

**Modulation der Helix-Bündel-Bildung  
eines Bipyridin-funktionalisierten  
peptidischen Ionenkanals  
durch Komplexierung von Ni(II)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
Claudia Sabine Pilz  
aus Regensburg

2007



Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Prof. Dr. Claudia Steinem in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2006 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg und in der Zeit von April 2006 bis Juli 2007 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Fakultät für Chemie der Georg-August-Universität, Göttingen.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im September 2007.

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Oktober 2007

1. Prüfer:	Prof. Dr. C. Steinem
2. Prüfer:	Prof. Dr. W. Kunz
3. Prüfer:	Prof. Dr. B. Dick
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. M. Liefländer



## ***Meinen Eltern***



**Abstract.** The aim of this study was to develop a new detection scheme based on a ligand (analyte)-induced control of the assembly of amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. The concept was based on a peptidic ion channel functionalised with a receptor moiety which allows for binding of the analyte. The peptide  $\text{H}_2\text{N}-(\text{LSSLLSL})_3\text{-CONH}_2$  (LS3) which is known to form ion channels after insertion into lipid bilayers in presence of a transmembrane voltage served as peptide component. The ligand-receptor interaction was based on the complexation of  $\text{Ni}^{2+}$  with a bipyridine moiety (bpy\*) which was covalently linked to the *N*-terminus of the peptide via a carboxy-terminated spacer.

Successful complex formation of the receptor-functionalized peptide bpy\*-LS3 in presence of  $\text{Ni}^{2+}$  was demonstrated by UV/Vis-spectroscopy. Complexation of the receptor moiety itself was also investigated by means of UV/Vis-spectroscopy, revealing that the complex formation is kinetically retarded in presence of micelles and vesicles, which indicates a strong interaction of the receptor moiety with the hydrophobic phase.

The ion channel characteristic of the receptor-functionalized peptide bpy\*-LS3 in absence and presence of  $\text{Ni}^{2+}$  and of the peptide component LS3 were investigated in two different artificial model membranes, namely classical black lipid membranes (BLMs) and nano-BLMs, which suspend the pores of porous aluminium oxide.

In classical BLMs the receptor-functionalized peptide bpy\*-LS3 acted similar to a detergent. This was ascribed to a destabilisation of the membrane due to the penetration of the receptor moiety across the membrane. After incorporation into the more robust nano-BLMs, bpy\*-LS3 exhibited four conductance states of  $(134 \pm 20)$  pS,  $(181 \pm 15)$  pS,  $(225 \pm 27)$  pS and  $(373 \pm 63)$  pS at a membrane voltage of +200 mV in 0.5 M KCl. The open time distribution of the channels formed by bpy\*-LS3 was described by a triple exponential decay function with three mean open lifetimes of  $(3.6 \pm 0.2)$  ms,  $(15.1 \pm 0.6)$  ms and  $(63 \pm 4)$  ms which showed no dependency on the conductance state. This was attributed to three different helix bundle populations, which vary in their orientations of the receptor moieties. In presence of 2.5 – 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  modulations of the channel characteristics were observed. On the one hand, the probability to find channels in higher conductance states was decreased. Since complexed peptides are supposed to repel each other due to the charged metal ion, this leads to a decreasing number of peptides in the membrane, which are able to assemble in helix bundles. On the other hand, there was a decrease in long lasting channel events which indicates that these are results from bundles composed of peptides where the majority of receptor moieties protrudes from the lipid bilayer surface into the water phase.

In conclusion, it was demonstrated that complex formation of a bipyridine moiety attached to an amphipathic peptide by  $\text{Ni}^{2+}$  alters the assembly process of helix bundles. The developed concept might provide new prospects to tailored sensor schemes.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Membranen .....	1
1.1.1	Biologische Membranen .....	1
1.1.2	Artifizielle Membransysteme .....	2
1.2	Ionenkanäle und ihr Einsatz als Biosensoren .....	10
1.3	Das Peptid LS3 .....	17
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Synthese</b> .....	<b>23</b>
3.1	Synthese des Peptids LS3 .....	23
3.1.1	Syntheseplanung .....	23
3.1.2	Durchführung .....	25
3.2	Synthese der Rezeptorfunktion bpy* .....	30
3.2.1	Syntheseplanung .....	30
3.2.2	Durchführung .....	30
3.3	Synthese des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy*-LS3 .....	33
3.3.1	Syntheseplanung .....	33
3.3.2	Durchführung .....	33
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>35</b>
4.1	UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie .....	35
4.1.1	Grundlagen .....	35
4.1.2	UV-spektroskopische Untersuchungen .....	37
4.1.2.1	Nachweis der Komplexierung von bpy* und bpy*-LS3 mit Ni(II) .....	38

4.1.2.2	Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von Ni(II)-bpy*-Komplexen in Ethanol und Mizellen.....	38
4.1.2.3	Kinetik der Komplexierung von bpy* mit Ni(II) in Mizellen und Vesikeln.....	39
4.1.3	<i>release</i> -Messungen mit 5(6)-Carboxyfluorescein.....	39
4.1.3.1	Versuchsbeschreibung.....	39
4.1.3.2	Durchführung.....	40
4.2	Impedanzspektroskopie.....	42
4.2.1	Physikalische Grundlagen.....	42
4.2.2	Darstellung von Impedanzspektren.....	42
4.2.3	Auswertung der Spektren.....	44
4.2.4	Elektrische Beschreibung von nano-BLMs.....	45
4.2.5	Experimenteller Teil.....	45
4.3	Einzelkanalmessungen.....	47
4.3.1	Die <i>Voltage Clamp</i> -Technik.....	47
4.3.2	Experimenteller Teil.....	48
4.3.2.1	Messaufbau und allgemeine Bedingungen.....	48
4.3.2.2	Einzelkanalmessungen an klassischen BLMs.....	49
4.3.2.3	Einzelkanalmessungen an nano-BLMs.....	50
4.3.2.4	Einzelkanalmessungen an nano-BLMs in Gegenwart von Ni(II).....	50
4.4	Präparative Methoden.....	51
4.4.1	Herstellung poröser Aluminate.....	51
4.4.1.1	Grundlagen der Herstellung.....	51
4.4.1.2	Präparative Vorgehensweise.....	54
4.4.2	Präparation von nano-BLMs.....	56
4.4.3	Präparation von klassischen BLMs.....	56
4.4.4	Herstellung von Ag/AgCl-Elektroden.....	56
4.4.5	Vesikelpräparation.....	57

## **5 Ergebnisse.....59**

5.1	Untersuchungen zur Komplexierung.....	59
5.1.1	Nachweis der Komplexierung von bpy*-LS3 mit Ni(II).....	59

5.1.2	Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von Ni(II)-bpy*-Komplexen in Ethanol und Mizellen .....	60
5.1.3	Kinetik der Komplexbildung von bpy* mit Ni(II) in Mizellen und Vesikeln .....	64
5.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Membranen .....	70
5.3	Bildung von nano-BLMs .....	73
5.4	Einzelkanalmessungen .....	75
5.4.1	Charakterisierung der Kanaleigenschaften des Peptids LS3 .....	75
5.4.1.1	LS3 in klassischen BLMs .....	75
5.4.1.2	LS3 in nano-BLMs .....	79
5.4.2	Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptor-funktionalisierten Peptids bpy*-LS3 .....	94
5.4.2.1	bpy*-LS3 in klassischen BLMs .....	94
5.4.2.2	bpy*-LS3 in nano-BLMs .....	96
5.4.3	Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptor-funktionalisierten Peptids bpy*-LS3 in Gegenwart von Ni <sup>2+</sup> .....	106

## **6 Diskussion .....** **119**

6.1	Untersuchungen zur Komplexbildung .....	119
6.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Membranen .....	127
6.3	Bildung von nano-BLMs .....	128
6.4	Kanaleigenschaften des Peptids LS3 .....	130
6.4.1	LS3 in klassischen BLMs .....	130
6.4.2	LS3 in nano-BLMs .....	133
6.5	Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy*-LS3 .....	143
6.5.1	bpy*-LS3 in klassischen BLMs .....	143
6.5.2	bpy*-LS3 in nano-BLMs .....	145
6.6	Modulation der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy*-LS3 in Gegenwart von Ni(II) .....	149

## **7 Zusammenfassung .....** **159**

## **8 Literaturverzeichnis..... 161**

## **A Anhang..... 173**

A.1	Spektren .....	173
A.1.1	Synthese des Peptids LS3 .....	173
A.1.2	Synthese der Rezeptorfunktion bpy* .....	176
A.1.3	Synthese des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy*-LS3 .....	181
A.2	Zusätzliche Tabellen.....	183
A.3	Symbolverzeichnis.....	184
A.4	Abkürzungsverzeichnis .....	185
A.5	Chemikalien.....	187
A.6	Materialien.....	189
A.7	Geräte .....	189

# 1 Einleitung

## 1.1 Membranen

### 1.1.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen umgeben alle lebenden Zellen und grenzen sie somit von ihrer Umgebung und anderen Zellen ab. Innerhalb eukaryotischer Zellen bilden sie auch physiologische Kompartimente, wodurch Prozesse und Zellbestandteile voneinander getrennt sind. Die Hauptbestandteile biologischer Membranen sind Lipide, Proteine und in tierischen Zellen Cholesterin. Lipide sind amphipatische Moleküle mit einer polaren Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Sie bilden in wässrigen Medien spontan geschlossene bimolekulare Schichten aus, um die Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Ketten und der wässrigen Phase zu minimieren<sup>1, 2</sup>.

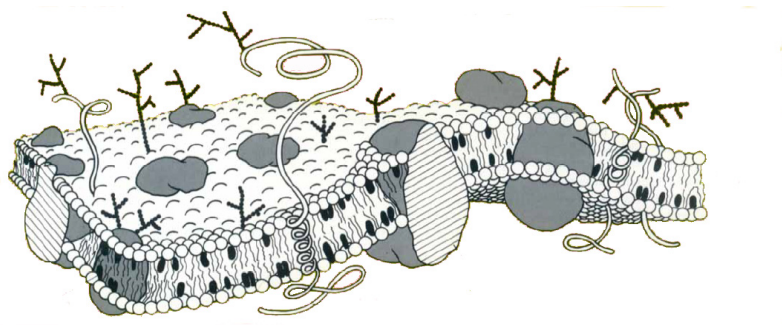


Abb. 1.1: Das *fluid mosaic Modell* nach Singer und Nicolson<sup>3</sup>.

Die Struktur biologischer Membranen kann mit dem sogenannten *fluid mosaic Modell* nach Singer und Nicolson<sup>3, 4</sup> beschrieben werden (Abb. 1.1). Die Lipiddoppelschicht wird demnach als zweidimensionale Flüssigkeit verstanden. In die Lipidmatrix sind *integrale Membranproteine* eingebettet. Sie stehen in hydrophoben Wechselwirkungen mit den Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Membran und können sich in der Membran lateral bewegen. Fast alle integralen Proteine sind *Transmembranproteine*, welche die Lipiddoppelschicht vollständig

durchspannen. *Periphere Proteine* sind über polare Wechselwirkungen an die Membranaußenseite gebunden<sup>1,2</sup>.

Die primäre Funktion einer biologischen Membran ist die Einschränkung der Permeabilität für wasserlösliche Substanzen. Besondere Membranfunktionen wie Transport, Kommunikation und Energieübertragung werden durch spezifische Proteine vermittelt. Der Fluss von Ionen oder polaren Molekülen durch biologische Membranen wird durch zwei Klassen von Transmembranproteinen kontrolliert, den *Kanälen* und den *Pumpen*. Kanäle ermöglichen den Fluss von Ionen durch die Membran entlang ihres elektrochemischen Gradienten (*passiver Transport*), während Pumpen Ionen entgegen des Konzentrationsgefälles unter Nutzung energiereicher Bindungen, von Redoxenergie oder von Sonnenlicht transportieren können (*aktiver Transport*)<sup>1,2</sup>.

### 1.1.2 Artificielle Membransysteme

Biologische Membranen sind komplex aufgebaute Vielteilchensysteme. Zur gezielten Untersuchung einzelner Membranprozesse bedient man sich daher meist artifizieller Systeme, die aus definierten Lipiden oder Lipidgemischen hergestellt werden können. Je nach Wahl der Präparationsmethode können unterschiedliche Doppelschichtsysteme erzeugt werden:

**Vesikel** Zwei Überstrukturen, die in wässrigen Medien gebildet werden können sind die Mizelle und der Vesikel. Durch das Dispergieren von Lipiden in Wasser bilden sich multilamellare Vesikel aus, die aus sphärisch angeordneten Lipiddoppelschichten bestehen (Abb. 1.2a). Diese können unter Einsatz von hochfrequenten Schallwellen oder durch die *Extrusionsmethode* nach MacDonald<sup>5</sup> in unilamellare Vesikel überführt werden (Abb. 1.2b). Bei letzterer wird eine Suspension multilamellarer Vesikel mehrere Male durch eine Polycarbonatmembran gepresst. Der Durchmesser der entstandenen unilamellaren Vesikel entspricht dem der Membranporen. Negativ geladene Lipide oder Lipidmischungen mit einem negativ geladenen Lipid bilden aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Lipiddoppelschichten beim Dispergieren in Wasser direkt unilamellare Vesikel aus<sup>6</sup>.

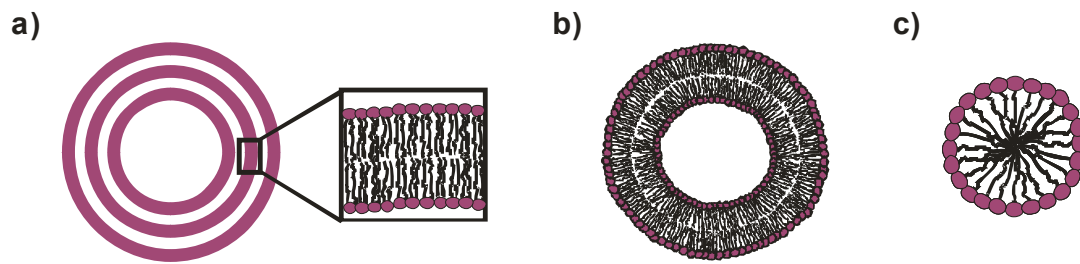


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Querschnitts a) eines multilamellaren Vesikels, b) eines unilamellaren Vesikels und c) einer Mizelle.

Bei der Mizellbildung ordnen sich die Lipide zu einer Kugel an. Hierbei wird die Kugeloberfläche von den polaren Kopfgruppen gebildet, während die hydrophoben Ketten im Inneren der Kugel von der wässrigen Phase abgeschirmt werden (Abb. 1.2c). Ob ein Lipid in wässriger Lösung eine Mizelle oder einen Vesikel bildet, hängt vom Verhältnis der Kopfgruppenfläche zur Länge der Fettsäureketten ab<sup>7</sup>. Häufig werden Mizellen von Lipiden mit nur einer Fettsäurekette ausgebildet.

**Festkörperunterstützte Membranen** In diesem Modellsystem wird ein Substrat mit einer Lipiddoppelschicht oder –monoschicht belegt. Die resultierenden festkörperunterstützten Membranen (*solid supported membranes*, SSMs) besitzen eine hohe Stabilität und bieten die Möglichkeit oberflächensensitive Methoden zur Untersuchung einzusetzen<sup>8</sup>. Besonders häufig werden festkörperunterstützte Membranen mittels Rasterkraftmikroskopie<sup>9</sup>, Quarzmikrowaage-technik<sup>10</sup> und Impedanzspektroskopie<sup>11</sup> untersucht.

Die Präparation von Lipiddoppelschichten kann durch Spreiten von Vesikeln<sup>12</sup> oder die *Langmuir-Blodgett-Technik*<sup>13, 14</sup> erfolgen. Im Fall der Langmuir-Blodgett-Technik werden Lipide auf einer Wasseroberfläche gespreitet. Anschließend wird ein hydrophiles Substrat bei konstantem Oberflächendruck vertikal aus dem Wasser bewegt, wobei die Lipide mit der hydrophilen Kopfgruppe am Substrat haften bleiben. Auf dieser damit hydrophoben Oberfläche kann durch erneutes Eintauchen eine zweite Monoschicht abgeschieden werden. Die Lipide lagern sich in diesem Präparationsschritt mit den hydrophoben Alkylketten an der ersten Monoschicht an und es entsteht eine Lipiddoppelschicht. Die Abscheidung der zweiten Monoschicht gelingt jedoch nur unter Verwendung spezieller Lipide, wie z. B. negativ geladene Phosphatidsäure in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder Phosphatidylethanolaminen mit gesättigten Fettsäuren<sup>14</sup>. Die alternative *Langmuir-Schäfer-Technik* ähnelt prinzipiell der eben beschriebenen Methode<sup>15</sup>. Jedoch wird das hydrophobe Substrat

zur Ausbildung der zweiten Monoschicht horizontal auf die Wasseroberfläche mit den amphiphilen Molekülen gelegt und dann durch die Wasseroberfläche in Wasser gestoßen.

Eine weitere Möglichkeit, eine erste hydrophobe Monoschicht auf einem Festkörper aufzubauen, besteht in der Chemisorption und Selbstorganisation von Thiolipiden oder Alkanthiolen auf Goldoberflächen. Die zweite Monoschicht kann durch das Spreiten von Vesikeln erfolgen oder wie bei den sogenannten *painted membranes*<sup>16</sup> durch Aufbringen einer Lösung des Lipids in *n*-Dekan auf die trockene Substratoberfläche. Durch Zugabe einer wässrigen Lösung bildet sich spontan eine Doppelschicht aus. Bei der *Detergenz-Verdünnungs-Methode* wird die zweite Monoschicht durch Zugabe einer mizellaren Lipid-Detergenz-Lösung erzielt<sup>17</sup>. Durch mehrmaligen Austausch eines Teils der Lösung gegen Wasser oder Puffer kommt es zur Ausbildung einer Doppelschicht.

Festkörperunterstützte Membranen weisen aufgrund der Nähe zum unterstützenden Substrat eine hohe Stabilität auf, jedoch bringt diese Nähe auch einige Nachteile mit sich. Zum einen ist die Mobilität der unteren Monoschicht eingeschränkt. Dies gilt im besonderen Maße, wenn sie durch Chemisorption quasi-kovalent an den Festkörper gebunden ist. Außerdem stellt der geringe Abstand zwischen Substrat und Lipiddoppelschicht ein sterisches Hindernis für den Einbau von Proteinen und Peptiden in die Membran dar. Dieses Problem kann durch das Einfügen von sogenannten *Ankermolekülen* zwischen der Membran und dem Festkörper gelöst werden<sup>18-20</sup>. Die Anker-moleküle besitzen einen hydrophilen Teil, der über Chemisorption an die Oberfläche des Festkörpers gebunden wird und einen hydrophoben Teil, der in die Lipidmembran insertiert und sie so an die Oberfläche bindet. Durch den hydrophilen Teil wird ein wässriges Reservoir zwischen dem Festkörper und der Membran gebildet, dessen Größe durch die Länge des *spacer*-Segments variiert werden kann. In der Literatur werden solche Membranen als *tethered black lipid membranes* (tBLMs) bezeichnet. Vogel et al. stellten als erste das Konzept der tBLMs vor. Sie synthetisierten sogenannte Thiolipide mit einer Kopfgruppe bestehend aus ein bis drei Ethylenglycol-Einheiten, die als hydrophober *spacer* dienen, und einer endständigen Thiolgruppe zur Anbindung an Goldoberflächen<sup>21</sup>.



**Black Lipid Membranes** Ein weiteres etabliertes Modellsystem sind die sogenannten *black lipid membranes* (BLMs). Sie werden im besonderen Maße zur Charakterisierung von Transportprozessen von Ionenkanälen oder –pumpen im Zuge von Einzelkanalmessungen genutzt. BLMs sind planare, freitragende Lipiddoppelschichten, die ein kleines Loch in einer Plastikwand überspannen und so zwei wässrige Kompartimente voneinander trennen.

Zur Herstellung einer BLM wird eine Kammer aus hydrophobem und chemisch inertem Plastik, wie z. B. Teflon, Polystyrol oder Delrin, verwendet. Die Kammer enthält zwei mit wässriger Lösung gefüllte Kompartimente, die über ein kleines Loch mit einem Durchmesser von 0.1 – 2.0 mm in einer dünnwandigen Trennwand miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 4.8b)<sup>22</sup>. Die Bildung einer BLM kann im Falle der *Müller-Rudin-Methode*<sup>23-26</sup> durch Aufpinseln eines winzigen Tropfens einer Lösung von Lipid in einem unpolaren, nichtflüchtigen Lösungsmittel wie z. B. *n*-Dekan erfolgen. Der Lipidtropfen dünnt spontan aus und es kommt zur Bildung einer Lipiddoppelschicht. Während des Ausdünnpzesses wandern Lipidmoleküle zusammen mit dem Lösungsmittel zur *Plateau-Gibbs-Grenze*, welche die Lipiddoppelschicht mit der Plastikwand verbindet und als Torus um die BLM erscheint (Abb. 1.3). Die BLM-Bildung kann optisch verfolgt werden. Der aufgebrauchte Lipid-Lösungsmittel-Tropfen erscheint bei Beleuchtung grau. Während der Lipidtropfen ausdünnt, schillert die Lipidphase in Regenbogenfarben. Die entstandene Lipiddoppelschicht erscheint schließlich schwarz, da sie mit einer Schichtdicke von 4 – 6 nm für Licht im sichtbaren Bereich destruktive Interferenz verursacht. Aus dieser Beobachtung begründet sich auch der Name<sup>22</sup>.

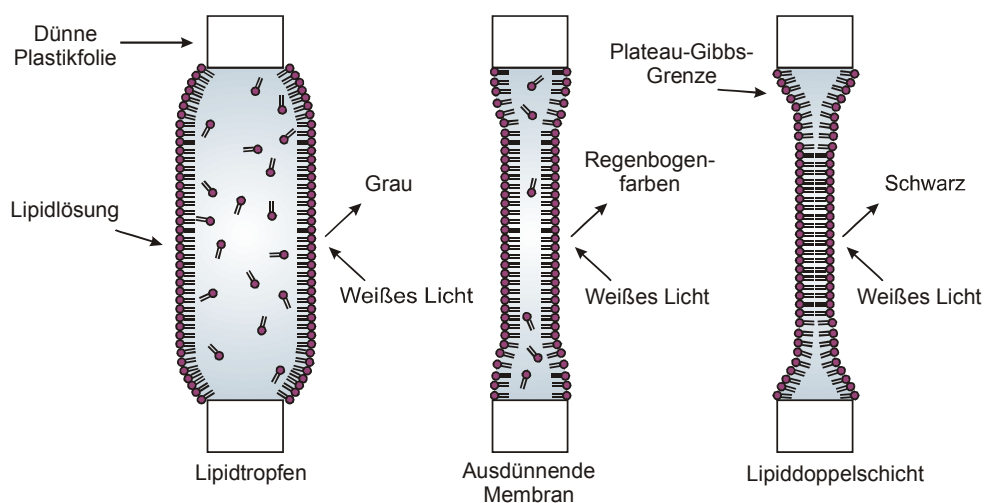


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der BLM-Bildung nach Müller-Rudin.

Alternativ kann eine freitragende Membran nach der *Montal-Müller-Methode* hergestellt werden<sup>24-28</sup>. Hierzu werden die beiden Kompartimente der BLM-Kammer bis knapp unter das Loch mit einer wässrigen Lösung befüllt. Nun wird eine Lösung eines Lipids in einem leichtflüchtigen Lösungsmittel wie z. B. Hexan auf den beiden Oberflächen gespreitet. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet ist und sich ein monomolekularer Lipidfilm auf der Oberfläche gebildet hat, werden die Flüssigkeitsspiegel in beiden Kammerhälften bis über das Loch angehoben. Auf diese Weise werden beide Seiten des Lochs mit monomolekularen Lipidfilmen überspannt, die sich zu einer Lipiddoppelschicht vereinen. Diese Methode bietet unter anderem die Möglichkeit asymmetrische Membranen zu erzeugen<sup>24, 29</sup> und den Vorteil, dass die resultierenden Membranen im Gegensatz zu den nach der *Müller-Rudin-Methode* erzeugten Membranen lösungsmittelfrei sind<sup>27</sup>.

Um klassische BLMs zum Einsatz in der Sensortechnik zu miniaturisieren und zu automatisieren, wurden in den letzten Jahren auch Substrate entwickelt, auf denen klassische BLMs über einer mikrostrukturierten Öffnung in z. B. Glas oder Silizium gebildet werden<sup>30-39</sup>. Fertig et al. benutzten beispielsweise Glas als Substrat, in das mittels der *single ion track*-Technik ein 1 – 10 µm großes Loch gefertigt wurde<sup>30-33</sup>. Diese Erfindung wird nun routinemäßig in kommerziell erhältlichen Instrumenten zur automatisierten Untersuchung elektrophysiologischer Prozesse eingesetzt. Neben Glas wurde auch häufig Silizium als Substrat verwendet.

BLMs bieten gegenüber festkörperunterstützten Membranen den Vorteil, dass die Lipiddoppelschicht auf beiden Seiten an ein wässriges Medium grenzt und beide Kompartimente gut zugänglich sind. Der Einbau von Transmembranproteinen und peptidischen Ionenkanälen kann leicht realisiert werden. Ein großer Nachteil der BLMs ist jedoch ihre mangelnde Langzeitstabilität, die typischerweise lediglich einige Stunden beträgt, und die Anfälligkeit gegenüber mechanischen Störungen.

***Porenüberspannende Membranen*** Sowohl festkörperunterstützte als auch freitragende Membranen bieten große Vorteile zur Untersuchung membrangekoppelter Prozesse. Sie sind jedoch durch die Nachteile des Fehlens eines zweiten wässrigen Kompartiments bzw. die mangelnde Langzeitstabilität in ihrer jeweiligen Anwendung begrenzt. Um die Vorteile beider Modellsysteme zu vereinen und die jeweiligen Nachteile zu überwinden, wurde das relativ neue System der

porenüberspannenden Lipidmembranen entwickelt. Dabei überspannen Lipidmembranen die Poren eines porösen Substrats. Diese artifiziellen Membranen werden zum einen von den Stegen zwischen den Poren getragen, so dass dem gesamten System Stabilität verliehen wird. Zum anderen werden die Poren von freitragenden Lipiddoppelschichten überspannt, die zu beiden Seiten an ein wässriges Kompartiment grenzen. Die auf den Porenstegen verankerten Membranbereiche können als SSMS angesehen werden, die porenüberspannenden Bereiche als BLMs. Aufgrund der beschriebenen Vorteile besitzen porenüberspannende Membranen verglichen zu klassischen BLMs das Potential, ein breites Anwendungsgebiet in der auf Membranen basierenden Biosensorik zu finden.

Favero et al. nutzten poröse Polycarbonatfolien als Substrate zur Herstellung porenüberspannender Membranen<sup>40, 41</sup>. Sie werden mit unterschiedlichen Porengößen kommerziell vertrieben. Zur Membranbildung wurden die mit Gold beschichteten Polycarbonatfolien zunächst mit Octadekanthiol hydrophobisiert, woraufhin eine Lipidlösung in *n*-Dekan aufgebracht wurde. Die Gruppe beobachtete in diesen Membranen die Aktivität des peptidischen Ionenkanals Gramicidin und des Ionophors Valinomycin. Des weiteren gelang ihnen durch Einbau eines ionotropen Glutamatrezeptors die Detektion von Glutamat. Die porenüberspannenden Membranen waren so stabil, dass sie in einer Durchflusskammer, in der die Lösungen auf beiden Membranseiten ausgetauscht wurden, eingesetzt werden konnten.

Steinem et al. verwendeten poröse Aluminate als Substrat<sup>42-45</sup>. Nanoporöse Aluminiumsubstrate können durch Anodisierung von Aluminium hergestellt werden. Der Porendurchmesser kann dabei durch die Anodisierungsbedingungen variiert werden (vgl. 4.4.1). Die durch das Ätzverfahren hergestellten Poren sind nach unten hin geschlossen, lassen sich aber durch Ablösen der Porenböden leicht öffnen. Abb. 1.4 zeigt die hochgeordnete siebartige Struktur von porösem Aluminat mit Porendurchmessern von 60 nm.

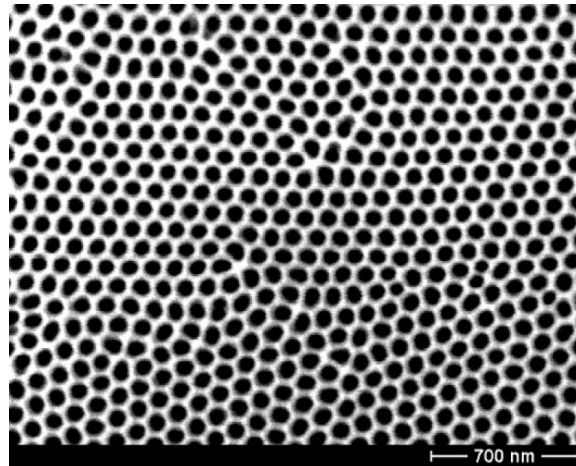


Abb. 1.4: SEM-Aufnahme von porösem Aluminat mit 60 nm Porendurchmesser<sup>46</sup>.

Membranen, die über Vesikelfusion hergestellt wurden, konnten mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden. Sie waren jedoch wegen des zu geringen Membranwiderstandes nicht geeignet, um im Zuge von Einzelkanalmessungen den Stromfluss durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Durch die Präparation lösungsmittelhaltiger Membranen wurde dies jedoch ermöglicht. Dazu wurde die Oberfläche des Aluminats mit Gold beschichtet und durch Chemisorption von Thiolipiden hydrophobisiert. In Anlehnung an die *Müller-Rudin-Methode* zur Herstellung klassischer BLMs konnten porenüberspannende Membranen erzeugt werden (Abb. 1.5)<sup>45, 46</sup>.

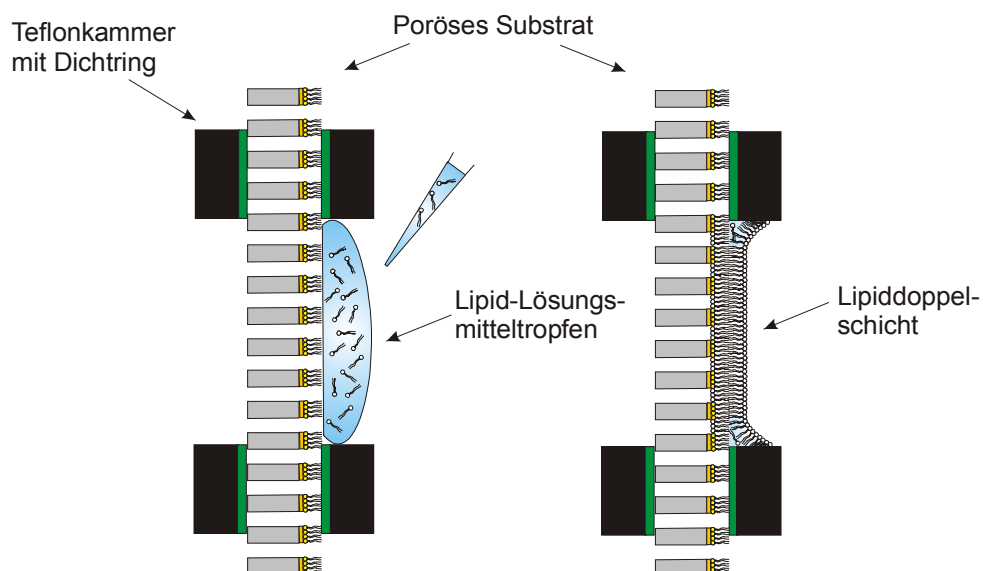


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Bildung von nano-BLMs.

Die auf diese Weise hergestellten Membranen werden in Anlehnung an ihre Vorläufer und die Dimensionen der Poren *nano-BLMs* genannt. Sie zeichnen sich durch eine hohe Langzeitstabilität und Membranwiderstände im  $G\Omega$ -Bereich aus. So

konnten Einzelkanalereignisse der antibiotischen Peptidkanäle Gramicidin und Alamethicin detektiert werden<sup>45, 46</sup>. Ebenso war die Untersuchung großer, komplex aufgebauter Membranproteine mittels nano-BLMs möglich. So konnte die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin an diesem Membransystem nachgewiesen werden<sup>47, 48</sup>. Außerdem gelang es, das komplex aufgebaute Membranprotein OmpF aus *Escherichia coli* erfolgreich in nano-BLMs zu rekonstituieren und seine Kanalaktivität zu charakterisieren<sup>49, 50</sup>.

## 1.2 Ionenkanäle und ihr Einsatz als Biosensoren

Ionenkanäle sind entscheidend an biologischen Schlüsselprozessen wie der Weiterleitung von Nervenimpulsen, der hormonellen Regulierung von Zellprozessen, dem Sehprozess und der Muskelkontraktion beteiligt. Sie umfassen eine facettenreiche Klasse von Molekülen, die sich von kleinen Peptiden mit weitgehend unregulierter Kanalaktivität bis zu großen Proteinen erstreckt, deren Funktion durch regulatorische Faktoren oder Signalmechanismen genau kontrolliert ist. Ihre gemeinsame Eigenschaft ist die Fähigkeit, eine hydrophile Pore auszubilden, die den Durchtritt von Ionen oder kleinen polaren Molekülen durch die ansonsten für diese Teilchen praktisch impermeable Zellmembran ermöglicht. Die Anzahl an Membranproteinen, für die Strukturinformationen in atomarer Auflösung vorhanden sind, nimmt stetig zu. Diese zeigen, dass bis zum heutigen Stand der Erkenntnisse die Pore durch  $\alpha$ -helicale Bündel (z. B. nicotinischer Acetylcholinrezeptor<sup>51</sup>) oder  $\beta$ -Faß-Strukturen (z. B. Porine<sup>52</sup>) gebildet wird, wobei erstere dominieren<sup>53, 54</sup>. Die Pore wird charakterisiert durch die Leitfähigkeit, also die Effizienz des Ionenflusses und die Ionenselektivität. Die Leitfähigkeit ist von der Porengröße, der Porenlänge und der Dielektrizitätskonstante in der Pore abhängig. Die Ionenselektivität wird unter anderem durch die Porengröße, die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ionen und den porenbildenden Aminosäureresten sowie der Dehydratisierungsenergie der Ionen bestimmt<sup>55</sup>. Die Aktivität von Ionenkanälen kann durch eine Reihe chemischer und physikalischer Faktoren beeinflusst werden. Entsprechend der Art der Regulierung spricht man von spannungsabhängigen Kanälen (z. B. Na<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Kanal<sup>53, 56</sup>), Liganden-operierten Kanälen (z. B. nicotinischer Acetylcholinrezeptor-Kanal<sup>51</sup>) oder mechanosensitiven Kanälen<sup>57</sup>.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, einen selektiven und regulierbaren Weg in einer Zelle auszubilden zu können, sind Ionenkanäle in vielen biotechnologischen Prozessen von besonderem Interesse. Dazu zählen z. B. die Kontrolle des Signalflusses zwischen Zellen und die gezielte Einschleusung pharmakologischer Wirkstoffe in Zellen. Ionenkanäle fanden bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht so umfangreich Anwendung als

Biosensoren wie Enzyme, Antikörper und Nukleinsäuren<sup>58</sup>. Dies liegt zum einen daran, dass die Langzeitstabilität der teilweise komplex aufgebauten Proteine oftmals gering ist. Zum anderen ist es sehr aufwendig maßgeschneiderte Sensorsysteme durch *protein engineering* zu entwickeln. Jedoch wächst das Interesse an Biosensoren, die sich Transportprozesse über Lipidmembranen zu Nutze machen, zumal Liganden- bzw. Analyt-gesteuerte Ionenkanäle eine enorme Signalverstärkung in einem Sensorsystem realisieren würden. In der Natur bewirkt beispielsweise die Anbindung eines einzelnen Ligandmoleküls einen Ionenstrom von  $10^4 - 10^5$  Ionen pro Millisekunde.

Im Folgenden werden einige Beispiele für Ionenkanäle und ihre Anwendung als Biosensoren vorgestellt.

**Alamethicin** Das Peptid Alamethicin ist der bekannteste Vertreter der Peptaibole und wurde erstmals aus dem Pilz *Trichoderma viride* isoliert. Es besitzt eine amphipatische  $\alpha$ -helicale Struktur und bildet durch die Aggregation mehrerer Moleküle spannungsinduziert Ionenkanäle in Membranen. Bedingt durch die Aminosäuresequenz liegen in amphipatischen  $\alpha$ -Helices die polaren Aminosäurereste an der einen Seite der Helix, während die unpolaren Aminosäurereste an der anderen Seite der Helix lokalisiert sind. Durch die Zusammenlagerung mehrerer Helices zu kompakten Bündeln, wobei die unpolaren Aminosäurereste zur Membranseite gerichtet sind und die polaren Aminosäurereste zur Bündelmitte weisen, wird eine hydrophile Pore im Inneren des Helix-Bündels gebildet (Abb. 1.6). Für Alamethicin sind Helix-Bündel-Strukturen mit 4 – 11 Helices pro Bündel bekannt<sup>59,60</sup>.

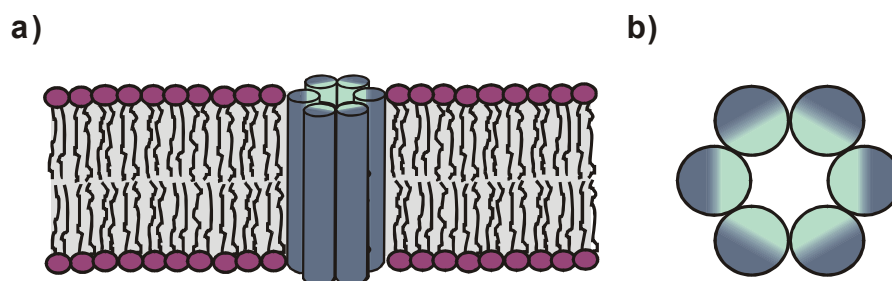


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines Ionenkanals, gebildet durch ein Helix-Bündel. a) In der Lipiddoppelschicht lokalisiertes Helix-Bündel. b) Aufsicht auf ein Helix-Bündel (die hellen Bereiche markieren die polaren Seiten der Helices, die dunklen Bereiche die unpolaren Seiten).

Yin et al. entwickelten ein Sensorsystem basierend auf in tBLMs inkorporierten Alamethicin-Kanälen. Mittels Impedanzspektroskopie konnte so die Wirksamkeit und Konzentration des Diuretikums Amilorid und einiger Derivate durch Blockierung der Alamethicin-Kanäle verfolgt werden<sup>61</sup>.

Parsegian et al. beschreiben eine Methode, mit der die durchschnittliche Anzahl an PEG-Polymeren unterschiedlicher Länge und deren Diffusionskoeffizienten in einem Alamethicin-Kanal ermittelt werden können. Dies beruht auf der Tatsache, dass durch die Diffusion von PEG-Polymeren durch einen Alamethicin-Kanal sowohl die Leitfähigkeit des Kanals, als auch das Rauschen des Signals beeinflusst wird<sup>62</sup>.

**Melittin** Melittin, der Hauptbestandteil von Bienengift, ist ein aus 26 Aminosäuren bestehendes basisches Peptid. Neben der Fähigkeit Ionenkanäle auszubilden, übt es hauptsächlich lytische und fusionierende Effekte auf Membranen aus. Es besitzt wie Alamethicin eine amphipatische  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur. Vier der sechs positiv geladenen Aminosäurereste des Melittins sind an den Position 21 – 24 lokalisiert, also dicht am C-Terminus. In Gegenwart einer Transmembranspannung inseriert Melittin in Lipiddoppelschichten und bildet dort unter speziellen Bedingungen, wie z. B. 5 M NaCl als Elektrolyt, Ionenkanäle mit multiplen Leitfähigkeitsstufen. Meist treten jedoch nur unregelmässige, wenig definierte Stromänderungen auf. Die Durchlässigkeit der Poren ist für Anionen größer als für Kationen, eine Tatsache, die sehr wahrscheinlich aus der Akkumulation positiver Ladungen am C-Terminus resultiert<sup>59, 63</sup>.

Vogel et al. entwickelten basierend auf Melittin einen synthetischen ligandengesteuerten Ionenkanal<sup>64, 65</sup>. Dazu wurden 4 Melittin-Peptide über den N-Terminus kovalent an einen verzweigten Peptidspacer gebunden. Die Bindungsstelle für den Liganden wurde durch Anknüpfung einer NANP-Sequenz an den C-Terminus jedes Melittins erzeugt. Die NANP-Sequenz ist in B-Zellen das Hauptepitop des Circumsporoziten-Proteins des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Der so erzeugte künstliche ligandengesteuerte Ionenkanal wurde über den Peptidspacer auf einer Goldoberfläche fixiert und in eine tBLM inkorporiert. Impedanzspektroskopisch konnte die Blockierung des Melittin-Kanals durch einen gegenüber der NANP-Sequenz spezifischen Antikörper beobachtet werden und die Konzentration des Antikörpers bestimmt werden (Abb. 1.7).



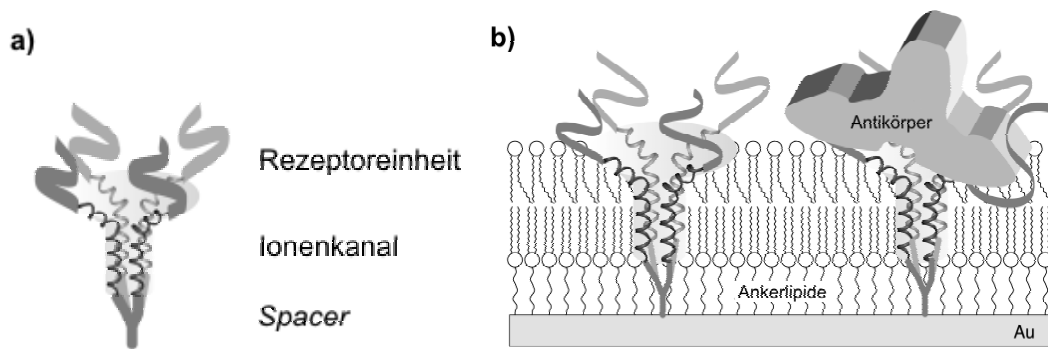


Abb. 1.7: Schematische Darstellung a) des synthetischen liganden-gesteuerten Ionenkanals basierend auf einem Melittin-Kanal und NANP-Sequenzen als Rezeptoreinheit und b) seine Einbindung in eine tBLM und Blockierung durch einen Antikörper<sup>64</sup>.

**Gramicidin** Gramicidin ist ein Peptid-Antibiotikum aus der Kulturflüssigkeit von *Bacillus brevis*. Es besteht aus 15 Aminosäuren und hat verglichen zu der Mehrheit kanalbildender Peptide einige unübliche Eigenschaften. So sind alle Aminosäurereste unpolar, der *N*-Terminus ist formyliert und an den *C*-Terminus ist Ethanolamin angekoppelt. Somit ist das Molekül extrem hydrophob und demzufolge sehr lipidlöslich. Zudem alternieren in der primären Aminosäuresequenz *L*- und *D*-Aminosäuren. Gramicidin bildet daher eine rechtsgängige  $\beta$ -Helix mit 6.3 Aminosäureresten pro Umdrehung. Die hydrophoben Reste zeigen nach außen und wechselwirken mit den Lipiden, wohingegen das Innere der Helix durch die hineinragenden Carbonylsauerstoffatome eine hydrophile Pore darstellt. Ein einzelnes Gramicidin-Molekül kann eine Monoschicht einer Lipidmembran durchspannen. Ionenkanäle, die die komplette Lipidmembran durchspannen, entstehen durch Dimerisierung zweier Gramicidin-Moleküle, welche in den beiden Lipidmonoschichten frei diffundieren. Innerhalb eines Dimers wechselwirken die *N*-Termini der Monomere über sechs intermolekulare H-Brücken. Der Porendurchmesser beträgt ca. 4 Å und erlaubt den Durchtritt von einwertigen Kationen<sup>66,67</sup>.

Cornell et al. nutzten unter Verwendung von auf Gold aufgebracht tBLMs die Dimerisierung von Gramicidin-Molekülen zur Entwicklung eines eleganten Sensorsystems<sup>68-70</sup>. Der *ion channel switch* (ICS)-Biosensor basiert auf mobilen und immobilisierten Gramicidin-Halbkanälen (Abb. 1.8). Der immobilisierte Anteil des Gramicidins ist in der unteren Membranhälfte lokalisiert und auf der Goldoberfläche fixiert. Die mobilen Gramicidin-Monomere befinden sich in der oberen Membranhälfte und sind am *C*-Terminus biotinyliert. Über eine Streptavidin/Biotin-

Brücke sind Antikörper-Fragmente ( $F_{ab}$ ) an die mobilen Gramicidin-Moleküle gebunden. Die Lipiddoppelschicht ist zudem mit einigen die Membran durchspannenden Lipiden versetzt. Diese sind zum einen stationär an der Goldfläche fixiert und tragen zum anderen wiederum über Streptavidin/Biotin-Brücken gebundene  $F_{ab}$ -Fragmente. In Abwesenheit des Analyten diffundiert der mobile Anteil der Gramicidin-Moleküle frei in der oberen Membranhälfte und es kommt immer wieder zur Ausbildung von Ionenkanälen mit den stationär gebundenen Gramicidin-Molekülen in der unteren Membranhälfte. Die Zugabe des Analyten führt zur Verknüpfung der  $F_{ab}$ -Fragmente an den mobilen Gramicidin-Monomeren und den Lipiden. Die gebildeten Komplexe schränken die freie Diffusion der Gramicidin-Moleküle ein, wodurch die Dimerisierung und demnach die Kanalbildung unterbunden wird. Folglich kommt es zu einer Verringerung der Leitfähigkeit der Membran, die impedanzspektroskopisch verfolgt werden kann.

