 91, 2163-2171.
- [16] Graneli A., Rydström, J., Kasemo B. und Höök, F., *Langmuir* **2003**, 19, 842-850.
- [17] Sackmann E., Tanaka, M., *Trends in Biotechnology* **2000**, 18, 58-64.
- [18] Steinem C., Janshoff A. *Chem. Unserer Zeit* **2008**, 42, 116-127.
- [19] Naumann R., Schiller, S. M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K. B., Kärcher, I., Köper, I., Lübber, J., Vasilev, K. und Knoll, W., *Langmuir* **2003**, 19, 5435-5443.
- [20] Steinem C., Janshoff A., Ulrich, W. P., Sieber M., Gallo, H. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes* **1996**, 1279(2), 169-180.

- [21] Wiegand G., Arribas-Layton, N., Hillebrandt H., Sackmann, E. und Wagner P., *Journal of Physical Chemistry* **2002**, 106(16), 4245-4254.
- [22] Bittermann A. G., Jacobi, S., Chi, L. F., Fuchs, H. und Reichelt R., *Langmuir* **2001**, 17(6), 1872-1877.
- [23] Taborelli P., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, 354(777-781).
- [24] Roskamp R. F., Diplomarbeit, **2006**.
- [25] Poglisch C. L., Sumner, M.T., Thompson, N. L., *Biochemistry* **1991**, 30, 6662-6671.
- [26] Costello R. F., Peterson, I. R., Heptinstall, J., Byrne, N. G., Miller, L., *Adv. Mater. Opt. Electron.* **1998**, 8, 47-52.
- [27] Cornell B.A., Braach Maksvytis, V.L.B. King, L.G. Osman, P.D.J. Raguse, B. Wiczorek, L. Pace, *Nature* **1997**, 387(6633), 580-583.
- [28] Terrettaz S, Mayer, M., und Vogel, H., *Langmuir* **2003**, 19(14), 5567-5569.
- [29] Schiller S, Naumann, R., lovejoy, K. und Knoll, W., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2003**, 225, U539-U540.
- [30] Schiller S, Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H., und Knoll, W., *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42(2), 208.
- [31] Atanasov V, Knorr, N., Duran, R.S., Ingebrandt, S., Offenhausser, A., Knoll, W., und Köper, I., *Biophysical Journal* **2005**, 89(3), 1780-1788.
- [32] Knoll W., C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhäusser, J. Rühle, E. K. Schmidt, W. W. Shen, A. Sinner, *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, 74(3), 137-158.
- [33] Abraham K., Ulman, Yitzhak Shnidman, Sheng Liao, Rainer Jordan, Gun-Young Choi, Julien Zaccaro, Allan S. Myerson, Miriam Rafailovich, Jonathan Sokolov, Cathy Fleischer, *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, 74(3), 175-188.
- [34] Vockenroth I, Ohm, C., Robertson, J.W.F., McGillivray, D.J., Lösche, M. und Köper I., *Biointerphases* **2008**, 3, FA 68-73.
- [35] Cornell B. A., Braach Maksvytis, King B., Osman P.D., Wiczorek, L., Pace, R.J., *Nature* **1997**, 387, 580-583.
- [36] Raguse B, Braach-Maksvytis, V., Cornell, B. A., King, L. G., Osman, P. D. J., Pace, R. J., Wiczorek, L., *Langmuir* **1998**, 14, 648-659.
- [37] Pace R. J., Braach-Maksvytis, V.M.B., King L., Osman, P., Raguse, B., Wiczorek, L., Cornell, B.A., *SPIE* **1998**, 3270, 50-58.
- [38] Krishna G., Schulte, J., Cornell, B.A., Pace, R.J., Wiczorek, L., Osman, P.D., *Langmuir* **2001**, 17(16), 4858-4866.

- [39] Krishna G., Schulte, J., Cornell, B.A., Pace, R.J., Osman, P.D., *Langmuir* **2003**, *19*, 2294-2305.
- [40] Beckey H. D., *Journal of Physics* **1979**(12), 72.
- [41] www.postech.ac.kr/chem/poly/research (2009).
- [42] Schiller S., Doktorarbeit, **2008**.
- [43] www.kruss.info/techniques/contact_angle.de (2009).
- [44] wikipedia.org.
- [45] Cornell B. A., L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek & R. J. Pace, *Nature* **1997**, *384*(6633), 580-583.
- [46] Schmickler W., *Grundlagen der Elektrochemie*, Vieweg, Braunschweig, **1996**.
- [47] MacDonald R. J., *Impedance Spectroscopy*, New York, **1997**.
- [48] Vockenroth I, Dissertation (Mainz), **2007**.
- [49] Kirste V.U., Doktorarbeit, **2007**.
- [50] Appel R., *Angewandte Chemie-International Edition* **1975**, *14*(12), 801-811.
- [51] Williamson A, *Journal of Chemical Society* **1852**, *4*, 229.
- [52] Neises B., Steglich, W., *Angewandte Chemie* **1978**, *90*, 556-557.
- [53] Neises B., Steglich, W., *Angewandte Chemie-International Edition* **1978**, *17*(7), 522-524.
- [54] Dhimitruke I., SantaLucia, J., Jr., *Organic Letters* **2006**, *8*(1), 47-50.
- [55] <http://www.organische-chemie.ch/OC/Namen/yamaguchi-veresterung.htm>, Yamaguchi-Veresterung (2009).
- [56] Tecilla P., Dixon, R.P., Slobodkin, G., Alavi, D. S., Waldeck, D. H. und Hamilton, A. D., *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*(25), 9408-9410.
- [57] Lindsey J. S., *New Journal of Chemistry* **1991**, *15*(2-3), 153-180.
- [58] Schreiber F., *Progress in Surface Science* **2000**, *65*(5-8), 151-256.
- [59] Buboltz, J.T.; Feigenson, G.W., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes* **1999**, *1417*(2), 232-245.
- [60] Butt H.-J., Müller, T. und Gross, H., *Journal of structural biology* **1993**, *110*, 127-132.
- [61] Miller C., Cuendet, P., Gratzel, M., *Journal of Electrochemical Chemistry* **1990**, *278*, 175-192.
- [62] Raguse B., Braach-Maksvytis, V., Cornell, B. A., King, L. G., Osman, P. D. J., Pace, R. J., Wiczorek, L., *Langmuir* **1998**, *14*, 648.

- [63] Kim, S. M., Koh, E., Miyashita, Y., Ogihara, T., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**, *164*, 1003.
- [64] Atanasov V, Atanasova P., Vockenroth I., Knorr, N. und Köper, I., *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 631-637.