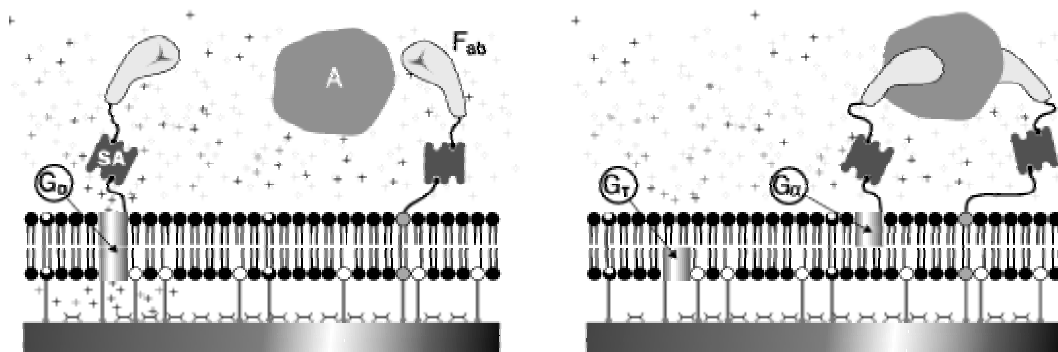


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des *ion channel switch*-Sensors. Immobilisierte ( $G_T$ ) und mobile Gramicidin-Halbkanäle ( $G_\alpha$ ) können einen leitenden Ionenkanal ( $G_D$ ) bilden. Die mobilen Halbkanäle sind biotinyliert und über Streptavidin (SA) sind biotinylierte Antikörper-Fragmente ( $F_{ab}$ ) angebunden. Die Zugabe des Analyten (A) bewirkt eine Verknüpfung der mobilen Gramicidin-Halbkanäle mit  $F_{ab}$ -markierten Lipiden und schränkt ihre Beweglichkeit ein. Folglich sinkt die Leitfähigkeit der Membran<sup>68</sup>.

In einer kompetitiven Version des ICS-Biosensors werden zunächst Komplexe zwischen den Gramicidin-Monomeren in der oberen Membranhälfte und den stationär fixierten Lipiden gebildet, wodurch die Leitfähigkeit der Membran verringert wird. In Gegenwart des Analyten werden die Komplexe aufgelöst, die Gramicidin-Monomere freigesetzt und es kommt aufgrund der nun möglichen Dimerisierung von Gramicidin zu einem Anstieg der Leitfähigkeit. Mittels des ICS-Biosensors konnte eine breitgefächerte Anzahl an Molekülen, wie z. B. Proteine, Hormone, DNA und ganze Zellen detektiert werden<sup>70-72</sup>.

**$\alpha$ -Hemolysin**  $\alpha$ -Hemolysin ( $\alpha$ HL) ist ein wasserlösliches Toxin, das von dem Bakterium *Staphylococcus aureus* abgesondert wird. Es besteht aus 293 Aminosäuren und liegt in Lösung als Monomer vor.  $\alpha$ HL bildet in Lipidmembranen homooligomere Poren, die aus sieben Untereinheiten bestehen. Der effektive Porendurchmesser beträgt 1 – 2 nm und erlaubt den Durchtritt von Molekülen mit Molmassen von bis zu 3000 Da. Bei der Kanalbildung assoziieren zunächst sieben  $\alpha$ HL-Monomere an der Membranoberfläche zum Heptamer. Daraufhin insertieren sieben glycinreiche *loops*, die jeweils die *N*- und *C*-terminale Domäne eines Monomers verbinden und eine 14-strängige  $\beta$ -Fass-Struktur ausbilden, in die Lipiddoppelschicht und es bildet sich eine leitende Pore durch die Membran. Die Kristallstruktur von  $\alpha$ HL in Detergenz zeigte eine pilzförmige Struktur des Heptamers (vgl. Abb. 1.9b). Die Kappe dieser pilzförmigen Struktur wird von den *N*- und *C*-terminalen Dritteln des Polypeptids gebildet, welche zum Großteil eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweisen. Der Transmembranbereich wird von der unteren Hälfte des Stamms gebildet, der aus den glycinreichen *loops* aufgebaut ist. Moleküle, die durch die  $\alpha$ HL-Pore treten, passieren einen 100 Å langen Kanal. Die engste Stelle dieses Kanals wird von der  $\beta$ -Fass-Struktur gebildet und bestimmt die Transportrate durch die Pore. Die  $\alpha$ HL-Pore ist mässig anionenselektiv und die Kanalaktivität ist nicht regulierbar<sup>73, 74</sup>.

Bayley et al. erzeugten durch den Austausch von fünf aufeinanderfolgenden Aminosäuren in der Mitte des glycinreichen *loops* durch Histidin eine Bindungsstelle für Metallionen innerhalb der  $\alpha$ HL-Pore. So konnte die Pore mit  $Zn^{2+}$  blockiert werden und durch Zugabe von EDTA wieder geöffnet werden<sup>75</sup>. Unter Verwendung einer weiteren  $\alpha$ HL-Mutante gelang es ihnen die Konzentration zweier Metallionen simultan zu detektieren<sup>76, 77</sup>.

$\alpha$ HL diente auch als Basis für einen neuartigen Biosensor, der das Potential besitzt ein breites Spektrum an Analyten zu detektieren. Hierbei wurden Cyclodextrine als Adaptermoleküle genutzt. Sie binden in der  $\alpha$ HL-Pore, wobei sie ihre Fähigkeit, spezifische organische Analyten zu binden beibehalten (Abb. 1.9). Die  $\alpha$ HL-Pore besitzt eine konstante Leitfähigkeit, die durch das Binden eines Cyclodextrins verringert wird. In Gegenwart eines Analyten, der an das Cyclodextrin bindet, wurde die Leitfähigkeit noch weiter herabgesetzt, da die Pore noch stärker verstopft wird.

Unterschiedlich Analyten verursachten dabei unterschiedlich starke Abnahmen der Leitfähigkeit der  $\alpha$ HL-Pore. Mittels dieser Adapter-Methode gelang es eine Vielzahl pharmokologischer Wirkstoffe zu detektieren und deren Konzentration zu bestimmen<sup>77, 78</sup>.

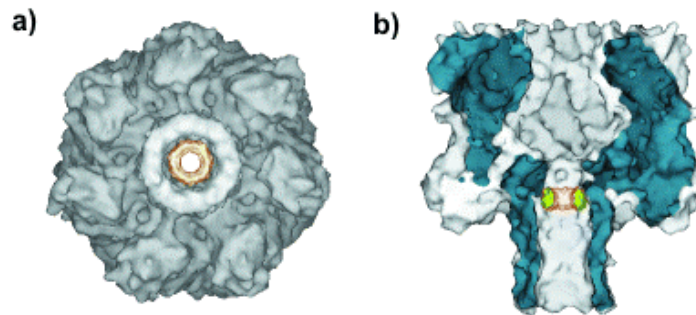


Abb. 1.9: a) Aufsicht auf einen  $\alpha$ HL-Kanal mit gebundenen  $\beta$ -Cyclodextrin (gold), b) Querschnitt durch einen  $\alpha$ HL-Kanal mit gebundenem  $\beta$ -Cyclodextrin<sup>78</sup>.

## 1.3 Das Peptid LS3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Peptid  $\text{H}_2\text{N}-(\text{LSSLLSL})_3\text{CONH}_2$ , auch als LS3 bezeichnet, verwendet. Es ist ein von DeGrado et al. 1988 entwickeltes synthetisches, amphipatisches Peptid mit  $\alpha$ -helicaler Struktur<sup>79</sup>. Es inseriert in Lipiddoppelschichten und bildet dort spannungsgesteuert kationenselektive Ionenkanäle<sup>79, 80</sup>.

Bei dem Design des Peptids LS3 wurden verschiedene strukturelle Faktoren berücksichtigt, welche die Fähigkeit eines Peptids Ionenkanäle bilden zu können bestimmen<sup>79, 80</sup>. Entscheidend für die Bildung einer Helix-Bündel-Struktur mit einer hydrophilen Pore im Inneren ist eine amphipatische helicale Struktur des Peptids. Als hydrophobe Komponente wurde daher die Aminosäure Leucin gewählt, da sie innerhalb einer Peptidkette eine große Neigung zur Ausbildung helicaler Strukturen zeigt. Serin dient als hydrophile Komponente, da es zwar hydrophil ist, jedoch keine Ladung trägt, wodurch gewährleistet wird, dass das Peptid insgesamt sehr hydrophob ist. Somit ist es in der Lage in Lipiddoppelschichten zu inserieren und dort eine vertikale Orientierung einzunehmen. Bei der Wahl der Aminosäuresequenz wurde eine sich wiederholende Siebenersequenz von (LSSLLSL) gewählt. Sequenzen vom Typ (*abcdefg*), in denen *a* und *d* hydrophobe Aminosäuren sind, begünstigen die Bildung sogenannter *coiled coil-Strukturen*<sup>81</sup>. Dabei bilden die Aminosäurereste *a* und *d* an einer Seite einer Helix ein Muster aus Erhebungen und Vertiefungen. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ist die Zusammenlagerung mit einer weiteren Helix mit einem entsprechenden Muster ähnlich einem Reißverschluss möglich. Schließlich wurde diese Siebenersequenz dreimal wiederholt, damit die Helix mit 21 Aminosäuren lang genug ist, um den etwa 3 nm dicken hydrophoben Membrankern einer Lipiddoppelschicht durchspannen zu können.

Die erstmalige Synthese des Peptids LS3 erfolgte über die Kupplung von geschützten, an einem *p*-Nitrobenzophenonoxim-Harz aufgebauten Heptamereinheiten unter Verwendung des *p*-Methylbenzhydryl-Harzes und der Boc-Gruppe zum Schutz der Aminfunktion<sup>79</sup>.

CD-spektroskopisch konnte die helicale Struktur des Peptids nachgewiesen werden. Abb. 1.10 zeigt die Projektion der helicalen Struktur eines Siebenerblocks des Peptids LS3. Entsprechend einer amphipatischen Helix sind die polaren und unpolaren Aminosäurereste auf unterschiedlichen Seiten der Helix lokalisiert<sup>79</sup>.

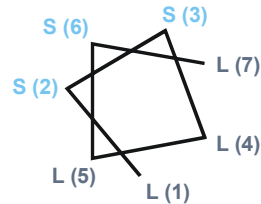


Abb. 1.10: Projektion der helicalen Struktur eines Siebenerblocks des Peptids LS3.

Einzelkanalmessungen an BLMs zeigten, dass das Peptid in Gegenwart einer Transmembranspannung in der Lage ist, Ionenkanäle mit einer Selektivität gegenüber einwertigen Kationen in Lipidmembranen auszubilden. Durch Leitfähigkeitsmessungen mit unterschiedlich großen Kationen konnte ein effektiver Durchmesser des Ionenkanals von ca. 0.8 nm bestimmt werden<sup>79, 80</sup>.

Im Einklang mit dieser Erkenntnis konnte mittels Computersimulation und Energieminimierung gezeigt werden, dass die Kationenselektivität allem Anschein nach auf der Bildung von Hexameren in der Membran beruht<sup>79, 80, 82</sup>.

Mittels Fluoreszenzspektroskopie an sieben analogen Peptiden, bei denen jeweils eine Aminosäure der mittleren Siebenersequenz von LS3 durch Tryptophan ersetzt wurde, wurde die Position des Peptids in einer Lipiddoppelschicht in Abwesenheit einer Transmembranspannung, also im nichtleitenden Zustand, bestimmt. Es zeigte sich, dass die Peptidhelix parallel zur Lipiddoppelschicht im Bereich der polaren Kopfgruppen liegt. Hierbei befinden sich die Serinreste an der den polaren Kopfgruppen zugewandten Seite der Helix und die Leucinreste orientieren sich in Richtung der unpolaren Alkylketten der Lipide<sup>83</sup>.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Mechanismus für die spannungsabhängige Öffnung der Ionenkanäle des Peptids LS3 vorgeschlagen (Abb. 1.11)<sup>83</sup>. In Abwesenheit einer Transmembranspannung ist das Peptid hauptsächlich parallel zur Lipiddoppelschicht in der Nähe der Kopfgruppen lokalisiert. Beim Anlegen einer Spannung an die Membran reorientiert sich das Peptid und nimmt aufgrund der Ausrichtung seines helicalen Dipolmoments im elektrischen Feld eine

Transmembranstellung ein. Die so orientierten Peptide sind in der Lipiddoppelschicht lateral beweglich und können zu hexameren Helix-Bündeln aggregieren. Durch die Abgrenzung der Serinseitenketten von den umgebenden Lipiden wird eine hydrophile Pore im Inneren des Bündels gebildet, wodurch der Durchtritt von Ionen durch die Membran ermöglicht ist.

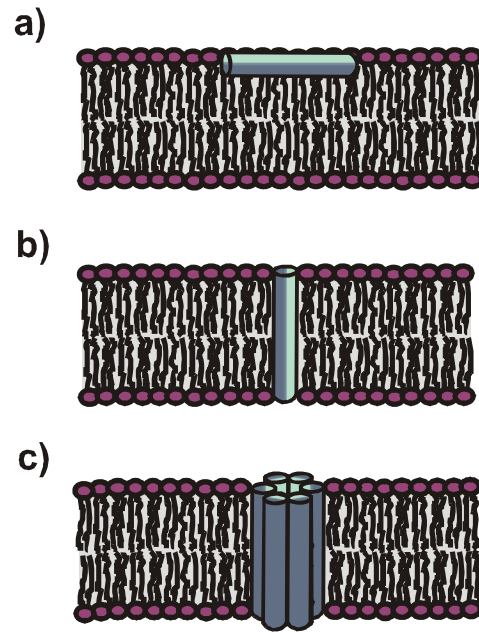


Abb. 1.11: Postulierter Mechanismus für die spannungsgesteuerte Kanalöffnung von LS3 (helle Bereiche entsprechen Serinresten, dunkle Bereiche Leucinresten). a) Geschlossener Zustand in Abwesenheit einer Transmembranspannung. b) Wechsel der Peptidorientierung beim Anlegen einer Spannung. c) Bildung eines Ionenkanals durch Aggregation der transmembranorientierten Peptide.





## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es ein neues Sensorsystem basierend auf einer Liganden (Analyten)-gesteuerten Kontrolle der Assemblierung amphipatischer  $\alpha$ -Helices zu entwickeln. Das Konzept basierte auf einem peptidischen Ionenkanal, der mit einer Rezeptorfunktion versehen wird, über die Anbindung eines Analyten erfolgt. Als Peptidkomponente wurde das Peptid LS3 gewählt, von dem bekannt ist, dass es spannungsgesteuert in Lipiddoppelschichten inseriert und kationenselektive Ionenkanäle bildet. Eine an das Peptid gebundene Bipyridineinheit sollte als Rezeptorfunktion für das Übergangsmetallkation  $\text{Ni}^{2+}$  fungieren, da diese bekanntermaßen sehr stabile Komplexe miteinander ausbilden. Es wurde erwartet, dass sich die Bindung von  $\text{Ni}^{2+}$  an das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 in veränderten Kanaleigenschaften des Peptids, wie z. B. der Leitfähigkeit, der Öffnungsdauer oder der Kanalaktivität, widerspiegelt.

Nach der Synthese des Peptid LS3 mittels Festphasenpeptidsynthese und anschließender Anbindung einer Bipyridineinheit an das Peptid, sollte UV-spektroskopisch die Komplexbildung des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 nachgewiesen werden und die Komplexbildung der Rezeptorfunktion bpy\* hinsichtlich der Komplexbildungskonstanten der gebildeten Komplexe und der Reaktionskinetik in einer hydrophoben Umgebung untersucht werden. Mittels *release*-Messungen sollte die Wechselwirkung beider Peptide mit Membranen in Abwesenheit einer Transmembranspannung betrachtet werden.

Im Fokus der Arbeit standen die Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Ab- und Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  mittels Einzelkanalmessungen. Um den Einfluss der Rezeptorfunktion auf die Kanaleigenschaften zu ermitteln, war auch die Kanalaktivität des Peptid LS3 von besonderem Interesse. Dabei sollten zwei unterschiedliche artifizielle Membransysteme Anwendung finden, zum einen klassische BLMs und zum anderen nano-BLMs, welche die Poren von porösem Aluminat überspannen.



# 3 Synthese

## 3.1 Synthese des Peptids LS3

### 3.1.1 Syntheseplanung

Die Synthese des Peptids  $\text{H}_2\text{N}-(\text{LSSLLSL})_3-\text{CONH}_2$  (LS3, **1**) erfolgte mittels automatisierter Festphasen-Synthese an einem Peptid-Synthesizer (Model 90 *Tabletop Synthesizer*, Advanced ChemTech).

**Fmoc/*tert*-Butyl – Taktik** Zum Schutz der Aminfunktion wurde die basenlabile Fmoc-Gruppe gewählt, welche die Möglichkeit des orthogonalen Schutzes der Hydroxylgruppe des Serins über einen säurelabilen *tert*-Butylether bietet<sup>84</sup>. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird im allgemeinen mit einer 20 – 55 %igen Lösung von Piperidin in DMF erzielt, während die Entschützung der Hydroxylgruppen mit Trifluoressigsäure (TFA) gelingt<sup>85, 86</sup>.

**Das Harz** Als polymerer Träger wurde das Tentakelpolymer TentaGel-S RAM Fmoc (Advanced ChemTech, Abb. 3.1) verwendet. Es besteht aus einem Polystyrol (PS)-Rumpf mit aufgepfropften Polyethylenglycol (PEG)-Ketten, welche die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Peptid und Harz einschränken und so die Abspaltung des Peptids vom Harz erleichtern. Die freien Enden der PEG-Ketten tragen den säurelabilen Rink-Linker zur Synthese von Peptidamiden<sup>87</sup>.

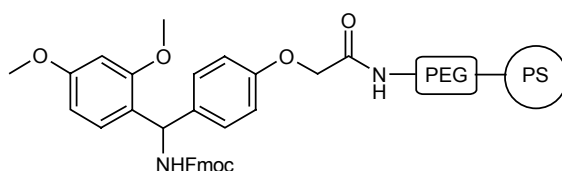


Abb. 3.1: TentaGel-S RAM Fmoc.

**Anbindung des C-Terminus** Die Anbindung der ersten Aminosäure an den Linker sollte über einen Aktivester erfolgen<sup>84, 88</sup>. Hierzu wurde das Harz nach erfolgter Entschützung der Aminfunktion des Linkers mit jeweils drei Äquivalenten der Aminosäure, 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid

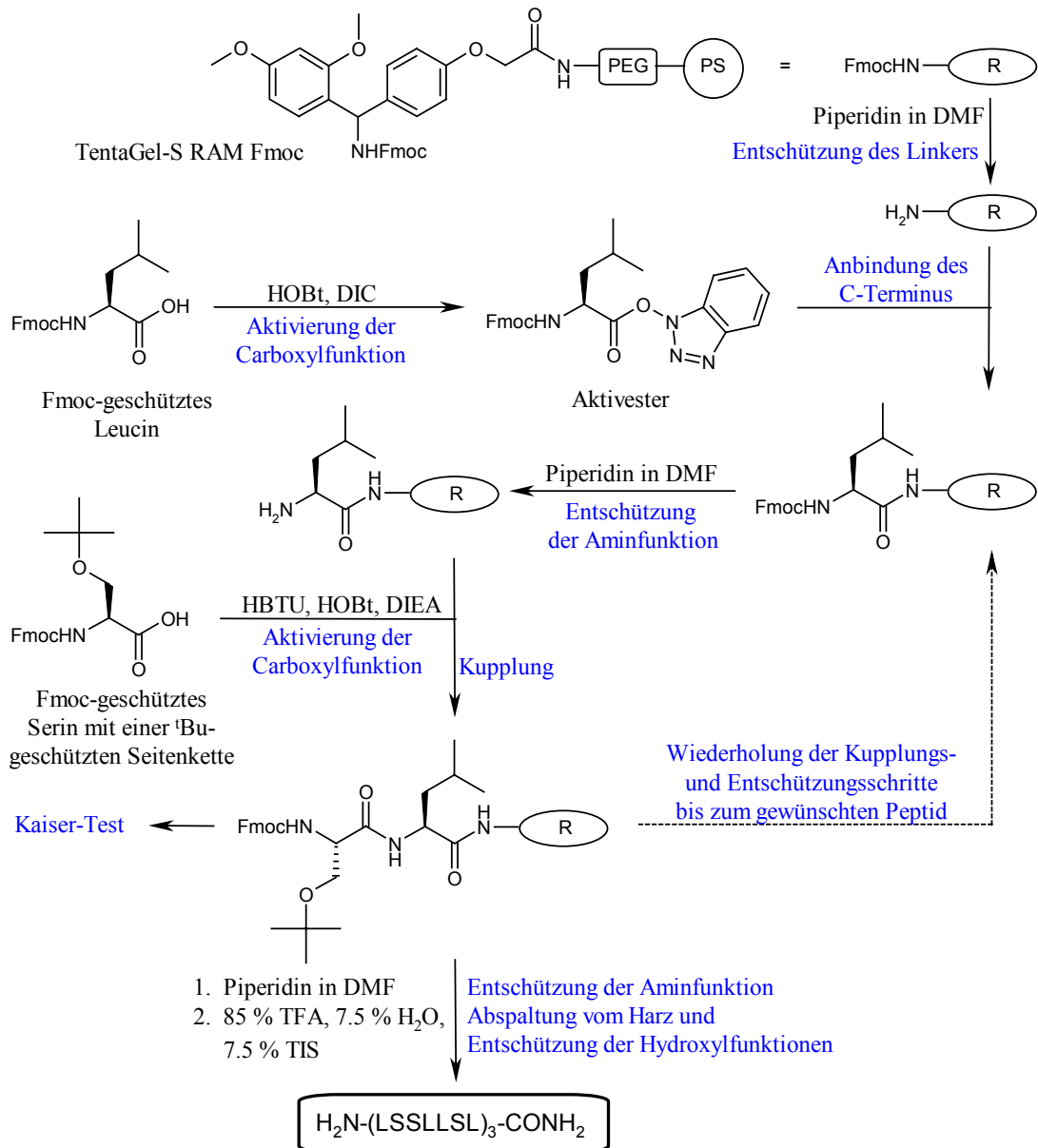
(DIC) zur Reaktion gebracht. Nach der Anbindung wurden nicht umgesetzte, freie Stellen am Harz durch Acetylierung blockiert.

**Kupplungsmethode** Zur Knüpfung der Peptidbindungen wurde eine Variation der Aktivestermethode mit dem Kupplungsreagenz *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) gewählt<sup>84, 88</sup>. Zur Beschleunigung der Kupplung wurde HOBt zugegeben und als basischer Zusatz diente Diisopropylethylamin (DIEA). Um eine möglichst vollständige Umsetzung zu erzielen, wurden bis zur 9. Aminosäure pro einzuführender Aminosäure Doppelkupplungen mit jeweils drei Äquivalenten Aminosäure, HBTU, HOBt und DIEA durchgeführt. Ab der 10. Aminosäure erfolgten Doppelkupplungen mit jeweils fünf Äquivalenten Aminosäure, HBTU und HOBt und zehn Äquivalenten der Base.

**Kaiser-Test** Um ein möglichst einheitliches Syntheseprodukt zu erhalten, ist es wichtig, dass die Kupplungs- und Entschützungsreaktionen quantitativ ablaufenden. Mit Hilfe des Kaiser-Tests kann überprüft werden, ob ein Kupplungsschritt vollständig erfolgt ist. Er beruht auf der Reaktion primärer Amine mit Ninhydrin<sup>89</sup>. Führt man den Test an einigen Harzkügelchen durch, so kommt es im Falle einer unvollständigen Kupplung zur Bildung eines blau-violetten Farbstoffs (*Ruhemanns Blau*). Ein negativer Kaiser-Test zeigt, dass die Kupplung bei Harzen mit einer Funktionalisierung im Bereich von 0.2 – 0.5 mmol/g zu 99.5 % erfolgt ist<sup>88</sup>.

**Abspaltung vom Harz** Die Abspaltung des Peptids vom Harz und Entschützung der Serinreste gelingt simultan durch Behandlung mit Trifluoressigsäure (TFA)<sup>87</sup>. Da bei der Abspaltung der Schutzgruppen reaktive *tert*-Butylkationen frei werden und aus der Spaltung der Peptid-Linker-Bindung Diphenylmethylkationen resultieren, werden nucleophile Reagenzien, sogenannte *scavenger*, zugesetzt, um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern<sup>90</sup>. Bei der Synthese von LS3 wurden als scavenger H<sub>2</sub>O und der Hydridonator Triisopropylsilan (TIS)<sup>91</sup> verwendet.

Abb. 3.2 zeigt eine Übersicht über die Synthese des Peptids LS3 1.

Abb. 3.2: Übersicht über die Synthese des Peptids H<sub>2</sub>N-(LSSLLSL)<sub>3</sub>-CONH<sub>2</sub> 1.

### 3.1.2 Durchführung

**Kaiser-Test** Der Kaiser-Test erfolgte mittels eines käuflich erworbenen Testkits, welcher aus einer ~ 80 %igen Lösung von Phenol in Ethanol, einer 6 %igen Lösung von Ninhydrin in Ethanol und einer KCN-Lösung in H<sub>2</sub>O/Pyridin besteht. Einige Kügelchen des Harzes wurden mit Ethanol gewaschen und jeweils drei Tropfen der drei Lösungen zugegeben. Nach Erhitzen auf 120 °C für 5 min, konnte im Falle eines positiven Tests eine Blaufärbung der Lösung bzw. des Harzes beobachtet werden.

**1. Kupplung – Anbindung des C-Terminus an das Harz** Die Anbindung der ersten und zweiten Aminosäure erfolgten nicht am Peptidsynthesizer, sondern manuell. 2.0 g (0.6 mmol bei einem mittleren Substitutionsgrad von 0.3 mmol/g) TentaGel-S RAM Fmoc wurden in 30 ml DMF vorgequellt. Anschließend wurde die Aminfunktion am Harz mit 20 % (v:v) Piperidin in DMF entschützt. Nach 45 min wurde die Lösung vom Harz abgesaugt und das Harz mit DMF (15 x 10 ml) gewaschen. Nun wurden 0.65 g (1.84 mmol, 3.1 eq) Fmoc-Leu-OH, 0.28 g (1.83 mmol, 3.1 eq) HOBt und 0.28 ml (0.23 g, 1.82 mmol, 3.0 eq) DIC in DMF zugegeben. Nach 3.5 h wurde zur Acetylierung nicht umgesetzter freier Aminfunktionen am Harz die Reaktionsmischung mit 170  $\mu$ l (0.184 g, 1.80 mmol, 3.0 eq) Acetanhydrid und 145  $\mu$ l (0.142 g, 1.796 mmol, 3.0 eq) Pyridin versetzt und weitere 40 min geschüttelt. Daraufhin wurde die Lösung abgesaugt und das Harz mit DMF (3 x 10 ml), DCM (3 x 10 ml) und Methanol (3 x 10 ml) gewaschen. Anschließend wurde an einer kleinen Probe des Harzes ein Kaiser-Test vorgenommen, welcher negativ verlief. Die Fmoc-Schutzgruppe der eingeführten Aminosäure wurde durch Behandlung des Harzes mit 30 ml 20 % (v:v) Piperidin in DMF für 1 h entfernt. Nach Absaugen der Lösung vom Harz wurde dieses mit DMF (7 x 15 ml) gewaschen.

**2. Kupplung** 0.69 g (1.80 mmol, 3.0 eq) Fmoc-Ser(tBu)-OH, 0.24 g (1.78 mmol, 3.0 eq) HOBt, 0.69 g (1.82 mmol, 3.0 eq) HBTU und 312  $\mu$ l (0.23 g, 1.79 mol, 3.0 eq) DIEA in DMF wurden zum Harz gegeben. Nach 1.5 h wurde die Lösung vom Harz abgesaugt. Das Harz wurde nochmals mit den oben angegebenen Mengen an Reaktanden versetzt und 1 h lang umgesetzt. Die Lösung wurde abgesaugt und das Harz mit DMF (3 x 15 ml) und 2-Propanol (5 x 15 ml) gewaschen. Es wurde eine kleine Probe entnommen und ein Kaiser-Test durchgeführt. Die Entschützung der Aminfunktion erfolgte wie unten beschrieben an einem Peptidsynthesizer.

**3. – 9. Kupplung** Die nachfolgenden Kupplungsreaktionen wurden an einem Peptidsynthesizer durchgeführt, wobei das Harz zu gleichen Teilen auf zwei Reaktionskolben aufgeteilt wurde. Die folgenden Reaktionsschritte erfolgten an beiden Harzteilen simultan, jedoch beziehen sich die Mengenangaben jeweils nur auf einen Reaktionskolben, also  $\sim$  1.0 g des Harzes.

Für die jeweiligen Kupplungsreaktionen wurden 2.0 ml 0.5 M (1.0 mmol, 3.3 eq) Fmoc-Leu-OH bzw. 1.0 ml 1 M (1.0 mmol, 3.3 eq) Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, 0.7 ml 1.4 M (1.0 mmol, 3.3 eq) HOBt, 2.0 ml 0.45 M (0.9 mmol, 3.0 eq) HBTU und 0.7 ml 1.4 M (1.0 mmol, 3.3 eq) DIEA in DMF zugegeben. Nach 60 min wurde die Lösung abgesaugt und die Reaktanden in analoger Weise nochmals zugegeben. Nachdem die Kupplung für weitere 30 min erfolgt war, wurde zur Verbesserung des Quellens des Harzes mit DCM eine 1:1-Verdünnung vorgenommen und weitere 30 min geschüttelt. Nun wurde die Lösung abgesaugt und das Harz mit DMF (4 x 15 ml) und 2-Propanol (6 x 15 ml) gewaschen. Eine Probe des Harzes wurde einem Kaiser-Test unterzogen. Bei negativem Ergebnis wurde die Synthese weitergeführt. Bei einem positiven Kaiser-Test erfolgte eine weitere Doppelkupplung mit den oben angegebenen Mengen an Reaktanden in DMF.

**10. – 21. Kupplung** Ab der 10. Aminosäure wurde nur ca. ein Fünftel des Harzes (0.13 mmol) weiter umgesetzt. Pro einzuführender Aminosäure erfolgte eine Doppelkupplung von je 50 min in DMF durch Zugabe von jeweils 1.3 ml 0.5 M (0.65 mmol, 5.0 eq) Fmoc-Leu-OH bzw. 0.7 ml 1 M (0.70 mmol, 5.4 eq) Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, 0.5 ml 1.4 M (0.70 mmol, 5.4 eq) HOBt, 1.4 ml 0.45 M (0.63 mmol, 4.8 eq) HBTU und 0.9 ml 1.4 M (1.26 mmol, 9.7 eq) DIEA. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz mit DMF (2 x 15 ml), DCM (4 x 15 ml) und 2-Propanol (4 x 15 ml) gewaschen. Eine Probe des Harzes wurde einem Kaiser-Test unterzogen. Im Falle eines positiven Kaiser-Tests, also bei unvollständiger Kupplung, wurde die Doppelkupplung wie oben beschrieben wiederholt und im Anschluss zur nächsten Aminosäure übergegangen.

**Entschützung** Zur Entschützung der Aminfunktion der neu eingeführten Aminosäure, wurde das Harz, nachdem es zunächst zweimal mit DMF gewaschen wurde, zweimal 15 min mit je 15 ml 20 % (v:v) Piperidin in DMF umgesetzt. Nach der 9. Kupplung erfolgte die Entschützung durch Zugabe von 15 ml 40 % (v:v) Piperidin in DMF für 5 min, Absaugen und erneuter Zugabe von 15 ml 20 % (v:v) Piperidin in DMF für 25 min. Nach erfolgter Entschützung wurde das Harz mit DMF (10 x 15 ml) gewaschen.

**Abspaltung des Peptids vom Harz** Zur Abspaltung des Peptids vom Harz wurde dieses dreimal mit je 20 ml einer Lösung von 85 % TFA, 7.5 % TIS und 7.5 % H<sub>2</sub>O für 1 h zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde jeweils abfiltriert und das Harz mit insgesamt 5 ml TFA gewaschen. Die vereinten Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur bis zu einem konstant bleibenden Volumen eingengt und anschließend zur Fällung des Peptids mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit kaltem Diethylether gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurden 93.7 mg weißes Rohprodukt erhalten.

**Analyse des Rohprodukts** Es wurde eine LC/MS-Kopplung einer Lösung des Rohprodukts in Methanol (1 mg/ml) durchgeführt (Abb. A.1, Abb. A.2). Hierbei wurde eine Phenomenex Luna C18(2)-Säule (Länge: 150 mm, Durchmesser: 2.00 mm) eingesetzt. Als Eluenten dienten H<sub>2</sub>O (0.1 % TFA) und Acetonitril (ACN) (0.1 % TFA). Der Gradient ist in Tab. 3.1 angegeben. Die Flussrate betrug 0.2 ml/min und das Injektionsvolumen 1 µl. Die Temperatur wurde konstant auf 25 °C gehalten.

Tab. 3.1: Gradient der LC/MS-Kopplung des Rohprodukts von LS3 1.

Zeit / min	H <sub>2</sub> O (0.1 % TFA) / %	ACN (0.1 % TFA) / %
0	85	15
30	25	75
35	5	95
42	5	95

Das Peptid LS3 eluierte bei einer Retentionszeit von 42.39 min. Neben Peaks, denen keine eindeutigen Massen zugeordnet werden konnten, wurden bei kürzeren Retentionszeiten Massenpeaks gefunden, die Peptiden mit Rumpf- oder Fehlsequenzen zugeordnet werden konnten. Außerdem traten auffallend geringe Massen bei sehr unterschiedlichen Retentionszeiten auf, denen allerdings keine Verbindungen zugeordnet werden konnten. (Tab. A.1)

**Aufreinigung** Das Peptid wurde mittels präparativer HPLC über eine Phenomenex Luna 10 C18(2)-Säule (21.1 x 250 mm) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml in 2-Propanol:ACN:H<sub>2</sub>O (1 % TFA) (4:4:2) gelöst, wobei pro Trennung 1.0 ml injiziert wurde. Der verwendete Lösungsmittel-Gradient kann Tab. 3.2 entnommen werden. Der Lösungsmittelfluss betrug 11 ml/min und die



Trennung wurde über die Absorption bei 220 nm verfolgt. Das Peptid LS3 **1** eluierte bei einer Retentionszeit von 56 – 58 min (Abb. A.3).

Tab. 3.2: Gradient der präparativen HPLC zur Aufreinigung von LS3 **1**.

Zeit / min	H <sub>2</sub> O (0.1 % TFA) / %	ACN (0.1 % TFA) / %
0	90	10
50	25	75
58	5	95
65	5	95

Die vereinten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nachdem die wässrige Phase über Gefriertrocknung entfernt wurde erhielt man 10.0 mg LS3 (11 % bezogen auf das Rohprodukt) als weißen Feststoff.

Eine zur LC/MS-Kopplung des Rohprodukts analoge LC/MS-Kopplung einer 0.5 mg/ml Lösung des Produkts in Ethanol zeigte, dass der nach Entfernung des Lösungsmittels erhaltene Feststoff neben kleinen Verunreinigungen, die nicht näher identifiziert werden konnten, hauptsächlich das Peptid LS3 **1** enthält (Abb. A.4, Abb. A.5). Das Peptid eluiert bei einer Retentionszeit von 41.30 min, die Verunreinigungen bei 34.30 min und 43.03 min.

ESI+ MS: m/z: 2159.4 [M+H]<sup>+</sup>, 1447.4 [2M+2H+Na]<sup>3+</sup>, 1439.9 [2M+3H]<sup>3+</sup>, 1090.9 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, 1080.3 [M+2H]<sup>2+</sup>, 720.3 [M+3H]<sup>3+</sup>, berechnet für C<sub>99</sub>H<sub>181</sub>N<sub>22</sub>O<sub>30</sub>: 2159.3.

## 3.2 Synthese der Rezeptorfunktion bpy\*

### 3.2.1 Syntheseplanung

Als Rezeptorfunktion wurde ein Bipyridinderivat mit einer Carboxylfunktion gewählt, um den Rezeptor über eine simple Amidbindung an den *N*-Terminus des Peptids LS3 anknüpfen zu können. Zusätzlich sollte ein Alkylspacer bestehend aus sieben CH<sub>2</sub>-Einheiten eingebaut werden, der eine gewisse Bewegungsfreiheit des Rezeptors gewährleisten sollte. Die Synthese des Rezeptors 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, **5**) erfolgte nach Mohler et al. ausgehend von 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin **2** in drei Stufen (Abb. 3.3)<sup>92</sup>. Nach Deprotonierung von **2** an einer der beiden Methylgruppen wurde in einer S<sub>N</sub>-Reaktion mit 8-Brom-1-octen eine Alkylkette mit endständiger Doppelbindung eingeführt. Da die Reaktion an beiden Methylgruppen erfolgen kann, wurde eine niedrige Ausbeute für das monofunktionalisierte Produkt **3** in Kauf genommen. Basische Ozonolyse von **3** lieferte den Methylester **4**, der im nächsten Schritt hydrolysiert wurde. Die Charakterisierung der Zwischenstufen und des Produkts erfolgte mittels Massenspektrometrie und teils NMR-Spektroskopie. Die entsprechenden Spektren finden sich im Anhang (A.1).

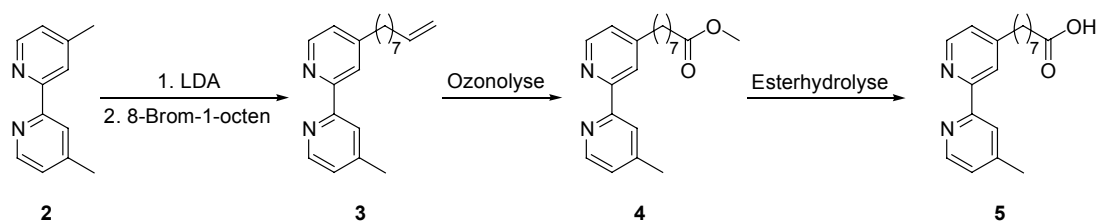


Abb. 3.3: Reaktionsweg zur Synthese von 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, **5**).

### 3.2.2 Durchführung

**4'-Methyl-4-(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin (3)** 4 ml einer 15 %igen Lösung von BuLi in Hexan (6.4 mmol, 1.1 eq) wurden bei -78 °C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre zu einer Lösung von 1.2 ml (8.7 mmol, 1.5 eq) Diisopropylamin in 10 ml wasserfreiem THF gegeben. Nach 15 min wurden 1.07 g (5.8 mmol) **2** in 45 ml THF innerhalb von 30 min zugegeben. Die resultierende tiefbraune Lösung wurde 2 h bei -78 °C gerührt, während eine Lösung von 1.1 ml (6.6 mmol, 1.1 eq) 8-Brom-1-octen in 5 ml

wasserfreiem THF tropfenweise zugegeben wurde. Nach weiteren 2 h Rühren bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die Kühlung entfernt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine Farbänderung nach orange beobachtet werden konnte. Nun wurde langsam mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 100 ml) ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das resultierende braune Öl wurde über eine Kieselgelsäule mit 5 % Ethanol, 5 % Essigsäure in Chloroform gereinigt. Die Elution wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert.  $R_f$  (Produkt **3**) = 0.4,  $R_f$  (4,4'-Di(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin) = 0.7,  $R_f$  (Edukt **2**) = 0.1. Erhaltene Mischfraktionen wurden nochmals über eine Kieselgelsäule gereinigt. Es verblieben 372 mg (1.3 mmol, 22 %) des gewünschten monoalkenylierten Produkts **3** als schwach rosa Öl, welches nicht auskristallisiert werden konnte.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm 8.56 (d,  $J = 5.0$ , 1H), 8.55 (d,  $J = 5.0$ , 1H), 8.25 (br s, 1H) 8.24 (br s, 1H), 7.14 (dd,  $J = 5.0$ , 1.3 Hz, 2H), 5.80 (ddt,  $J = 17.1$ , 10.2, 6.7 Hz, 1H), 4.99 (ddt,  $J = 17.1$ , 2.2, 1.6 Hz, 1H), 4.93 (ddt,  $J = 10.2$ , 2.2, 1.2 Hz, 1H), 2.70 (t,  $J = 7.81$  2H), 2.45 (s, 3H), 2.07 – 2.00 (m, 2H), 1.74 - 1.65 (m, 2H), 1.42 - 1.25 (m, 8H)

EI MS (70 eV):  $m/z$ : 294.1  $[\text{M}]^+$ , 265.1  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ , 253.1  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5]^+$ , 251.0  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ , 237.0  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$ , 223.0  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$ , 211.0  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}]^+$ , 209.0  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$ , 197.0  $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{13}]^+$ , 184.0  $[\text{Ed}]^+$  berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2$ : 294.2

**8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäuremethylester (4)** In eine Mischung aus 372 mg (1.26 mmol) **3** in 15 ml trockenem DCM und 10 ml einer 2.5 M NaOH-Lösung in Methanol wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 min Ozon mit einer Flussrate von 150 l/h geleitet, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit 25 ml Diethylether und 25 ml Wasser verdünnt und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wurde diese mit Diethylether gewaschen (3 x 25 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Es wurden 375 mg **4** (1.15 mmol, 91 %) als weißer Feststoff erhalten.

ESI+ MS:  $m/z$ : 327.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 313.0  $[\text{M}-\text{CH}_2]^+$ , berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$ : 327.2.

**8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, 5)** 375 mg (1.15 mmol) **4** wurden in 4 ml Ethanol gelöst und anschließend mit 4 ml einer 2.5 M NaOH in Wasser versetzt. Nachdem 18 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde zunächst mit Eisessig pH 5.5 eingestellt und anschließend mit 25 ml Diethylether versetzt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit Diethylether gewaschen (3 x 25 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Hexan/EtOAc (5:1) umkristallisiert. Es wurden 307 mg (0.98 mmol, 85 %) **5** als weißer Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.59 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.25 (br s, 1H), 8.21 (br s, 1H), 7.19 (dd, *J* = 5.1, 0.9 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 5.0, 1.6 Hz, 1H), 2.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.77 - 1.61 (m, 4H), 1.42 - 1.35 (m, 6H)

CI MS: *m/z*: 313.3 [M+H]<sup>+</sup>, 299.3 [M-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 313.2.

## 3.3 Synthese des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3

### 3.3.1 Syntheseplanung

Die Anbindung der Rezeptorfunktion bpy\* (3.2) an den *N*-Terminus des Peptids LS3 (vgl. 3.1) sollte über eine Amidbindung erfolgen. Zur Aktivierung der Carboxylgruppe des Rezeptors wurde der klassische Aktivester des Pentafluorphenols gewählt<sup>84</sup>, welcher im ersten Schritt der Synthese (Abb. 3.4) hergestellt wurde. Die Kupplung an das Peptid erfolgte daraufhin in Gegenwart der Base DIEA. Unter diesen milden Aktivierungsbedingungen konnte auf einen Schutz der Hydroxylgruppen der Serinreste verzichtet werden<sup>84</sup>.

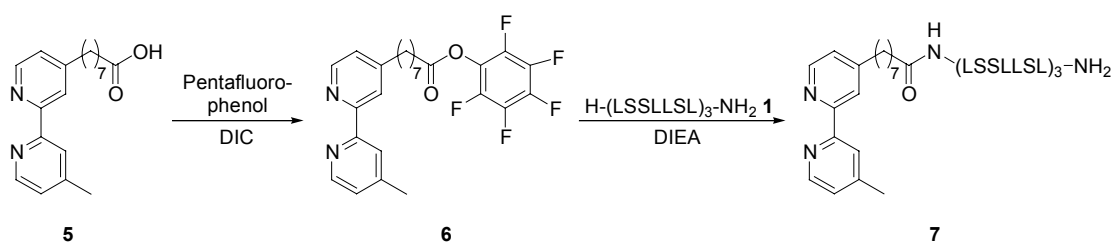


Abb. 3.4: Reaktionsweg zur Synthese von bpy\*-LS3 7.

### 3.3.2 Durchführung

**8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäurepentafluorphenolester (6)** Zu einer Lösung von 31.2 mg (0.1 mmol) bpy\* **5** in 200  $\mu$ l EtOAc / DMF (1:1) wurden 55.7 mg (0.3 mmol, 3.0 eq) Pentafluorphenol zugegeben. Nachdem diese Reaktionsmischung mittels eines Eisbads gekühlt war, wurden 46.7  $\mu$ l (37.8 mg, 0.3 mmol, 3.0 eq) DIC unter Rühren zugegeben. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Um das Ausfallen zu vervollständigen wurden 5 ml Hexan zugegeben und über Nacht gekühlt. Es wurden 45.2 mg (95  $\mu$ mol, 95 %) **6** als weißer Feststoff erhalten.

EI MS (70 eV):  $m/z$ : 478.2  $[\text{M}]^+$ , 295.2  $[\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+$ , 281.2  $[\text{M}-\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$ , 267.2  $[\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2]^+$ , 197.2  $[\text{M}-\text{C}_{12}\text{F}_5\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$ , 184.1  $[\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}]^+$  berechnet für  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}_5$ : 478.2.

**bpy\*-LS3 7** Eine Lösung von 3.0 mg (1.3  $\mu\text{mol}$ ) LS3 **1** und 2.0 mg (4.2  $\mu\text{mol}$ , 3.2 eq) **6** in 100  $\mu\text{l}$  DMF wurden in einem mit einem Septum verschlossenen Reaktionsgefäß auf einem Eisbad gerührt. 2  $\mu\text{l}$  DIEA / DMF (1:8) (1.5  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) wurden über eine Spritze zugegeben und 1 h unter Kühlung zur Reaktion gebracht. Nun wurde das Eisbad entfernt und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Fällung des Produkts wurde 1 ml eiskalter Diethylether zugegeben und über Nacht gekühlt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit eiskaltem Diethylether (3 x 1 ml) gewaschen. Es wurden 3.5 mg Rohprodukt als rosa Feststoff erhalten.

Es wurde eine LC/MS-Kopplung einer gesättigten Lösung des Rohprodukts in Ethanol durchgeführt (Abb. A.13, Abb. A.14). Es wurde eine Phenomenex Luna C18(2)-Säule (4.6  $\times$  150 mm) verwendet mit dem in Tab. 3.3 angegebenen Lösungsmittel-Gradienten bei einer Flussrate von 0.4 ml/min. Neben der Massendetektion wurde die Trennung auch über die Absorption bei 220 nm verfolgt.

Tab. 3.3: Gradient der LC/MS-Kopplung und der quantitativen HPLC des Rohprodukts von bpy\*-LS3 7.

Zeit / min	H <sub>2</sub> O (0.0059 % TFA) / %	2-Propanol / %
0	97	3
30	2	98
60	2	98

Das Peptid bpy\*-LS3 **7** eluierte nach 30.17 min. Neben kleinen Verunreinigungen, denen keine eindeutigen Massen zugeordnet werden konnten, eluierte nicht umgesetztes LS3 **1** bei einer Retentionszeit von 23.95 min, wohingegen überschüssiger Aktivester der Rezeptorfunktion **6** nicht identifiziert werden konnte.

Das Rohprodukt wurde unter zur LC/MS-Kopplung analogen Bedingungen mittels HPLC im qualitativen Maßstab gereinigt (Tab. 3.3, Abb. A.15). Pro Trennschritt wurden 100  $\mu\text{l}$  des Peptids in ethanolischer Lösung ( $\sim$  0.4 mg/ml) injiziert. Die Trennung wurde über die Absorption bei 220 nm verfolgt. Nach erfolgter Trennung wurden die Fraktionen vereint. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Phase über Gefriertrocknung. Es wurden 1.2 mg (0.5  $\mu\text{mol}$ , 38 %) bpy\*-LS3 als weißer Feststoff erhalten.

ESI+ MS:  $m/z$ : 1238.2  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ , 1236.2  $[\text{M}+\text{H}+\text{NH}_4]^{2+}$ , 1227.6  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , 833.1  $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^{3+}$ , 831.5  $[\text{M}+\text{H}+2\text{NH}_4]^{3+}$ , 826.8  $[\text{M}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+}$ , 824.4  $[\text{M}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+}$ , 818.7  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , berechnet für C<sub>118</sub>H<sub>202</sub>N<sub>24</sub>O<sub>31</sub>: 2452.5.

# 4 Materialien und Methoden

## 4.1 UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie

### 4.1.1 Grundlagen

Die UV-Spektroskopie ist ein Verfahren der optischen Spektroskopie, das auf der spezifischen Absorption von Ultraviolett (UV)- oder sichtbarer (Vis) Strahlung (200–800 nm) durch sogenannte *Chromophore* in organischen oder anorganischen Verbindungen beruht. Nach dem *Lambert-Beerschen Gesetz* ist die Absorption  $A$  in verdünnten Lösungen proportional zur Anzahl absorbierender Moleküle:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

mit der Intensität des eintretenden Lichtstrahls  $I_0$ , der Intensität des austretenden Lichtstrahls  $I$ , dem molaren dekadischen Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$ , der Konzentration  $c$  und der Schichtdicke  $d$  der Küvette.

Durch die Absorption von UV/Vis-Strahlung werden elektronische Übergänge im Molekül angeregt und das Molekül wird vom energiearmen Grundzustand  $S_0$  in den ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  überführt. In der Regel erfolgt der Übergang dabei aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Eine Klassifizierung der Elektronenübergänge ist mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale möglich (Abb. 4.1)<sup>93</sup>.

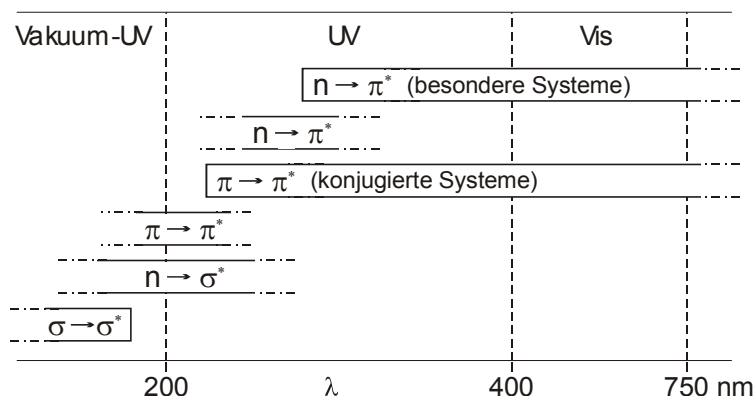


Abb. 4.1: Absorptionsbereiche der verschiedenen Elektronenübergänge.

Der Übergang des Elektrons aus dem angeregten Zustand zurück in den Grundzustand kann durch Emission von Licht oder strahlungslos, beispielsweise durch die Abgabe von Wärme, erfolgen. Bei der Desaktivierung unter Emission von Licht muss man zwei Arten unterscheiden. Bei der *Fluoreszenz* gehen die Elektronen direkt vom angeregten Singulettzustand  $S_1$  in den Singulettgrundzustand  $S_0$  über. Bei der *Phosphoreszenz* dagegen kommt es im ersten Schritt zu einem *intersystem crossing*, wobei das angeregte Molekül unter Spinumkehr in den angeregten Triplettzustand  $T_1$  übergeht. Der Übergang von  $T_1$  in den Singulettgrundzustand  $S_0$  erfolgt unter Lichtemission und erneuter Spinumkehr. Die verschiedenen Mechanismen sind in Abb. 4.2 in einem vereinfachten *Jablonski-Diagramm* dargestellt.

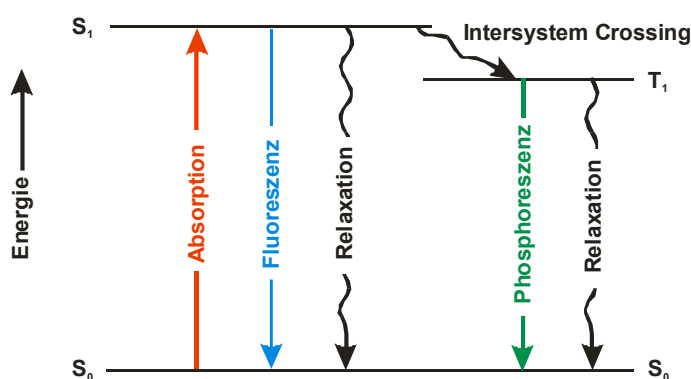


Abb. 4.2: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm:  $\rightarrow$  Strahlungsübergänge,  $\rightsquigarrow$  strahlungslose Übergänge.

**Übergangsmetallkomplexe** Die Absorption von Übergangsmetallkomplexen wird seit langem zur Charakterisierung dieser Verbindungen verwendet. Es können drei Typen elektronischer Übergänge unterschieden werden<sup>94</sup>:



- **d→d-Übergänge** Durch das elektrische Feld der Liganden kommt es zur teilweisen Aufhebung der Entartung der d-Orbitale, so dass Übergänge zwischen den d-Orbitalen des Metalls stattfinden können.
- **Charge Transfer (CT)-Übergänge** CT-Übergänge lassen sich in grober Näherung als Elektronenübergänge zwischen Komplexzentren und Liganden verstehen. Je nachdem, ob der Übergang hierbei vom Liganden zum Metallzentrum oder vom Metallzentrum zum Liganden erfolgt, spricht man von LMCT (*ligand to metal charge transfer*)-Übergängen oder MLCT (*metal to ligand charge transfer*)-Übergängen.
- **Intraligand-Übergänge** Übergänge zwischen Molekülorbitalen, die vorwiegend an den Liganden lokalisiert sind, werden als Intraligand-Übergänge bezeichnet.

#### 4.1.2 UV-spektroskopische Untersuchungen

Bipyridin zeigt zwei  $\pi \rightarrow \pi^*$  Absorptionsbanden bei 237 nm und 281 nm ( $\epsilon_{237} = 10890 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{281} = 14500 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>95</sup>. Wenn es in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zur Komplexbildung kommt, so unterliegen die Intraligand-Absorptionsbanden einer bathochromen Verschiebung (Rotverschiebung) mit einhergehender Aufspaltung der längerwelligen Bande<sup>96</sup>. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde diese Gegebenheit genutzt, um die Komplexbildung der Rezeptoreinheit bpy\* bzw. des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen näher zu analysieren.

Alle Messungen wurden an einem Cary 50 Scan UV-Spektrometer (Varian, Darmstadt) bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

#### **4.1.2.1 Nachweis der Komplexbildung von bpy\* und bpy\*-LS3**

##### **mit Ni(II)**

Zum Nachweis der Komplexbildung der Rezeptorfunktion bpy\* und des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 mit Ni<sup>2+</sup> wurde jeweils ein Absorptionsspektrum der untersuchten Substanz in Ethanol vor und nach Zugabe einer Lösung von NiCl<sub>2</sub> in Wasser aufgenommen.

#### **4.1.2.2 Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von**

##### **Ni(II)-bpy\*-Komplexen in Ethanol und Mizellen**

Die Rezeptoreinheit bpy\* enthält neben der Bipyridin-Einheit auch einen Alkylspacer mit endständiger Carboxylgruppe, der sich auf die mögliche Komplexstöchiometrie und –stabilität auswirken kann. Mittels einer photometrischen Titration ist die Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und damit verbunden auch der Stöchiometrie der gebildeten Komplexe möglich. Die Komplexbildung wurde dabei sowohl in ethanolischer Lösung als auch in einer Lösung von Octyl-Polyoxyethylen (o-POE)-Mizellen in 0.5 M KCl untersucht. Letztere diente dazu, die Bedingungen der Komplexbildung während der Durchführung von Einzelkanalmessungen zu simulieren. Die Mizellen sollten die Anwesenheit einer Lipidmembran nachahmen, mit der die Rezeptorfunktion wechselwirken kann, ohne jedoch, wie es bei Vesikeln denkbar ist, einen Anteil der bpy\*-Moleküle durch Einschluss in den Innenraum für das Metallion unzugänglich zu machen.

Für die Messungen wurden jeweils 500 µl einer 59.1 µM bpy\*-Lösung in Ethanol bzw. 52.0 µM bpy\* in 1 % o-POE, 0.5 M KCl in Wasser vorgelegt. Nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums wurden 0.5 µl einer NiCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben und erneut ein Spektrum aufgenommen. Die Konzentration der NiCl<sub>2</sub>-Lösung wurde im Zuge der Einzelmessungen jeweils so gewählt, dass innerhalb der Messreihe das Verhältnis von Ni<sup>2+</sup>/bpy\* in einem Bereich von 0 bis ca. 1.2 variierte. Bei den Messungen in mizellarer Lösung wurde nach der Ni<sup>2+</sup>-Zugabe eine Inkubationszeit von 2 h eingeräumt.

### 4.1.2.3 Kinetik der Komplexierung von bpy\* mit Ni(II) in

#### Mizellen und Vesikeln

Zur Untersuchung der Kinetik der Komplexbildung von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in Mizellen und Vesikeln wurde die Abnahme der Absorption von freiem bpy\* bei 285 nm nach Zugabe von NiCl<sub>2</sub> beobachtet. Dazu wurden jeweils 500 µl einer Lösung von bpy\* in 1 % o-POE, 0.5 M KCl in Wasser bzw. in einer Suspension unilamellarer 100 nm 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC)-Vesikel (2.36 mM) in 0.5 M KCl (vgl. 4.4.5) vorgelegt und 0.5 µl NiCl<sub>2</sub>-Lösung unterschiedlicher Konzentration zugegeben. Die Konzentration von bpy\* wurde durch entsprechende Verdünnung mit reiner Mizelllösung bzw. reiner Vesikelsuspension variiert.

### 4.1.3 release-Messungen mit 5(6)-Carboxyfluorescein

#### 4.1.3.1 Versuchsbeschreibung

Um festzustellen, ob das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 auch ohne eine angelegte Membranspannung in Lipiddoppelschichten insertiert und dort Poren bildet oder Löcher in die Membran reißt, wurde in sogenannten *release*-Messungen die Farbstofffreisetzung aus Vesikeln untersucht. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein (Abb. 4.3) in konzentrierter Lösung Dimere bildet, die im Gegensatz zu den Monomeren keine Fluoreszenz zeigen. Zudem kommt es in konzentrierter Lösung zu einem Energietransfer von noch vorliegenden Monomeren auf die nicht-fluoreszierenden Dimere. Dieser Transfer wird zusätzlich durch den ebenfalls ablaufenden Energietransfer zwischen den Monomeren vereinfacht.

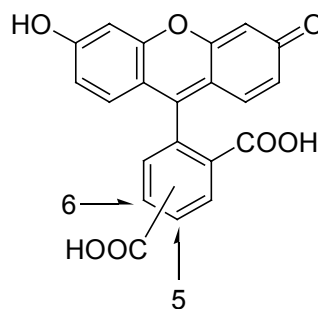


Abb. 4.3: 5(6)-Carboxyfluorescein.

Wenn Vesikel in einer konzentrierten Farbstofflösung hergestellt werden und der überschüssige Farbstoff in der die Vesikel umgebenden Lösung abgetrennt wird, so wird die Fluoreszenz im Inneren der Vesikel nahezu vollständig gelöscht<sup>92, 97</sup>. Nach Zugabe von Peptid zur Vesikelsuspension kommt es, falls Poren oder Löcher ausreichender Größe gebildet werden oder die Vesikel gar vollständig zerstört werden, zu einem Austritt des Farbstoffs in die umgebende Lösung. Die damit einhergehende Verdünnung des Farbstoffs führt zur Dissoziation der Dimere und somit zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität<sup>98</sup>. Neben der Wechselwirkung von bpy\*-LS3 mit farbstoffgefüllten Vesikeln, wurde auch der Einfluss des Peptids LS3 und der Rezeptorfunktion bpy\* sowie von bpy\*-LS3 in Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> untersucht.

#### 4.1.3.2 Durchführung

Für die Messungen wurden zunächst, wie unter 4.4.5 beschrieben 100 nm Vesikel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC, ~ 0.08 mM) in Tris-Puffer (10 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.5) hergestellt, die im Inneren zusätzlich 100 mM 5,6-Carboxyfluorescein und 100 mM EDTA enthielten. Die Messungen wurden an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian, Darmstadt) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm durchgeführt. Die Emissions- und Anregungsbandweite betrug je 5 nm. Es wurden jeweils 400 µl der Vesikelsuspension in einer Quarzglasküvette (Schichtdicke 1 cm) vorgelegt und der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm verfolgt. Zunächst wurde für 1 min die Grundfluoreszenz  $F_0$  der Vesikelsuspension beobachtet, woraufhin in 1 min-Intervallen jeweils 5 µl einer Lösung von 1.6 µM bpy\*-LS3 bzw. 9.3 µM LS3 bzw. 5.3 µM bpy\* bzw. 1.5 µM bpy\*-LS3, 15 µM NiCl<sub>2</sub> in Ethanol/Tris-Puffer (1:10) zugegeben wurden. Um den Einfluss des Lösungsmittels und der Verdünnung abschätzen zu können, erfolgte eine weitere Messung, in der gleiche Volumina Ethanol/Tris-Puffer (1:10) zugegeben wurden. Außerdem erfolgte eine Messreihe mit sukzessiver Zugabe von 16.3 µM bpy\*-LS3 in Ethanol ( $t = 1$  min: 10 µl, folgende Zugaben in 5 µl-Schritten und 1 min-Intervallen, letzte Zugabe bei  $t = 8.5$  min) und eine entsprechende Messung unter Zugabe von reinem Ethanol. Am Ende jeder Messreihe wurden die Vesikel

durch die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  einer 10 %igen Triton-X-Lösung zerstört, um den maximal möglichen Anstieg der Fluoreszenz  $F_T$  bei einer 100 %igen Farbstofffreisetzung beobachten zu können.

## 4.2 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie ist eine elektrochemische Messmethode, die zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Festkörpern, Flüssigkeiten und deren Grenzflächen eingesetzt wird. In der Biophysik wird sie unter anderem zur Charakterisierung von Lipiddoppelschichten und zur Untersuchung der Aktivität und Funktionalität integraler Proteine und Peptide verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit diente die Impedanzspektroskopie der Qualitätskontrolle bei der Herstellung von nano-BLMs.

### 4.2.1 Physikalische Grundlagen

Das Prinzip der Impedanzspektroskopie besteht darin, den Wechselstromwiderstand eines Systems, die sogenannte Impedanz, in Abhängigkeit von der Frequenz des angelegten Erregersignals zu bestimmen. Dabei wird als Erregersignal eine sinusförmige Wechselspannung geringer Amplitude verwendet, deren Frequenz über den Messbereich diskret variiert wird. Ausgehend vom *Ohmschen Gesetz* ist die Impedanz  $Z$  gegeben durch:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{U_0 \cdot \exp(i\omega t)}{I_0(\omega) \cdot \exp(i(\omega t - \Theta(\omega)))} = |Z|(\omega) \cdot \exp(i\Theta(\omega)) \quad (4.2)$$

mit der Spannung  $U$ , dem Strom  $I$ , der Kreisfrequenz  $\omega$ , dem Betrag der Impedanz  $|Z|$  und der Phase  $\Theta$ .

In kartesischen Koordinaten ausgedrückt erhält man:

$$Z(\omega) = Z^{\text{Re}}(\omega) + i \cdot Z^{\text{Im}}(\omega) \quad (4.3)$$

mit dem Realteil der Impedanz  $Z^{\text{Re}}$  (Wirkwiderstand) und dem Imaginärteil der Impedanz  $Z^{\text{Im}}$  (Blindwiderstand).

### 4.2.2 Darstellung von Impedanzspektren

Die Impedanz  $Z$  wird entweder durch die Angabe ihres Betrages  $|Z|$  und der Phasenverschiebung  $\Theta$  oder durch den Real- ( $Z^{\text{Re}}$ ) und Imaginärteil ( $Z^{\text{Im}}$ ) vollständig

beschrieben. Eine Auftragung der beiden Messgrößen in Abhängigkeit der Frequenz des Erregersignals ergibt zwangsläufig eine dreidimensionale Grafik. Da eine solche Darstellung schnell unübersichtlich wird und daher allenfalls für einfache Systeme geeignet ist, haben sich zwei Möglichkeiten der zweidimensionalen Darstellung etabliert. Eine Auftragung des Imaginärteils  $Z^{\text{Im}}$  gegen den Realteil  $Z^{\text{Re}}$  wird *Ortskurve* genannt. Im sogenannten *Bode-Diagramm* werden der Betrag der Impedanz  $|Z|$  und die Phasenverschiebung  $\Theta$  separat gegen die Frequenz  $f$  des Erregersignals aufgetragen.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Darstellung im Bode-Diagramm verwendet, welche anhand des einfachen Netzwerks in Abb. 4.4 näher vorgestellt werden soll.

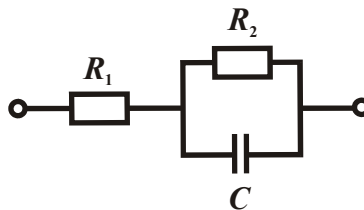


Abb. 4.4: Netzwerk zur Erklärung des Bode-Diagramms, bestehend aus zwei Ohmschen Widerständen  $R_1$  ( $100 \Omega$ ) und  $R_2$  ( $10^6 \Omega$ ) und einer Kapazität  $C$  ( $0.45 \mu\text{F}$ ).

Die entsprechenden Kurven des Bode-Diagramms sind in Abb. 4.5 dargestellt. In den Bereichen sehr hoher (3) bzw. sehr niedriger Frequenzen (1) zeigen beide Kurven ein für Ohmsche Widerstände typisches Verhalten. Der Betrag der Impedanz ist frequenzunabhängig, Strom und Spannung schwingen in Phase. In Bereich (3) entspricht der Betrag der Impedanz  $|Z|$  dem Widerstand  $R_1$ , im Bereich (1) der Summe der Widerstände  $R_1$  und  $R_2$ . In Bereich (2) dagegen zeigt sich ein für Kapazitäten charakteristisches Verhalten. Strom und Spannung sind um  $-90^\circ$  phasenverschoben und der Betrag der Impedanz ist umgekehrt proportional zur Frequenz. In diesem Bereich kann über die Beziehung  $\log |Z| = -\log(2\pi fC)$  die Kapazität bestimmt werden.

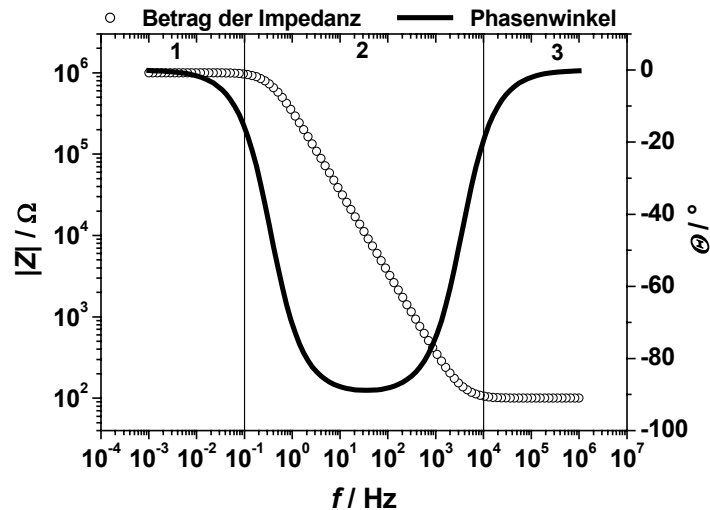


Abb. 4.5: Bode-Diagramm des Netzwerks aus Abb. 4.4. Halb- bzw. doppellogarithmische Auftragung der Phasenverschiebung  $\Theta$  und des Betrags der Impedanz  $|Z|$  gegen die Frequenz  $f$  des Erregersignals.

### 4.2.3 Auswertung der Spektren

Zur Auswertung eines Impedanzspektrums (Abb. 4.6) muss zunächst ausgehend von einem physikalischen Modell des untersuchten Systems ein Ersatzschaltbild mit gleicher Impedanz-Frequenz-Charakteristik erstellt werden. Der so erhaltene funktionale Zusammenhang zwischen Impedanz  $Z$  und Kreisfrequenz  $\omega$  erlaubt über eine nicht-lineare Kurvenanpassung (*non-linear-least-square-fit*) die Bestimmung systemspezifischer Parameter.

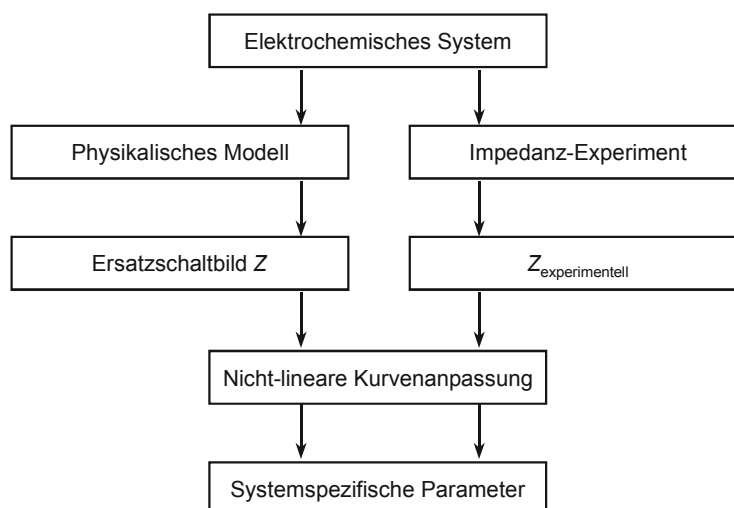


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der Auswertung von Impedanzspektren (nach Ende & Mangold)<sup>99</sup>.



#### 4.2.4 Elektrische Beschreibung von nano-BLMs

Das Ersatzschaltbild zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften einer porenüberspannenden Membran ist zusammen mit einer schematischen Darstellung in Abb. 4.7 dargestellt. Die elektrischen Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht können durch eine Parallelschaltung aus Membrankapazität  $C_m$  und Membranwiderstand  $R_m$  beschrieben werden. Außerdem muss der Ohmsche Widerstand der Elektrolytlösung  $R_e$  im Ersatzschaltbild berücksichtigt werden. Die Doppelschichtkapazitäten an den Grenzflächen Membran/Elektrolyt und den verwendeten Elektroden müssen im Ersatzschaltbild nicht berücksichtigt werden, da sie verglichen mit der Membrankapazität  $C_m$  sehr groß sind und im Frequenzbereich bis  $10^{-3}$  Hz nicht beobachtbar sind. Für den Fall sehr hoher Membranwiderstände ergibt sich eine weitere Vereinfachung, da der Membranwiderstand  $R_m$  im gewählten Frequenzbereich nicht detektierbar ist. Das Ersatzschaltbild vereinfacht sich zu einer Serienschaltung aus Elektrolytwiderstand  $R_e$  und Membrankapazität  $C_m$ .

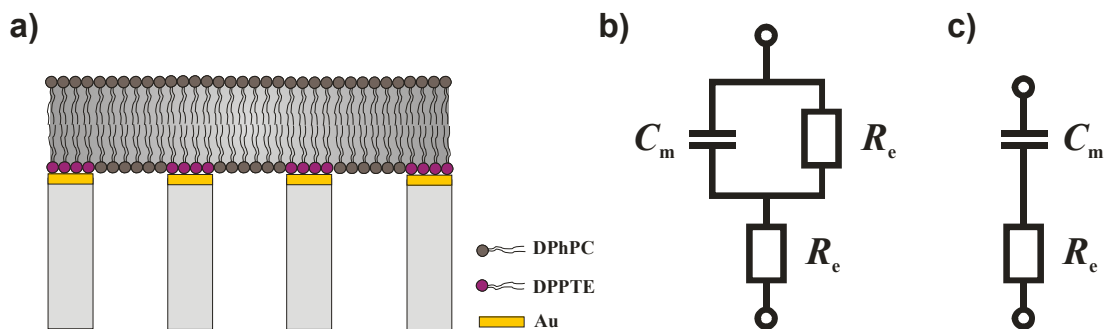


Abb. 4.7: a) Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran. b) Ersatzschaltbild zur Beschreibung porenüberspannender Membranen bestehend aus dem Elektrolytwiderstand  $R_e$  und der Parallelschaltung aus Membrankapazität  $C_m$  und Membranwiderstand  $R_m$ . c) Vereinfachtes Ersatzschaltbild für den Fall sehr hoher Membranwiderstände.

#### 4.2.5 Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Impedanzspektroskopie zur Kontrolle des Ausdünnprozesses und der Qualität von nano-BLMs verwendet<sup>50</sup>. Hierzu wurde ein Frequenzganganalysator der Firma Solartron Instruments (*Impedance Gain-Phase Analyser* SI 1260) verwendet. Während der Messung wird dem System eine sinusförmige Wechselspannung definierter Amplitude und Frequenz aufgeprägt. Aus der resultierenden Stromantwort und der angelegten Wechselspannung wird die Impedanz des Systems bestimmt. Die Messungen wurden über einen Computer unter

Verwendung des Programms *ZPlot* 2.8 gesteuert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei einer Spannungsamplitude von 30 mV und die Frequenz wurde in einem Bereich von  $10^{-1}$  bis  $10^6$  Hz diskret variiert. Zur Kontrolle des Ausdünnprozesses während der Bildung von nano-BLMs wurde der Phasenwinkel  $\theta$  bei einer Frequenz von  $10^6$  Hz und einer Amplitude von 30 mV in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet. Liegt eine Lipiddoppelschicht vor, so entspricht der Betrag der Impedanz  $|Z|$  bei dieser Frequenz dem Elektrolytwiderstand und es liegt, einem Ohmschen Widerstand entsprechend, keine Phasenverschiebung vor.

## 4.3 Einzelkanalmessungen

### 4.3.1 Die *Voltage Clamp*-Technik

Die *voltage clamp*-Technik ist eine Methode zur Beobachtung und Analyse der durch Ionenkanäle induzierten Transmembranströme in meist artifiziellen Membranen. Die zeitliche Auflösung dieser Methode ( $\mu\text{s}$ -Bereich) und ihre Genauigkeit (pA-Bereich) machen Strommessungen auf Einzelkanalebene möglich<sup>22</sup>.

Bei *voltage clamp*-Messungen wird eine konstante Spannung  $U_m$  an die Membran angelegt. Über einen Rückkopplungsmechanismus wird die Membranspannung mit Hilfe eines kompensatorischen Stroms, welcher den Membranstrom  $I_m$  widerspiegelt, auf den vorgegebenen Wert fixiert<sup>100</sup>. Das Öffnen eines Ionenkanals bewirkt eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran und damit verbunden eine Zunahme des Transmembranstroms. Die Leitfähigkeit  $G$  eines Ionenkanals entspricht dem reziproken Widerstand  $R_m$ , der über das *Ohmsche Gesetz* durch den Strom  $I_m$  und die Spannung  $U_m$  definiert ist:

$$G = \frac{1}{R_m} = \frac{I_m}{U_m} \quad (4.4)$$

Eine Weiterentwicklung der *voltage clamp*-Technik ist die *patch clamp*-Technik, die es ermöglicht, Ströme einzelner Ionenkanäle einer Zelle zu messen<sup>11, 101, 102</sup>. Durch Aufsetzen einer speziell präparierten dünnen Glaspipette auf die Zellmembran werden ein Membranareal (*patch*) und die darin enthaltenen Ionenkanäle elektrisch vom Rest der Zellmembran isoliert. Hierzu wird durch Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette die Bildung eines Abdichtwiderstandes von einigen Gigaohm, eines sogenannten *Gigaohmseals*, erzielt. Eine Elektrode im Inneren der Pipette ermöglicht nun unter *voltage clamp*-Bedingungen die Messung des Stroms, der durch die isolierten Ionenkanäle im untersuchten Membranareal fließt.

### 4.3.2 Experimenteller Teil

Zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in An- und Abwesenheit seines Liganden  $\text{Ni}^{2+}$  wurden Einzelkanalmessungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei zwei artifizielle Membransysteme verwendet, klassische BLMs und porenüberspannende nano-BLMs (vgl. 1.1.2). Um den Einfluss der Rezeptorfunktion auf die Kanaleigenschaften zu untersuchen, wurden zudem die Kanaleigenschaften des Peptids LS3 in beiden Membransystemen untersucht.

#### 4.3.2.1 Messaufbau und allgemeine Bedingungen

Für die Einzelkanalmessungen an klassischen BLMs und nano-BLMs wurde der in Abb. 4.8 gezeigte Messaufbau verwendet. Die jeweilige Messkammer befindet sich zur elektrostatischen Abschirmung innerhalb eines Faraday-Käfigs. Dieser ist zum Schutz vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen auf einem schwingungsgedämpften Steintisch platziert. In die beiden durch die BLM bzw. nano-BLMs getrennten, elektrolytgefüllten Kompartimente tauchen zwei Ag/AgCl-Elektroden. Die beiden Kammerhälften werden als *cis*- und *trans*-Seite bezeichnet, wobei das *cis*-Kompartiment die Arbeitselektrode beinhaltet und das *trans*-Kompartiment die Referenzelektrode. Über den Vor- und Hauptverstärker wird zwischen den beiden Elektroden das gewünschte Potential eingestellt und der Strom verstärkt und gefiltert. Der Hauptverstärker ist mit einem Oszilloskop und einem Frequenzgenerator, mit dem Spannungspulse erzeugt werden können, verbunden. Über einen A/D-Wandler wird das Messsignal digitalisiert und an einen Computer weitergeleitet.

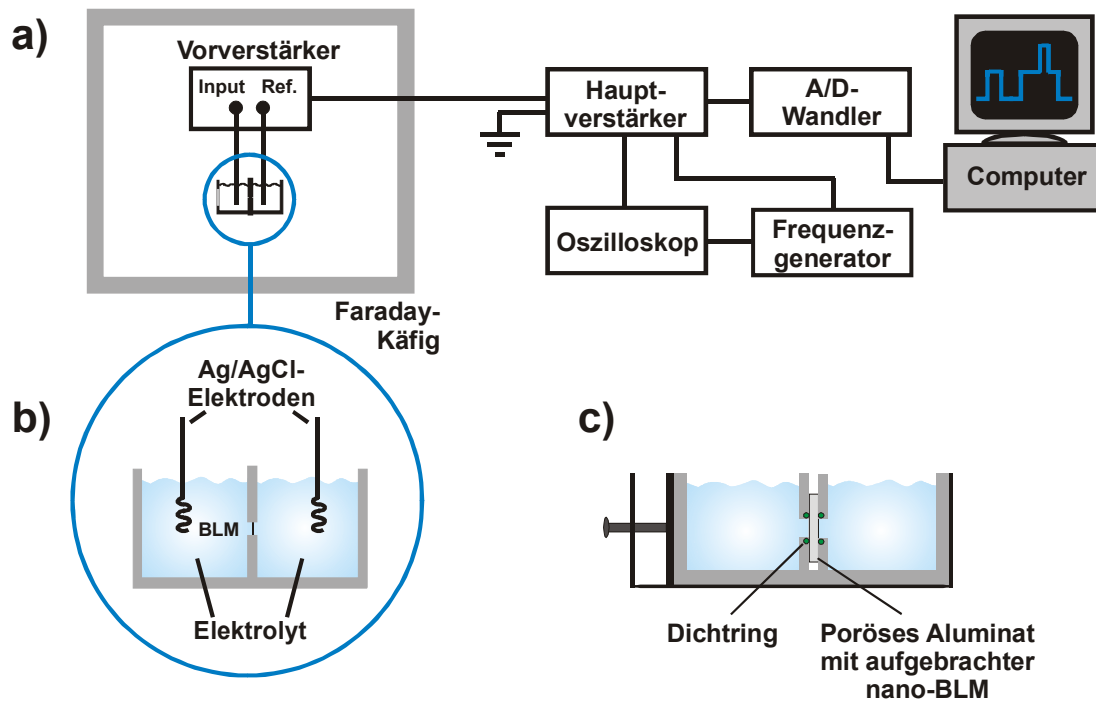


Abb. 4.8: a) Schematische Darstellung des Aufbaus bei Einzelkanalmessungen. b) Messkammer für BLMs. c) Messkammer für nano-BLMs.

Alle Messungen erfolgten mittels eines Axopatch 200B *Amplifier* (Axon Instruments, Union City, USA) unter *voltage clamp*-Bedingungen bei einer konstanten Spannung von +200 mV und einer Ausgabeverstärkung von 10 mV/pA. Die Samplerate betrug 50 kHz. Das Messsignal wurde mit einem 1 kHz 4-Pol-Tiefpass-Bessel-Filter gefiltert und anschließend digitalisiert. Zur Datenaufnahme und Auswertung wurde das Programm *pClamp* 9.1 (Axon Instruments) verwendet. Die aufgezeichneten Stromkurven wurden bei Messungen an nano-BLMs zur Verminderung des Rauschens vor der Auswertung mit einem 500 Hz Gauß-Tiefpassfilter gefiltert.

#### 4.3.2.2 Einzelkanalmessungen an klassischen BLMs

Bei den Messungen an klassischen BLMs wurde eine Kammer mit zylindrischem Küvetteneinsatz aus Delrin der Firma Warner Instruments verwendet. Der Küvetteneinsatz besitzt seitlich ein Loch mit einem Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$ , über das die BLM, bestehend aus DPhPC, gespannt wird. Die BLM-Präparation erfolgte jeweils auf der *cis*-Seite der Messkammer (vgl. 4.4.3) und als Elektrolyt wurde 0.5 M KCl verwendet. Nach Zugabe einer kleinen Menge von LS3 bzw. bpy\*-LS3 in Ethanol zum *cis*-Kompartiment wurde der resultierende Transmembranstrom

beobachtet. Für das Peptid LS3 betrug die Endkonzentration im *cis*-Kompartiment 50 nM, für bpy\*-LS3 variierte die Konzentration zwischen 10 und 14 nM. Neben den Untersuchungen an BLMs aus DPhPC wurden mit dem rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 auch Messungen an BLMs bestehend aus einer Mischung von DPhPC/Cholesterin (7:3) durchgeführt. Die Peptidkonzentration im *cis*-Kompartiment betrug hierbei 20 – 24 nM.

#### **4.3.2.3 Einzelkanalmessungen an nano-BLMs**

Für die Messungen an nano-BLMs wurden poröse Aluminate mit Porendurchmessern von 60 nm verwendet. Das poröse Substrat wurde vor der Präparation der aus DPhPC bestehenden nano-BLMs mit 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTE) funktionalisiert (vgl. 4.4.2) und in eine Teflonkammer gespannt, deren Kompartimente über ein Loch mit einem Durchmesser von 3 mm verbunden sind. Die Präparation der nano-BLMs sowie die Peptid-Zugabe erfolgte, analog zu den Messungen an klassischen BLMs, im *cis*-Kompartiment mit 0.5 M KCl als Elektrolyt. Bei den Messungen variierte die LS3-Konzentration im *cis*-Kompartiment zwischen 1.25 und 25.00 nM, die bpy\*-LS3-Konzentration zwischen 0.03 und 3.75 nM.

#### **4.3.2.4 Einzelkanalmessungen an nano-BLMs in Gegenwart von Ni(II)**

Messungen an nano-BLMs in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> erfolgten bis auf die nachfolgend angegebenen Änderungen, analog zu den oben beschriebenen Messungen in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>. Die bpy\*-LS3-Konzentration im *cis*-Kompartiment betrug 1.25 nM. Wenn nach der Peptid-Zugabe Einzelkanalereignisse beobachtet werden konnten, erfolgte die Zugabe kleiner Mengen wässriger NiCl<sub>2</sub>-Lösung in beide Kompartimente. Die Endkonzentration an Ni<sup>2+</sup> betrug zwischen 2.5 und 5.0 µM.

## 4.4 Präparative Methoden

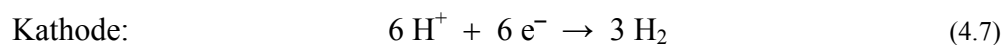
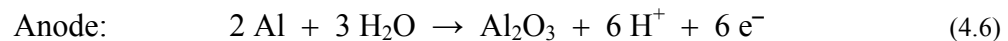
### 4.4.1 Herstellung poröser Aluminate

#### 4.4.1.1 Grundlagen der Herstellung

Aluminium ist sowohl in Wasser als auch an Luft mit einer Oxidschicht überzogen, was auf die Reaktion:



zurückzuführen ist. Die native Oxidschicht trennt die Reaktionspartner voneinander und bewirkt eine Passivierung des Aluminiums sobald eine Schichtdicke von wenigen Nanometern erreicht ist. Die Reaktion kann jedoch durch Anlegen einer äußeren Spannung aufrechterhalten werden, wobei an den Elektroden folgende Reaktionen ablaufen:



Die Oxidation des Aluminiums vollzieht sich dabei an der Metall/Oxid-Grenzfläche. Die  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen bilden entweder mit zur Metall/Oxid-Grenzfläche gewanderten  $\text{O}^{2-}$ - oder  $\text{OH}^-$ -Ionen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  oder wandern aufgrund des angelegten Feldes zur Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche.

**Einfluss des Elektrolyten** Erfolgt die Oxidation in Elektrolyten, die das gebildete Aluminiumoxid nicht auflösen (z. B. Borsäure, Zitronensäure), so kommt es zur Ausbildung einer massiven Oxidschicht. Dieses sogenannte *Barriereoxid* wächst solange, bis die angelegte Spannung nicht mehr ausreicht, um den Ionenstrom durch das Oxid aufrechtzuerhalten. Das Oxidwachstum findet an beiden Oxidgrenzflächen statt, da sowohl  $\text{Al}^{3+}$ - als auch  $\text{O}^{2-}/\text{OH}^-$ -Ionen durch das Oxid transportiert werden. Zudem ist der Ionenstrom in Bereichen dünnerer Oxidschichten aufgrund des größeren elektrischen Feldes stärker ausgeprägt, wodurch anfängliche Unebenheiten im Barriereoxid ausgeglichen werden.

Verwendet man zur Oxidation einen Elektrolyten, der in der Lage ist, das Oxid langsam aufzulösen (z. B. Oxalsäure, Phosphorsäure), so kommt es zur Ausbildung einer porösen Oxidschicht. Die Bildung des Oxids findet in diesem Fall fast ausschließlich an der Metall/Oxid-Grenzfläche statt, da die durch das Oxid wandernden  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche direkt in den Elektrolyten übergehen.

Wird die Oxidation dagegen in einem Elektrolyten durchgeführt, der das Oxid sehr schnell auflöst (z. B. konzentrierte anorganische Säuren), so wird die Aluminiumoberfläche elektropoliert. Durch die hohe Bildungs- und Auflösungsrate von  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wird die Oberfläche geglättet und es entsteht ein reflektierendes Substrat mit einer dünnen, planaren Oxidschicht<sup>103</sup>.

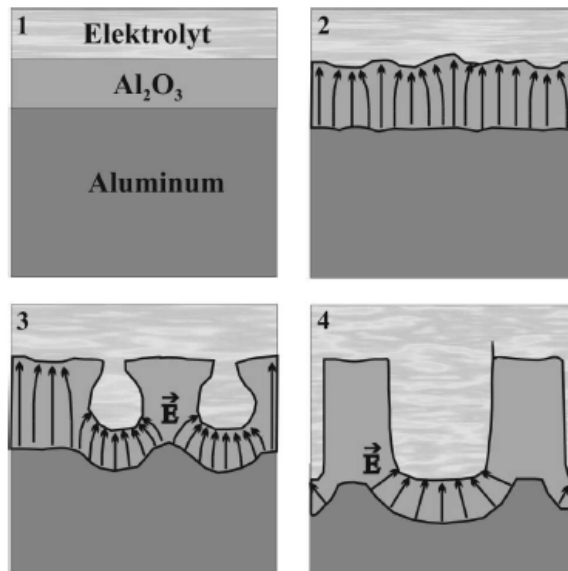


Abb. 4.9: Kinetik des Porenwachstums: 1. Bildung eines Barriereoxids, 2. Entstehung von Vertiefungen, 3. Bildung der ersten Poren, 4. Porenwachstum<sup>46</sup>.

**Porenbildung** In Abb. 4.9 ist die Ausbildung einer porösen Oxidschicht bei Verwendung schwach auflösender Elektrolyten schematisch dargestellt. Abb. 4.10 zeigt die zugehörige Strom-Zeit-Kennlinie. Nach Anlegen einer Spannung bildet sich zunächst ein Barriereoxid aus und es kommt zu einem Abfall des Stromflusses (Phase 1). Die Oxidschicht ist aufgrund von Inhomogenitäten auf der Oberfläche des Aluminiums unterschiedlich dick, was sich auf die lokale Stärke des über die Oxidschicht abfallenden elektrischen Feldes auswirkt. Bereiche kleinerer Schichtdicke besitzen eine größere Feldstärke. An diesen Stellen wird einerseits das Aluminiumoxid aufgrund stärker polarisierter Al-O-Bindungen schneller aufgelöst,



andererseits kommt es jedoch durch den erhöhten Ionenstrom auch zur verstärkten Oxidbildung. Bestehende Unebenheiten im Substrat werden somit nicht wie beim Elektropolieren eingeebnet, sondern dienen als Keime für die Porenbildung (Phase 2). Der Strom steigt nun an, bis die ganze Substratoberfläche mit Poren bedeckt ist und diese sich gegenseitig im Wachstum einschränken. Jetzt stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Oxidbildung an der Metall/Oxid-Grenzfläche und Oxidauflösung an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche ein (Phase 4). Theoretisch sollte die Gleichgewichtseinstellung einen konstanter Stromfluss zur Folge haben, praktisch nimmt der Strom jedoch über einen längeren Zeitraum betrachtet leicht ab, da es zu Konzentrationsänderungen des Elektrolyten innerhalb der Poren kommt<sup>46</sup>.

103

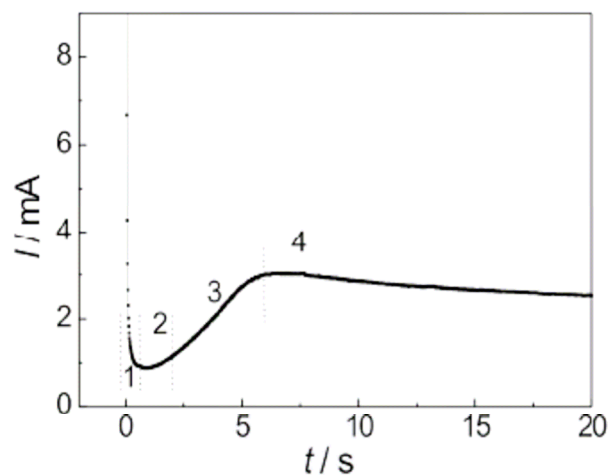


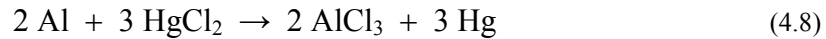
Abb. 4.10: Stromverlauf des Anodisierungsprozesses von Aluminium in 0.3 M Oxalsäure<sup>46</sup>.

**Ungeordnete und geordnete Poren** Das beschriebene Porenwachstum ist im Anfangsstadium gekennzeichnet durch eine zufällige Anordnung der Poren und eine große Variation in Größe und Form. Im Laufe des Anodisierungsprozesses geht das ungeordnete Wachstum aufgrund abstoßender Kräfte zwischen den Poren in ein geordnetes Wachstum mit hexagonaler Anordnung der Poren über. Wird das so gebildete Oxid abgelöst, erhält man eine vorstrukturierte Oberfläche, deren hexagonal angeordnete Vertiefungen in einem zweiten Anodisierungsprozess als Keime für die Bildung geordneter Poren dienen<sup>103, 104</sup>.

**Einfluss der Anodisierungsparameter** Durch die Wahl geeigneter Anodisierungsparameter können Porengröße, -abstand und -tiefe bestimmt werden<sup>103, 105, 106</sup>. So nimmt die Tiefe der Poren linear mit der Anodisierungsdauer zu. Der Durchmesser und Abstand der Poren kann über die angelegte Spannung gesteuert

werden. Zudem stellen niedrige Temperaturen eine kleine Wachstumsrate sicher, wodurch eine höhere Ordnung der Poren erzielt wird.

**Abtrennung des Aluminiums und Öffnen der Porenböden** Nach dem Ätzprozess kann überschüssiges Aluminium mittels Quecksilber(II)-chlorid entfernt werden:



Um eine offene siebartige Porenstruktur zu erhalten, kann das nun freiliegende Barriereoxid an den Porenböden mit Phosphorsäure aufgelöst werden.

#### 4.4.1.2 Präparative Vorgehensweise

Die Herstellung poröser Aluminate mit Porendurchmessern von 60 nm erfolgte ausgehend von hochreinen Aluminiumfolien (99.999 %, Dicke: 0.5 mm, 2 x 2 cm<sup>2</sup>, Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, England) in einem mehrstufigen Prozess.

**Elektropolieren** Vor der Anodisierung wurden die Aluminiumfolien zur Glättung der Oberfläche dreimal bei 65 °C elektropoliert. Hierzu wurde solange eine Spannung von 20 V angelegt, bis der Strom auf ca. 0.3 A abgefallen war. Als Elektrolyt diente eine Mischung aus konz. Schwefelsäure, Phosphorsäure und Wasser in einem Massenverhältnis von 2:2:1 bzw. 1:1:1.

**Herstellung einer vorstrukturierten Oberfläche** Nach dem Elektropolieren wurden in einem ersten Ätzschritt ungeordnete Poren gebildet. Abb. 4.11 zeigt den schematischen Aufbau der Ätzkammer. Die Anode besteht aus einem Kupferblock mit eingebautem Peltierelement, über den die Aluminiumfolie kontaktiert wird. Ein in den Elektrolyten eintauchendes Platinnetz bildet die Kathode. Ein Rührer gewährleistet, dass die Zusammensetzung des Elektrolyten an der Substratoberfläche konstant bleibt. Das Peltierelement und ein angeschlossener Kühlwasserkreislauf dienen der Temperaturregulierung.

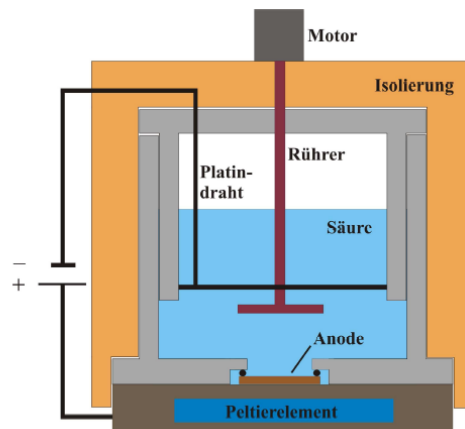


Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Ätzapparatur: Die Aluminiumfolie bildet, kontaktiert über einen Kupferblock, am Boden der Apparatur die Anode, ein Platindraht dient als Kathode<sup>103</sup>.

Die Anodisierung der Aluminiumfolien erfolgte bei 2 °C und einer Spannung von 40 V in 0.3 M Oxalsäure. Zur Vorstrukturierung der Oberfläche reicht ein Zeitraum von 6 – 12 h aus. Nach erfolgter Ätzung wurden die Aluminiumfolien zur Ablösung der gebildeten porösen Oxidschicht bei 70 °C in einer sauren Chrom(VI)-Oxid-Lösung (1.8 % (w:w) CrO<sub>3</sub>, 7.06 % (w:w) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %ig) in Wasser) inkubiert. Nach ca. 5 h wurden die Substrate zur Entfernung von Säureresten gründlich mit Reinstwasser gespült.

**Herstellung geordneter Poren** Aufgrund der vorliegenden Vorstrukturierung auf der Substratoberfläche stellte sich in einem weiteren Anodisierungsschritt mit identischen Anodisierungsparametern von Beginn an ein geordnetes Porenwachstum ein. Diese zweite Anodisierung wurde fünf Tage durchgeführt, um bei einer Wachstumsrate von 1 – 2 µm/h<sup>103</sup> eine ausreichende Porentiefe zu erzielen.

**Ablösen des Aluminiums** Zur Abtrennung des überschüssigen Aluminiums wurden die Träger solange bei Raumtemperatur in einer gesättigten HgCl<sub>2</sub>-Lösung inkubiert, bis das Aluminium vollständig oxidiert war.

**Öffnen der Porenböden** Die nun vorliegenden porösen Aluminiumoxidträger wurden zur Entfernung des Barriereoxids an der Substratunterseite mit 10 %iger (w:w) Phosphorsäure 90 min bei 30 °C behandelt. Um ausschließlich das Oxid an den Porenböden anzugreifen wurden das Substrat in eine Teflonkammer gespannt und einseitig auf einer Fläche mit einem Durchmesser von 5 mm mit Säure benetzt.

#### 4.4.2 Präparation von nano-BLMs

Vor der Präparation von nano-BLMs wurden die Porenstege der porösen Aluminate mit einer Thiolipidmonoschicht funktionalisiert. Dabei wurde die Affinität von Thiolen zu Gold genutzt. Aufgrund der geringeren Rauigkeit der Substrate an der Unterseite wurde diese für die Funktionalisierung gewählt.

Nach der Reinigung der porösen Aluminate im Argon-Plasma wurde eine 25 nm dicke Goldschicht aufgesputtert (*Sputter Coater* 108 auto, Cressington). Die Funktionalisierung der Aluminate erfolgte durch Inkubation in 1 mM ethanolischer Lösung von DPPE bei 8 °C über Nacht. Anschließend wurden die funktionalisierten Substrate gründlich mit Ethanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und zwischen zwei Teflonkompartimente gespannt, die über ein Loch mit einem Durchmesser von 3 mm verbunden waren (Abb. 4.8). Nachdem beide Kompartimente mit Elektrolytlösung gefüllt waren, wurden 8.5 µl einer 20 mM Lösung von DPhPC in *n*-Dekan auf die hydrophobisierte Fläche pipettiert.

#### 4.4.3 Präparation von klassischen BLMs

Klassische BLMs wurden nach der *Müller-Rudin-Methode* präpariert<sup>23-26</sup>. Hierzu wurde eine kleine Menge einer 20 mM Lösung von DPhPC bzw. DPhPC/Cholesterin (7:3) in *n*-Dekan mittels eines auf ein paar Härchen ausgedünnten Pinsels über das Loch gestrichen.

#### 4.4.4 Herstellung von Ag/AgCl-Elektroden

Zwei 4 – 6 cm lange Silberdrähte mit einem Durchmesser von 1.0 mm wurden zur Entfettung 5 min in Aceton eingelegt. Anschließend wurden die Drähte ca. 1 cm tief in 0.5 M KCl eingetaucht und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die angelegte Spannung wurde so hoch gewählt, dass deutlich die Bildung von Wasserstoff an der Kathode zu erkennen war. Durch mehrmaliges Umpolen kam es zu einer gleichmäßigen Abscheidung von Silberchlorid an beiden Elektroden, wobei gut beschichtete Elektroden eine violette bis schwarze Farbe aufweisen. Während des Einsatzes von Ag/AgCl-Elektroden kommt es zu einem Abbau der

Silberchloridschicht, wodurch die Qualität der Elektroden abnimmt. So kann es während Einzelkanalmessungen zur Erhöhung des Rauschens kommen. Daher wurden die Elektroden während des Einsatzes von Zeit zu Zeit erneuert. Die verbliebene AgCl-Schicht wurde dazu mittels Schleifpapier entfernt.

#### 4.4.5 Vesikelpräparation

Unilamellare Vesikel wurden nach der *Extrusionsmethode* hergestellt<sup>5</sup>. Die gesamte Präparation muss dabei bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der Lipide erfolgen. In dieser Arbeit wurden die Lipide DPhPC und POPC verwendet. POPC liegen bei Raumtemperatur in der fluiden Phase vor. Für DPhPC liegen derzeit keine Information zum Phasenverhalten vor. Die Präparationen wurden daher bei Raumtemperatur durchgeführt.

**Allgemeine Präparation** Für die Präparation wurden zunächst Lipidfilme hergestellt. Eine entsprechende Menge der in Chloroform gelösten Lipide wurde in ein Reagenzglas gegeben und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen. Der resultierende dünne, an der Glaswand haftende Lipidfilm wurde zur vollständigen Entfernung von Lösungsmittelresten 3 h im Vakuum bei 30 °C getrocknet. Die Lipidfilme wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung von Vesikeln wurde der Lipidfilm nach Zugabe einer entsprechenden Menge der bei der jeweiligen Anwendung gewünschten Lösung 15 min inkubiert. Anschließend wurde in periodischen Abständen von 5 min dreimal für 30 s geschüttelt (Vortexer REAX top, Heidolph). Die Lipide waren als multilamellare Vesikel suspendiert. Zur Herstellung unilamellarer Vesikel wurde die Suspension mittels eines Miniextruders (LiposoFast<sup>®</sup>, Avestin) 31 mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm gedrückt.

**Präparation zur Durchführung kinetischer Untersuchungen mittels UV-Spektroskopie** Bei den unter 4.1.2.3 beschriebenen Messungen wurden 100 nm Vesikel von DPhPC mit integriertem bpy\* in 0.5 M KCl und als Referenz eine entsprechende Vesikelsuspension von reinem DPhPC benötigt. Dazu wurden 2 mg Lipidfilme hergestellt, wobei für die Vesikelsuspensionen mit integriertem bpy\* vor dem Verblasen des Lösungsmittels eine entsprechende Menge bpy\* in Ethanol

zugesetzt wurden. Die Lipidfilme wurden daraufhin in 1 ml 0.5 M KCl aufgenommen und die Vesikelpräparation wie oben beschrieben vorgenommen.

**Präparation für *release*-Messungen** Für die unter 4.1.3 beschriebenen *release*-Messungen wurden 100 nm Vesikel hergestellt, die im Inneren 5,6-Carboxyfluorescein einschlossen, während die Vesikel umgebende Lösung kein 5,6-Carboxyfluorescein enthielt. Dazu wurde zunächst ein 2 mg POPC-Film in 400  $\mu$ l einer 100 mM Lösung von 5,6-Carboxyfluorescein und 100 mM EDTA in Tris-Puffer (10 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.5) suspendiert. Nach der Extrusion wurden 200  $\mu$ l der Vesikelsuspension zur Abtrennung des 5,6-Carboxyfluorescein in der umgebenden Lösung auf eine Sephadex G25-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit Tris-Puffer konditioniert, welcher auch als Eluent diente. Aufgrund ihrer Größe eluieren die Vesikel vor dem freien 5,6-Carboxyfluorescein mit dem Ausschlussvolumen. Die Vesikelfraktion ist erkennbar als trübe, dunkelgelbe Lösung und wurde für die Messungen 1:20 mit Tris-Puffer verdünnt. Die Lipidkonzentration in der Suspension wurde unter Berücksichtigung aller Verdünnungen auf ca. 0.08 mM geschätzt.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Untersuchungen zur Komplexierung

### 5.1.1 Nachweis der Komplexierung von bpy\*-LS3 mit Ni(II)

Die Rezeptorfunktion bpy\* zeigt in ethanolischer Lösung zwei  $\pi \rightarrow \pi^*$  Absorptionsbanden bei 241 und 282 nm (Abb. 5.1a). In Gegenwart äquimolarer Mengen  $\text{Ni}^{2+}$  kommt es zu einer für komplexiertes 2,2'-Bipyridin charakteristischen bathochromen Verschiebung mit einhergehender Aufspaltung der längerwelligen Bande. Die Absorptionsmaxima liegen für komplexiertes bpy\* in Ethanol bei 250, 294 und 305 nm.

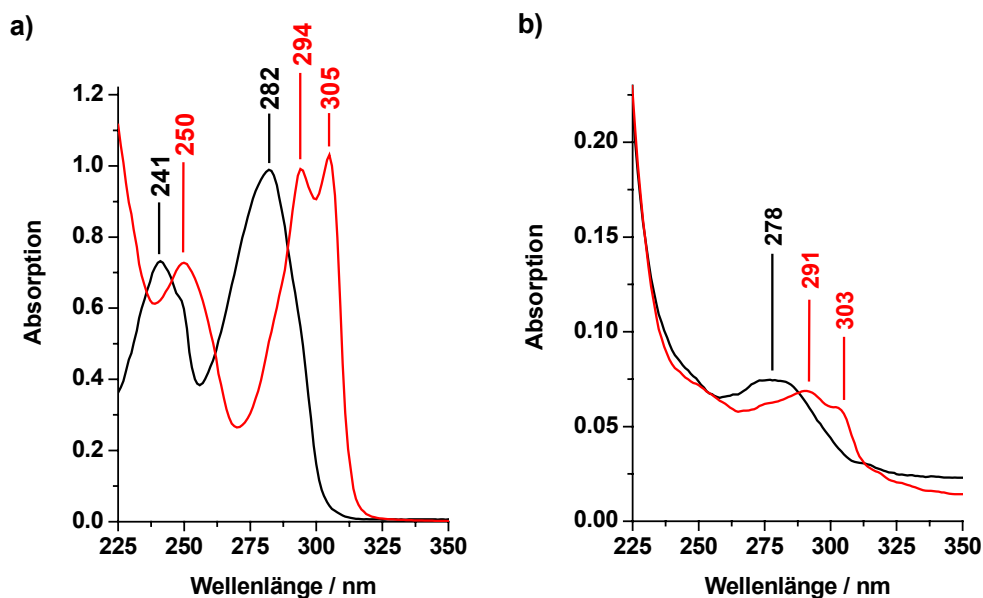


Abb. 5.1: a) Absorptionsspektrum von 68.2  $\mu\text{M}$  bpy\* in Ethanol in Abwesenheit (—) und Anwesenheit (—) von 70  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ . b) Absorptionsspektrum von 5.2  $\mu\text{M}$  bpy\*-LS3 in Ethanol in Abwesenheit (—) und Anwesenheit (—) von 13  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ .

Abb. 5.1b zeigt das Absorptionsspektrum des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Ethanol. Es ist nur ein Absorptionsmaximum der Bipyridin-Einheit bei 278 nm beobachtbar. Die zweite für 2,2'-Bipyridin charakteristische  $\pi \rightarrow \pi^*$

Absorptionsbande im Bereich von 240 nm wird durch die Absorption der Peptidbindungen überlagert. In Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  konnte eine Rotverschiebung und Aufspaltung der beobachteten Absorptionsbande zu 291 und 303 nm beobachtet werden, die nur auf die Komplexbildung der Bipyridinfunktion des Peptids zurückgeführt werden kann.

### **5.1.2 Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von Ni(II)-bpy\*-Komplexen in Ethanol und Mizellen**

2,2'-Bipyridin ist ein starker Komplexbildner. Als zweizähliger Ligand bildet es in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen sehr stabile 1:1-, 2:1- und 3:1-Komplexe. Die Rezeptoreinheit bpy\* enthält neben der Bipyridin-Einheit auch einen Alkylspacer mit endständiger Carboxylgruppe, der sich auf die mögliche Komplexstöchiometrie und -stabilität auswirken kann. Aufgrund des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens von freien und komplexgebundenen bpy\* ist mittels einer photometrischen Titration die Bestimmung von Komplexbildungskonstanten möglich. Die Komplexbildung wurde dabei sowohl in ethanolischer Lösung als auch in einer Lösung von neutralen Octyl-Polyoxyethylen (o-POE)-Mizellen in 0.5 M KCl untersucht. Letztere diente dazu, die Bedingungen der Komplexbildung des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 während der Einzelkanalmessungen zu simulieren. Die Mizellen sollten dabei die hydrophobe Umgebung einer Lipidmembran nachahmen, mit der die Rezeptorfunktion wechselwirken kann, ohne jedoch, wie es bei Vesikeln denkbar ist, einen Anteil der bpy\*-Moleküle durch Einschluss in den Innenraum für das Metallion unzugänglich zu machen.

Es gibt zwei Gründe, warum für die Bestimmung der Komplexbildungskonstanten lediglich die bpy\*-Einheit anstatt des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 verwendet wurde. Zum einen besitzt bpy\*-LS3 in Ethanol eine deutlich geringere Löslichkeit als die Rezeptorfunktion bpy\*. Die Absorptionsunterschiede von freiem und komplexgebundenen bpy\*-LS3 sind daher nur gering, wodurch die Bestimmung der Komplexbildungskonstanten entsprechend ungenauer ist. Zum anderen erfolgten die Titrations in den beiden unterschiedlichen Lösungen nicht durch sukzessive Zugabe einer Lösung des Metallions, da dies zu einer kontinuierlichen Verdünnung führt. Um die Verfälschung der Absorptionsunterschiede zu umgehen, wurden zu



unterschiedlichen Lösungen der Rezeptorfunktion bpy\* jeweils eine kleine Menge von  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentration gegeben. Eine entsprechende Vorgehensweise war im Falle des Peptids bpy\*-LS3 nicht möglich, da der Verbrauch an Substanz zu groß gewesen wäre. Aus diesen Gründen wurden die Titrations zur Bestimmungen der Komplexbildungskonstanten ebenso wie die im folgenden Kapitel (5.1.3) beschriebenen Untersuchungen zur Kinetik der Komplexierung nicht mit dem rezeptorfunktionalisierten Peptid durchgeführt, sondern die Rezeptorfunktion bpy\* als Referenzsubstanz gewählt.

Abb. 5.2a zeigt die im Rahmen einer photometrischen Titration einer ethanolischen Lösung von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  erhaltenen Spektren. Mit steigender  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentration kann die zunehmende Verschiebung der Absorptionsmaxima und damit verbunden die zunehmende Komplexierung von bpy\* spektroskopisch verfolgt werden. Die Spektren weisen dabei zwei isosbestische Punkte bei 262 und 289 nm auf. Eine weitere Erhöhung der Metallkonzentration führte zu keiner weiteren Veränderung im Spektrum.

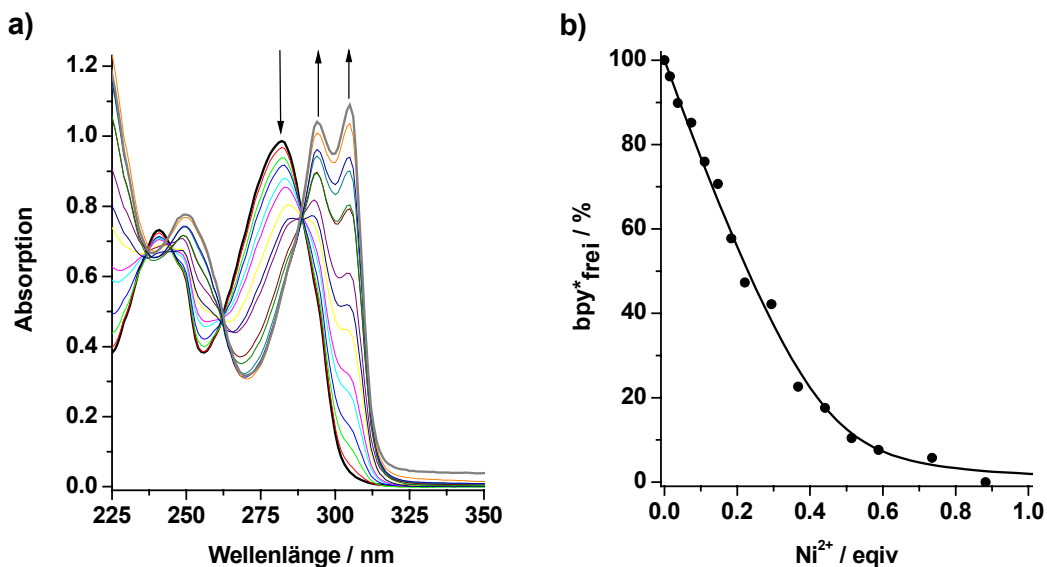


Abb. 5.2: Titration einer Lösung von  $68.0 \mu\text{M}$  bpy\* in Ethanol mit  $\text{NiCl}_2$ . a) Absorptionsspektren der reinen Lösung (—) und nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  (—),  $2.5 \mu\text{M}$  (—),  $5 \mu\text{M}$  (—),  $7.5 \mu\text{M}$  (—),  $10 \mu\text{M}$  (—),  $12.5 \mu\text{M}$  (—),  $15 \mu\text{M}$  (—),  $20 \mu\text{M}$  (—),  $25 \mu\text{M}$  (—),  $30 \mu\text{M}$  (—),  $35 \mu\text{M}$  (—),  $40 \mu\text{M}$  (—),  $50 \mu\text{M}$  (—) bzw.  $60 \mu\text{M}$  (—)  $\text{NiCl}_2$ . b) Berechneter Stoffmengenanteil an freiem Ligand bpy\* (•) und Kurvenanpassung unter Annahme von drei sukzessiven Komplexierungsstufen und der Vorgabe  $\log K_1 = 6.25$  (—).

Die gemessene Gesamtabsorption  $A(\lambda)$  setzt sich aus der Absorption von freiem Liganden  $A_L$  und komplexgebundenem Liganden  $A_C$  zusammen. Nach:

$$A(\lambda) = x_L \cdot A_L^* + (1-x) \cdot A_C^* \quad (5.1)$$

kann der molare Anteil an freiem Liganden  $x_L$  bei verschiedenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentrationen bestimmt werden.  $A_L^*$  entspricht dabei der Absorption des Liganden zu Beginn der Titration und  $A_C^*$  der Absorption des komplexierten Liganden, die in Gegenwart hoher Nickelkonzentrationen bzw. sobald eine Erhöhung der Nickelkonzentration zu keiner weiteren Veränderung im Spektrum führt, bestimmt werden kann.

Abb. 5.2b zeigt den bezogen auf die Ausgangskonzentration berechneten relativen Stoffmengenanteil an freiem bpy\* in Abhängigkeit der zugegebenen Metallionenäquivalente. Zur Berechnung wurde die Absorptionsabnahme bei 282 nm herangezogen. Eine entsprechende Kurvenanpassung unter Einbeziehung der drei möglichen sukzessiven Komplexierungsstufen zeigte bei drei unterschiedlichen Titrationsreihen, dass, sofern alle drei Komplexbildungskonstanten frei variiert wurden, die Komplexbildungskonstante  $K_1$  schlecht definiert ist. Dies spiegelte sich darin wieder, dass sehr unterschiedliche Werte im Bereich von  $\log K_1 = 1$  bis  $\log K_1 = 35$  erhalten wurden, deren Fehler den eigentlichen Wert um ein Vielfaches überstieg. Die ermittelten Komplexbildungskonstanten  $K_2$  und  $K_3$  waren dagegen in der gleichen Größenordnung und ihre Fehler waren kleiner als 5 %. Eine analoge Kurvenanpassung, bei der nur zwei Komplexierungsstufen zugrunde gelegt wurden, war dagegen nicht möglich oder lieferte chemisch nicht sinnvolle Werte. Aus diesem Grund erfolgte die Kurvenanpassung gemäß einer möglichen 3:1-Stöchiometrie, wobei die Komplexbildungskonstante  $K_1$  konstant auf dem Literaturwert<sup>107</sup> von  $\log K_1 = 6.25$  gehalten wurde.

Durch gewichtete Mittelwertbildung der aus drei Titrationsen von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  ermittelten Werte ergeben sich für die Komplexbildungskonstanten in ethanolischer Lösung:

$$\log K_1 = 6.25 \quad (\text{Literaturwert}^{107}, \text{ konstant gehalten})$$

$$\log K_2 = 5.41 \pm 0.09$$

$$\log K_3 = 3.97 \pm 0.09.$$

In Abb. 5.3a sind die Spektren einer photometrischen Titration von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in einer Lösung von o-POE-Mizellen in 0.5 M KCl dargestellt. Die Absorptionsmaxima von bpy\* in Abwesenheit des Metallions sind in der mizellaren Elektrolytlösung verglichen mit dem Spektrum in Ethanol leicht rotverschoben und liegen bei 242 und 285 nm. Nach Zusatz zunehmender Mengen Ni<sup>2+</sup> konnte wiederum die, durch die Komplexierung verursachte, charakteristische bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima mit gleichzeitiger Aufspaltung der längerwelligen Bande beobachtet werden, jedoch musste im Gegensatz zu den Messungen in Ethanol eine Inkubationszeit von 2 h eingebracht werden (vgl. 5.1.3). Bei 264, 290 und zusätzlich 241 nm traten isosbestische Punkte auf. Die Absorptionsmaxima für komplexgebundenes bpy\* in der mizellaren Elektrolytlösung liegen bei 250, 295 und 306 nm.

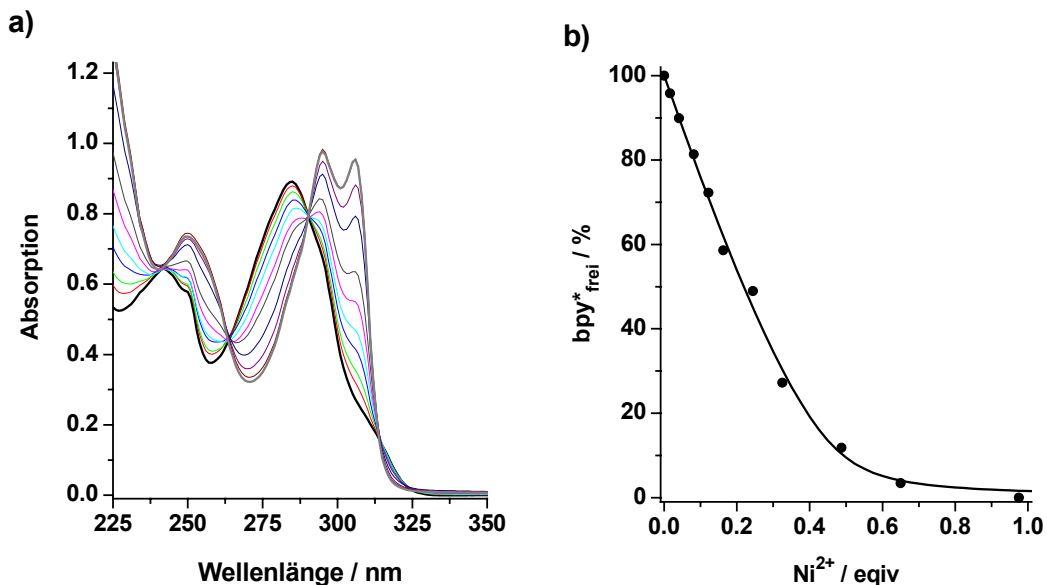


Abb. 5.3: Titration einer Lösung von 61.5 μM bpy\* in 0.5 M KCl, 1 % o-POE mit NiCl<sub>2</sub>. a) Absorptionsspektren der reinen Lösung (—) und nach Zugabe von 1 μM (—), 2.5 μM (—), 5 μM (—), 7.5 μM (—), 10 μM (—), 15 μM (—), 20 μM (—), 30 μM (—), 40 μM (—) bzw. 60 μM (—) NiCl<sub>2</sub>. b) Berechneter Stoffmengenanteil an freiem Ligand bpy\* (•) und Kurvenanpassung unter Annahme von drei sukzessiven Komplexierungsstufen und der Vorgabe log K<sub>1</sub> = 6.25 (—).

Entsprechend Gl. 5.1 wurde wiederum der relative Stoffmengenanteil an freiem bpy\* nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Ni<sup>2+</sup> berechnet (Abb. 5.3b). Zur Berechnung wurde die Absorptionsabnahme bei 285 nm verwendet. Analog zur Untersuchung der Komplexierung in Ethanol war auch im Falle der mizellaren Lösung eine Kurvenanpassung an die ermittelten Wertepaare basierend auf einer maximalen Komplexstöchiometrie von 2:1 nicht möglich. Ausgehend von drei

Komplexierungsstufen zeigte sich anhand zweier Titrations wiederum, dass die Komplexbildungskonstante  $K_1$  nicht ausreichend definiert ist. Daher wurde sie wie bei der Bestimmung der Komplexbildungskonstanten in ethanolischer Lösung konstant auf  $\log K_1 = 6.25$  gehalten.

Die Komplexbildungskonstanten von  $\text{bpy}^*\text{-Ni}^{2+}$ -Komplexen betragen demnach in einer Lösung von neutralen o-POE-Mizellen in 0.5 M KCl nach gewichteter Mittelwertbildung aus zwei Bestimmungen:

$$\log K_1^{\text{Miz}} = 6.25 \quad (\text{Literaturwert}^{107}, \text{ konstant gehalten})$$

$$\log K_2^{\text{Miz}} = 5.8 \pm 0.2$$

$$\log K_3^{\text{Miz}} = 4.25 \pm 0.07.$$

Die in mizellarer Lösung ermittelten  $K_2$  und  $K_3$ -Werte sind etwas höher als die in Ethanol bestimmten Werte, liegen allerdings in der gleichen Größenordnung. Die thermodynamische Stabilität der gebildeten  $\text{bpy}^*\text{-Ni}^{2+}$ -Komplexe wird demnach durch die Gegenwart von Mizellen und dem bei den nachfolgenden Einzelkanalmessungen verwendeten Elektrolyten nicht beeinflusst.

### 5.1.3 Kinetik der Komplexierung von $\text{bpy}^*$ mit Ni(II) in Mizellen und Vesikeln

Neben der Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von  $\text{Ni}^{2+}$  mit der Rezeptorfunktion  $\text{bpy}^*$ , wurde mittels UV-Spektroskopie auch die Kinetik der Reaktion in einer unpolaren Umgebung von elektrisch neutralen o-POE-Mizellen in 0.5 M KCl untersucht. Abb. 5.4 zeigt die im Zuge der Komplexierung auftretende Absorptionsabnahme von freiem  $\text{bpy}^*$  bei 285 nm nach Zugabe unterschiedlicher Mengen  $\text{NiCl}_2$ .

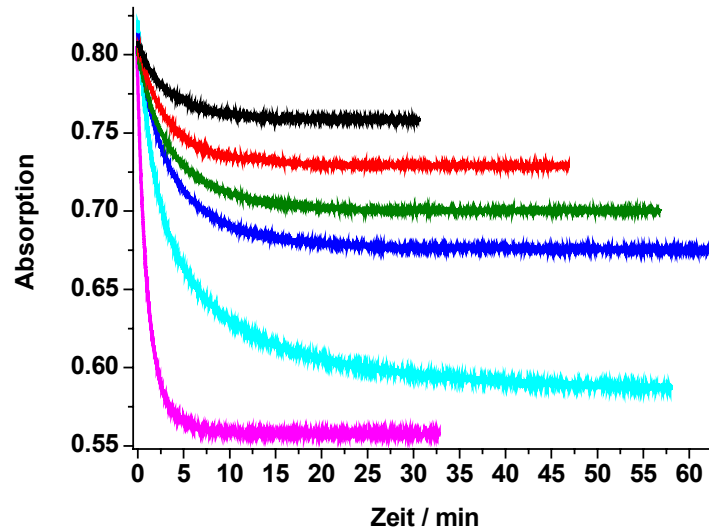


Abb. 5.4: Verlauf der Absorptionsabnahme von 53.4  $\mu\text{M}$  bpy\* in 0.5 M KCl, 1 % o-POE bei 285 nm nach Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  (—), 7.5  $\mu\text{M}$  (—), 10  $\mu\text{M}$  (—), 12.5  $\mu\text{M}$  (—), 20  $\mu\text{M}$  (—) und 70  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> (—).

Die Absorption und damit die Konzentration an freiem bpy\* nimmt nach Zugabe unterschiedlicher Ni<sup>2+</sup>-Konzentrationen exponentiell ab. Die Zeitspanne bis zur Einstellung des Gleichgewichts, erkennbar an einer konstantbleibenden Absorption, war sowohl von der bpy\*-Ausgangskonzentration  $[\text{bpy}^*]_0$  als auch von der Ni<sup>2+</sup>-Ausgangskonzentration  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  abhängig. Lag das Verhältnis  $[\text{Ni}^{2+}]_0/[\text{bpy}^*]_0$  im Bereich von 1:2, so konnte die Einstellung des Gleichgewichts bis zu 90 min dauern. Je mehr die Konzentrationen von diesem Verhältnis abwichen, umso schneller konnte eine konstante Absorption beobachtet werden, jedoch waren immer mehrere Minuten nötig.

Dagegen verlief die Komplexbildung von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in Ethanol sehr schnell. Beispielsweise betrug die Zeitspanne bis zur Einstellung des Gleichgewichts nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> zu einer 59.5  $\mu\text{M}$  Lösung von bpy\* in Ethanol unter 5 s (nicht abgebildet). Die Komplexbildung von Ni<sup>2+</sup> durch die Rezeptorfunktion bpy\* ist demnach in einer Lösung von elektrisch neutralen o-POE-Mizellen in 0.5 M KCl retardiert.

Mittels einer Auftragung des natürlichen Logarithmus der Absorption  $\ln(A(t) - A_\infty^*)$  gegen die Zeit  $t$  wurden durch lineare Regression Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexbildung als Steigungen der Geraden ermittelt:

$$\ln(A(t) - A_{\infty}^*) = C - k' \cdot t \quad (5.2)$$

$A_{\infty}^*$  steht hierbei für den Endwert der Absorption nach Zugabe eines Überschusses an  $\text{Ni}^{2+}$  bezüglich  $\text{bpy}^*$ , also für die Absorption nach Einstellung des Gleichgewichts und möglichst vollständiger Komplexierung.  $C$  ist eine Konstante, die der vertikalen Verschiebung entspricht. Auf diese Weise werden im Allgemeinen Geschwindigkeitskonstanten 1. oder pseudo-1. Ordnung bestimmt. Die Komplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit  $\text{bpy}^*$  ist keine Reaktion 1. Ordnung und bei den gewählten Ausgangskonzentrationen auch keine Reaktion pseudo-1. Ordnung. Dennoch wurde dieser Ansatz gewählt, um anhand der so bestimmten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  den Einfluss unterschiedlicher  $\text{bpy}^*$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ausgangskonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexierung in mizellarer Lösung vergleichen zu können.

Abb. 5.5 zeigt die Abhängigkeit der bestimmten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  von  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen des Rezeptors  $[\text{bpy}^*]_0$ . Die Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  nehmen bei konstanter Ausgangskonzentration  $[\text{bpy}^*]_0$  mit steigender Konzentration  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  linear zu. Auch bei steigender Konzentration  $[\text{bpy}^*]_0$  kommt es zu einem Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung.

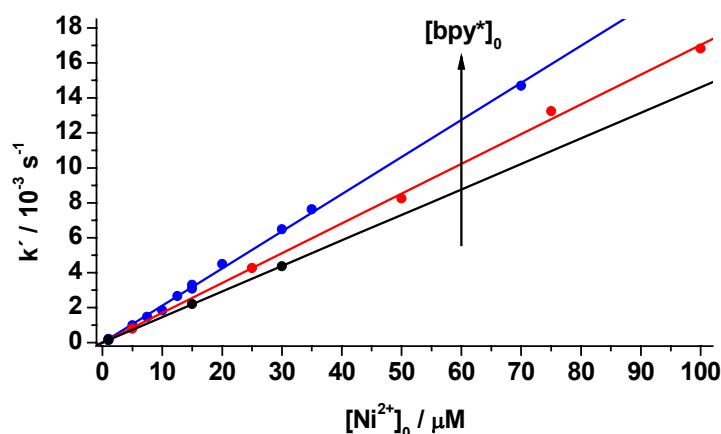


Abb. 5.5: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit  $\text{bpy}^*$  von  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  in 0.5 M KCl, 1 % o-POE bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen  $[\text{bpy}^*]_0$  (29.1  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), 38.3  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ ), 53.4  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ )) und durch lineare Regression durch den Ursprung erhaltene Geraden (—, —, —).

Analog zu den oben beschriebenen kinetischen Untersuchungen zur Komplexbildung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit  $\text{bpy}^*$  in *o*-POE-Mizellen wurde auch die Kinetik der Komplexbildung in Vesikeln betrachtet. Dabei wurde das Lipid 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) verwendet, welches im Rahmen der Einzelkanalmessungen zur Ausbildung von BLMs bzw. nano-BLMs verwendet wurde. Um möglichst nahe an den Messbedingungen der Einzelkanalmessungen zu bleiben wurde wiederum in 0.5 M KCl gearbeitet.

Abb. 5.6 zeigt die Absorptionsabnahme bei 285 nm von freiem  $\text{bpy}^*$  in 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC)-Vesikeln nach Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$ . Die Ausgangskonzentration  $[\text{bpy}^*]_0$  betrug ca. 36  $\mu\text{M}$ . Eine genauere Angabe der Konzentration ist nicht möglich, da die Korrektur der Absorption der Probe mittels einer Referenzlösung, die nur Vesikel enthielt, nicht exakt gelang. Dies resultiert zum einen aus der durch die Vesikel verursachten Lichtstreuung und ist zum anderen bedingt durch die separate Präparation beider Vesikellösungen, bei der es zu unterschiedlicher Verdünnung der Vesikelsuspensionen kam (vgl. 4.4.5).

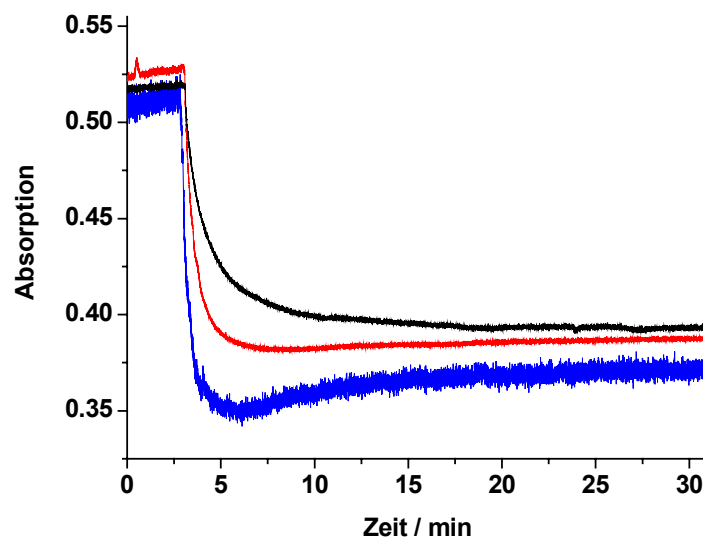


Abb. 5.6: Verlauf der Absorptionsabnahme von ca. 36  $\mu\text{M}$   $\text{bpy}^*$  in DPhPC-Vesikeln ( $\sim 2.4$  mM Lipid) bei 285 nm nach Zugabe von 15  $\mu\text{M}$  (—), 30  $\mu\text{M}$  (—), 50  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  (—) bei  $t = 3$  min.

Die Einstellung des Gleichgewichtszustands in Vesikeln erfolgte nach Zugabe des Metallions innerhalb von 18 - 25 min und dauerte wie in Gegenwart der Mizellen deutlich länger als in Ethanol. Die Komplexbildung ist demnach auch in der hydrophoben Umgebung der Vesikel retardiert.

Im Unterschied zu den Messungen in Mizellen benötigte die Einstellung einer konstanten Absorption bei einem Überschuss an  $\text{Ni}^{2+}$  am längsten. Auffallend ist, dass nach Zugabe von  $50 \mu\text{M NiCl}_2$  die Absorption zunächst relativ schnell von 0.513 auf 0.351 abfällt und dann verhältnismäßig langsam wieder ansteigt, bevor sich ein konstanter Wert von 0.374 einstellt (Abb. 5.6, —). Auch nach Zugabe von  $30 \mu\text{M NiCl}_2$  nimmt die Absorption zunächst ab, durchläuft ein Minimum und steigt dann wieder leicht an bevor sich ein konstanter Wert einpendelt (Abb. 5.6, —). Allerdings ist der Effekt innerhalb dieser Messung nicht so stark ausgeprägt wie nach Zugabe von  $50 \mu\text{M NiCl}_2$ .

Außerdem zeigten die einzelnen Messungen deutliche Unterschiede in der Grundabsorption vor der Zugabe des Metallions. Betrachtet man jedoch die Differenzen ( $A_0 - A_\infty$ ) der Absorption vor Zugabe des Metallions und nach Einstellen eines konstanten Werts der Absorption, so zeigt sich, dass die Absorptionsänderung nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  und  $30 \mu\text{M NiCl}_2$  annähernd gleich groß ist. Das Verhältnis  $[\text{Ni}^{2+}]_0 / [\text{bpy}^*]_0$  betrug nach Zugabe von  $30 \mu\text{M NiCl}_2$  0.83 bzw. nach Zugabe von  $50 \mu\text{M NiCl}_2$  1.39. Die Beobachtung annähernd gleicher Absorptionsänderungen bei den beiden deutlich unterschiedlichen  $[\text{Ni}^{2+}]_0 / [\text{bpy}^*]_0$ -Verhältnissen ist im Einklang mit den Untersuchungen zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten (vgl. 5.1.2), die zeigten, dass ab einem Verhältnis  $[\text{Ni}^{2+}]_0 / [\text{bpy}^*]_0$  von etwa 0.8 der Anteil an freiem  $\text{bpy}^*$  nach erfolgter Komplexierung durch Erhöhung der Metallausgangskonzentration nur noch geringfügig abnimmt.

Die Absorptionsänderung nach Zugabe von  $50 \mu\text{M NiCl}_2$  zu einer  $38.3 \mu\text{M}$  Lösung von  $\text{bpy}^*$  in o-POE-Mizellen betrug nach Einstellung des Gleichgewichts 0.197. Dagegen bewirkte die Zugabe von  $50 \mu\text{M NiCl}_2$  zu einer ca.  $36 \mu\text{M}$  Lösung von  $\text{bpy}^*$  in Vesikeln nach Einstellung des Gleichgewichts lediglich 0.139 und war somit trotz annähernd gleicher Konzentrationen deutlich geringer als bei der vergleichbaren Messung in Mizellen. Indessen führte die Zugabe eines Überschusses an  $\text{Ni}^{2+}$  zu einer  $29.1 \mu\text{M}$  Lösung von  $\text{bpy}^*$  in Mizellen zu einer vergleichbaren Absorptionsänderung von 0.132.



Entsprechend zu den Messungen in Mizellen, wurden auch für die Messungen in Vesikeln anhand einer Auftragung  $\ln(A(t) - A_\infty^*)$  gegen die Zeit  $t$  die Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung in Vesikeln bestimmt. In Abb. 5.7 sind die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  dargestellt. Zum direkten Vergleich sind außerdem die bereits in Abb. 5.5 gezeigten Abhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten der Komplexierung von  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen  $[\text{bpy}^*]_0$  in Mizellen abgebildet.

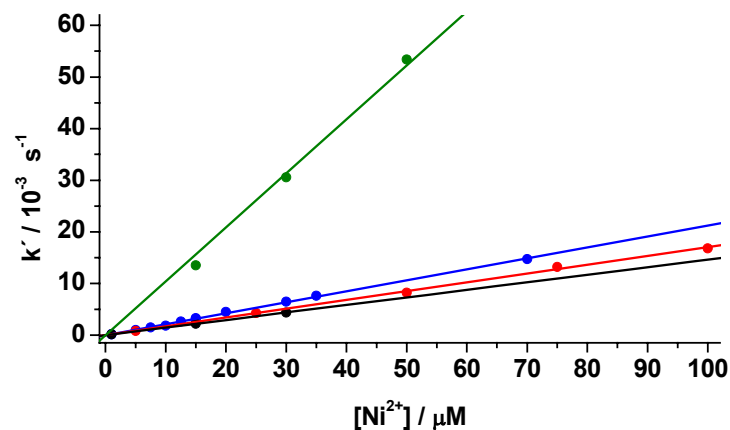


Abb. 5.7: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit  $\text{bpy}^*$  von  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  in DPhPC-Vesikeln in 0.5 M KCl ( $[\text{bpy}^*]_0 \approx 36 \mu\text{M}$ ) ( $\bullet$ ) und in 0.5 M KCl, 1 % o-POE ( $[\text{bpy}^*]_0 = 29.1 \mu\text{M}$  ( $\bullet$ ),  $38.3 \mu\text{M}$  ( $\bullet$ ),  $53.4 \mu\text{M}$  ( $\bullet$ )) und durch lineare Regression durch den Ursprung erhaltene Geraden (—, —, —, —).

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung in Vesikeln nehmen wiederum mit steigender  $[\text{Ni}^{2+}]_0$  zu, liegen allerdings deutlich über denen der Komplexierung in Mizellen.

## 5.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Membranen

Um feststellen zu können, ob die Rezeptorfunktion bpy\* eine permeabilisierende Wirkung auf Lipiddoppelschichten ausübt oder das Peptid bpy\*-LS3 in Abwesenheit einer Transmembranspannung in Lipiddoppelschichten inseriert und dort Poren oder Löcher bildet, wurde in sogenannten *release*-Messungen die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs 5(6)-Carboxyfluorescein aus Vesikeln untersucht.

Abb. 5.8 zeigt exemplarisch die Auftragung der normierten Fluoreszenzintensität:

$$F_{\text{norm}} = (F - F_0) / (F_T - F_0) \quad (5.3)$$

von 5(6)-Carboxyfluorescein gegen die Zeit  $t$  nach sukzessiver Zugabe einer Lösung der Rezeptorfunktion bpy\* in EtOH/Tris-Puffer (1:10) (10 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.5) in 1 min-Intervallen sowie nach entsprechender Zugabe des reinen Lösungsmittelgemisches. Das Verhältnis Lipid/bpy\* wurde bei der betrachteten Messung von ca. 1600 auf 160 erhöht. Nach 11 Minuten wurden die Vesikel durch Zugabe von Triton-X zerstört, wodurch die maximale Farbstofffreisetzung erzielt wurde.

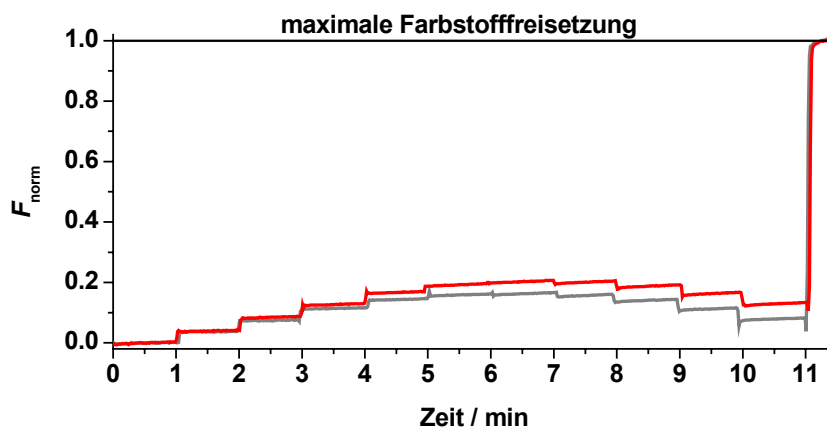


Abb. 5.8: Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität von 5(6)-Carboxyfluorescein in Abhängigkeit von der Zeit bei sukzessiver Zugabe von 5.3  $\mu\text{M}$  bpy\* (—) in Ethanol/Tris-Puffer (1:10) sowie reinem Ethanol/Tris-Puffer (1:10) (—) in 5  $\mu\text{l}$ -Schritten und 1 min-Intervallen. Bei  $t = 11$  min erfolgte jeweils die Zerstörung der Vesikel durch Triton-X.

Die untersuchten Substanzen waren aufgrund der besseren Löslichkeit in einer 1:10-Mischung von Ethanol/Tris-Puffer (10 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.5) gelöst. Durch Zugabe des Ethanol/Tris-Puffer-Gemisches kommt es zunächst zu

einem sukzessiven Anstieg der Fluoreszenzintensität auf etwa 17 % des maximal möglichen Wertes. Da die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  reinem Tris-Puffer zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität führte (nicht abgebildet), kann der beobachtete Anstieg nur durch das im Gemisch enthaltene Ethanol verursacht werden. Im weiteren Verlauf der Messung nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab. Im Falle der Zugabe von bpy\* zeigt sich ein analoger Kurvenverlauf wie bei der Zugabe des Lösungsmittelgemisches. Ab einem Lipid/bpy\*-Verhältnis von  $\sim 1/320$  (ab  $t = 5$  min) konnte ein verglichen mit dem Lösungsmittelgemisch höherer Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.

Um die Effekte der Rezeptorfunktion bpy\* und des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 auf die Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus Vesikeln deutlicher zu machen, wurde jeweils die Differenz  $F_{\text{norm}} - F_{\text{norm,LM}}$  der normierten Fluoreszenzintensitäten von 5(6)-Carboxyfluorescein  $F_{\text{norm}}$  der jeweiligen Messreihe und der normierten Fluoreszenzintensität nach Zugabe des verwendeten Lösungsmittels  $F_{\text{norm,LM}}$  gebildet..

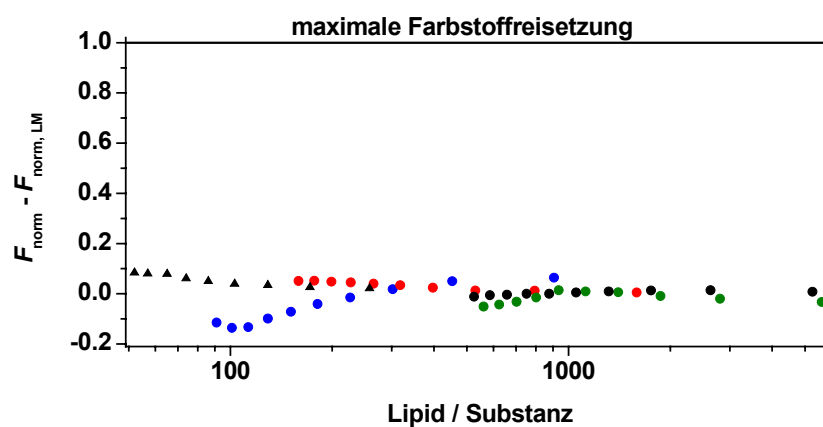


Abb. 5.9: Differenz zwischen den normierten Fluoreszenzintensitäten von 5(6)-Carboxyfluorescein  $F_{\text{norm}}$  nach Zugabe von bpy\* (•), LS3 (•), bpy\*-LS3/NiCl<sub>2</sub> (1:10) (•), bpy\*-LS3 (•) je in Ethanol/Tris-Puffer (1:10) bzw. nach Zugabe von bpy\*-LS3 (▲) in EtOH und der normierten Fluoreszenzintensität  $F_{\text{norm,LM}}$  nach Zugabe analoger Volumina Ethanol/Tris-Puffer (1:10) bzw. EtOH in Abhängigkeit vom Lipid/Substanz-Verhältnis.

Abb. 5.9 zeigt die jeweilige Abhängigkeit von  $F_{\text{norm}} - F_{\text{norm,LM}}$  vom Lipid/Substanz-Verhältnis zusammen mit den Ergebnissen zweier weiterer Messreihen, in denen die durch das Peptid LS3 bzw. durch komplexiertes Peptid bpy\*-LS3 bedingten Effekte auf die Farbstofffreisetzung untersucht wurden. Die Differenzen  $F_{\text{norm}} - F_{\text{norm,LM}}$  liegen bei allen untersuchten Substanzen im Bereich des Nullwerts, der keiner

Farbstofffreisetzung entspricht. Demnach bewirken weder die untersuchten Peptide bpy\*-LS3 und LS3 noch die Rezeptorfunktion bpy\* bei den betrachteten Konzentrationsverhältnissen eine Farbstofffreisetzung aus Vesikeln. Auch die Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> im Falle des Peptids bpy\*-LS3 und die damit verbundene Komplexierung des Peptids zeigt keinen Effekt auf die Farbstofffreisetzung.

## 5.3 Bildung von nano-BLMs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nano-BLMs als Modellmembranen zur Durchführung von Einzelkanalmessungen des Peptids LS3 und des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 verwendet. Nano-BLMs überspannen die Poren mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 nm von porösem Aluminiumoxid. Das Substrat wurde vor der Präparation der nano-BLMs mit Gold beschichtet und durch Chemisorption des Lipids 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTE) hydrophobisiert. Die Präparation der nano-BLMs gelang durch Aufpipettieren eines Tropfens einer Lösung von 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) in *n*-Dekan auf das hydrophobisierte Aluminat. Mit einer Länge von 21 Aminosäuren ist die Helix der beiden Peptide lang genug, um den hydrophoben Membrankern einer Lipiddoppelschicht mit einer Dicke von ca. 3 nm zu durchspannen. Um einen Ionenfluss zwischen zwei wässrigen Kompartimenten zu ermöglichen, ist allerdings eine optimale Membrandicke nötig. Die verwendeten nano-BLMs sollten aus diesem Grund möglichst wenig Lösungsmittelreste enthalten.

Zur Kontrolle des Ausdünnprozesses eines auf das poröse Substrat aufgetragenen Lipidtropfens wurde der Phasenwinkel  $\Theta$  bei einer Frequenz von  $10^6$  Hz in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet. Die Impedanz des Systems ist im Falle einer vollständig ausgedünnten Membran bei  $10^6$  Hz frequenzunabhängig und weist damit einen Phasenwinkel von  $0^\circ$  auf. Es wird also lediglich der Elektrolytwiderstand erfasst. In Abb. 5.10a ist der zeitliche Verlauf des Phasenwinkels exemplarisch dargestellt. Nach dem Aufbringen des Lipidtropfens nimmt der Phasenwinkel sprunghaft auf annähernd  $-90^\circ$  ab ( $t = 27$  s). Im weiteren Verlauf steigt die Phase zunächst langsam auf etwa  $-70^\circ$  an, gefolgt von einem schnellen Anstieg auf etwa  $-10^\circ$  und einem langsamen Abklingen des Anstiegs auf einen Phasenwinkel von  $-3^\circ$ .

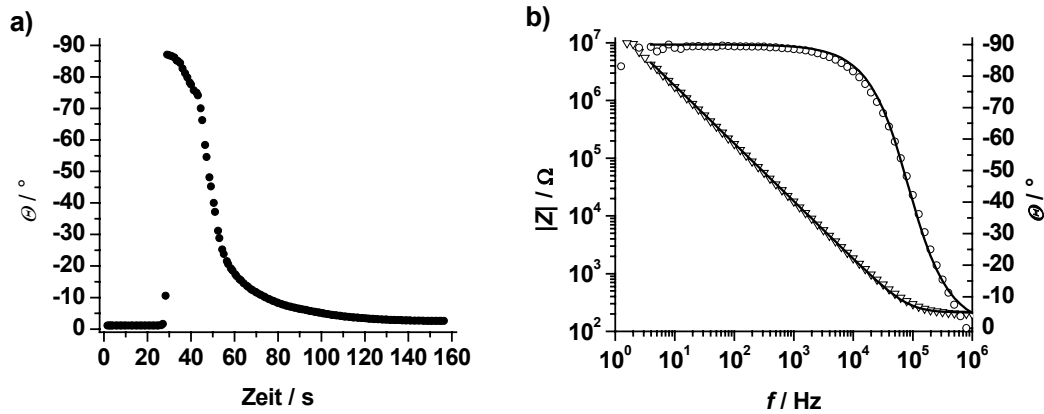


Abb. 5.10: Kontrolle der Bildung von nano-BLMs (Elektrolyt: 0.5 M KCl). a) Beobachtung des Ausdünnverhaltens eines Lipidtropfens auf porösem Aluminat mittels impedanzspektroskopischer Messung des Phasenwinkels  $\theta$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  bei einer Frequenz von  $10^6$  Hz. Das Aufbringen des Lipidtropfens erfolgte nach 27 s. b) Impedanzspektrum einer nano-BLM. Phasenwinkel  $\theta$  (o), Betrag der Impedanz  $|Z|$  ( $\nabla$ ) in Abhängigkeit von der Frequenz  $f$  und einem  $RC$ -Modell entsprechende nichtlineare Kurvenanpassungen (—, —),  $C_m = 0.39 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Abb. 5.10b zeigt exemplarisch das Impedanzspektrum einer nano-BLM nach erfolgreichem Ausdünnen des aufgetragenen Lipidtropfens. Der Membranwiderstand ist so hoch, dass er im betrachteten Frequenzfenster nicht erfasst werden kann. Daher erfolgte die Kurvenanpassung gemäß eines  $RC$ -Modells, bestehend aus einer Serienschaltung von Elektrolytwiderstand  $R_e$  und Membrankapazität  $C_m$  (vgl. 4.2.4). Die Fläche des Aluminats auf dem die nano-BLMs präpariert wurden, betrug  $0.07 \text{ cm}^2$  und die Porosität lag bei 32 %. Die Membrankapazität  $C_m$  der nano-BLMs betrug, bezogen auf die poröse Fläche, im Mittel  $(0.39 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ <sup>^</sup>.

<sup>^</sup> Gemittelt aus 22 Einzelmessungen.

## 5.4 Einzelkanalmessungen

### 5.4.1 Charakterisierung der Kanaleigenschaften des Peptids LS3

#### 5.4.1.1 LS3 in klassischen BLMs

Da sich die Anbindung der Rezeptorfunktion bpy\* an das Peptid LS3 auf die Kanaleigenschaften auswirken kann, wurden zunächst die Kanaleigenschaften von LS3 in klassischen BLMs untersucht, um so einen direkten Vergleich mit dem rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 ziehen zu können.

Abb. 5.11 zeigt für das Peptid LS3 typische Einzelkanalereignisse in klassischen BLMs bestehend aus DPhPC bei einem Membranpotential von +200 mV. Vor der Digitalisierung wurden alle Einzelkanalmessungen mit einem 1 kHz 4-Pol-Tiefpass-Bessel-Filter gefiltert. Als Elektrolyt diente 0.5 M KCl. Die Peptidkonzentration im *cis*-Kompartiment betrug 50 nM. Bei kleineren Konzentrationen konnten keine Ereignisse beobachtet werden. Die sprunghafte Erhöhung des Transmembranstroms entspricht einer Zunahme der Leitfähigkeit  $G$  aufgrund der Öffnung eines Ionenkanals. Schließt der Ionenkanal nimmt der beobachtete Stromfluss wieder ab. Die Einzelkanalereignisse traten in der Regel, wie in Abb. 5.11 erkennbar, innerhalb einer kurzen Zeitspanne von 100 bis 200 ms gehäuft auf, woraufhin in Folge für mehrere Sekunden keine Kanalöffnungen beobachtet werden konnten.

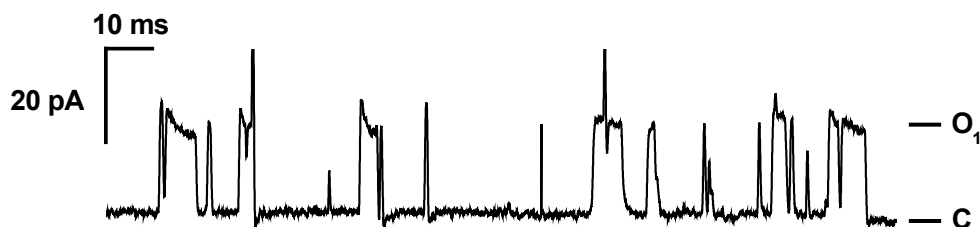


Abb. 5.11: Einzelkanalmessung von LS3 in klassischen BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand C in den geöffneten Zustand  $O_1$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Die Kanalöffnungen resultierten nicht immer in einem Stromplateau. Häufig fiel der Ionenstrom im Verlauf der Kanalöffnung ab oder schwankte, gelegentlich konnten

auch kurze undefinierte Strompulse ausgehend vom geöffneten Zustand  $O_1$  des Kanals beobachtet werden. Trotzdem ist ein einheitliches Leitfähigkeitsniveau der durch das Peptid LS3 gebildeten Ionenkanäle mit einer Stromamplitude im Bereich von 20 pA erkennbar. In variierenden Anteilen traten jedoch auch Kanäle mit kleinerer Leitfähigkeit auf, welche allerdings bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden, da keine definierte Zunahme des Membranstroms ersichtlich war.

Zur Bestimmung der Leitfähigkeit  $G$  des durch das Peptid LS3 gebildeten Ionenkanals wurde eine Histogrammanalyse von 1122 Ereignissen vorgenommen (Abb. 5.12). Bei der Ermittlung der Leitfähigkeiten der einzelnen Ereignisse wurde bei einem Abfall des Stromflusses während der Kanalöffnung der Endwert bzw. bei Schwankungen der Mittelwert herangezogen.

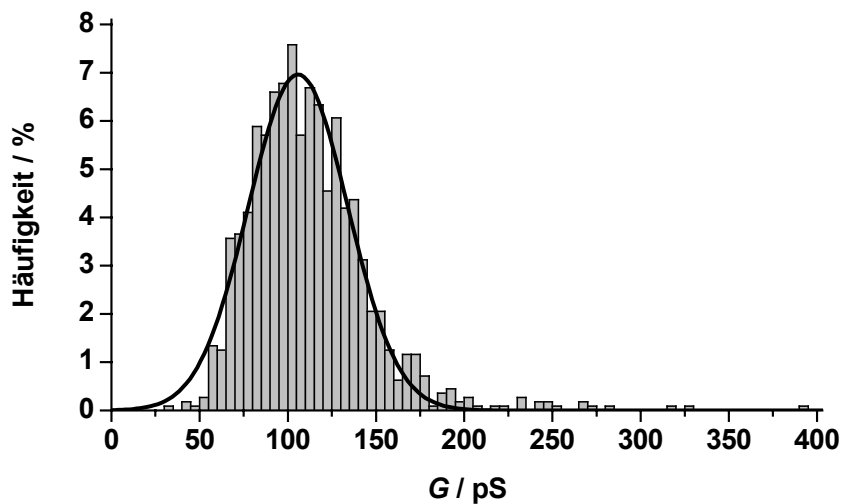


Abb. 5.12: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von LS3 in klassischen BLMs (1122 Ereignisse, 5 pS-Intervalle) und an die Daten angepasste Gaußfunktion (—) mit  $A = 492$  pS und  $G = (106 \pm 28)$  pS ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Die Histogrammanalyse zeigte, dass die Leitfähigkeiten der beobachteten Einzelkanalereignisse im Bereich von 50 bis 165 pS eine Normalverteilung aufweisen. Daher wurden die Parameter einer normierten Gaußfunktion an die Daten angepasst:

$$f(G_{\text{EKE}}) = \frac{A}{\sigma_G \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(\frac{-(G_{\text{EKE}} - G)^2}{2\sigma_G^2}\right) \quad (5.4)$$

Hierbei steht  $G_{\text{EKE}}$  für die experimentell bestimmte Leitfähigkeit der Einzelkanalereignisse,  $G$  für die Leitfähigkeit an der die Gaußfunktion zentriert ist und die nach unendlich vielen Messungen dem wahren Wert der Leitfähigkeit



entspricht,  $\sigma_G$  für den Breitenparameter bzw. die Standardabweichung der Leitfähigkeit und  $A$  für die Fläche der Gaußfunktion.

Die Leitfähigkeit von LS3-Kanälen in klassischen BLMs bei einem Membranpotential von +200 mV beträgt demnach:

$$G = (106 \pm 28) \text{ pS.}$$

Um die mittlere Öffnungsdauer  $\tau$  des Ionenkanals zu ermitteln, wurde eine Histogrammanalyse der Öffnungsdauer der einzelnen Ereignisse vorgenommen. Ereignisse mit kurzen undefinierten Strompulsen ausgehend vom geöffneten Zustand des Kanals wurden dabei nicht berücksichtigt. Das längste betrachtete Ereignis besaß eine Öffnungsdauer von 14.0 ms. Die Histogrammanalyse zeigte eine monoexponentielle Verteilung der Dauer der Kanalöffnungen (Abb. 5.13a). Daher wurden die Parameter einer Exponentialfunktion an die Daten angepasst:

$$f(t) = A \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_{\text{exp}}}\right) \quad (5.5)$$

$A$  steht für die Amplitude der Funktion,  $t$  für die experimentell bestimmte Öffnungsdauer und  $\tau_{\text{exp}}$  für die mittlere Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse, deren Wert entsprechend der Kurvenanpassung  $(1.82 \pm 0.01) \text{ ms}$  beträgt.

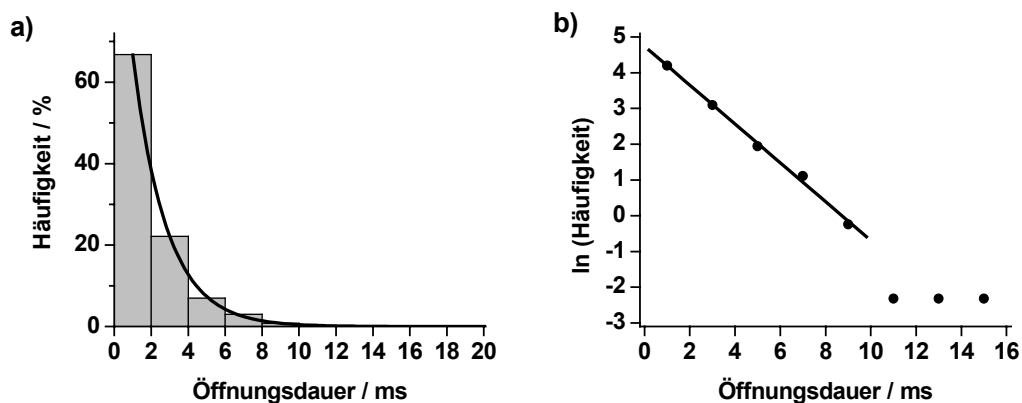


Abb. 5.13: Bestimmung der Öffnungsdauer von LS3 in klassischen BLMs ( $U_m = +200 \text{ mV}$ , Elektrolyt: 0.5 M KCl). a) Histogrammanalyse (1017 Ereignisse, 2 ms-Intervalle) und an die Daten angepasste Exponentialfunktion (—) mit  $A = 66.6$  und  $\tau_{\text{exp}} = (1.82 \pm 0.01) \text{ ms}$ . b) Linearisierung der in a) dargestellten Daten (•) und durch lineare Regression erhaltene Gerade (—) mit  $\ln A = 4.7$  und einer Steigung von  $(-0.54 \pm 0.02) \text{ ms}^{-1}$ .

Eine Linearisierung der durch die Histogrammanalyse gewonnenen Daten gemäß:

$$f(t) = \ln A + \left( -\frac{1}{\tau_{\text{lin}}} \right) \cdot t \quad (5.6)$$

lieferte im Bereich von 0 – 10 ms eine Gerade und bestätigte somit die monoexponentielle Verteilung der Öffnungsdauer (Abb. 5.13b). Die Steigung der Geraden entspricht hierbei dem negativen Kehrwert der mittleren Öffnungsdauer  $\tau_{\text{lin}}$ . Mittels linearer Regression wurde für  $\tau_{\text{lin}}$  ein Wert von  $(1.85 \pm 0.07)$  ms bestimmt.

Durch gewichtete Mittelwertbildung zwischen  $\tau_{\text{exp}}$  und  $\tau_{\text{lin}}$  ergibt sich demnach eine mittlere Öffnungsdauer von:

$$\tau = (1.82 \pm 0.01) \text{ ms}$$

für LS3 in klassischen BLMs.

### 5.4.1.2 LS3 in nano-BLMs

Um einen Eindruck zu gewinnen, inwiefern das bei den Einzelkanalmessungen verwendete Membransystem Einfluss auf die Eigenschaften des untersuchten Ionenkanals hat, wurden neben der Charakterisierung von LS3-Kanälen in klassischen BLMs auch die Eigenschaften in nano-BLMs untersucht.

Analog zu den Experimenten an klassischen BLMs wurde das Lipid DPhPC zur Präparation der nano-BLMs benutzt. Es wurde wiederum ein konstantes Membranpotential von +200 mV angelegt und 0.5 M KCl als Elektrolyt verwendet.

Im Vergleich zu den Messungen an klassischen BLMs zeigte sich, dass der Grundstrom über die Membran ohne geöffneten Ionenkanal bei nano-BLMs deutlich höher liegt. Im Falle der klassischen BLMs wurde ein Grundstrom im Bereich von  $-1$  pA bis maximal 5 pA beobachtet, während er bei den Messungen an nano-BLMs meist zwischen 15 pA und 200 pA lag. Hieraus folgte für die nano-BLMs ein erhöhtes Grundrauschen. Das Peak-zu-Peak-Rauschen lag bei einer Filterfrequenz von 1 kHz nach der Digitalisierung der Daten bei klassischen BLMs im Bereich von 1 – 2 pS und bei nano-BLMs im Bereich von 10 – 20 pA. Zur Verminderung des Rauschens wurden die aufgezeichneten Stromkurven bei Messungen mit nano-BLMs vor der Auswertung zusätzlich mit einem Gauß-Tiefpassfilter (500 Hz) gefiltert.

Die LS3-Konzentration im *cis*-Kompartiment variierte bei den Messungen zwischen 1.25 und 25 nM, wobei auch im Falle der kleinen Peptidkonzentration die Kanalaktivität deutlich höher war als bei den vergleichbaren Messungen an klassischen BLMs.

In Abb. 5.14 sind für das Peptid LS3 charakteristische Einzelkanalmessungen in nano-BLMs abgebildet. Die Einzelkanalereignisse traten wie bei den analogen Messungen an klassischen BLMs wiederum innerhalb bestimmter Zeitspannen, sogenannter *bursts*, gehäuft auf. Die deutlich höhere Aktivität von LS3 in nano-BLMs verglichen mit den analogen Messungen in klassischen BLMs äußerte sich zum einen darin, dass die Zeitspannen, in denen gehäuft Einzelkanalereignisse auftraten, deutlich länger waren. So konnten teilweise über mehrere Sekunden kontinuierlich Einzelkanalereignisse detektiert werden, die so dicht aufeinander

folgten, dass der Strom nur sehr kurz auf den Ausgangswert des geschlossenen Zustands  $C$  zurückging (Abb. 5.14a). Zum anderen waren die Zeitspannen zwischen zwei Perioden, in denen Ereignisse gehäuft auftraten, deutlich kürzer. Abb. 5.14b zeigt einen Ausschnitt einer Messung bei relativ geringer Aktivität von LS3, in der die Einzelkanalereignisse besser aufgelöst sind.

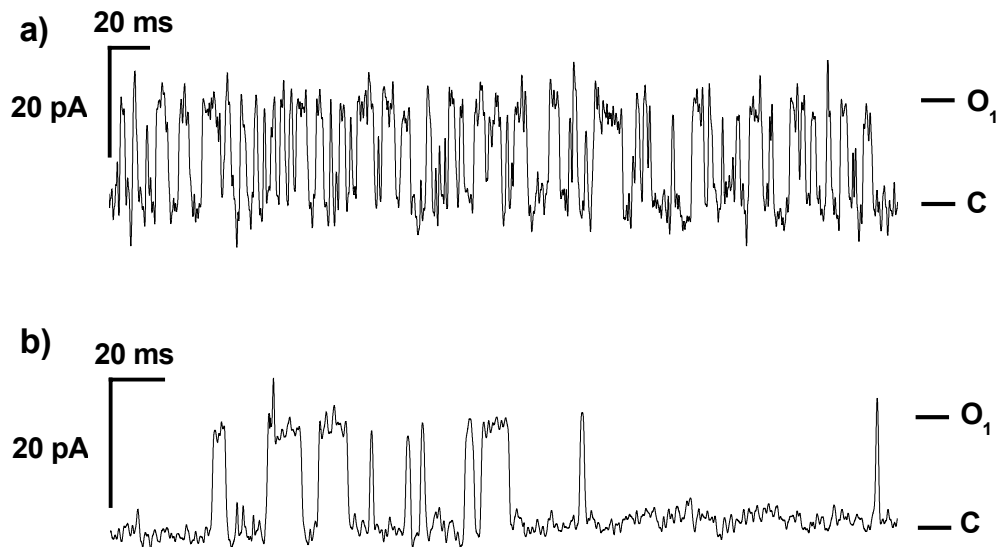


Abb. 5.14: Einzelkanalmessungen von LS3 in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand  $C$  in den geöffneten Zustand  $O_1$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Ebenso wie bei den Messungen in klassischen BLMs konnte bei den Einzelkanalereignissen ein Abfall oder Schwanken des Stromflusses während der Kanalöffnung beobachtet werden. Jedoch war der Anteil an Kanalöffnungen mit einem Abfall im Stromfluss geringer. Auch traten vereinzelt Einzelkanalereignisse mit kleineren Stromamplituden auf. Diese wurden analog zur Auswertung der Messungen in klassischen BLMs nicht berücksichtigt, zumal sie sich bei den Messungen in nano-BLMs oft nicht deutlich genug vom Rauschen absetzten.

Neben den auch in klassischen BLMs beobachteten Stromamplituden von ca. 20 pA ( $O_1$ ) konnten in nano-BLMs auch höhere Stromamplituden in Bereichen von 30 pA ( $O_2$ ), 40 pA ( $O_3$ ) und 70 pA ( $O_4$ ) beobachtet werden (Abb. 5.15).

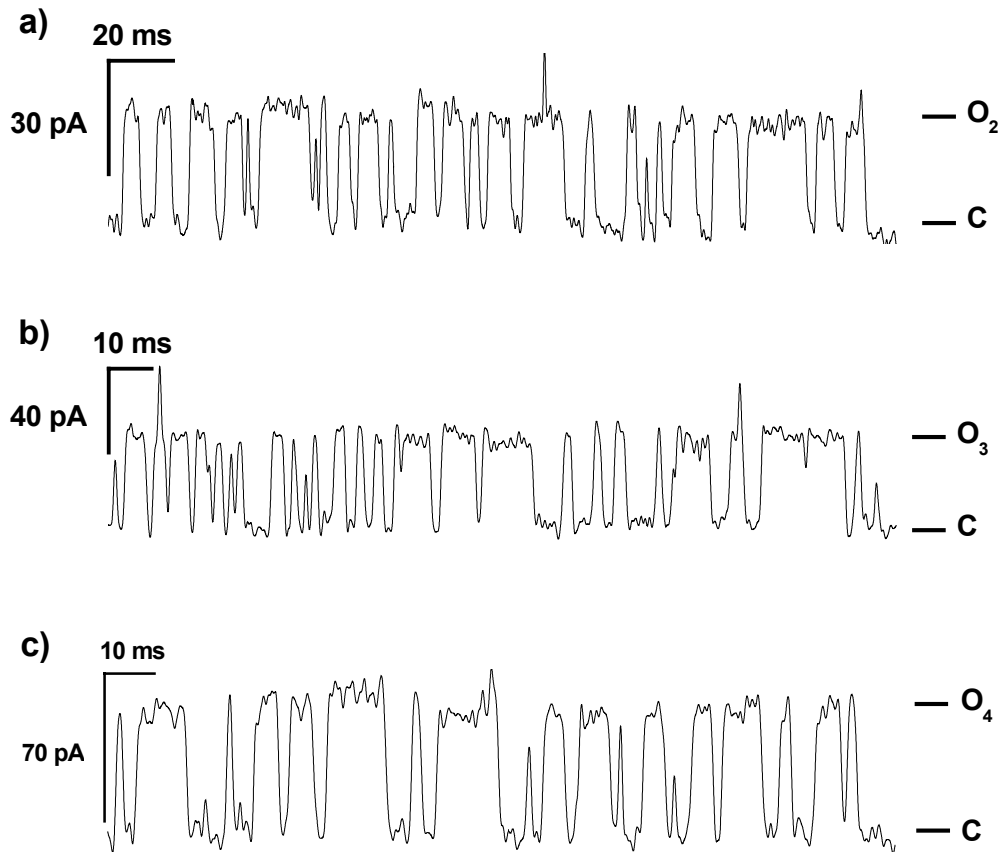


Abb. 5.15: Einzelkanalmessungen von LS3 in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand  $C$  in die geöffneten Zustände  $O_2$  (a),  $O_3$  (b) und  $O_4$  (c) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Auffallend war, dass Ereignisse mit der selben Stromamplitude wiederum gehäuft auftraten, also innerhalb eines *bursts* nahezu ausschließlich Einzelkanalereignisse einer Öffnungsstufe detektiert werden konnten. Außerdem konnte beobachtet werden, dass in verschiedenen Experimenten die unterschiedlichen Öffnungsstufen in variierenden Anteilen detektiert wurden. So konnten beispielsweise innerhalb eines Experiments zunächst einige *bursts* der Öffnungsstufe  $O_2$  beobachtet werden, woraufhin nur noch *bursts* der Öffnungsstufe  $O_4$  folgten. Während eines anderen Experiments traten dagegen z. B. ausschließlich *bursts* der Öffnungsstufen  $O_1$  und im späteren Verlauf des Experiments *bursts* der Öffnungsstufe  $O_2$  auf.

Eine Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten von 16359 Ereignissen zeigte zwei Bereiche, in denen sich die Ereignisse entsprechend einer Gaußverteilung häufen (Abb. 5.16). Es handelt sich dabei um Leitfähigkeiten im Bereich von 175 – 280 pS und 280 – 450 pS, welche den *bursts* mit Stromamplituden von etwa 40 pA ( $O_3$ ) bzw. 70 pA ( $O_4$ ) entsprechen. Im Bereich von 50 – 175 pS, der den *bursts* mit

Stromamplituden von ca. 20 pA ( $O_1$ ) und knapp 30 pA ( $O_2$ ) entspricht, kann man lediglich eine Gaußverteilung mit einer Schulter zu höheren Leitfähigkeiten beobachten. Dies resultiert aus einer Kombination zwischen der Streuung und des verglichen dazu geringen Unterschieds in den Leitfähigkeiten der Einzelkanalereignisse.

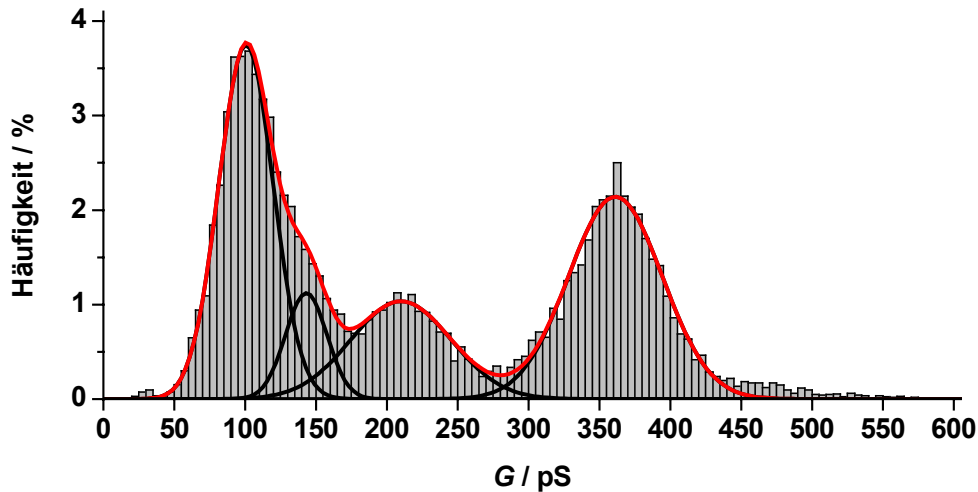


Abb. 5.16: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von LS3 in nano-BLMs (16359 Ereignisse, 5 pS-Intervalle) und an die Daten angepasste Gaußfunktionen 1. Ordnung (—) und 4. Ordnung (—) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Um den vier beobachteten Leitfähigkeitsstufen gerecht zu werden, wurden in den Bereichen bis 115 pS, 175 – 280 pS und ab 280 pS jeweils eine Gaußfunktion an die Daten angepasst. Um die Parameter der vierten Gaußfunktion, welche die weitere Leitfähigkeitsstufe beschreibt zu bestimmen, wurde eine Gaußfunktion 4. Ordnung (Gl 5.7) im gesamten Wertebereich an die Daten angepasst, die insbesondere im Bereich von 50 – 450 pS den Daten sehr gut entspricht. Dabei wurden die Parameter der drei separat bestimmten Gaußfunktionen als Konstanten vorgegeben. So konnten die Parameter der verbliebenen Gaußfunktion bestimmt werden.

$$f(G_{\text{EKE}}) = \sum_{i=1}^k \frac{A_i}{\sigma_{G_i} \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(\frac{-(G_{\text{EKE}} - G_i)^2}{2\sigma_{G_i}^2}\right) \quad \text{mit } k = 4 \quad (5.7)$$

Tab. 5.1 fasst die Parameter der so bestimmten Gaußfunktionen und ihre relativen Flächenanteile zusammen. Die Kennziffer  $n$  entspricht der fortlaufenden Nummerierung der ermittelten Leitfähigkeitsstufen.

Tab. 5.1: Zusammenfassung der an die bestimmten Leitfähigkeiten angepassten Parameter der Gaußfunktionen in den drei Wertebereichen bis 115 pS ( $n = 1$ ), 175 – 280 pS ( $n = 3$ ) und ab 280 pS ( $n = 4$ ) und den daraus über eine Gaußfunktion 4. Ordnung bestimmten Parametern der verbliebenen Gaußfunktion ( $n = 2$ ) für LS3 in nano-BLMs.

$n$	$A$ / pS	$G_i$ / pS	$\sigma_G$ / pS	Anteil / %
1	180	101	19	37
2	41	143	15	8
3	92	210	35	19
4	178	361	33	36

Neben den bisher beschriebenen Öffnungsstufen konnte noch eine weitere Öffnungsstufe  $O_5$  mit Stromamplituden im Bereich von 95 pA erfasst werden. Abb. 5.17 zeigt einen Ausschnitt eines *bursts* von Einzelkanalereignissen. Zudem sind in Abb. 5.17 kurze uneinheitliche Strompulse ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_5$  dargestellt, auf die im späteren Verlauf weiter eingegangen wird.

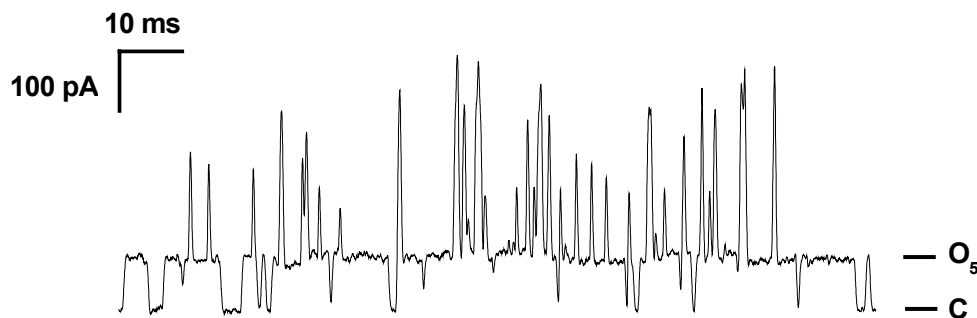


Abb. 5.17: Einzelkanalmessungen von LS3 in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand  $C$  in den geöffneten Zustand  $O_5$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Einzelkanalereignisse der Öffnungsstufe  $O_5$  konnten nur innerhalb von zwei *bursts* mit insgesamt 109 Ereignissen detektiert werden. Aufgrund des seltenen Auftretens der Öffnungsstufe  $O_5$  war innerhalb der oben dargestellten Histogrammanalyse (Abb. 5.16) eine Bestimmung der Leitfähigkeit durch Anpassung einer Gaußfunktion im entsprechenden Bereich nicht möglich. Um dennoch eine Aussage über die Leitfähigkeit treffen zu können, wurde eine Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten der Einzelkanalereignisse innerhalb der beiden beobachteten *bursts* vorgenommen (Abb. 5.18) und die Parameter einer Gaußfunktion angepasst (Tab. 5.2).

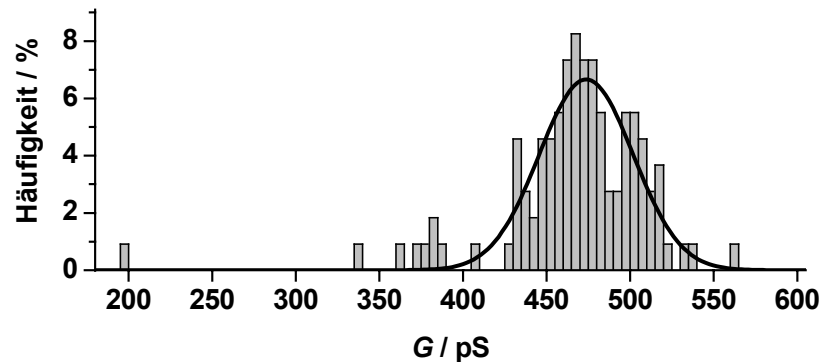


Abb. 5.18: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von LS3 in nano-BLMs innerhalb von *bursts* der Öffnungsstufe  $O_5$  (109 Ereignisse, 5 pS-Intervalle) und an die Daten angepasste Gaußfunktion (—) mit  $A = 469$  pS und  $G = (474 \pm 28)$  pS ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

In Abb. 5.17 sind, wie bereits erwähnt, kurze Strompulse ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_5$  dargestellt. Diese Strompulse ausgehend von der Stromamplitude eines Einzelkanalereignisses konnten auch in klassischen BLMs beobachtet werden. Allerdings traten sie in nano-BLMs vor allem bei den höheren Öffnungsstufen sehr viel häufiger auf. Ihre Stromamplituden waren, wie in Abb. 5.17 erkennbar, uneinheitlich und zeigten, bis auf wenige Ausnahmen, kein Plateau. Die Maximalwerte innerhalb eines *bursts* lagen meist in einem Bereich von 350 – 400 pA, erreichten allerdings auch gelegentlich Werte von bis zu 750 pA. Diese Werte beziehen sich auf das ursprüngliche Stromsignal, welches für die Auswertung nicht mit einem Tiefpassfilter (500 Hz) bearbeitet wurde. Aufgrund der Uneinheitlichkeit dieser Strompulse wurde von einer quantitativen Auswertung ihrer Leitfähigkeiten abgesehen.

Darüber hinaus konnten ausgehend von einer bestehenden Öffnungsstufe auch Übergänge beobachtet werden, bei denen sich für einen gewissen Zeitraum eine definierte Stromamplitude einstellte. Abb. 5.19 zeigt beispielsweise einen Ausschnitt einer Messung in der es neben Übergängen zwischen dem geschlossenen Zustands  $C$  und der Öffnungsstufe  $O_4$  auch zu Übergängen zwischen  $O_4$  und einer weiteren Öffnungsstufe  $O_6$  kommt.



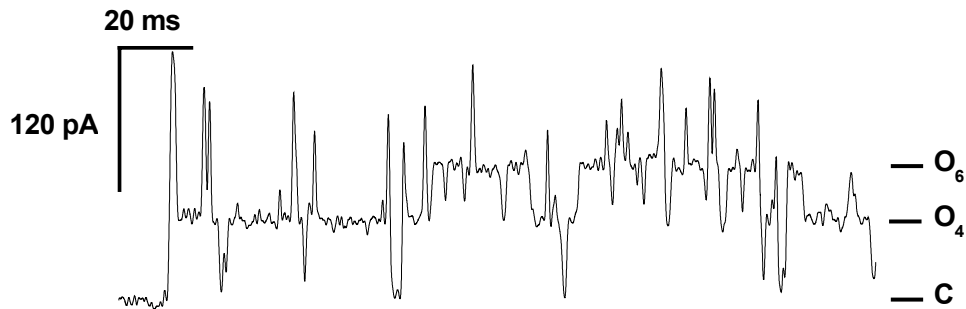


Abb. 5.19: Einzelkanalmessungen von LS3 in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand  $C$  in die geöffneten Zustände  $O_4$  und  $O_6$ , sowie Übergänge zwischen den geöffneten Zuständen  $O_4$  und  $O_6$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Diese Übergänge zwischen einem geöffneten Zustand  $O_i$  und einem weiteren geöffneten Zustand  $O_{i+x}$  mit höherer und definierter Stromamplitude traten verglichen mit den kurzen, undefinierten Strompulsen weniger häufig auf. Um diesen Öffnungsstufen dennoch gerecht zu werden, wurden in einer separaten Histogrammanalyse ihre Leitfähigkeiten untersucht (Abb. 5.20). In die Auswertung flossen dabei nur Ereignisse, bei denen ein Plateau in der Stromamplitude erkennbar war. Die Intervall-Breite des Wertebereichs wurde aufgrund der stärkeren Streuung der Einzelwerte verglichen mit den bisher gezeigten Histogrammanalysen auf 10 pS verdoppelt. Außerdem wurden Übergänge zwischen den Öffnungsstufen  $O_{1-5}$  nicht berücksichtigt, da diese verglichen mit dem Auftreten der Ereignisse ausgehend vom geschlossenen Zustand  $C$  nur extrem selten beobachtet werden konnten.

Durch die Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten von 1004 Stromamplituden mit Plateaus konnten drei Bereiche ausfindig gemacht werden, in denen sich die Leitfähigkeiten entsprechend einer Gaußverteilung häufen (Abb. 5.20). Diese liegen im Bereich von 500 – 690 pS, 690 – 920 pS und 920 – 1200 pS, welche Stromamplituden von ca. 120 pA ( $O_6$ ), 160 pA ( $O_7$ ) und 200 pA ( $O_8$ ) entsprechen. Zudem zeigte sich eine Anhäufung von Leitfähigkeiten mit undefinierter Verteilung im Bereich von 1500 – 2100 pS. In Tab. 5.2 sind die in den Wertebereichen bis 690 pS, 690 – 920 pS und 920 – 1200 pS angepassten Parameter von drei Gaußfunktionen angegeben.

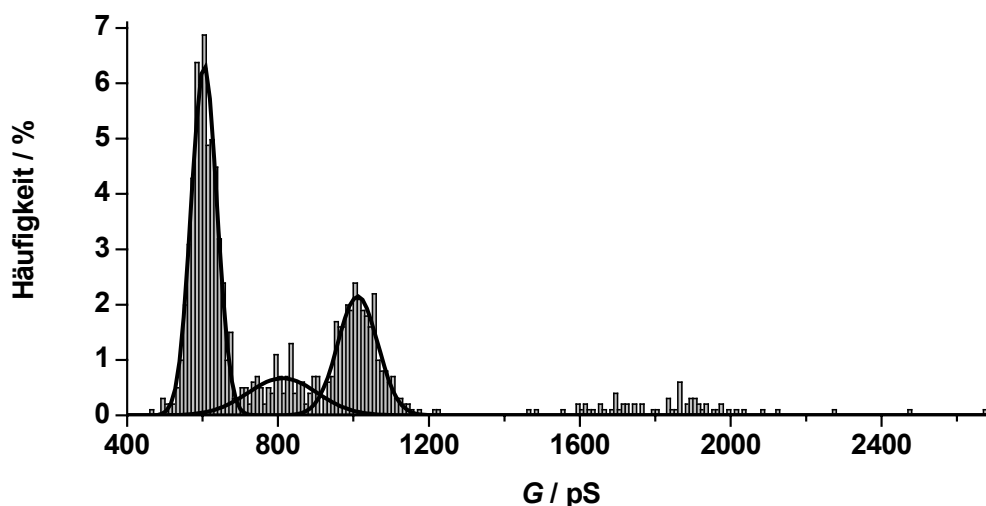


Abb. 5.20: Histogrammanalyse der höheren Leitfähigkeiten von LS3 in nano-BLMs (1004 Ereignisse, 10 pS-Intervalle) und an die Daten angepasste Gaußfunktionen (—) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Tab. 5.2: Zusammenfassung der an die innerhalb von *bursts* der Öffnungsstufe  $O_5$  ( $n = 5$ ) bestimmten Leitfähigkeiten angepassten Parameter einer Gaußfunktion und der an die bestimmten höheren Leitfähigkeiten angepassten Parameter der Gaußfunktionen in den drei Wertebereichen bis 690 pS ( $n = 6$ ), 690 – 920 pS ( $n = 7$ ) und 920 - 1200 pS ( $n = 8$ ) für LS3 in nano-BLMs.

$n$	$A$ / pS	$G_i$ / pS	$\sigma_G$ / pS
5	469	474	28
6	538	604	34
7	154	812	92
8	284	1011	53

Abb. 5.21 zeigt die separate Betrachtung der erreichten Leitfähigkeiten bei Übergängen ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_4$  bzw.  $O_5$  zu einer höheren Öffnungsstufe. Anhand der Histogramme wird deutlich, dass ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_4$  bevorzugt Übergänge zu den Öffnungsstufen  $O_6$  und  $O_8$  erfolgen. Ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_5$  erfolgen ausschließlich Übergänge zur Öffnungsstufe  $O_7$  und zu höheren Leitfähigkeiten im Bereich von ca. 1500 – 2100 pS.

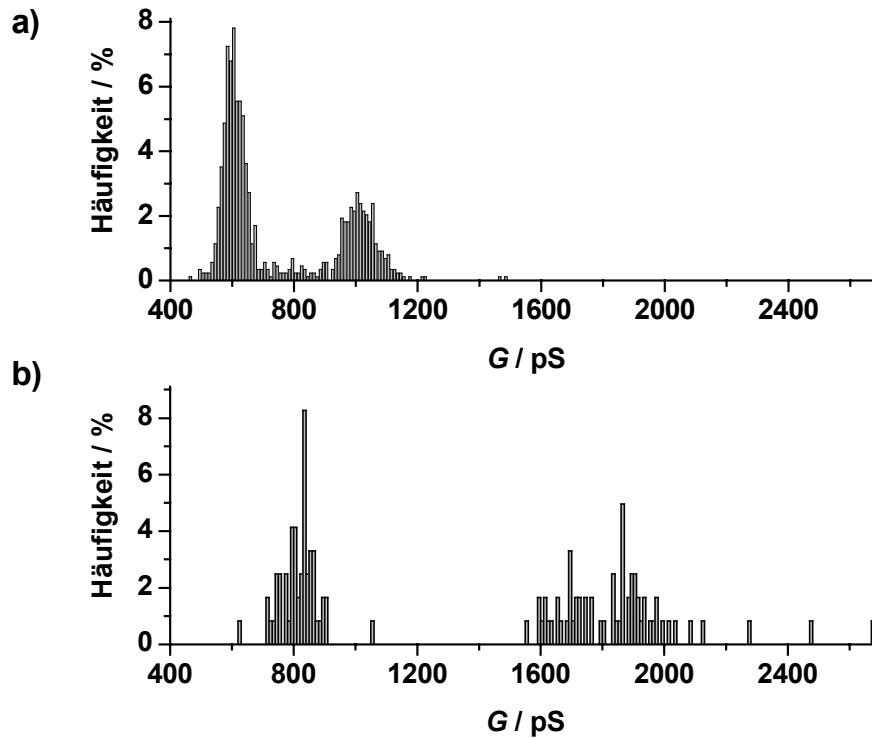


Abb. 5.21: Histogrammanalyse der höheren Leitfähigkeiten von LS3 in nano-BLMs a) ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_4$  (883 Ereignisse, 10 pS-Intervalle) und b) ausgehend von der Öffnungsstufe  $O_5$  (121 Ereignisse, 10 pS-Intervalle) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Zusammenfassend ergeben sich für die bestimmten Leitfähigkeitsstufen von LS3 in nano-BLMs folgende Werte:

$$G_1 = (101 \pm 19) \text{ pS}$$

$$G_2 = (143 \pm 15) \text{ pS}$$

$$G_3 = (210 \pm 35) \text{ pS}$$

$$G_4 = (361 \pm 33) \text{ pS}$$

$$G_5 = (474 \pm 28) \text{ pS}$$

$$G_6 = (604 \pm 34) \text{ pS}$$

$$G_7 = (812 \pm 92) \text{ pS}$$

$$G_8 = (1011 \pm 53) \text{ pS}.$$

Die Leitfähigkeit eines Ionenkanals ist von der Porengröße, der Porenlänge und der Dielektrizitätskonstante innerhalb der Pore abhängig. Die Leitfähigkeit kann durch eine einfache Näherung der Kanalstruktur abgeschätzt werden<sup>59</sup>. Dabei wird der Kanal als eine zylindrische Pore in der Lipiddoppelschicht angesehen. Der

Widerstand des Ionenkanals setzt sich zusammen aus dem Widerstand im Inneren der Pore  $R_p$  und dem Eingangswiderstand  $R_E$ , den die Ionen bei der Diffusion zum Poreneingang bzw. vom Porenausgang weg erfahren.

Der Widerstand der Pore  $R_p$  ist gegeben durch:

$$R_p = \frac{\rho \cdot l}{r^2 \cdot \pi} \quad (5.8)$$

mit dem spezifischen Widerstand der Elektrolytlösung  $\rho$ , der Länge der Pore  $l$  und dem Porenradius  $r$ .

Der Eingangswiderstand  $R_E$  ist gegeben durch:

$$R_E = \frac{\rho}{2 \cdot r} \quad (5.9)$$

Für die Leitfähigkeit  $G$  eines Ionenkanals ergibt sich demnach:

$$G = \frac{1}{R_p + R_E} = \frac{r^2 \cdot \pi}{\rho \cdot (l + 0.5 \cdot \pi \cdot r)} \quad (5.10)$$

Betrachtet man den Ionenkanal als ein Bündel von  $N$  Zylindern mit Radius  $R$  so ergibt sich für den Porenradius nach dem *Zylinder-Modell* in erster Näherung:

$$r_{\text{calc}} = R \cdot \left( \frac{1}{\sin(\pi/N)} - 1 \right) \quad (5.11)$$

Somit kann die Leitfähigkeit eines Ionenkanals in Abhängigkeit der Anzahl  $N$  der Peptidhelices im kanalbildenden Bündel berechnet werden.

Die in dieser Betrachtung der Leitfähigkeit eines Ionenkanals getroffenen Näherungen sind stark vereinfacht, da jegliche Wechselwirkung der Ionen mit dem Kanal ausgeschlossen wird und die Peptidhelices als starre Zylinder angesehen werden. Die berechneten Leitfähigkeiten sind daher höher als die tatsächlich beobachteten. So ergibt sich für ein hexameres Helix-Bündel von LS3 mit einem Durchmesser der einzelnen Peptidhelices  $R$  von 0.5 nm, einer Porenlänge  $l$  von 3.15 nm, die einer  $\alpha$ -Helix mit 21 Aminosäuren entspricht, und einem spezifischen Widerstand  $\rho$  von 0.13  $\Omega\text{m}$  für 0.5 M KCl eine Leitfähigkeit von etwa 1.5 nS.

Ausgehend von den für das Peptid LS3 beobachteten Leitfähigkeitsstufen wurde der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  der gebildeten Helix-Bündel berechnet. DeGrado et al. beobachteten für das Peptid LS3 in klassischen BLMs lediglich eine

Leitfähigkeitsstufe und korrelierten diese anhand von Computersimulationen mit einer hexameren Helix-Bündel-Struktur<sup>79, 80, 82</sup>. Abb. 5.22a zeigt die Abhängigkeit des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  von der Anzahl an Monomeren  $N$ , wobei postuliert wurde, dass die niedrigste Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  einem hexameren Bündel entspricht und sich die höheren Leitfähigkeiten aus einer sukzessiven Zunahme um jeweils ein Monomer ergeben. Das Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  weist keine signifikante Abhängigkeit von der Anzahl an Peptidhelices im Bündel auf und ist weitgehend konstant. Der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  von Helix-Bündeln des Peptids LS3 beträgt demnach nur 20 – 26 % des nach dem *Zylinder-Modell* berechneten Porenradius  $r_{\text{calc}}$ .

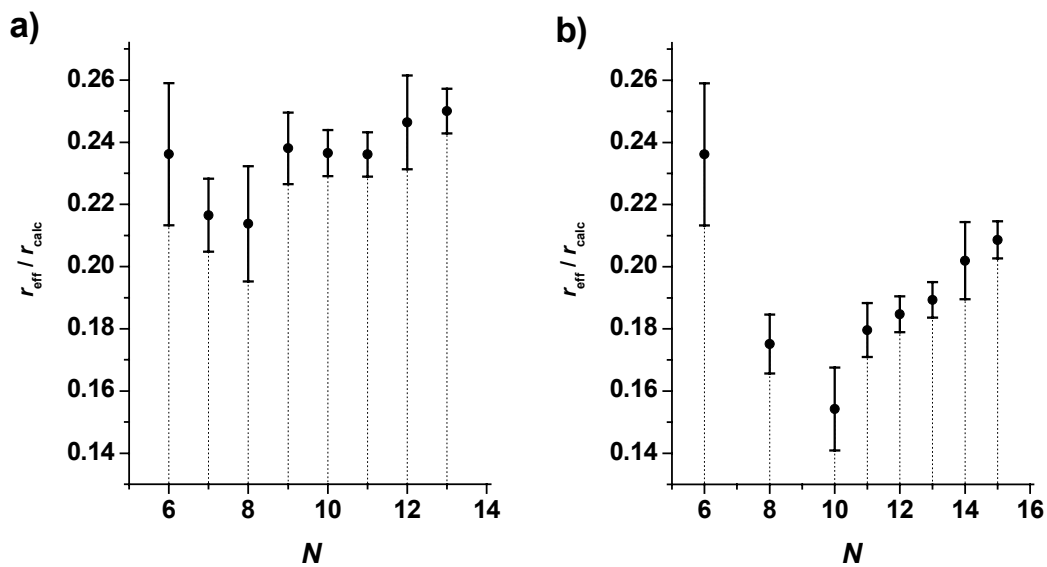


Abb. 5.22: Abhängigkeit des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  von der Anzahl an Monomeren  $N$  unter Annahme unterschiedlich großer Helix-Bündel-Strukturen von LS3 in nano-BLMs.

In Abb. 5.22b ist beispielsweise eine entsprechende Betrachtung des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  dargestellt, bei der, ausgehend von  $N = 6$  für die niedrigste Leitfähigkeitsstufe  $G_1$ , eine Zunahme um jeweils zwei Monomere bei den beiden nächst höheren Leitfähigkeitsstufen  $G_2$  und  $G_3$  angenommen wurde. Bei den nachfolgenden Leitfähigkeitsstufen wurde wiederum eine Zunahme um nur jeweils ein Monomer vorgegeben. Die entsprechenden Verhältnisse  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  liegen nun für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten nicht mehr in einem Bereich. Für die Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-3}$  mit  $N = 6, 8$  bzw.  $10$  nimmt das Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  zunächst drastisch ab und steigt bei den folgenden Leitfähigkeitsstufen mit  $N = 11 - 16$  wieder an.

Das kanalbildende Peptid Alamethicin besitzt acht Leitfähigkeitsstufen und es ist bekannt, dass diese aus Bündeln mit  $N = 4 - 11$  Helices resultieren. Eine entsprechende Korrelation des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  und der Anzahl an Monomeren im kanalbildenden Bündel zeigt für das Peptid Alamethicin bei  $N = 5 - 11$  ebenfalls ein weitgehend konstantes Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  (Abb. 5.23a)\*. Der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  beträgt aufgrund der höheren Leitfähigkeit von Alamethicin 76 – 85 % des nach dem *Zylinder-Modell* berechneten Porenradius  $r_{\text{calc}}$ . Das aus vier Helices bestehende sehr kleine Bündel bildet mit einem effektiven Radius von 52 % des berechneten Radius eine Ausnahme. Nimmt man fiktiv an, dass sich die Leitfähigkeiten aus Bündeln mit  $N = 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13$  ergeben, so zeigen die Verhältnisse  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  ab  $N = 5$  eine analoge Abhängigkeit von  $N$  wie in der entsprechenden Betrachtung für LS3 mit  $N = 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15$  (Abb. 5.23b).

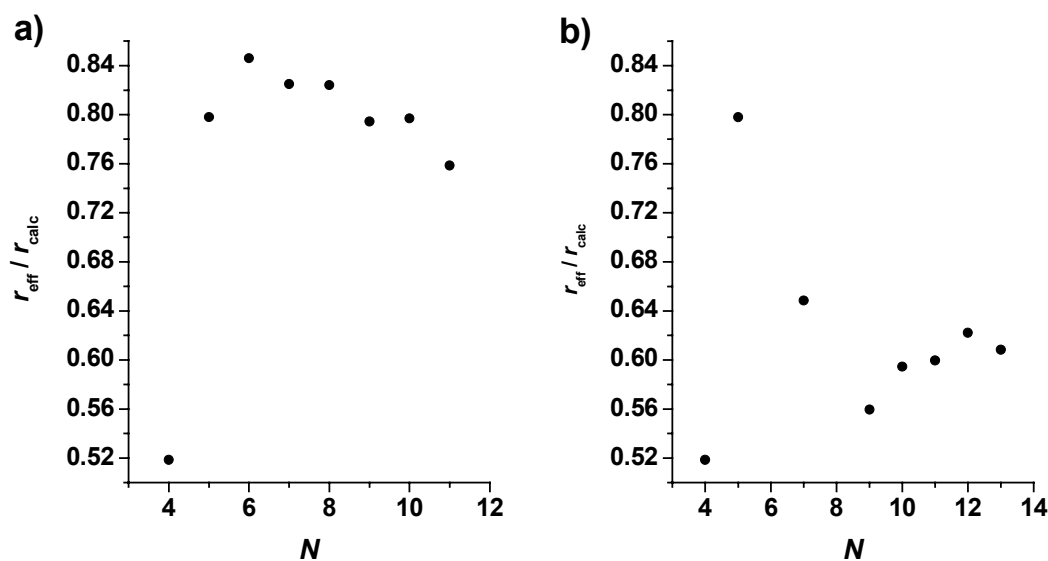


Abb. 5.23: Abhängigkeit des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  von a) der tatsächlichen Anzahl an Monomeren  $N$  in Helix-Bündel-Strukturen von Alamethicin und b) einer fiktiven Anzahl an Monomeren  $N$ .

Aufgrund dieser Betrachtung und unter der Annahme, dass die Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  einem Helix-Bündel aus 6 LS3-Monomeren entspricht, wurde geschlossen, dass die einzelnen Leitfähigkeitsstufen jeweils aus Helix-Bündel-Strukturen mit einer kontinuierlich steigenden Anzahl an Peptidhelices resultieren. Die Anzahl an Monomeren  $N$  der beobachteten Leitfähigkeitsstufen  $G_n$  entspricht somit  $(n + 5)$ .

\* Die zur Berechnung verwendeten Leitfähigkeiten wurden einer Abbildung von M. S. Sansom entnommen<sup>59</sup>.

Abb. 5.24 zeigt graphisch die Abhängigkeit der in nano-BLMs bestimmten Leitfähigkeitsstufen  $G_n$  von der Anzahl an Monomeren  $N$  im Helix-Bündel.

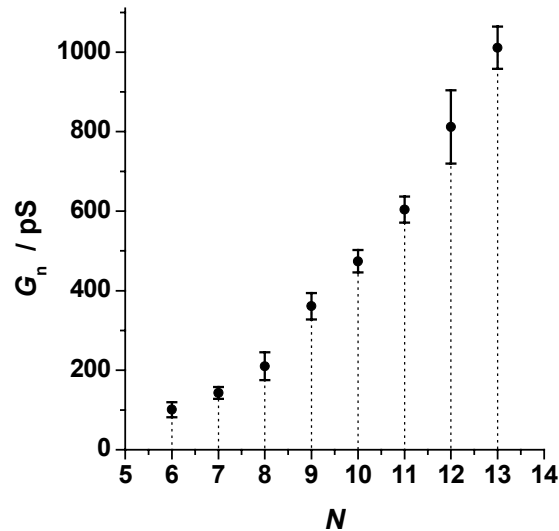


Abb. 5.24: Darstellung der Leitfähigkeiten  $G_n$  von LS3 in nano-BLMs in Abhängigkeit von der Anzahl an Monomeren  $N$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Neben der Leitfähigkeit von LS3-Kanälen in nano-BLMs wurde auch die Öffnungsdauer der Kanäle untersucht. Dabei wurden nur Ereignisse berücksichtigt mit reinen Übergängen zwischen dem geschlossenen Zustand und der jeweiligen Öffnungsstufe. Ereignisse, bei denen Übergänge zu anderen Öffnungsstufen oder Strompulse undefinierter Höhe auftraten, wurden vernachlässigt. Entsprechend wurde die mittlere Öffnungsdauer der Leitfähigkeitsstufen  $G_{6-8}$  nicht bestimmt.

Die Öffnungsdauern der Einzelkanalereignisse der Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-5}$  wiesen keine Abhängigkeit von der Höhe der Leitfähigkeitsstufe auf. Eine Histogrammanalyse der Öffnungsdauer von 10501 Ereignissen der Leitfähigkeiten  $G_{1-5}$  zeigt eine monoexponentielle Verteilung der Öffnungsdauer im Bereich von 0 – 14 ms. Dies wird durch eine Linearisierung der aus der Histogrammanalyse gewonnenen Daten deutlich. Abb. 5.25 zeigt die entsprechenden Graphen. Aufgrund der besseren Übersicht ist in beiden Abbildungen nicht der gesamte Wertebereich abgebildet. 98 % der Ereignisse wiesen eine Öffnungsdauer unter 20 ms auf und Ereignisse mit längeren Öffnungsdauern traten nur vereinzelt auf. Das längste detektierte Ereignisse besaß eine Öffnungsdauer von 162.6 ms.

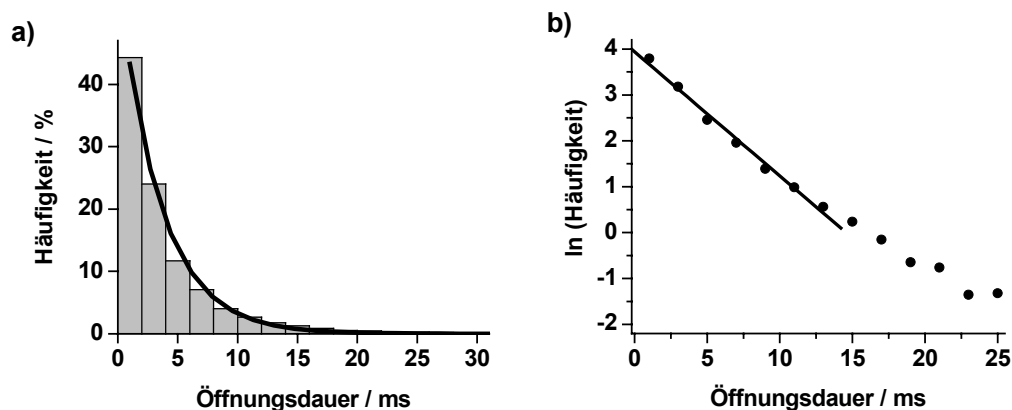


Abb. 5.25: Bestimmung der Öffnungsdauer von LS3 in nano-BLMs bei Übergängen zwischen dem geschlossenen Zustands  $C$  und den Öffnungsstufen  $O_{1-5}$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl). a) Histogrammanalyse (10501 Ereignisse, 2 ms-Intervalle) und an die Daten angepasste Exponentialfunktion (—) mit  $A = 43.3$  und  $\tau_{\text{exp}} = (3.47 \pm 0.04)$  ms. b) Linearisierung der in a) dargestellten Daten (•) und durch lineare Regression erhaltene Gerade (—) mit  $\ln A = 39.4$  und einer Steigung von  $(-0.27 \pm 0.01)$  ms $^{-1}$ .

Die Anpassung einer Exponentialfunktion (5.5) an die Daten lieferte eine mittlere Lebensdauer  $\tau_{\text{exp}}$  von  $(3.47 \pm 0.04)$  ms. Mittels linearer Regression der linearisierten Daten im Bereich von 0 – 14 ms wurde eine mittlere Lebensdauer  $\tau_{\text{lin}}$  von  $(3.7 \pm 0.1)$  ms ermittelt.

Durch Mittelwertbildung ergibt sich daraus für LS3 in nano-BLMs eine mittlere Öffnungsdauer von:

$$\tau = (3.6 \pm 0.1) \text{ ms.}$$

Abgesehen von den bisher beschriebenen Einzelkanalereignissen, die in *bursts* von Ereignissen mit meist gleicher Öffnungsstufe auftraten, konnte noch eine weitere Klasse von Ereignissen ausgemacht werden, bei denen während der Öffnung das Rauschen des Stromsignals stark anstieg (Abb. 5.26a). Ereignisse dieser Art traten vor allem bei höheren Konzentrationen gelegentlich auf, dann jedoch meist über einen Zeitraum von mehreren Sekunden. Die beschriebenen Zeiträume wurden oft unterbrochen von Zeitspannen, in denen nur undefinierte Stromänderungen auftraten (Abb. 5.26b).



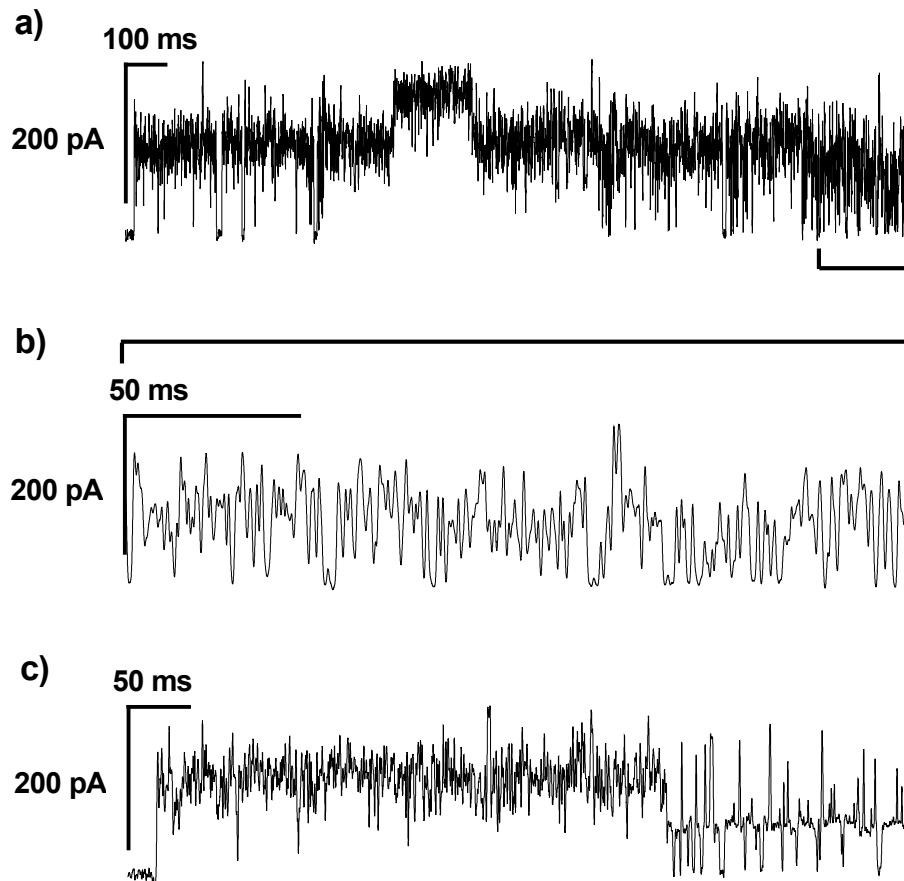


Abb. 5.26: a) Einzelkanalmessungen von LS3 in nano-BLMs mit Einzelkanalereignissen bei denen während der Öffnung das Rauschen stark zunimmt. b) Zeitliche Auflösung des in a) markierten Bereichs. c) Übergang von einem Ereignis einer Öffnungsstufe mit starkem Rauschen in einen *burst* der Öffnungsstufe  $O_4$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Häufig konnten Ereignisse mit starkem Rauschen während des geöffneten Zustands unmittelbar nach oder vor dem Auftreten eines *bursts* mit Ereignissen der Öffnungsstufe  $O_4$  beobachtet werden (Abb. 5.26c). Das Rauschen während der Öffnung stieg dann auf 50 – 100 pA an und die mittleren Stromamplituden lagen in einem Bereich von 130 – 140 pA an und die mittleren Stromamplituden lagen in einem Bereich von 130 – 140 pA mit gelegentlichen Stufen zu Stromamplituden von ca. 210 – 220 pA. Allerdings konnten sie auch in Verbindung mit Ereignissen der Öffnungsstufe  $O_1$  beobachtet werden, wobei die mittleren Stromamplituden dann im Bereich von 10 – 20 pA lagen und das Rauschen ca. 20 pA betrug.

## 5.4.2 Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3

### 5.4.2.1 bpy\*-LS3 in klassischen BLMs

Bei der Untersuchung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in klassischen BLMs aus DPhPC zeigte sich, dass bpy\*-LS3 sehr unspezifische Stromamplituden hervorruft. In Abb. 5.27 sind charakteristische Messungen bei einem Membranpotential von +200 mV in 0.5 M KCl abgebildet. Die Peptidkonzentration im *cis*-Kompartiment betrug während der Messungen 10 – 14 nM.

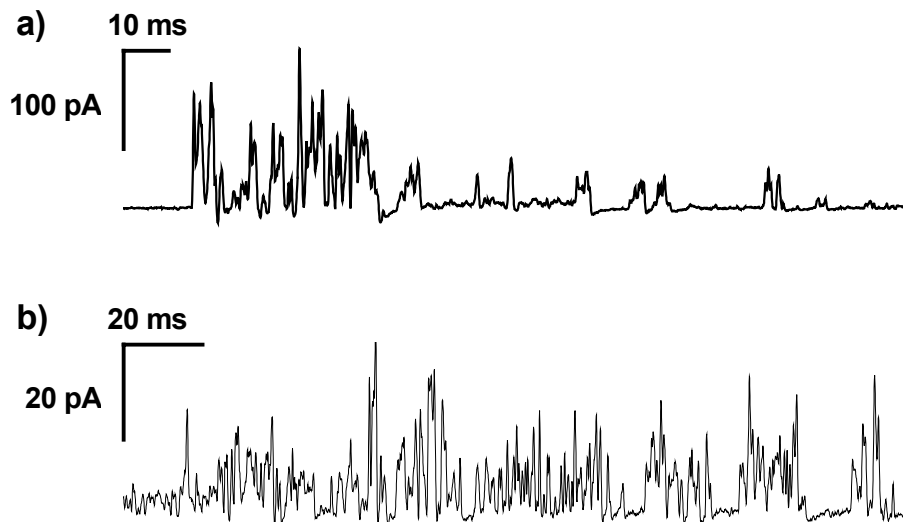


Abb. 5.27: Einzelkanalmessung von bpy\*-LS3 in klassischen BLMs von DPhPC ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

In Ausnahmefällen konnten Einzelkanalereignisse entdeckt werden, jedoch ähnelten die im Allgemeinen beobachteten Stromänderungen denen eines Detergenz, das unspezifische Löcher in der Lipidmembran bildet und diese destabilisiert. Der beobachtete Transmembranstrom wies meist kurze Amplituden von einigen Millisekunden auf. Die Höhe der Stromamplituden lag größtenteils in einem Bereich von bis zu 50 pA, jedoch konnten auch bedeutend höhere Amplituden beobachtet werden.

Aufgrund der destabilisierenden Wirkung des Peptids bpy\*-LS3 auf klassische BLMs bestehend aus DPhPC wurde versucht, die Lipiddoppelschicht durch einen

Cholesterin-Anteil zu stabilisieren<sup>108, 109</sup>. Abb. 5.28 zeigt zu den oben beschriebenen Experimenten analoge Messungen mit Membranen bestehend aus DPhPC/Cholesterin in einem Verhältnis von 7:3 und einer Peptidkonzentration von 20 – 24 nM.

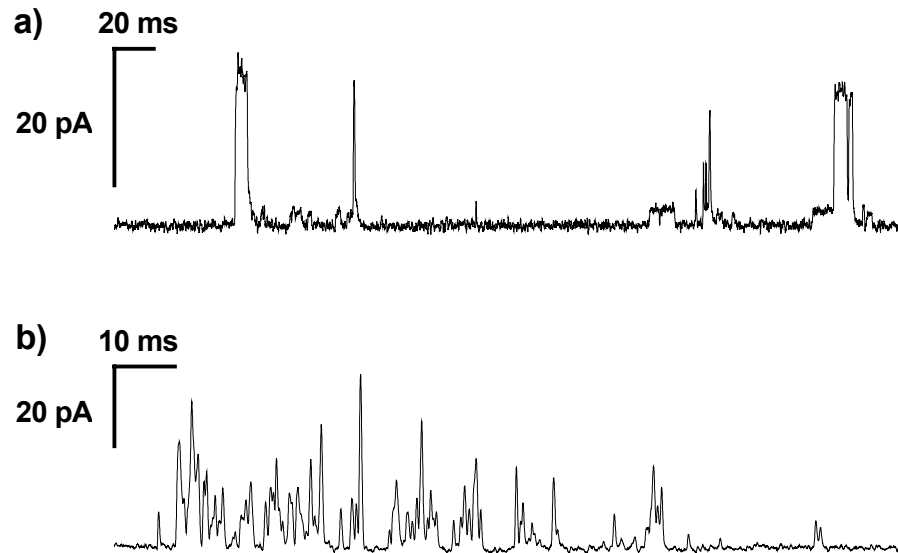


Abb. 5.28: Einzelkanalmessung von bpy\*-LS3 in klassischen BLMs von DPhPC/Cholesterin (7:3) bei einem Membranpotential von +200 mV in 0.5 M KCl.

Verglichen mit den Messungen mit reinen DPhPC-Membranen konnten bei einem Cholesterin-Anteil in der BLM häufiger Einzelkanalereignisse des Peptids mit definierten Stromamplituden beobachtet werden (Abb. 5.28a), jedoch traten wiederum häufig Zeitintervalle auf, in denen nur unspezifische Stromamplituden erfasst wurden (Abb. 5.28b).

### 5.4.2.2 bpy\*-LS3 in nano-BLMs

Nano-BLMs sind durch die Stabilisierung der Membran über die Porenstege des Substrats robuster als klassische BLMs. Aufgrund der beobachteten destabilisierenden Wirkung des Peptids bpy\*-LS3 auf klassische BLMs wurde versucht, dass Peptid in nano-BLMs zu inkorporieren.

Tatsächlich konnten nach Zugabe von bpy\*-LS3 zur *cis*-Seite einer nano-BLM bestehend aus DPhPC die für Ionenkanäle charakteristischen Rechteckstrome beobachtet werden. Die Messungen erfolgten wiederum bei einem Membranpotential von +200 mV und 0.5 M KCl als Elektrolyt. Die Peptidkonzentration im *cis*-Kompartiment betrug zwischen 0.03 und 3.75 nM.

Abb. 5.29 zeigt charakteristische Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3. Ebenso wie bei den Einzelkanalereignissen des Peptids LS3 ohne Rezeptor konnte bei den Einzelkanalereignissen ein Abfall oder Schwanken des Stromflusses während der Kanalöffnung beobachtet werden. Außerdem konnten vier unterschiedliche Öffnungsstufen identifiziert werden, deren Stromamplituden im Bereich von ca. 25 pA ( $O_1$ ), 35 pA ( $O_2$ ), 45 pA ( $O_3$ ) und 70 pA ( $O_4$ ) lagen. Einzelkanalereignisse einer Öffnungsstufe traten wiederum gehäuft in *bursts* auf, welche oft mehreren Sekunden andauerten. Allerdings konnten deutlich häufiger auch Übergänge zwischen unterschiedlichen Öffnungsstufen beobachtet werden als bei den entsprechenden Messungen mit LS3. Diese Übergänge grenzten sich durch das Erreichen eines Stromplateaus deutlich von ebenfalls auftretenden kurzen undefinierten Strompulsen ab, wie sie auch bei Messungen mit LS3 beobachtet werden konnten.

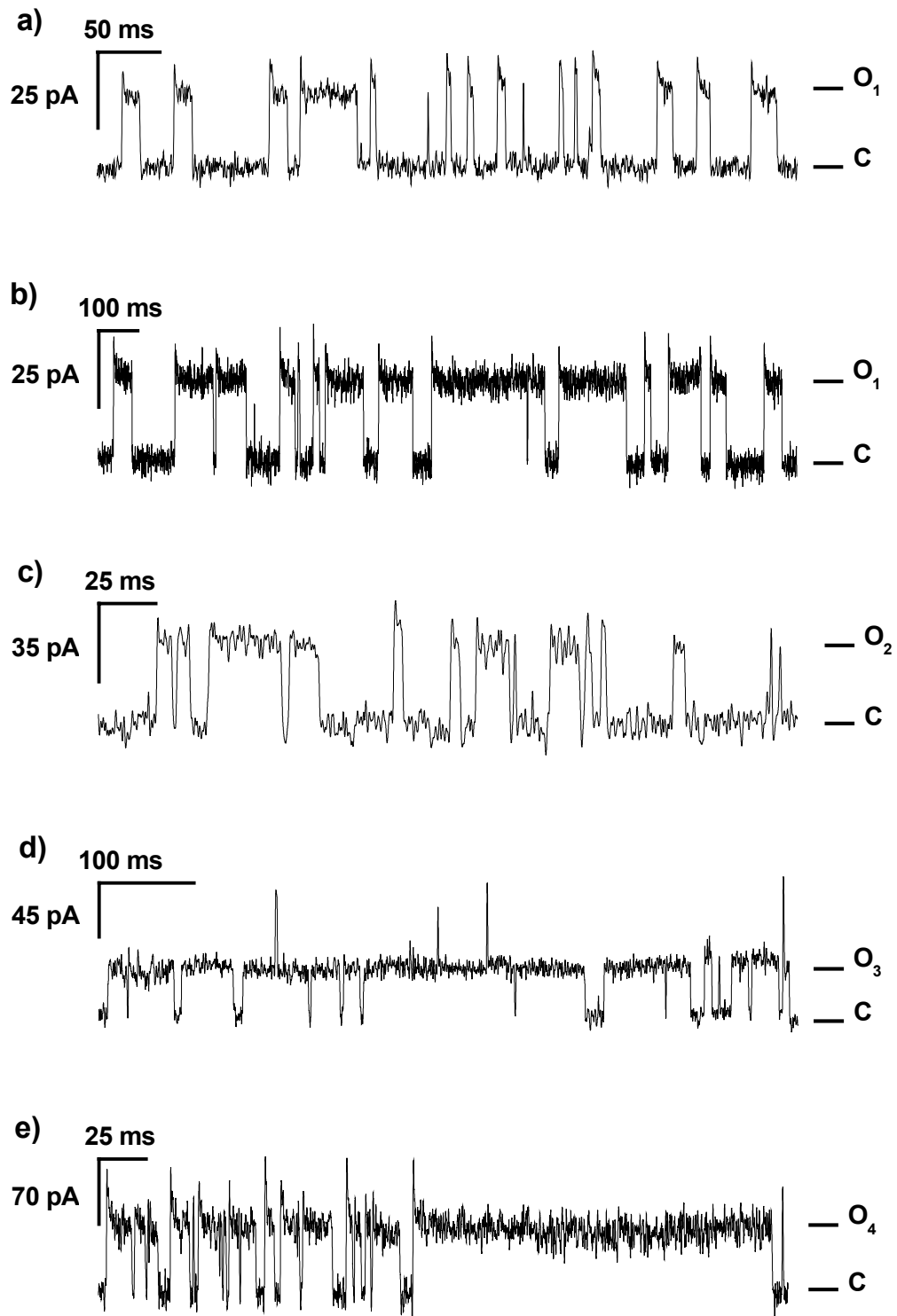


Abb. 5.29: Einzelkanalmessungen von bpy\*-LS3 in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand C in die geöffneten Zustände O<sub>1</sub> (a, b), O<sub>2</sub> (c), O<sub>3</sub> (d) und O<sub>4</sub> (e) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Die Mehrzahl der Einzelkanalereignisse von bpy\*-LS3 resultierte in Stromamplituden zwischen 15 und 110 pA, dennoch konnten auch Ereignisse mit größerem Stromfluss beobachtet werden, welche teilweise innerhalb von *bursts* auftraten, teilweise auch nur vereinzelt. Abb. 5.30 zeigt beispielsweise Ereignisse mit einer Stromamplitude von ca. 150 pA. Außerdem traten, wie bei dem Peptid LS3, auch Einzelkanalereignisse mit kleineren Stromamplituden auf. Diese wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie sich wie bei den entsprechenden Messungen mit dem Peptid LS3 meist nicht deutlich genug vom Rauschen absetzten.

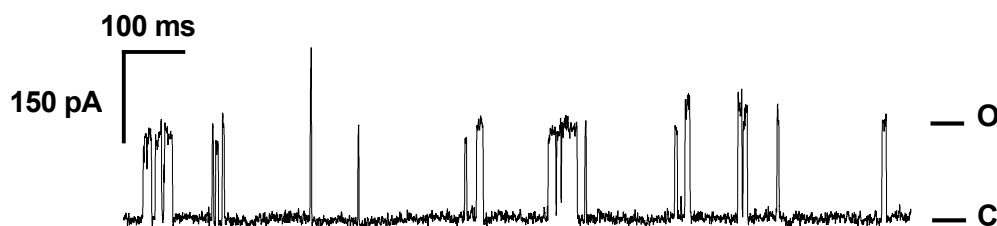


Abb. 5.30: Einzelkanalmessung von bpy\*-LS3 in nano-BLMs mit Ereignissen hoher Stromamplitude, Übergänge erfolgen vom geschlossenen Zustand C in einen geöffneten Zustand O ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Zur Evaluierung der Leitfähigkeiten von bpy\*-LS3 Kanälen wurde eine Histogrammanalyse von 4524 Ereignissen erstellt. In die Auswertung wurden dabei auch Leitfähigkeiten mit einbezogen, bei denen die entsprechenden Stromplateaus ausgehend von einem niedrigeren Öffnungszustand erreicht wurden. Kurze Strompulse ausgehend von einer Öffnungsstufe, welche kein Plateau besaßen, wurden nicht berücksichtigt. Abb. 5.31 zeigt das Histogramm im Wertebereich bis 600 pS (3556 Ereignisse). Im Bereich von 100 – 150 pS ist eine scharfe Gaußverteilung erkennbar, die im Bereich von 150 – 280 pS in zwei zusammenfließende, aber dennoch erkennbare Gaußverteilungen übergeht. Dieser Wertebereich entspricht den Einzelkanalereignissen mit Stromamplituden von etwa 25 pA ( $O_1$ ), 35 pA ( $O_2$ ) und 45 pA ( $O_3$ ). Im Bereich von 280 – 500 pS, der Ereignisse mit Stromamplituden von ca. 75 pA ( $O_4$ ) widerspiegelt, findet sich eine breite Gaußverteilung. Um die Leitfähigkeitsstufen zu bestimmen, wurden in den zwei Bereichen von 0 – 150 pS und 280 - 500 pS jeweils die Parameter einer Gaußfunktion angenähert. Anschließend wurden die Parameter einer Gaußfunktion 4. Ordnung an die Daten angepasst, wobei die Parameter der in den angegebenen Wertebereichen ermittelten Gaußfunktionen vorgegeben wurden. Auf diese Weise wurden die Parameter der beiden verbliebenen Funktionen erhalten. In Tab. 5.3 sind

die für die vier Gaußfunktionen bestimmten Werte und ihre relativen Flächenanteile zusammengefasst. Abb. 5.31 zeigt die einzelnen Gaußfunktionen, sowie die Gaußfunktion 4. Ordnung, welche den Daten sehr gut entspricht.

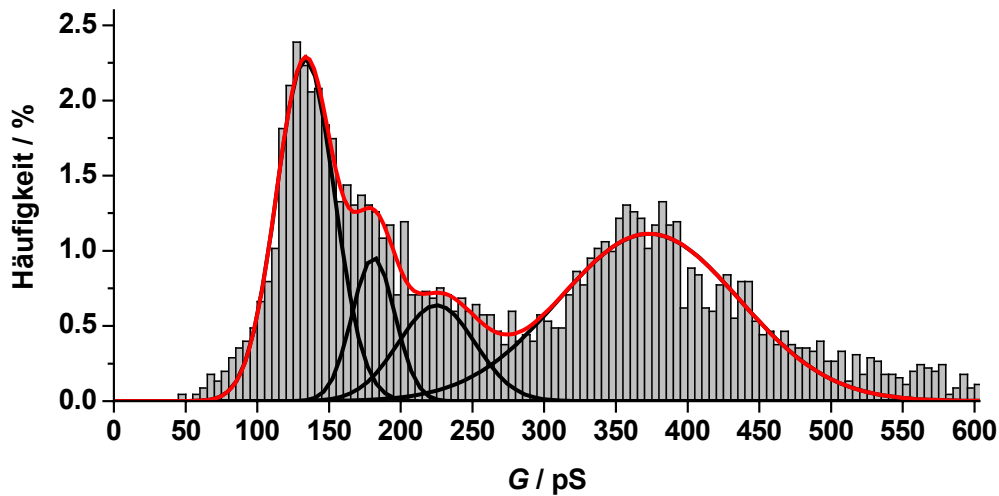


Abb. 5.31: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von bpy\*-LS3 in nano-BLMs im Wertebereich bis 600 pS (3556 Ereignisse, 5 pS-Intervalle, normiert auf die Summe (4524) aller Ereignisse) und an die Daten angepasste Gaußfunktionen 1. Ordnung (—) und 4. Ordnung (—) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Tab. 5.3: Zusammenfassung der an die bestimmten Leitfähigkeiten angepassten Parameter der Gaußfunktionen in den zwei Wertebereichen 0 - 150 pS ( $n = 1$ ) und 280 - 500 pS ( $n = 4$ ) und den daraus über eine Gaußfunktion 4. Ordnung bestimmten Parametern der beiden weiteren Gaußfunktionen ( $n = 2, 3$ ) für bpy\*-LS3 in nano-BLMs.

$n$	$A$ / pS	$G_i$ / pS	$\sigma_G$ / pS	Anteil / %
1	116	134	20	31
2	36	181	15	10
3	43	225	27	12
4	176	373	63	47

In Abb. 5.32 ist die Histogrammanalyse der höheren Leitfähigkeiten dargestellt. Die Intervallbreite des Wertebereichs wurde dabei auf 50 pS erhöht, da bei den Stromamplituden der entsprechenden Einzelkanalereignisse größere Schwankungen auftraten als bei den Ereignissen mit kleinerer Leitfähigkeit. Außerdem nahm das Rauschen aufgrund des höheren Stromflusses zu. Um dennoch einen Vergleich mit der Häufigkeit der niedrigen Leitfähigkeiten bis 0.6 nS (Abb. 5.31) treffen zu können, ist der Wertebereich ab 0.5 nS abgebildet (1144 Ereignisse). Im Bereich von 0.5 - 2 nS ist eine breite Verteilung der Leitfähigkeiten erkennbar, deren Häufigkeit zu höheren Leitfähigkeiten hin konstant abnimmt. Oberhalb von 2 nS bis 10.2 nS findet man vereinzelt Ereignisse mit zwei kleineren Anhäufungen in den Bereichen von 3 - 3.5 nS und 5.5 - 6 nS. Von einer Festlegung von Leitfähigkeitsstufen in

diesen Bereichen wurde aufgrund des seltenen Auftretens der Ereignisse jedoch abgesehen.

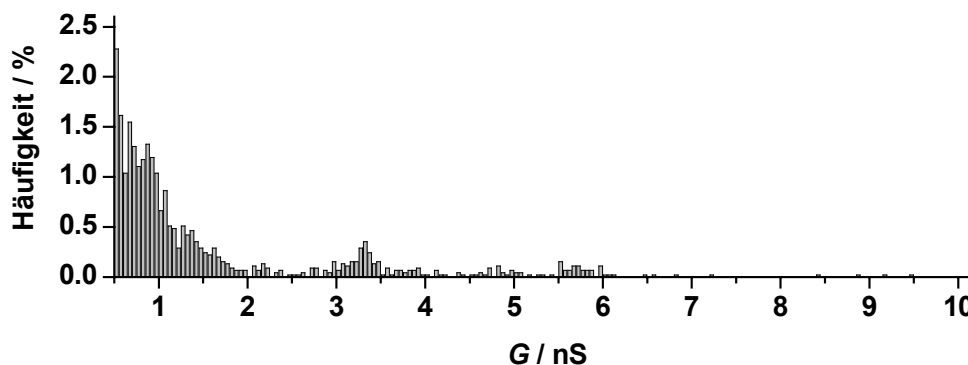


Abb. 5.32: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von bpy\*-LS3 in nano-BLMs im Wertebereich ab 500 pS (1144 Ereignisse, 50 pS-Intervalle, normiert auf die Summe (4524) aller Ereignisse) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 bildet demnach in nano-BLMs Ionenkanäle mit Leitfähigkeiten von:

$$G_1 = (134 \pm 20) \text{ pS}$$

$$G_2 = (181 \pm 15) \text{ pS}$$

$$G_3 = (225 \pm 27) \text{ pS}$$

$$G_4 = (373 \pm 63) \text{ pS}.$$

Wie für das Peptid LS3 wurde auch für die Leitfähigkeitsstufen des Peptids bpy\*-LS3 der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  entsprechend des *Zylinder-Modells* zur Beschreibung der Helix-Bündel-Struktur berechnet (vgl. 5.4.1.2). Dabei wurde wiederum davon ausgegangen, dass die niedrigste Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  einem hexameren Bündel entspricht. Abb. 5.33a zeigt die Abhängigkeit des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  von einer kontinuierlich ansteigenden Anzahl an Monomeren  $N$ . Das Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  ist wie im Falle des Peptids LS3 annähernd konstant und der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  von Helix-Bündeln des Peptids bpy-LS3 beträgt lediglich 20 – 29 % des nach dem *Zylinder-Modell* berechneten Porenradius  $r_{\text{calc}}$ . Ausgehend von  $N = 6$  für die Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  zeigten sich analog zu den Leitfähigkeitsstufen des Peptids LS3 dagegen unter Annahme größerer Monomerzahlen bei den höheren Leitfähigkeiten deutliche Unterschiede in den Verhältnissen  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$ .



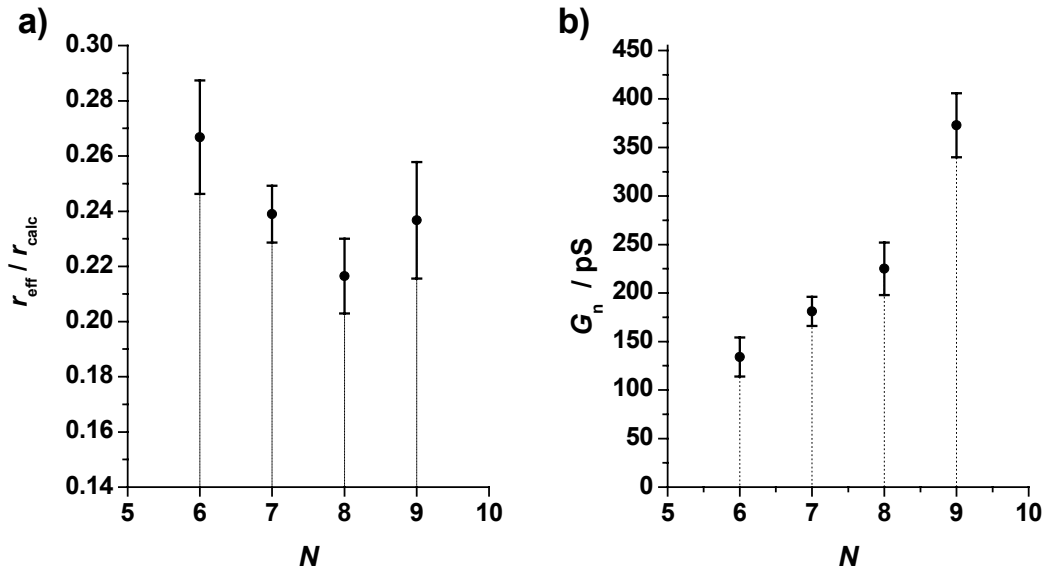


Abb. 5.33: a) Abhängigkeit des Verhältnisses  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  von der Anzahl an Monomeren  $N$  für Helix-Bündel-Strukturen von bpy\*-LS3 in nano-BLMs. b) Darstellung der Leitfähigkeiten  $G_n$  von bpy\*-LS3 in nano-BLMs in Abhängigkeit von der Anzahl an Monomeren  $N$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Basierend auf der Annahme, dass die erste Leitfähigkeitsstufe einem hexameren Bündel entspricht, wurde daher wiederum geschlossen, dass sich die höheren Leitfähigkeiten aus einer kontinuierlich steigenden Anzahl an Monomeren ergeben. Abb. 5.33b zeigt die Abhängigkeit der Leitfähigkeitsstufen  $G_n$  von bpy\*-LS3 in nano-BLMs von der Anzahl der Peptidhelices  $N$  in der Helix-Bündel-Struktur ( $N = n + 5$ ).

Auffallend an den Einzelkanalereignissen aller Leitfähigkeitsstufen des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 war eine längere Öffnungsdauer verglichen mit den Einzelkanalereignissen des Peptids LS3 (Abb. 5.29a, c, e). Unregelmäßig traten auch Zeitspannen auf, in denen die Öffnungsdauer der bpy\*-LS3-Ereignisse erheblich länger war (Abb. 5.29b, d). Dies konnte wiederum in allen Leitfähigkeitsstufen beobachtet werden.

Zur Bestimmung der Öffnungsdauer wurde eine Histogrammanalyse von 2992 Ereignissen mit Leitfähigkeiten unter 550 pS durchgeführt, wobei nur Ereignisse mit reinen Übergängen zwischen dem geschlossenen Zustand und einer Öffnungsstufe berücksichtigt wurden. Abb. 5.34 zeigt das entsprechende Histogramm mit einer Intervallbreite von 5 ms. Zur besseren Übersicht ist nicht der gesamte Wertebereich abgebildet. Das längste betrachtete Ereignis besaß eine Öffnungsdauer von 1.54 s. Im

Wertebereich bis 200 ms, in dem 98 % aller Ereignisse anzutreffen waren, wurden die Parameter von Exponentialfunktionen 1. – 3. Ordnung angepasst:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_{\text{exp},i}}\right) \quad n. \text{ Ordnung} \quad (5.12)$$

mit der experimentell bestimmten Öffnungsdauer  $t$ , den jeweiligen Amplituden  $A_i$  und der mittleren Öffnungsdauer  $\tau_{\text{exp},i}$  der Einzelfunktionen. Der Wertebereich wurde festgelegt, um auszuschließen, dass nur selten auftretende Ereignisse mit größerer Öffnungsdauer bei der Kurvenanpassung überbewertet werden.

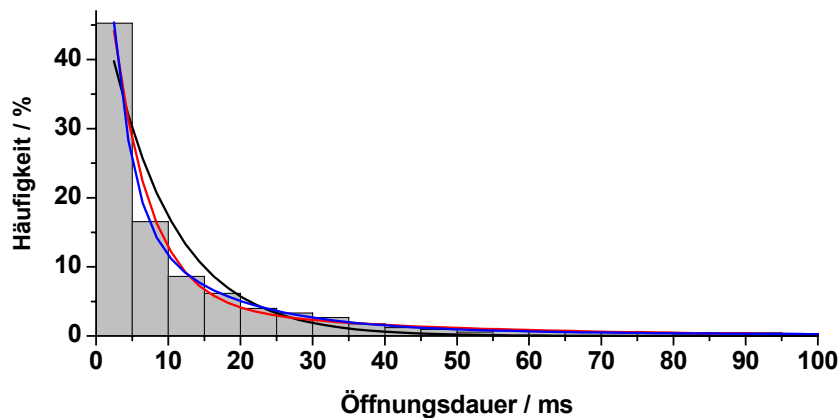


Abb. 5.34: Histogrammanalyse zur Bestimmung der Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse von bpy\*-LS3 in nano-BLMs mit Leitfähigkeiten bis 550 pS ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl) und an die Daten angepasste Exponentialfunktionen 1. Ordnung ( $\chi^2 = 99.54$ ) (—), 2. Ordnung ( $\chi^2 = 9.63$ ) (—) und 3. Ordnung ( $\chi^2 = 0.86$ ) (—) (2992 Ereignisse, 5 ms-Intervalle).

Die Exponentialfunktion 1. Ordnung beschreibt die Daten nur schlecht ( $\chi^2 = 99.54$ ) (Abb. 5.34). Mit steigender Ordnung der Exponentialfunktion werden die Daten erwartungsgemäß zunehmend besser beschrieben. So beträgt der  $\chi^2$ -Wert für die Anpassung einer Exponentialfunktion 2. Ordnung 9.63 und bei Anpassung einer Exponentialfunktion 3. Ordnung 0.86. Die erhaltenen mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{\text{exp},i}$  der jeweiligen Funktionen zeigen entsprechend der zunehmenden Ordnung große Unterschiede. So nimmt  $\tau_{\text{exp},1}$  mit steigender Ordnung der Exponentialfunktion von 9.0 ms über 5.1 ms zu 2.7 ms ab. Für die Funktion 2. Ordnung beträgt  $\tau_{\text{exp},2}$  33 ms, für die Funktion 3. Ordnung dagegen nur 13 ms. Die bei der Funktion 3. Ordnung zusätzlich erhaltene mittlere Öffnungsdauer  $\tau_{\text{exp},3}$  beträgt 64 ms. Tab. 5.4 bietet eine Übersicht über die Parameter der angepassten Funktionen.

Tab. 5.4: Zusammenfassung der Parameter der Exponentialfunktionen  $n$ . Ordnung zur Bestimmung der mittleren Öffnungsdauer für bpy\*-LS3 in nano-BLMs der Histogrammanalyse bei einer Intervallbreite von 5 ms des Wertebereichs.

$n$	$A_1$	$\tau_{\text{exp}, 1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp}, 1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp}, 2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp}, 2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp}, 3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp}, 3})$ / ms
1	40	9.0	0.6						
2	39	5.1	0.3	5	33	7			
3	28	2.7	0.2	16	13	1	1.2	64	20
4	27	2.5	0.3	17	12	3	2	51	94

Anhand der Histogrammanalyse der Öffnungsdauer der Ionenkanäle des Rezeptor-funktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 und der an die Daten angepassten Exponentialfunktionen, ist es nicht möglich eine Aussage zu treffen, welche Exponentialfunktion das System korrekt beschreibt.

Zur Klärung der Frage, welche exponentielle Verteilung für das Peptid bpy\*-LS3 vorliegt, wurde eine Linearisierung der aus der Histogrammanalyse gewonnenen Daten durchgeführt (Abb. 5.35). Es sind zwei lineare Bereiche von 0 - 15 ms und 15 - 50 ms ersichtlich, wobei im ersten lediglich drei Datenpunkte liegen. Im Bereich von 50 - 200 ms ist eine linear abnehmende Verteilung mit starker Streuung erkennbar.

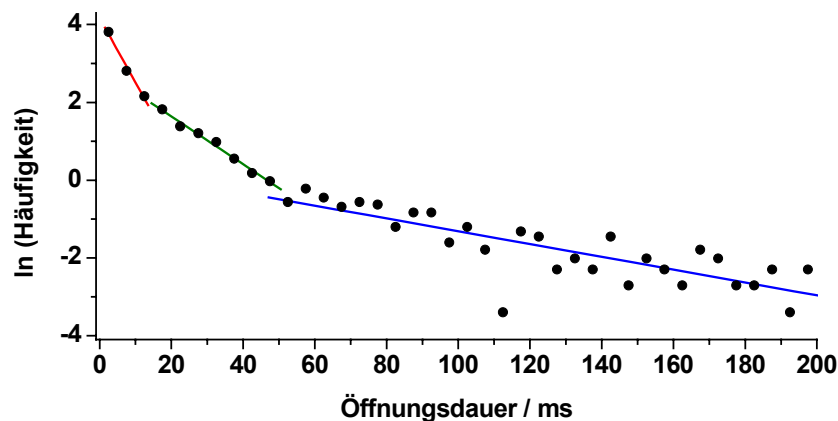


Abb. 5.35: Bestimmung der Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse von bpy\*-LS3 in nano-BLMs mit Leitfähigkeiten bis 550 pS ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl). Linearisierung der Histogrammanalyse mit 5 ms-Intervallen des Wertebereichs (Abb. 5.34) und durch lineare Regression erhaltene Geraden (—, —, —).

Aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten im ersten Wertebereich und der starken Streuung im dritten Wertebereich wurden zwei weitere Histogrammanalysen der Öffnungsdauer durchgeführt. Zum einen wurden kleinere Intervalle des Wertebereichs von 2 ms verwendet, die bei der Ermittlung der mittleren Öffnungsdauer des Peptids LS3 benutzt wurden und zum anderen größere Intervalle von 10 ms. Im Falle der 2 ms-Intervalle zeigten sich wiederum zwei lineare Bereiche

von 0 – 14 ms und 14 – 50 ms. Im Bereich ab 50 ms war erwartungsgemäß die Streuung noch stärker als bei den 5 ms-Intervallen. Bei analoger Analyse mit 10 ms-Intervallen des Wertebereichs zeigte sich in diesem Bereich ein eindeutig linearer Verlauf. Ebenso war der Bereich von 10 – 50 ms, in dem allerdings nur vier Datenpunkte liegen, linear. Der Datenpunkt für den Bereich von 0 – 10 ms grenzte sich deutlich davon ab.

Mittels linearer Regression wurden in den linearen Bereichen bei den Analysen mit unterschiedlicher Intervallbreite des Wertebereichs mittlere Öffnungsdauern  $\tau_{\text{lin},1-3}$  bestimmt. Tab. 5.5 bietet eine Übersicht über die erhaltenen Parameter und die daraus errechneten mittleren Öffnungsdauern. Die jeweiligen Öffnungsdauern  $\tau_{\text{lin},1-3}$  besitzen gleiche Werte, die im Bereich der Werte  $\tau_{\text{exp},1-3}$  liegen, welche aus der Anpassung einer Exponentialfunktion 3. Ordnung an die nichtlinearisierten Daten bei einer Intervallbreite von 5 ms gewonnen wurden. Lediglich der aus der Analyse mit 2 ms-Intervallbreiten des Wertebereichs ermittelte  $\tau_{\text{lin},3}$ -Wert liegt etwas höher als die analogen Werte aus den Betrachtungen bei höheren Intervallbreiten. Dies ist auf die stärkere Streuung der Datenpunkte im entsprechenden Wertebereich bei 2 ms-Intervallen zurückzuführen.

Tab. 5.5: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression nach Linearisierung von Histogrammanalysen unterschiedlicher Intervallbreite zur Bestimmung der mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{\text{lin},i}$  für bpy\*-LS3 in nano-BLMs.

Intervallbreite: 2 ms						
$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin},n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}$
1	0 - 14	3.26	-0.174	0.008	5.8	0.3
2	14 - 50	2.0	-0.063	0.005	16	1
3	50 - 200	-0.9	-0.013	0.002	77	12

Intervallbreite: 5 ms						
$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin},n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}$
1	0 - 15	4.2	-0.17	0.02	5.9	0.7
2	15 - 50	2.9	-0.061	0.003	16.4	0.8
3	50 - 200	0.3	-0.016	0.002	63	8

Intervallbreite: 10 ms						
$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin},n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}$
1	0 - 10	-	-	-	-	-
2	10 - 50	3.61	-0.063	0.002	15.9	0.5
3	50 - 200	1.1	-0.016	0.001	63	4

Aus der Betrachtung der linearisierten Daten kann daher geschlossen, dass die Verteilung der Öffnungsdauer von bpy\*-LS3 einer Exponentialfunktion 3. Ordnung folgt, die drei unterschiedliche mittlere Öffnungsdauern  $\tau_{1-3}$  liefert.

Anhand zweier Kriterien wurden  $\tau_{\text{lin},1-3}$  festgelegt. Zum einen sollte die Bestimmung aus möglichst vielen Datenpunkten erfolgen. Zum anderen sollte die Streuung aufgrund zu kleiner Intervallbreiten des Wertebereichs nicht zu groß werden. Somit ergeben sich die Werte  $\tau_{\text{lin},1} = (5.8 \pm 0.3)$  ms (2 ms-Intervalle, 7 Datenpunkte),  $\tau_{\text{lin},2} = (16.4 \pm 0.8)$  ms (5 ms-Intervalle, 7 Datenpunkte) und  $\tau_{\text{lin},3} = (63 \pm 4)$  ms (100 ms-Intervalle, 15 Datenpunkte).

Da die Linearisierung der Daten zeigte, dass bei einer Intervallbreite von 5 ms alle drei Abklingkonstanten ausreichend definiert sind, ist die Bestimmung von  $\tau_{\text{exp},1-3}$  durch eine Histogrammanalyse mit 5 ms-Intervallen des Wertebereichs gerechtfertigt.  $\tau_{\text{exp},1}$  beträgt demnach  $(2.7 \pm 0.2)$  ms,  $\tau_{\text{exp},2}$   $(13 \pm 1)$  ms und  $\tau_{\text{exp},3}$   $(64 \pm 20)$  ms (Tab. 5.4). Eine Tabelle über die Parameter, die durch eine Anpassung einer Exponentialfunktion 3. Ordnung an die Histogrammanalysen mit 2 ms- und 10 ms-Intervallen des Wertebereichs gewonnen wurden, ist im Anhang zu finden (Tab. A.2).

Durch gewichtete Mittelwertbildung zwischen den jeweiligen  $\tau_{\text{exp},i}$  und  $\tau_{\text{lin},i}$  ergeben sich für die mittleren Öffnungsdauern  $\tau_i$  von Einzelkanalereignissen der Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-4}$  des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in nano-BLMs folgende Werte:

$$\tau_1 = (3.6 \pm 0.2) \text{ ms}$$

$$\tau_2 = (15.1 \pm 0.6) \text{ ms}$$

$$\tau_3 = (63 \pm 4) \text{ ms.}$$

Eine Betrachtung der Öffnungsdauer von Einzelkanalereignissen der einzelnen Leitfähigkeitsstufen  $G_n$  des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 zeigte, dass die mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{1-3}$  des Ionenkanals unabhängig von der Höhe der Leitfähigkeitsstufe sind.

### 5.4.3 Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup>

Nachdem das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 in nano-BLMs Kanalaktivität zeigte, wurden entsprechende Messungen in Gegenwart seines Liganden Ni<sup>2+</sup> durchgeführt.

Es wurden wiederum nano-BLMs bestehend aus DPhPC benutzt. Das Membranpotential betrug +200 mV und als Elektrolyt wurde 0.5 M KCl verwendet. Die Peptidkonzentration im *cis*-Kompartiment betrug 1.25 nM. Nachdem Einzelkanalereignisse des Peptids beobachtet werden konnten, erfolgte die Zugabe von Ni<sup>2+</sup> auf beiden Seiten der Membran, um mögliche Effekte basierend auf einem Konzentrationsgradienten auszuschließen. Die Ni<sup>2+</sup>-Konzentration in beiden Kompartimenten betrug nach der Zugabe 2.5 – 5.0 µM. Aufgrund der unter 5.1.3 beschriebenen Retardation der Komplexierung von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in der hydrophoben Umgebung der Lipidmembran und der gehinderten Diffusion im Inneren der Poren des porösen Substrats der nano-BLMs wurde nach der Zugabe von Ni<sup>2+</sup> einige Minuten gewartet, bevor die Messungen erfolgten.

Abb. 5.36 zeigt den Ausschnitt einer Messung in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup>. Wie in Abwesenheit des Metallions lagen die Stromamplituden der Mehrzahl der Einzelkanalereignisse in einem Bereich von 15 – 110 pA, wobei vermehrt Ereignisse mit Stromamplituden im unteren Bereich von 15 – 50 pA auftraten. Auch Ereignisse mit größeren Stromamplituden konnten beobachtet werden. Die Einzelkanalereignisse traten wiederum innerhalb von *bursts* auf, in denen die Ereignisse eine relativ einheitliche Stromamplitude besaßen. Abb. 5.36 zeigt z. B. einen *burst* von Ereignissen mit Stromamplituden im Bereich von 30 pA. Während eines Einzelkanalereignisses konnte wie bei dem rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup> und dem Peptid LS3 oft ein Abfall oder Schwanken des Stromflusses beobachtet werden. Auch kurze Strompulse ausgehend von einer Öffnungsstufe traten auf, sowie Übergänge zu höheren Stromamplituden mit einem Plateau des Stromflusses.

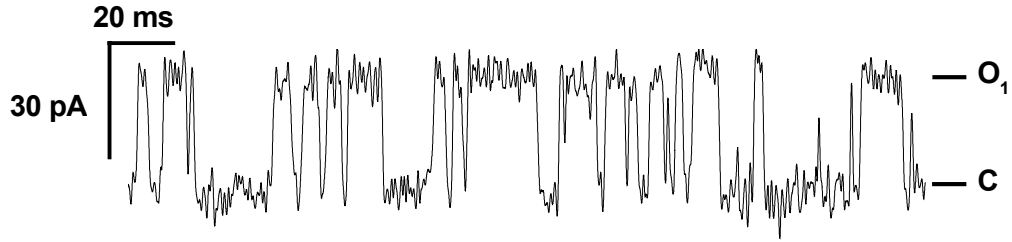


Abb. 5.36: Einzelkanalmessungen von bpy\*-LS3 in Gegenwart von 2.5 – 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs mit Übergängen vom geschlossenen Zustand  $C$  in den geöffneten Zustand  $O_1$  ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Zur Bestimmung der Leitfähigkeitsstufen des Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart seines Liganden  $\text{Ni}^{2+}$  wurde eine Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten von 2189 Ereignissen durchgeführt. Wie bei der Ermittlung der Leitfähigkeitsstufen in Abwesenheit des Metallions wurden auch Leitfähigkeiten mit einbezogen, bei denen die entsprechenden Stromplateaus ausgehend von einem niedrigeren Öffnungszustand erreicht wurden. Kurze Strompulse ausgehend von einer Öffnungsstufe, welche kein Plateau besaßen, wurden wiederum nicht berücksichtigt.

Abb. 5.37a zeigt das entsprechende Histogramm im Bereich von 0 – 600 pS (2029 Ereignisse). Im Bereich von 50 – 200 pS befindet sich eine breite Gaußverteilung. Ab 200 pS zeigt sich eine ausgedehnte Verteilung der Leitfähigkeiten. Im Bereich von 320 – 500 pS ist wiederum eine breite Gaußverteilung mit geringer Amplitude erkennbar. Zur Bestimmung der Leitfähigkeiten wurden in den Bereichen von 0 – 310 pS ( $n = 1$ ) und 310 – 500 pS ( $n = 2$ ) jeweils die Parameter einer Gaußfunktion angepasst. Die Leitfähigkeiten des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  betragen demnach:

$$G_1^{\text{Ni}^{2+}} = (149 \pm 34) \text{ pS}$$

$$G_2^{\text{Ni}^{2+}} = (363 \pm 61) \text{ pS.}$$

In Tab. 5.6 sind zum Vergleich neben den erhaltenen Parametern auch die Parameter der Gaußfunktionen der vier Leitfähigkeitsstufen von bpy\*-LS3 in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  zusammengefasst. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_2^{\text{Ni}^{2+}}$  stimmt sehr gut mit der Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  überein. Die niedrigere Leitfähigkeitsstufe  $G_1^{\text{Ni}^{2+}}$  liegt zwischen  $G_1$  und  $G_2$  und ist stärker fehlerbehaftet. Im Bereich der

Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  des Peptids in Abwesenheit des Metallions findet sich in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  lediglich eine breite Verteilung der Leitfähigkeiten.

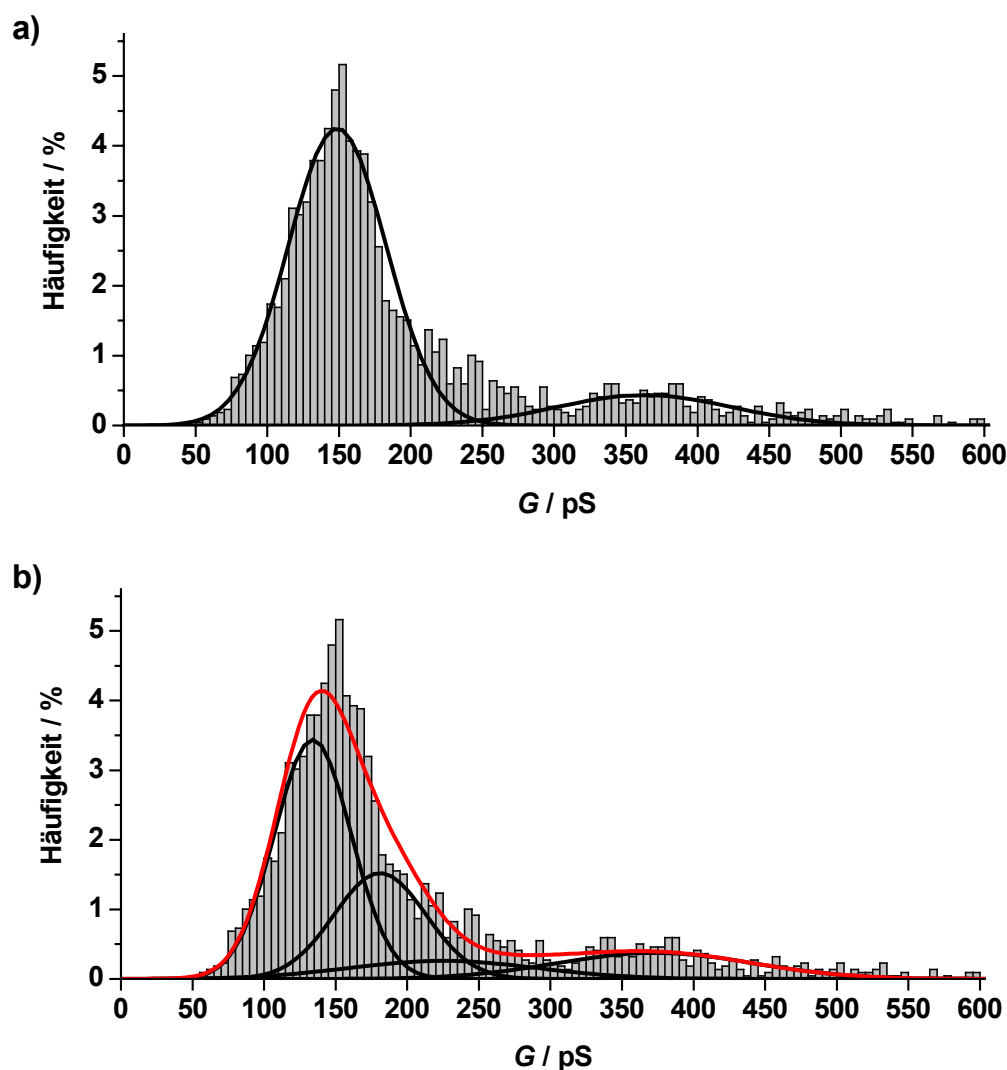


Abb. 5.37: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von  $\text{bpy}^*\text{-LS3}$  in Gegenwart von  $2.5 - 5.0 \mu\text{M Ni}^{2+}$  in nano-BLMs im Wertebereich bis  $600 \text{ pS}$  ( $2029$  Ereignisse,  $5 \text{ pS}$ -Intervalle, normiert auf die Summe ( $2189$ ) aller Ereignisse) ( $U_m = +200 \text{ mV}$ , Elektrolyt:  $0.5 \text{ M KCl}$ ). a) In den Datenbereichen von  $0 - 310 \text{ pS}$  ( $n = 1$ ) und  $310 - 500 \text{ pS}$  ( $n = 2$ ) angepasste Gaußfunktionen (—). b) An die Daten im Bereich von  $0 - 500 \text{ pS}$  angepasste Gaußfunktion 4. Ordnung (—) ( $n = \text{I, II, III, IV}$ ) unter Vorgabe der in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  ermittelten Leitfähigkeiten von  $\text{bpy}^*\text{-LS3}$ , sowie Darstellung der einzelnen Gaußfunktionen (—).

Da für das Peptid  $\text{bpy}^*\text{-LS3}$  in nano-BLMs in Abwesenheit des Metallions im Bereich bis  $500 \text{ pS}$  vier Leitfähigkeitsstufen identifiziert werden konnten, wurden vergleichsweise die Parameter einer Gaußfunktion 4. Ordnung ( $n = \text{I} - \text{IV}$ ) an die Daten der Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten in Gegenwart des Metallions angepasst (Abb. 5.37b). Dabei wurden die in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  bestimmten Werte für die vier Leitfähigkeiten vorgegeben. Die erhaltenen Parameter sind ebenfalls in Tab. 5.6 angegeben. Die Funktion 4. Ordnung beschreibt die Daten



relativ gut. Die Einzelfunktionen weisen, ausgenommen der Funktion, welche die Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  repräsentiert, eine breitere Verteilung als in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  auf. Besonders gravierend ist dies bei der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$ , welche praktisch nicht definiert ist.

Tab. 5.6: Zusammenfassung der an die bestimmten Leitfähigkeiten angepassten Parameter der Gaußfunktionen für bpy\*-LS3 in An- und Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs und Angabe der relativen Flächenverteilung.

In Anwesenheit von $\text{Ni}^{2+}$				
$n$	$A / \text{pS}$	$G_i / \text{pS}$	$\sigma_G / \text{pS}$	Anteil / %
1	363	149	34	85
2	66	363	61	15
I	231	134	27	50
II	123	181	32	27
III	43	225	67	9
IV	64	373	68	14
i	225	134	27	48,5
ii	154	181	36	33
iii	-	-	-	-
iv	85	373	87	18,5
i*	295	134	31	63
ii*	-	-	-	-
iii*	135	225	54	29
iv*	39	373	33	8

In Abwesenheit von $\text{Ni}^{2+}$				
$n$	$A / \text{pS}$	$G_i / \text{pS}$	$\sigma_G / \text{pS}$	Anteil / %
1	116	134	20	31
2	36	181	15	10
3	43	225	27	12
4	176	373	63	47

Daher wurde auch eine Gaußfunktion 3. Ordnung an die Daten angepasst, wobei lediglich die Leitfähigkeitsstufen  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_4$  ( $n = i, ii, iv$ ) in Abwesenheit des Metallions als feste Parameter vorgegeben wurden und die Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  nicht berücksichtigt wurde (Abb. 5.38a). Zum Vergleich wurde ebenfalls eine Anpassung einer Gaußfunktion 3. Ordnung unter Vorgabe der Leitfähigkeitsstufen  $G_1$ ,  $G_3$  und  $G_4$  ( $n = i^*, iii^*, iv^*$ ) und nicht-Berücksichtigung der Leitfähigkeitsstufe  $G_2$  vorgenommen (Abb. 5.38b). In Tab. 5.6 sind auch die erhaltenen Parameter dieser Kurvenanpassungen und die relativen Flächenanteile der unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen angegeben.

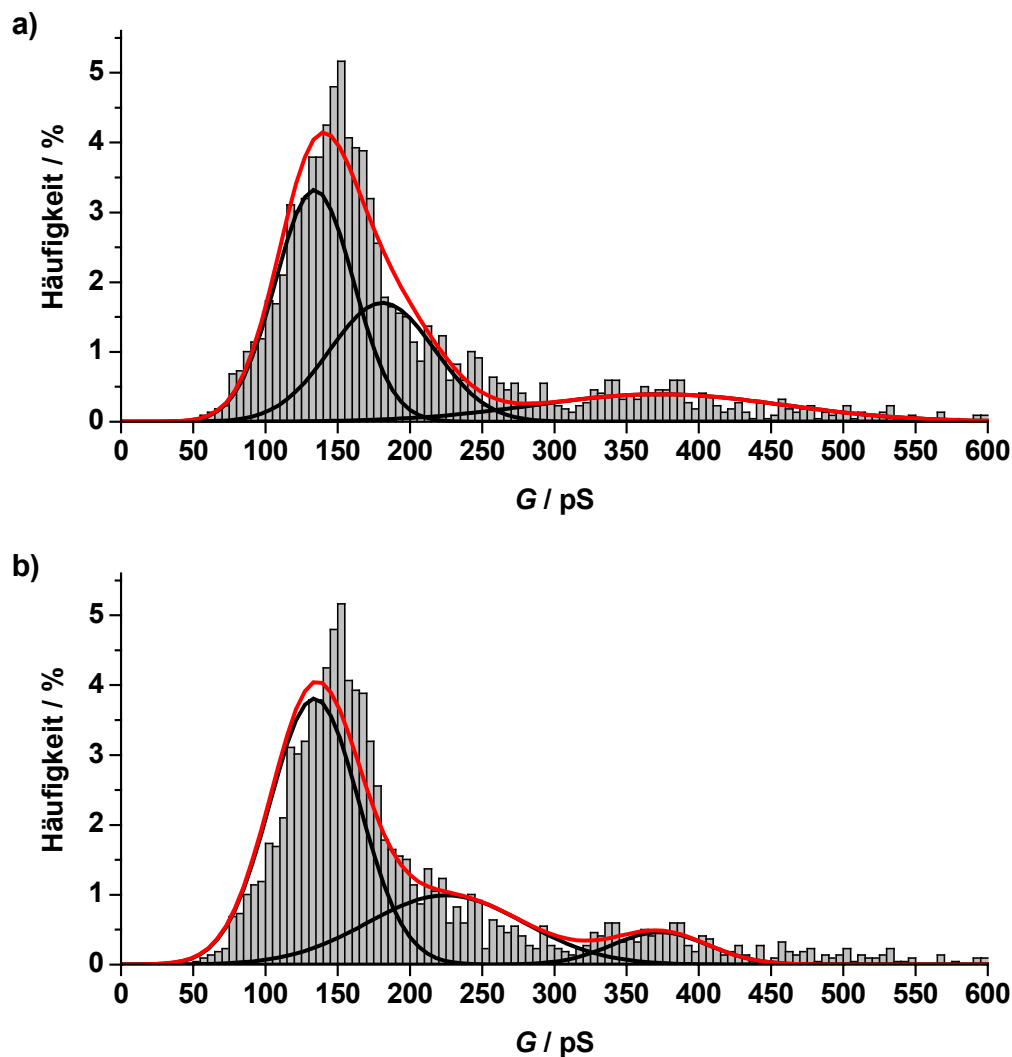


Abb. 5.38: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von bpy\*-LS3 in Gegenwart von 2.5 – 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs im Wertebereich bis 600 pS (2029 Ereignisse, 5 pS-Intervalle, normiert auf die Summe (2189) aller Ereignisse) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl) und an die Daten im Bereich von 0 -500 pS angepasste Gaußfunktionen 3. Ordnung (—) unter Vorgabe der in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  ermittelten Leitfähigkeiten  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_3$  (a) bzw.  $G_1$ ,  $G_3$ , und  $G_4$  (b) von bpy\*-LS3, sowie Darstellung der einzelnen Gaußfunktionen (—).

Die Gaußfunktion 3. Ordnung unter Vorgabe der Leitfähigkeitsstufen  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_4$  beschreibt die Daten mit einem  $\chi^2$ -Wert von 8.04 besser als die Gaußfunktion 3. Ordnung, bei der die Leitfähigkeitsstufen  $G_1$ ,  $G_3$  und  $G_4$  vorgeben wurden ( $\chi^2 = 14.34$ ). Allerdings ist die Verteilung der Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  wesentlich breiter. Dagegen zeigt unter nicht-Berücksichtigung der Leitfähigkeitsstufe  $G_2$  die Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  eine vergleichsweise breite Verteilung, wohingegen die Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  eine wesentlich engere Verteilung aufweist. Der  $\chi^2$ -Wert im Falle der Anpassung einer Gaußfunktion 4. Ordnung betrug 7.85. Die Gaußfunktion 3. Ordnung unter nicht-Berücksichtigung der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  beschreibt die

Daten demnach, trotz einer geringeren Anzahl an freien Parametern, genauso gut. Daher ist anzunehmen, dass, sofern die Leitfähigkeitsstufen des Rezeptorfunktionalisierten Peptids durch die Gegenwart des Metallions nicht beeinflusst werden, der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  verschwindend gering ist und lediglich die Leitfähigkeitsstufen  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_4$  in signifikantem Maße auftreten.

Aufgrund dieser Betrachtungen der Leitfähigkeiten kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es durch die Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  zu einer Veränderung der Leitfähigkeit des Peptids kommt oder ob lediglich die Leitfähigkeitsstufen eine stärkere Streuung aufweisen. Vergleicht man jedoch die relativen Flächenanteile der ermittelten Gaußfunktionen in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  mit denen in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ , so wird, wie bereits bei Betrachtung der jeweiligen Histogrammanalysen erkennbar, deutlich, dass das Metallion eine Abnahme der Häufigkeit von Einzelkanalereignissen mit höheren Leitfähigkeiten bewirkt (Tab. 5.6). So nimmt der Anteil an Ereignissen, unabhängig von der Art der Betrachtung der Leitfähigkeiten, im Bereich der Stufe  $G_4$  in Gegenwart des Metallions von 47 % auf 15 % ( $G_2^{\text{Ni}^{2+}}$ ) bzw. 18.5 % ( $G_{\text{iv}}^{\text{Ni}^{2+}}$ ) gravierend ab. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_1^{\text{Ni}^{2+}}$  in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  ist dagegen mit 85 % deutlich häufiger vertreten, als die niedrigste Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ , deren relativer Flächenanteil lediglich 31 % beträgt. Auch im Falle der Anpassung einer Gaußfunktion 3. Ordnung unter nicht-Berücksichtigung der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  an die Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten in Gegenwart des Metallions weist die erste Leitfähigkeitsstufe  $G_{\text{i}}^{\text{Ni}^{2+}}$  eine deutlich höhere Häufigkeit von 48.5 % auf. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_{\text{ii}}^{\text{Ni}^{2+}}$  zeigt ebenfalls eine starke Zunahme der Häufigkeit um 23 %. Der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  ist dagegen in Gegenwart des Metallions verschwindend gering.

Abb. 5.39 zeigt die Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  im Bereich über 500 pS (139 Ereignisse). Die Intervallbreite des Wertebereichs beträgt wie in der entsprechenden Histogrammanalyse der höheren Leitfähigkeiten in Abwesenheit des Metallions 50 pS. Aufgrund der geringen Häufigkeit der Ereignisse mit Leitfähigkeiten über 500 pS ist nur eine zufällige

Verteilung erkennbar. Der Großteil der Ereignisse lag allerdings im Bereich bis 1.7 nS. In Abwesenheit des Metallions lag die Mehrzahl der Ereignisse mit höheren Leitfähigkeiten ebenfalls in diesem Bereich, jedoch traten Ereignisse mit höherer Leitfähigkeit häufiger auf.

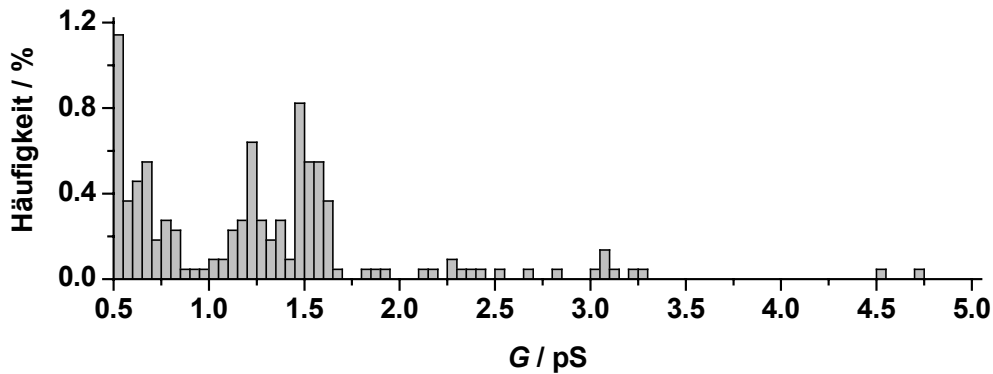


Abb. 5.39: Histogrammanalyse der Leitfähigkeit von bpy\*-LS3 in Gegenwart von 2.5 – 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs im Wertebereich ab 500 pS (193 Ereignisse, 50 pS-Intervalle, normiert auf die Summe (2189) aller Ereignisse) ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

Um die Öffnungsdauer der Ionenkanäle von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  zu bestimmen, wurde eine analoge Betrachtung wie für das Peptid in Abwesenheit seines Liganden gemacht. In die Auswertung flossen 1608 Ereignisse mit Leitfähigkeiten unter 550 pS und reinen Übergängen zwischen dem geschlossenen Zustand und einer Öffnungsstufe ein. Das längste Ereignis besaß eine Öffnungsdauer von 0.57 s, jedoch besaßen 98 % aller Ereignisse eine Öffnungsdauer unter 60 ms. In Abwesenheit des Metallions lagen im Bereich bis 60 ms lediglich 92 % der Ereignisse und 98 % der Ereignisse zeigten eine Öffnungsdauer von bis zu 200 ms. In Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  nimmt also der Anteil an Ereignissen mit Öffnungsdauern über 60 ms ab.

Abb. 5.40 zeigt die Histogrammanalyse der Öffnungsdauer in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  im Wertebereich bis 60 ms und die entsprechende Linearisierung der Daten, wobei neben einer Analyse mit 5 ms-Intervallen des Wertebereichs, durch die die Öffnungsdauer des Peptids in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  am besten beschrieben wird, auch eine Analyse mit 3 ms-Intervallen dargestellt ist. 2 ms-Intervalle, wie bei der Untersuchung der Öffnungsdauer des Peptids in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ , konnten hier nicht verwendet werden, da die Häufigkeit im ersten Wertebereich (0 - 2 ms) geringer ist als im zweiten (2 - 4 ms) wodurch aufgrund der zu kleinen Intervallbreite eine exponentielle Verteilung nicht mehr gegeben ist. Der

Wertebereich bis 60 ms wurde festgelegt, um, wie bei der Bestimmung der Öffnungsdauer von bpy\*-LS3 in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ , auszuschließen, dass nur selten auftretende Ereignisse mit größerer Öffnungsdauer bei der Anpassung von Exponentialfunktionen überbewertet werden. So erfolgte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des Metallions die Bestimmung der mittleren Öffnungsdauer der Ionenkanäle über den Wertebereich, in dem sich jeweils 98 % der Ereignisse befanden.

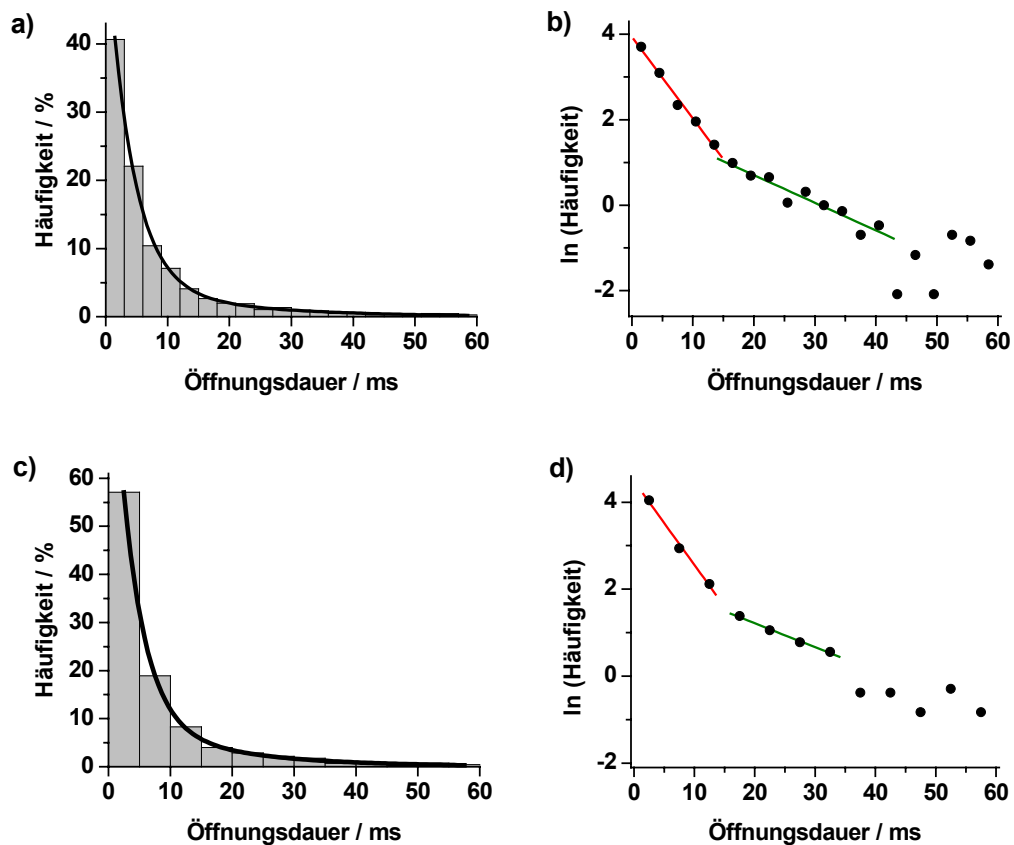


Abb. 5.40: Bestimmung der Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs mit Leitfähigkeiten bis 550 pS ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl). a) und c) Histogrammanalyse (1608 Ereignisse, 3 ms- (a) und 5 ms-Intervalle (c)) und an die Daten angepasste Exponentialfunktion 2. Ordnung (—). b) und d) Linearisierung der in a) bzw. c) dargestellten Daten (•) und durch lineare Regression erhaltene Geraden (—, —).

Anhand der linearisierten Daten zeigt sich, dass die Öffnungsdauer des Peptids in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  im Bereich bis 60 ms durch eine exponentielle Verteilung 2. Ordnung beschrieben wird, da im betrachteten Wertebereich zwei lineare Bereiche unterschiedlicher Steigung auftreten. Im Falle der Analyse mit 5 ms-Intervallen des Wertebereichs werden diese allerdings nur durch drei bzw. vier Punkte in den Bereichen von 0 – 15 ms bzw. 15 – 35 ms definiert. Ab 35 ms tritt nur noch eine

zufällige Anordnung der Datenpunkte auf. Durch die Betrachtung mit 3 ms-Intervallen des Wertebereichs werden allerdings erneut eindeutig zwei lineare Bereiche von 0 – 15 ms und 15 – 42 bestätigt, wobei in letzterem die Einzelwerte deutlich streuen.

Aus den beschriebenen linearen Bereichen wurden mittels linearer Regression mittlere Öffnungsdauern  $\tau_{\text{lin},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  gewonnen (Tab. 5.7). Die entsprechenden Werte für  $\tau_{\text{lin},1}^{\text{Ni}^{2+}}$  stimmen bei beiden Intervallbreiten überein und stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den entsprechenden Werten in Abwesenheit des Metallions sehr gut überein.  $\tau_{\text{lin},2}^{\text{Ni}^{2+}}$  liegt bei den unterschiedlichen Intervallbreiten im gleichen Bereich. Im Falle der 3 ms-Intervalle stimmt der Wert innerhalb der Fehlergrenzen auch gut mit dem entsprechenden Wert in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  überein. Da im Falle der 3 ms-Intervalle die Anzahl an Datenpunkten zur Bestimmung der  $\tau_{\text{lin},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  größer ist, wurden für die Berechnung der Werte für die mittleren Öffnungsdauern  $\tau_i^{\text{Ni}^{2+}}$  und deren Fehler die  $\tau_{\text{lin},i}^{\text{Ni}^{2+}}$ -Werte dieser Bestimmung verwendet.  $\tau_{\text{lin},1}^{\text{Ni}^{2+}}$  beträgt demnach  $(5.3 \pm 0.3)$  ms und  $\tau_{\text{lin},2}^{\text{Ni}^{2+}}$   $(15 \pm 2)$  ms.

Tab. 5.7: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression nach Linearisierung von Histogrammanalysen unterschiedlicher Intervallbreite zur Bestimmung der mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{\text{lin},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  für bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs.

Intervallbreite: 3 ms						
$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (-1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin},n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}$
1	0 - 15	3.9	-0.19	0.01	5.3	0.3
2	15 - 42	2.0	-0.065	-0.008	15	2

Intervallbreite: 5 ms						
$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (-1/\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin},n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin},n}) / \text{ms}$
1	0 - 15	4.5	-0.19	0.02	5.3	0.6
2	15 - 35	2.23	-0.055	0.003	18	1

Die Anpassung der Parameter von Exponentialfunktionen 2. Ordnung an die nicht linearisierten Daten der beiden Histogrammanalysen lieferte die in Tab. 5.8 zusammengefassten Werte. Die jeweiligen  $\tau_{\text{exp},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  stimmen innerhalb der Fehlergrenzen gut überein. Obwohl die jeweiligen Fehler aus der Ermittlung mit 3 ms-Intervallen größer sind als bei den 5 ms-Intervallen wurden diese Werte zur

Berechnung der  $\tau_i^{\text{Ni}^{2+}}$  und deren Fehler herangezogen, da die Anzahl an Datenpunkten für die Kurvenanpassung bei 3 ms-Intervallen größer ist.  $\tau_{\text{exp},1}^{\text{Ni}^{2+}}$  beträgt somit  $(4.0 \pm 0.2)$  ms und  $\tau_{\text{exp},2}^{\text{Ni}^{2+}}$   $(18 \pm 5)$  ms.

Tab. 5.8: Zusammenfassung der im Wertebereich von 0 – 60 ms angepassten Parameter der Exponentialfunktionen 2. Ordnung an Histogrammanalysen unterschiedlicher Intervallbreite zur Bestimmung der mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{\text{exp},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  für bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs.

Intervallbreite: 3 ms					
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1} / \text{ms}$	$\sigma(\tau_{\text{exp},1}) / \text{ms}$	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2} / \text{ms}$	$\sigma(\tau_{\text{exp},2}) / \text{ms}$
36	4.0	0.2	4	18	5

Intervallbreite: 5 ms					
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1} / \text{ms}$	$\sigma(\tau_{\text{exp},1}) / \text{ms}$	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2} / \text{ms}$	$\sigma(\tau_{\text{exp},2}) / \text{ms}$
49	3.7	0.1	9	17	2

Aus einer gewichteten Mittelwertbildung zwischen den jeweiligen  $\tau_{\text{exp},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_{\text{lin},i}^{\text{Ni}^{2+}}$  ergeben sich für die mittlere Öffnungsdauer  $\tau_1^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_2^{\text{Ni}^{2+}}$  des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart seines Liganden  $\text{Ni}^{2+}$  die Werte:

$$\tau_1^{\text{Ni}^{2+}} = (4.4 \pm 0.2) \text{ ms}$$

$$\tau_2^{\text{Ni}^{2+}} = (15 \pm 2) \text{ ms.}$$

Die Öffnungsdauer der Ionenkanäle von bpy\*-LS3 in Abwesenheit des Metallions wird durch drei mittlere Öffnungsdauern  $\tau_1 = (3.6 \pm 0.2)$  ms,  $\tau_2 = (15.1 \pm 0.6)$  ms und  $\tau_3 = (63 \pm 4)$  ms charakterisiert. Aus der Gegenwart des Metallions resultieren demnach keine signifikanten Änderungen in den mittleren Öffnungsdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3.

Um zu untersuchen inwiefern eine mittlere Öffnungsdauer  $\tau_3^{\text{Ni}^{2+}}$  vorliegt, wurde entsprechend der Betrachtung der Öffnungsdauer in Abwesenheit des Metallions, eine Histogrammanalyse mit 10 ms-Intervallen im Datenbereich bis 200 ms erstellt. Abb. 5.41 zeigt die entsprechenden linearisierten Daten. Im Wertebereich von 10 – 50 ms ist ein  $\tau_{\text{lin},2}^{\text{Ni}^{2+}}$  entsprechender linearer Bereich. Ab 50 ms streuen die

Datenpunkte stark. Legt man dessen ungeachtet eine Ausgleichsgerade in diesen Bereich, so kann ein  $\tau_{\text{lin},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  von  $(71 \pm 15)$  ms ermittelt werden (Tab. 5.9).

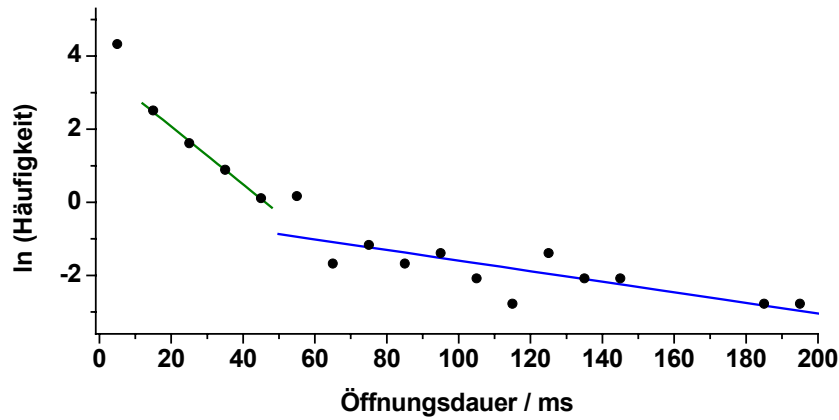


Abb. 5.41: Bestimmung der Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse mit Leitfähigkeiten bis 550 pS (1608 Ereignisse) von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl). Linearisierung der Histogrammanalyse mit Intervallen des Wertebereichs von 10 ms und durch lineare Regression erhaltene Geraden (—, —).

Tab. 5.9: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression nach Linearisierung der Histogrammanalyse der Öffnungsdauer von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs mit 10 ms-Intervallen des Wertebereichs.

$n$	Bereich / ms	$\ln A_n$	$-(1/\tau_{\text{lin}, n}) / \text{ms}^{-1}$	$\sigma (1/\tau_{\text{lin}, n}) / \text{ms}^{-1}$	$\tau_{\text{lin}, n} / \text{ms}$	$\sigma (\tau_{\text{lin}, n}) / \text{ms}$
1	0 - 10	-	-	-	-	-
2	10 - 50	3.66	-0.079	0.002	12.7	0.3
3	50 - 200	-0.1	-0.014	0.003	71	15

Tab. 5.10 bietet eine Übersicht über die im Wertebereich von 0 – 200 ms angepassten Parameter von Exponentialfunktionen 3. Ordnung an die nicht linearisierten Daten der Histogrammanalysen mit 3 ms-, 5 ms- und 10 ms-Intervallen des Wertebereichs. Die jeweiligen  $\tau_{\text{exp},1}^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_{\text{exp},2}^{\text{Ni}^{2+}}$  liegen im gleichen Bereich und nehmen mit steigender Intervallbreite ab. Der Fehler in  $\tau_{\text{exp},1}^{\text{Ni}^{2+}}$  ist im Falle der 10 ms-Intervallbreiten vergleichsweise groß, was aus der zur Bestimmung eines Wertes in dieser Größenordnung zu großen Intervallbreite resultiert. Die ermittelten  $\tau_{\text{exp},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  sind stark fehlerbehaftet. Im Falle der 3 ms- und 5 ms-Intervallbreiten übersteigt der Fehler den eigentlichen Wert um 513 % bzw. 139 %. Dies ist wiederum im Einklang mit der Linearisierung der entsprechenden Daten, bei der im Bereich ab 42 ms bzw. 35 ms nur noch eine zufällige Anordnung der Datenpunkte beobachtet werden konnte. Im Falle der 10 ms-Intervallbreite ist  $\tau_{\text{exp},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  zwar immer



noch stark fehlerbehaftet, liegt jedoch mit einem Wert von  $(59 \pm 42)$  ms im Bereich des ermittelten  $\tau_{\text{lin},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  Wertes.

Tab. 5.10: Zusammenfassung der im Wertebereich von 0 – 200 ms angepassten Parameter von Exponentialfunktionen 3. Ordnung an Histogrammanalysen der Öffnungsdauer von bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs mit unterschiedlichen Intervallbreiten des Wertebereichs.

Intervallbreite: 3 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
36	3.9	0.2	5	16	4	0.07	137	703
Intervallbreite: 5 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
46	3.5	0.1	10	14	2	0.2	83	115
Intervallbreite: 10 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
51	2.7	0.6	24	12	2	0.8	59	42

Daraus wurde abgeleitet, dass eine mittlere Öffnungsdauer  $\tau_3^{\text{Ni}^{2+}}$  existiert. Aufgrund der zu geringen Häufigkeit, mit der Ereignisse mit längeren Öffnungsdauern auftreten, kann jedoch keine Intervallbreite für die Histogrammanalyse gefunden werden, in der alle drei Öffnungsdauern ausreichend definiert sind. Daher ist eine eindeutige Bestimmung von  $\tau_3^{\text{Ni}^{2+}}$  nicht möglich. Jedoch liegen bei einer Intervallbreite der Histogrammanalyse von 10 ms sowohl  $\tau_{\text{exp},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  als auch  $\tau_{\text{lin},3}^{\text{Ni}^{2+}}$  im Bereich der mittleren Öffnungsdauer  $\tau_3$  des Peptids in Abwesenheit des Metallions.

Demnach hat die Gegenwart des Metallions keinen Einfluss auf die mittlere Öffnungsdauern  $\tau_{1-3}$  des Peptids, lediglich die Häufigkeit mit der Ereignissen mit längerer Öffnungsdauer auftreten nimmt in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  ab.



# 6 Diskussion

## 6.1 Untersuchungen zur Komplexierung

Um die Komplexierung der Rezeptoreinheit bpy\* und des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 nachzuweisen bzw. näher zu untersuchen, wurde das unterschiedliche Absorptionsverhalten von freiem und komplexgebundenem 2,2'-Bipyridin genutzt.

Die Rezeptoreinheit bpy\* zeigte in ethanolischer Lösung zwei  $\pi \rightarrow \pi^*$  Absorptionsbanden bei 241 nm und 282 nm. In Gegenwart äquimolarer Mengen  $\text{Ni}^{2+}$  kam es zur bathochromen Verschiebung der Intraligand-Absorptionsmaxima mit einhergehender Aufspaltung der längerwelligen Bande. Diese Absorptionsmuster in An- und Abwesenheit des Metallions sind charakteristisch für freies bzw. komplexiertes 2,2'-Bipyridin<sup>95, 96</sup>. In Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  trat im Absorptionsspektrum des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 dagegen lediglich die längerwellige Absorptionsbande der Bipyridin-Einheit auf. Die Absorptionsbande im Bereich von 240 nm wird durch die Absorption der Peptidbindung überlagert, die bei einer  $\alpha$ -Helix Maxima bei 191 nm, 208 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) und 222 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) aufweist<sup>110</sup>. In Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  konnte allerdings, wie im Falle der Rezeptorfunktion, die charakteristische Rotverschiebung und Aufspaltung des Absorptionsmaximums der Bipyridin-Einheit beobachtet werden, die im Zuge der Komplexierung auftritt. Sowohl die Rezeptorfunktion bpy\*, als auch das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 bilden demnach Komplexe mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen aus.

Um den Einfluss des Alkylspacers in der Rezeptorfunktion bpy\* auf die Komplexstabilität und damit auch -stöchiometrie zu untersuchen, wurde eine photometrische Titration von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  in Ethanol durchgeführt. Die daraus gewonnenen Daten waren nur mit einer möglichen 3:1-Stöchiometrie beschreibbar, auch wenn sich im Zuge der entsprechenden Kurvenanpassung zeigte, dass die

Komplexbildungskonstante  $K_1$ , welche dem 1:1-Komplex zugeordnet ist, schlecht definiert ist. Ihr Wert wurde daher konstant auf den Literaturwert von  $\log K_1 = 6.25$  gesetzt<sup>107</sup>▼. Die ermittelte Komplexbildungskonstante  $\log K_2 = 5.41 \pm 0.09$  des 2:1-Komplexes entspricht sehr gut dem Literaturwert von  $\log K_2 = 5.55$ <sup>107</sup>. Dagegen liegt die ermittelte Komplexbildungskonstante  $K_3$  des 3:1-Komplexes mit einem Wert von  $\log K_3 = 3.97 \pm 0.09$  deutlich unter dem Literaturwert von  $\log K_3 = 5.20$ <sup>107</sup>. Die geringere Stabilität des 3:1-Komplexes von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  verglichen zum entsprechenden 2,2'-Bipyridin-Komplex kann nur auf den sterischen Anspruch des Alkylsubstituenten zurückgeführt werden. Lehn et al. stellten 4,4'-disubstituierte 2,2'-Bipyridinderivate her, die zwei über Ethylenglycol-Spacer angebrachte  $\text{C}_{16}$ -Alkylketten als lipophilen Anker trugen<sup>113</sup>. Sie inkorporierten diese von ihnen als Lipoliganden bezeichneten Bipyridinderivate in Vesikel und konnten nach Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  eine durch die Komplexbildung der Lipoliganden induzierte Fusion der Vesikel beobachten. Im Rahmen ihrer Studien untersuchten sie ebenfalls die Komplexstabilität und -stöchiometrie anhand einer photometrischen Titration der Lipoliganden in Ethanol. Sie konnten ihre Ergebnisse lediglich mit einer maximal möglichen 2:1-Stöchiometrie beschreiben<sup>113</sup>. Die Gegenwart von zwei sterisch anspruchsvollen Substituenten bewirkt demnach, dass 3:1-Komplexe nicht mehr ausgebildet werden können. Im Falle des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monosubstituierten bpy\* scheint der sperrige Alkylspacer dagegen verglichen mit 2,2'-Bipyridin lediglich eine Destabilisierung des 3:1-Komplexes zu bewirken.

Im Rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 ist der Substituent am Bipyridinring deutlich größer als in der Rezeptorfunktion bpy\*. In der Literatur sind jedoch einige Beispiele bekannt, in denen Peptide mit kovalent gebundenem 2,2'-Bipyridin über eine Komplexbildung mit Übergangsmetallionen wie  $\text{Ni}^{2+}$  verknüpft wurden<sup>114-120</sup>. Ghadiri et al. gelang so beispielsweise die Verknüpfung von drei amphipatischen Peptidhelices, die eine Bipyridinfunktion am *N*-Terminus trugen, in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Ru}^{2+}$  zu einem Tripelhelix-Metalloprotein mit einer *coiled coil*-

---

▼ Anmerkend sei erwähnt, dass in der Literatur unterschiedliche Komplexbildungskonstanten der 2,2'-Bipyridin- $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexe vorliegen. Ihre Werte liegen in Bereichen von  $\log K_1 = 6.25 - 7.13$ ,  $\log K_2 = 5.55 - 6.88$  und  $\log K_3 = 5.19 - 6.53$  und variieren mit der jeweiligen Art der Bestimmung und den Messbedingungen<sup>107, 111, 112</sup>. In dieser Arbeit wurden die von Dazzi et al. potentiometrisch in 20 % Ethanol ermittelten Komplexbildungskonstanten als Referenzwerte herangezogen<sup>107</sup>.

Struktur<sup>115</sup>. Gochin et al. versahen ein Peptid aus der *coiled coil*-Region des Glycoproteins gp41 von HIV-1 mit einer Bipyridin-Einheit am *N*-Terminus. Durch Komplexierung mit  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  waren sie in der Lage, die im nativen Protein vorliegende trimere *coiled coil*-Struktur zu stabilisieren, wobei das resultierende Metalloprotein charakteristische Eigenschaften des nativen Proteins zeigte<sup>120</sup>. Beide Gruppen beobachteten bei den verwendeten Peptiden die charakteristische Änderung des Absorptionsverhaltens der Bipyridin-Einheit in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ , die auch für das Peptid bpy\*-LS3 beobachtet werden konnte. Innerhalb einer *coiled coil*-Struktur sind die Peptidhelices parallel zueinander ausgerichtet. Die daraus resultierende sterische Einschränkung der Ausrichtung der Bipyridin-Liganden am Metallion scheint demnach kein Problem bei der Komplexbildung darzustellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 Komplexe mit bis zu 3 Peptiden pro Metallatom bilden kann. Darüber hinaus sollte dies auch im Falle einer räumlichen Fixierung der Peptide aus sterischer Sicht möglich sein, wenn sie sich, wie im Falle der Einzelkanalmessungen, in einer planaren Lipiddoppelschicht befinden.

Wie wirkt sich allerdings die Gegenwart der hydrophoben Umgebung der Lipidmembran auf die Komplexbildung aus? Um den Effekt einer hydrophoben Umgebung auf die Komplexstabilität der bpy\*- $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexe zu untersuchen, wurden entsprechend der photometrischen Titration in ethanolischer Lösung die Komplexbildungskonstanten in einer Lösung von neutralen Octyl-Polyoxyethylen (o-POE)-Mizellen bestimmt. Die Mizellen sollten dabei die hydrophobe Umgebung der Lipidmembran nachahmen, mit der die Rezeptorfunktion wechselwirken kann, ohne jedoch, wie es bei Vesikeln denkbar ist, einen Anteil der bpy\*-Moleküle durch Einschluss in den Innenraum für das Metallion unzugänglich zu machen. Um möglichst nahe an den Messbedingungen der Einzelkanalmessungen zu sein, wurde in 0.5 M KCl gearbeitet. Die aus der Titration gewonnenen Daten waren wie bei der Bestimmung in Ethanol nur durch eine mögliche 3:1-Stöchiometrie beschreibbar. Die Komplexbildungskonstante  $K_1$  war wiederum nicht definiert und wurde daher analog zur Bestimmung in Ethanol bei der Kurvenanpassung konstant auf den Literaturwert von  $\log K_1^{\text{Miz}} = 6.25$  gehalten. Die ermittelten Komplexbildungskonstanten  $K_2$  und  $K_3$  betragen in mizellarer Lösung  $\log K_2^{\text{Miz}} = 5.8 \pm 0.2$  und

$\log K_3^{\text{Miz}}$   $4.25 \pm 0.07$ . Ihre Werte sind demnach etwas höher als die in Ethanol bestimmten Werte, liegen allerdings im gleichen Bereich. Weder die Gegenwart der hydrophoben Umgebung der Mizellen noch der bei den Einzelkanalmessungen verwendete Elektrolyt KCl wirken sich demnach auf die Komplexstabilität der bpy\*-Ni<sup>2+</sup>-Komplexe aus.

Jedoch konnte in mizellarer Lösung beobachtet werden, dass nach Zugabe des Metallions die im Zuge der Komplexierung auftretende charakteristische Absorptionsänderung der Rezeptorfunktion bpy\* deutlich langsamer erfolgt als in ethanolischer Lösung. So dauerte die Einstellung des Gleichgewichtszustands, erkennbar an einer konstant bleibenden Absorption, in Ethanol lediglich wenige Sekunden, während in mizellarer Lösung der Gleichgewichtszustand abhängig vom Verhältnis der Ausgangskonzentrationen an bpy\* und Metallion erst nach bis zu 90 min erreicht wurde. Da in wässriger Lösung die Einstellung des Gleichgewichtszustands sehr schnell erfolgt<sup>121</sup> und die ebenfalls in der Lösung vorhandenen Chlorid-Ionen nicht in der Lage sind stabile Komplexe mit Ni<sup>2+</sup> zu bilden<sup>122</sup>, muss die beobachtete Retardation der Komplexierung von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in mizellarer Lösung aus einer starken Wechselwirkung der Rezeptorfunktion bpy\* mit den Mizellen resultieren.

Robinson et al. untersuchten die Kinetik der Komplexierung von Ni<sup>2+</sup> mit 2,2'-Bipyridin, 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridin und 4-(2-Pyridylazo)-*N,N*-Dimethylanilin (PADA) in anionischen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Mizellen<sup>123</sup>. Sie fanden heraus, dass die Komplexbildung an der Mizelloberfläche stattfindet und die Reaktionsgeschwindigkeit durch die elektrostatische Wechselwirkung der Metallkationen mit den negativ geladenen Mizellen und der daraus resultierenden höheren lokalen Ni<sup>2+</sup>-Konzentration an der Mizelloberfläche drastisch zunimmt. Des weiteren beobachteten sie, dass die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Hydrophobizität der Liganden und der daraus resultierenden Verteilung zwischen der wässrigen Phase und der Mizellphase in der Reihenfolge 2,2'-Bipyridin < 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridin < PADA steigt<sup>123</sup>. Für die Rezeptorfunktion bpy\* ist demnach anzunehmen, dass sowohl der unpolare Alkylspacer, als auch die polarere Bipyridineinheit mit den ungeladenen o-POE-Mizellen wechselwirkt.

Teramoto et al. untersuchten die Bildung von 1:1-Komplexen zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und Benzoylacetone (1-Phenylbutan-1,3-dion) in elektrisch neutralen Mizellen von *n*-Dodecyl-POE<sup>124</sup>. Benzoylacetone liegt in wässriger Lösung als Keto- und Enolform vor. Die Bildung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Enolatkomplexes kann mit beiden Spezies erfolgen, jedoch ist die Reaktion von  $\text{Cu}^{2+}$  mit der Ketoform sowie der Übergang von der Keto- in die Enolform sehr langsam. Die Enolform ist in unpolaren Medien wesentlich besser löslich als in polaren und dort stabiler als die Ketoform, daher liegt der in den Mizellen befindliche Teil des Benzoylacetons fast ausschließlich in der Enolform vor. Mittels der *Stopped Flow*-Methode konnten Teramoto et al. unter Reaktionsbedingungen pseudo-1. Ordnung eine schnelle und eine langsame Relaxation beobachten. Die langsame Reaktion entsprach der Komplexbildung mit der Ketoform und die Geschwindigkeitskonstante stimmte mit dem Wert, der auch in Abwesenheit von Mizellen gefunden wurde überein. Die schnelle Relaxation entsprach der Reaktion der Enolform mit dem Metallion in der wässrigen Phase und in der mizellaren Phase. Anhand der Kenntnis des Verteilungsgrades der Enolform in den beiden Phasen war es ihnen möglich sowohl die Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung in der wässrigen Phase, als auch die in der mizellaren Phase zu bestimmen. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeitskonstante in der Mizellphase um ca. einen Faktor 10 kleiner war als in der wässrigen Phase<sup>124</sup>. Die hydrophobe Umgebung einer elektrisch neutralen Mizelle kann demnach einen retardierenden Effekt auf die Komplexbildung ausüben, wenn der Ligand relativ hydrophob ist und stark mit der Mizelle wechselwirkt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Untersuchung der Reaktionskinetik der Komplexbildung in Mizellen wurde nach Zugabe des Metallions die Absorptionsabnahme bei 285 nm beobachtet, der Wellenlänge, bei der freies bpy\* ein Maximum aufweist. Letztlich betrachtet man also die Abnahme der Konzentration an freiem bpy\*. In Abwesenheit von Mizellen erfolgt die Komplexbildung gemäß einer möglichen 3:1-Stöchiometrie der Komplexe in drei Stufen. Geht man in Gegenwart der Mizellen von einem analogen Reaktionsschema aus, wie es Teramoto et al. für die Komplexbildung von  $\text{Cu}^{2+}$  und Benzoylacetone in mizellarer Lösung in Betracht ziehen<sup>124</sup>, so kommen zu diesen drei Gleichgewichtsreaktionen der Komplexbildung in der wässrigen Phase die entsprechenden Reaktionen in der Mizelle hinzu. Außerdem stehen alle Spezies in

einem ständigen Gleichgewicht zwischen der mizellaren Phase und der wässrigen Phase. Es liegt also eine Vielzahl von Gleichgewichtsreaktionen vor, die sich auf die Konzentration an freiem bpy\* auswirken. Entsprechend kompliziert ist das differentielle Zeitgesetz zur Beschreibung der Konzentrationsänderung von freiem bpy\*. Selbst wenn man im Falle eines großen Ni<sup>2+</sup>-Überschusses die Bildung von 2:1- und 3:1-Komplexen unterdrücken würde und bezüglich der Bildung des 1:1-Komplexes eine Reaktion pseudo-1. Ordnung vorliegen würde, so müsste zur gleichzeitigen Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung in der mizellaren Phase und in der wässrigen Phase die Verteilung der Rezeptorfunktion bpy\* in beiden Phasen bekannt sein<sup>124</sup>. Um dennoch die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung von bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der beiden Reaktanden vergleichen zu können, wurden ungeachtet des tatsächlich vorliegenden Zeitgesetzes die Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der unterschiedlichen Messreihen entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung bestimmt. Die so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  stellen demnach lediglich ein Maß dar, um den Einfluss unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen an Rezeptorfunktion bpy\* und Metallion auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung vergleichen zu können. Sie können allerdings nicht mit Literaturangaben verglichen werden. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  nahmen bei gegebener bpy\*-Ausgangskonzentration mit steigender Ausgangskonzentration an Ni<sup>2+</sup> linear zu. Dies spricht dafür, dass die Reaktion 1. Ordnung bezüglich des Metallions ist. Auch bei steigender Ausgangskonzentration an bpy\* kam es, wie letztlich zu erwarten war, zu einer Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Kinetik der Komplexbildung der Rezeptorfunktion bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> wurde auch in einer Lösung von 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC)-Vesikeln in 0.5 M KCl untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch in Gegenwart des bei den Einzelkanalmessungen zur Herstellung von klassischen BLMs und nano-BLMs verwendeten Lipids die Komplexbildung kinetisch retardiert ist. Die Einstellung des Gleichgewichtszustands benötigte bis zu 25 min. Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen von Lehn et al. bezüglich der Kinetik der Komplexbildung ihrer Lipoliganden mit Ni<sup>2+</sup> in Vesikeln. Auch bei ihnen trat erst 30 min nach Zugabe des Metallions keine weitere Änderung im Absorptionsspektrum auf<sup>113</sup>.



Die beobachtete maximale Absorptionsänderung von bpy\* in Vesikeln nach Zugabe eines Überschusses  $\text{Ni}^{2+}$  war trotz annähernd gleicher Ausgangskonzentrationen der beiden Reaktanden deutlich kleiner als in der mizellaren Lösung. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Teil der bpy\*-Moleküle im Vesikelinnenraum gefangen und somit für das Metallion nicht zugänglich ist. Ein Vergleich der Ausgangskonzentrationen von bpy\* in Vesikeln und Mizellen, bei denen in Gegenwart eines Überschusses an Metallion eine vergleichbare Absorptionsänderung eintrat, legt nahe, dass ca. 20 % der Rezeptorfunktionen im Vesikelinnenraum oder an der Innenseite der Membran lokalisiert sind.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  der Komplexierung von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  in Vesikeln zeigten bei konstanter Ausgangskonzentration von bpy\* wie im Falle der mizellaren Lösung eine lineare Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration. Ihre Werte lagen deutlich über den Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  in mizellarer Lösung. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wechselwirkung der Rezeptorfunktion bpy\* mit DPhPC-Vesikeln weniger stark ausgeprägt ist als mit den verwendeten o-POE-Mizellen.

Die Einstellung des Gleichgewichtszustand erfolgte in der Vesikellösung zwar schneller als in der Mizelllösung, jedoch liegt die Ursache für die höheren Geschwindigkeitskonstanten in Vesikeln nicht allein darin. In Gegenwart der Vesikel konnte im Falle eines deutlichen  $\text{Ni}^{2+}$ -Überschusses verglichen zur Ausgangskonzentration an bpy\* innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe des Metallions zunächst ein relativ schneller Abfall der Absorption bei 285 nm beobachtet werden, gefolgt von einem langsamen Anstieg bis die Absorption schließlich konstant blieb und sich das Gleichgewicht eingestellt hatte. Woraus diese Beobachtung resultiert ist unklar. Letztlich wird dadurch induziert, dass zunächst mehr bpy\* komplexgebunden wird als im Gleichgewichtszustand und dass zur Einstellung des Gleichgewichts wieder bpy\* freigesetzt wird. Es muss also zur Dissoziation bereits gebildeter  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexe kommen. Dies wäre denkbar, wenn eine veränderte Membranumgebung, die aus der Wechselwirkung mit  $\text{Ni}^{2+}$  resultieren kann, die Komplexstabilität beeinträchtigt. Stellt sich die Veränderung der Membranumgebung langsamer ein, als die erste Gleichgewichtseinstellung der Komplexierung, so käme es zu einer Relaxation und es würde wieder bpy\* freigesetzt werden.

Die beschriebenen Untersuchungen bezüglich der Komplexstabilität und der Kinetik der Komplexbildung wurden aufgrund des damit verbundenen hohen Substanzverbrauchs nicht mit dem rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 durchgeführt. Zusammenfassend kann man aufgrund der durchgeführten Untersuchungen mit der Rezeptorfunktion bpy\* als Referenzsubstanz davon ausgehen, dass das Peptid bpy\*-LS3 mit Ni<sup>2+</sup> auch in der hydrophoben Umgebung einer Lipidmembran stabile Komplexe mit einer möglichen Komplexstöchiometrie von bis zu 3:1 ausbilden kann, die Komplexbildung allerdings kinetisch retardiert ist.

## 6.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Membranen

Die *release*-Messungen mit 5(6)-Carboxyfluorescein zeigten, dass das Peptid LS3 keine Farbstofffreisetzung aus Vesikeln bewirkt. Es werden also keine Poren oder Löcher in der Membran gebildet, die für den Austritt von 5(6)-Carboxyfluorescein groß genug wären. Dies ist im Einklang mit Fluoreszenzstudien von DeGrado et al. bezüglich der Orientierung von LS3 in Vesikeln<sup>83</sup>. Die Gruppe verwendete sieben analoge Peptide, bei denen jeweils eine Aminosäure der mittleren Siebenersequenz des Peptids LS3 durch Tryptophan ersetzt wurde. Diese zeigten, dass das Peptid in Abwesenheit einer Transmembranspannung nicht in Lipiddoppelschichten insertiert, sondern parallel zur Membranoberfläche im Bereich der Kopfgruppen liegt. Dathe et al. stellten fest, dass das Peptid Alamethicin, welches wie LS3 spannungsgesteuert Ionenkanäle in Lipidmembranen bildet, erst ab einem sehr kleinen Lipid/Peptid-Verhältnis von 15 eine Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein aus Vesikeln bewirkt<sup>125</sup>.

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen zur Kinetik der Komplexbildung der Rezeptoreinheit bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> in Vesikeln ließen darauf schließen, dass der Rezeptor stark mit Lipiddoppelschichten wechselwirkt. Daher war nicht auszuschließen, dass aus der Anbindung von bpy\* an das Peptid LS3 permeabilisierende Effekte auf Membranen resultieren. Allerdings zeigten weder die Rezeptorfunktion bpy\* noch das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 eine Farbstofffreisetzung aus Vesikeln. Selbst bei kleinen Lipid/Peptid-Verhältnissen von 52 oder in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> bei höheren Lipid/Peptid-Verhältnissen konnte im Falle des Peptids bpy\*-LS3 kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität von 5(6)-Carboxyfluorescein beobachtet werden. Dagegen bewirkt beispielsweise Melittin, dessen lytische Effekte auf Membranen bekannt sind, bereits bei einem Lipid/Peptid-Verhältnis von 275 eine Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein von über 60 %<sup>126</sup>. Demnach besitzt das Peptid bpy\*-LS3 keine lytischen Eigenschaften und bildet in Abwesenheit einer Transmembranspannung keine Poren oder Kanäle, die den Durchtritt von 5(6)-Carboxyfluorescein erlauben.

## 6.3 Bildung von nano-BLMs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nano-BLMs zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften der Peptide LS3 und bpy\*-LS3 verwendet. Die Herstellung der porenüberspannenden Membranen erfolgte über eine Methode, die mit der *Müller-Rudin-Technik*<sup>23</sup> zur Präparation von klassischen BLMs vergleichbar ist. Es ist bekannt, dass das durch diese Technik in das System eingebrachte *n*-Dekan einen Einfluss auf die Schichtdicke der Membran hat<sup>127-130</sup>. Die Lösungsmittelmoleküle lagern sich zwischen den Fettsäureketten ein und führen zu einer größeren Membrandicke. Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide LS3 und bpy\*-LS3 sind mit einer Helixlänge von 21 Aminosäuren gerade lang genug, um den hydrophoben Membrankern der Lipiddoppelschicht durchspannen zu können. Aus diesem Grund war es wichtig, dass die bei den Einzelkanalmessungen verwendeten Membranen möglichst wenig Lösungsmittelreste enthielten. Der Prozess der Membranbildung, der auch als Ausdünnen des Lipidtropfens bezeichnet wird, wurde daher impedanzspektroskopisch verfolgt. Hierzu eignete sich die Betrachtung des Phasenwinkels nach Aufbringen des Lipid-Lösungsmittel-Tropfens auf das poröse Aluminat bei einer Frequenz von  $10^6$  Hz. Im Falle einer optimal ausgedünnten Membran wurde bei dieser Frequenz nur der Elektrolytwiderstand erfasst. Diese Vorgehensweise zur Betrachtung des Ausdünnverhaltens wurde bereits von Schmitt et al. auf unterschiedlichen porösen Substraten beschrieben<sup>49, 50</sup>. Nach dem Aufbringen des Lipidtropfens nimmt der Phasenwinkel sprunghaft auf annähernd  $-90^\circ$  ab. Während des Ausdünnens steigt der Phasenwinkel zunächst langsam, dann exponentiell an. Tien et al. postulierten für die Bildung einer klassischen BLM nach Müller und Rudin einen *Reißverschluss-Mechanismus*<sup>131, 132</sup>. Demnach ordnen sich die Lipide gemäß ihres amphiphilen Charakters an der Wasser/Lösungsmittel-Grenzfläche an. Durch thermische Bewegung, mechanische Schwingungen oder Ähnliches können die Monoschichten in Kontakt treten. Es bildet sich aufgrund von *Van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Fettsäureketten unter Verdrängung des Lösungsmittels in kleinen Bereichen eine Doppelschicht, welche den Ausgangspunkt für das Wachstum der Membran darstellt<sup>22</sup>. Fujiwara et al. bestätigten anhand von elektrischen und optischen Betrachtungen der Membranbildung diesen Mechanismus<sup>133</sup>. Sie zeigten, dass zur schnellen und

vollständigen Ausbildung einer Membran zu Beginn eine Doppelschicht mit einer bestimmten Mindestgröße vorliegen muss, bevor die Van der Waals-Kräfte zwischen den Fettsäureketten die Bildung einer Membran vorantreiben. Schmitt et al. zogen die Möglichkeit in Betracht, dass dieser Mechanismus auch bei der Bildung von nano-BLMs auftritt<sup>49, 50</sup>. Der zunächst langsame Anstieg des Phasenwinkels während des Ausdünnens kann mit der Bildung vieler Lipiddoppelschichtkeime erklärt werden. Erreichen diese eine ausreichende Größe, so setzt der *Reißverschluss-Mechanismus* der Membranbildung ein, welcher sich in einem exponentiellen Anstieg der Phase widerspiegelt. Nano-BLMs stellen allerdings im Vergleich zu klassischen BLMs komplexe Systeme aus freitragenden und festkörperunterstützten Membranen dar. Daher kann der Mechanismus des Ausdünnens von BLMs nur bedingt auf nano-BLMs übertragen werden.

Mittels Impedanzspektroskopie können charakteristische Parameter wie Membrankapazität und –widerstand bestimmt werden. Zur Untersuchung der Membrankapazität der gebildeten nano-BLMs wurden Impedanzspektren in einem Frequenzfenster von  $10^{-1}$  bis  $10^6$  Hz aufgenommen. Lag der Membranwiderstand im für Einzelkanalmessungen nötigen  $G\Omega$ -Bereich, so konnte er im betrachteten Frequenzbereich nicht beobachtet werden. Die bestimmte Membrankapazität der nano-BLMs betrug bezogen auf die poröse Fläche des Aluminats  $(0.39 \pm 0.03)$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Dieser Wert stimmt gut mit der von Schmitt et al. für nano-BLMs ermittelten mittlere Membrankapazität von  $(0.4 \pm 0.1)$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  überein<sup>49, 50</sup>. In der Literatur wird die Kapazität einer nach der *Müller-Rudin-Technik* hergestellten klassischen BLM typischerweise im Bereich von  $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  angegeben<sup>27, 134</sup>. Die Membrankapazitäten von nahezu lösungsmittelfreien nach der *Montal-Müller-Methode* hergestellten BLMs liegen dagegen mit Kapazitäten im Bereich von  $0.9 - 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  verglichen zu den lösungsmittelhaltigen BLMs höher<sup>27, 134</sup>.

## 6.4 Kanaleigenschaften des Peptids LS3

### 6.4.1 LS3 in klassischen BLMs

Seit ihrer Entwicklung in den frühen 60er Jahren sind BLMs ein unverzichtbares Werkzeug für analytische Methoden wie Einzelkanalmessungen an Ionenkanälen. Die Messung der von einem Ionenkanal verursachten Stromamplituden und die daraus resultierende Bestimmung der Leitfähigkeit ist eine wichtige Methode zur Charakterisierung eines Ionenkanals. Die Art, in der die Amplituden mit der ionischen Zusammensetzung der Elektrolytlösungen und dem Membranpotential variieren, liefert wichtige Daten für die Untersuchung des Mechanismus des Ionendurchtritts<sup>135, 136</sup>. Im einfachsten Fall variiert der Strom zwischen zwei Werten, die dem geschlossenen und geöffneten Zustand eines Ionenkanals entsprechen. Auch das in dieser Arbeit untersuchte Peptid LS3 zeigte in BLMs bestehend aus DPhPC bei einem Membranpotential von +200mV und 0.5 M KCl als Elektrolyt eine Leitfähigkeitsstufe von  $(106 \pm 28)$  pS. Neben dieser Hauptleitfähigkeit konnten in variierenden Anteilen auch kleinere Leitfähigkeiten beobachtet werden. Sie zeigten allerdings keine definierten Stromamplituden und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. DeGrado et al. beobachteten für das Peptid LS3 in klassischen BLMs ebenfalls eine Hauptleitfähigkeit und geringere Leitfähigkeiten, denen keine weitere Leitfähigkeitsstufe zugeordnet werden konnte. In 0.5 M KCl bestimmten sie bei einem Membranpotential von -100 mV eine Leitfähigkeit von 70 pS<sup>79</sup>. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle zeigen im Allgemeinen kein ohmsches Verhalten. Der Zusammenhang zwischen einer angelegten Membranspannung und dem aus einem geöffneten Ionenkanal resultierenden Strom wird über sogenannte *Strom/Spannungskennlinien* charakterisiert. Ein Vergleich der ermittelten Leitfähigkeit von LS3 mit den Ergebnissen von DeGrado und seinen Mitarbeitern ist nicht möglich, da bezüglich der Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit keine Angaben gemacht wurden. DeGrado et al. postulierten basierend auf Computersimulationen, dass die Leitfähigkeit des Ionenkanals auf der Bildung hexamerer Helix-Bündel-Strukturen beruht<sup>79, 80</sup>. Das Auftreten von Ereignissen mit einer geringeren Stromamplitude als der vorherrschenden kann, wenn man bedenkt,

dass die Leitfähigkeit eines Ionenkanals entscheidend von der Porengröße abhängt, aus der Bildung von kleineren Aggregaten der Peptide resultieren.

Die Kanalöffnungen des Peptids LS3 resultierten nicht immer in einem Stromplateau. Häufig fiel der Ionenstrom im Verlauf der Kanalöffnung ab oder schwankte. Dies deutet auf eine hohe Dynamik innerhalb der Helix-Bündel-Struktur hin. Eine mögliche Ursache für den leichten Abfall des Ionenstroms während eines Einzelkanalereignisses könnte sein, dass sich die Peptide innerhalb eines zunächst gebildeten Helix-Bündels enger anordnen. Der Porendurchmesser wird somit etwas kleiner und der Ionenstrom nimmt leicht ab.

Einzelkanalereignisse traten in der Regel gehäuft innerhalb eines kurzen Zeitraums von 100 – 200 ms auf, woraufhin für mehrere Sekunden keine weiteren Ereignisse registriert werden konnten. Analoge Beobachtungen wurden auch für Alamethicin-Kanäle gemacht. Es wird angenommen, dass die Einzelkanalereignisse während der kurzen Zeitspanne, in der sie gehäuft auftreten, von einem einzigen Kanal verursacht werden<sup>59</sup>. Das gehäufte Auftreten von Einzelkanalereignissen kann erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass die nach der Insertion in der Membran befindlichen Peptide in der Lage sind, die Membran wieder zu verlassen. Sie können zum einen eine zur Lipiddoppelschicht parallele Anordnung einnehmen oder zum anderen wieder in die wässrige Phase übertreten. Alternativ ist auch denkbar, dass sich die Peptide während des Zeitraums des gehäuften Auftretens von Einzelkanalereignissen in einem Gleichgewicht zwischen Helix-Bündel-Strukturen und einzelnen Helices befinden, die innerhalb der Membran in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind. Diffundieren die Peptide jedoch weiter auseinander, treten zunächst keine weiteren Einzelkanalereignisse auf, bis wieder eine für das kanalbildende Bündel ausreichende Anzahl an Peptiden in der Membran zusammentrifft.

Die Öffnungsdauer der Ionenkanäle von LS3 wies eine monoexponentielle Verteilung auf. Dies spricht dafür, dass der Übergang zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand des Ionenkanals ein Prozess erster Ordnung ist<sup>135</sup>:



Die Übergangsrate  $k$  entspricht dem Kehrwert der mittleren Öffnungsdauer  $\tau$  eines Ionenkanals. In der Reaktionskinetik stellt  $k$  gewöhnlich die

Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion dar. Das Schließen eines einzelnen Ionenkanals erfolgt jedoch zufällig. Daher muss die Übergangsrate  $k$  als ein Maß für die Wahrscheinlichkeit angesehen werden, dass ein geöffneter Kanal während eines Zeitintervalls schließt<sup>135</sup>. Die für das Peptid LS3 bestimmte mittlere Öffnungsdauer betrug  $(1.82 \pm 0.01)$  ms. DeGrado et al. ermittelten bei analogen Messbedingungen eine mittlere Öffnungsdauer von 3 bis 8 ms, die in einem breiten Spannungsbereich weitgehend unabhängig vom Membranpotential ist<sup>79</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte mittlere Öffnungsdauer von LS3 in klassischen BLMs ist demnach kleiner. In der Literatur ist bekannt, dass die mittlere Lebensdauer eines Ionenkanals im Allgemeinen unabhängig vom Membranpotential ist. Sie hängt unter anderem von der Lipidzusammensetzung der Membran und der lateralen Diffusion der Lipidmoleküle innerhalb der Membran ab. DeGrado et al. verwendeten zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften von LS3 ebenfalls BLMs bestehend aus DPhPC, jedoch wurden diese nach der *Montal-Müller-Methode* hergestellt. Fahey et al. zeigten anhand von FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Messungen, dass der Diffusionskoeffizient des Fluoreszenzfarbstoffs 3,3'-Diocetadecylindotricarbocyanin in nach der *Müller-Rudin-Technik* hergestellten BLMs etwa zweimal so groß ist wie in entsprechenden BLMs, die nach Montal und Müller erzeugt wurden. Sie führten die höhere laterale Diffusion in BLMs nach Müller und Rudin auf in der Membran verbliebene Lösungsmittelreste zurück. Die verglichen mit der Angabe von DeGrado et al. kleinere mittlere Lebensdauer von LS3 kann also auf eine höhere Diffusion innerhalb der in dieser Arbeit verwendeten BLMs zurückgeführt werden.



### 6.4.2 LS3 in nano-BLMs

Nano-BLMs sind ein relativ neues Modellsystem für biologische Membranen. Um den Einfluss des verwendeten Membransystems auf die Kanaleigenschaften zu untersuchen, wurden neben der Charakterisierung von LS3 in klassischen BLMs auch die Kanaleigenschaften in nano-BLMs untersucht. Dabei zeigten sich unter analogen Messbedingungen sowohl bezüglich der Leitfähigkeit und der Kanalaktivität als auch der Öffnungsdauer deutliche Unterschiede.

Im Gegensatz zu den klassischen BLMs konnten in nano-BLMs acht unterschiedliche Leitfähigkeitsstufen bestimmt werden. Die niedrigste Stufe  $G_1$  entspricht mit einem Wert von  $(101 \pm 19)$  pS sehr gut der in klassischen BLMs bestimmten Leitfähigkeit von  $(106 \pm 28)$  pS. Die höchste Leitfähigkeitsstufe betrug  $(1011 \pm 53)$  pS. Im Allgemeinen besitzen  $\alpha$ -helicale peptidische Ionenkanäle mehrere Leitfähigkeitsstufen. Beispielsweise weist das Peptid Alamethicin acht Stufen zwischen 88 pS und 5 nS auf, die aus der Aggregation von 4 bis 11 Alamethicin-Monomeren zu unterschiedlich großen Helix-Bündel-Strukturen mit entsprechend großen Porendurchmessern resultieren<sup>59</sup>. Einige weitere Beispiele unter der Vielzahl an peptidischen Ionenkanälen mit multiplen Leitfähigkeitsstufen wären Peptaibole der Zervamicin-Familie<sup>59, 137</sup> oder Nicht-Peptaibole wie Melittin und  $\delta$ -Toxin<sup>59</sup>. Die Tatsache, dass das Peptid LS3 in nano-BLMs mehr als eine Leitfähigkeitsstufe aufweist, entspricht also eher der Regel, als die Beobachtung von nur einer Leitfähigkeit in klassischen BLMs.

Aufgrund der übereinstimmenden Werte der niedrigsten Stufe in nano-BLMs und der beobachteten Leitfähigkeit in klassischen BLMs kann geschlossen werden, dass die Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  dem von DeGrado et al. postulierten Hexamer entspricht<sup>79</sup>. Die erzielten höheren Leitfähigkeitsstufen von LS3 in nano-BLMs können nur aus der Bildung größerer Helix-Bündel-Strukturen resultieren. Basierend auf dem *Zylinder-Modell* zur Beschreibung der Kanalstruktur ist es möglich eine stark vereinfachte theoretische Betrachtung der Leitfähigkeiten von Helix-Bündel-Strukturen durchzuführen. Mit Hilfe dieses Modells und dem Vergleich mit dem Peptid Alamethicin wurde geschlossen, dass sich die höheren Leitfähigkeiten von LS3 aus einer kontinuierlich steigenden Anzahl an LS3-Monomeren im Helix-

Bündel ergeben. Geht man dabei von einer hexameren Struktur des LS3 bei der Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  aus, so ergeben sich die acht Leitfähigkeitsstufen von LS3 demnach aus Helix-Bündeln mit 6 bis 13 Monomeren pro Kanal.

Mit Hilfe des verwendeten sehr einfachen Modells der Leitfähigkeiten eines Ionenkanals lassen sich die entsprechenden Porenradien  $r_{\text{eff}}$  berechnen. Der effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  von Helix-Bündeln des Peptids LS3 beträgt demnach nur 20 – 26 % des nach dem *Zylinder-Modell* berechneten Porenradius  $r_{\text{calc}}$ . Für die Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  ergibt sich ein effektiver Porenradius von  $(0.12 \pm 0.01)$  nm. Dieser Wert liegt deutlich unter dem von DeGrado et al. bestimmten Porenradius. Sie ermittelten anhand von Einzelkanalmessungen mit unterschiedlich großen Kationen und theoretischen Betrachtungen des Ionenflusses durch wassergefüllte Poren einen Wert von  $0.4 \text{ nm}^{79}$ . Sansom et al. bestimmten mittels einer Moleküldynamik (MD)-Simulation des hexameren LS3-Bündels einen mittleren Porenradius von  $(0.36 \pm 0.05)$  nm. Die engste Stelle der Pore besaß allerdings nur einen Radius von  $\sim 0.2 \text{ nm}^{82}$ . Der in dieser Arbeit bestimmte effektive Porenradius des Bündels der Leitfähigkeitsstufe  $G_1$  liegt also durchaus im Bereich eines Hexamers.

Für das Peptid Alamethicin, bei dem der Grad der Aggregation für jede Leitfähigkeitsstufe bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  für Helix-Bündel mit 5 bis 11 Monomeren weitgehend konstant ist. Bei dem Peptid LS3 lag für die unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen nur dann ein annähernd konstantes Verhältnis  $r_{\text{eff}}/r_{\text{calc}}$  vor, wenn den Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-8}$  Helix-Bündel-Strukturen mit einer kontinuierlich zunehmenden Anzahl an Monomeren zugrunde gelegt wurden. Eine Auftragung der bestimmten Leitfähigkeiten als Funktion der Monomeranzahl im Bündel zeigte einen für peptidische Ionenkanäle typischen Verlauf. Die multiplen Leitfähigkeitsstufen der meisten peptidischen Ionenkanäle werden durch eine kontinuierlich ansteigende Anzahl an Monomeren pro Helix-Bündel erzielt<sup>59, 137</sup>. Eine Möglichkeit zur Ermittlung des Grades der Aggregation bietet das von Mutter entwickelte Konzept der *Templat-organisierten synthetischen Proteine (TASPs, template-assembled synthetic proteins)*<sup>138</sup>. Durch die kovalente Anbindung von Peptiden an ein Templat können Helix-Bündel definierter Größe gebildet werden. Montal et al. verknüpften beispielsweise vier bzw. fünf Peptidhelices, die dem M2-Segment des nicotinischen Acetylcholinrezeptor entsprechen, kovalent über ein Templat. Beide synthetischen Proteinen bildeten

Ionenkanäle in Lipidmembranen und die Leitfähigkeiten entsprachen denen, die für Monomere M2 $\delta$ -Peptide beobachtet wurden<sup>139, 140</sup>. Die Synthese von auf Templaten assemblierten Peptiden ist allerdings enorm aufwendig und ihre Kanalaktivität nicht garantiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher von dieser Möglichkeit der Bestimmung des Aggregationsgrads in Helix-Bündel-Strukturen abgesehen.

Doch wie ist das Auftreten multipler Leitfähigkeitsstufen, die in klassischen BLMs nicht beobachtet werden, in nano-BLMs zu erklären? Bei nano-BLMs befindet sich auf den Porenstegen eine Lipiddoppelschicht, deren untere Monoschicht fest mit dem Substrat verankert ist. Die Diffusionskoeffizienten von Lipiden in festkörperunterstützten Membranen sind wegen der Wechselwirkungen mit der immobilisierten unteren Monoschicht nachweislich deutlich geringer als in freitragenden Membranen<sup>141</sup>. Das Peptid LS3 müsste aufgrund seiner Transmembranorientierung innerhalb der Lipiddoppelschicht zum Überwinden der Porenstege durch die immobilisierte Monoschicht diffundieren. Es ist also naheliegend, dass die laterale Diffusion von LS3 in nano-BLMs auf eine einzelne Pore des Substrats mit einem Durchmesser von 60 nm beschränkt ist. Dagegen bietet sich in einer klassischen BLM mit einem Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  eine wesentlich größere Fläche in der die Peptide frei diffundieren können. Damit Helix-Bündel-Strukturen mit höheren Leitfähigkeiten zustande kommen, muss sich innerhalb der Membran eine größere Anzahl an LS3-Molekülen in unmittelbarer Nähe befinden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist demnach in nano-BLMs größer als in klassischen BLMs. Diese Annahme erklärt auch die deutlich höhere Aktivität von LS3 in nano-BLMs, die sich zum einen in wesentlich längeren *bursts* von Einzelkanalereignissen und zum anderen in kürzeren Zeitspannen zwischen aufeinanderfolgenden *bursts* widerspiegeln. Sobald eine ausreichende Anzahl an LS3-Molekülen innerhalb einer Pore lokalisiert ist, treffen diese innerhalb der vergleichsweise kleinen Fläche wesentlich häufiger aufeinander.

Des Weiteren konnte für die Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-4}$  beobachtet werden, dass innerhalb eines *bursts* nahezu ausschließlich Einzelkanalereignisse einer einzigen Leitfähigkeitsstufe auftraten. *Bursts* einer gegebenen Leitfähigkeitsstufe folgten dabei immer wieder aufeinander. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass LS3-Moleküle innerhalb einer Pore quasi gefangen sind. Solange eine gleichbleibende Anzahl an Peptidhelices innerhalb einer Pore lokalisiert ist, kommt

es immer wieder zur Ausbildung der gleichen Helix-Bündel-Struktur mit einer Leitfähigkeit. Im späteren Verlauf eines Experiments traten darüber hinaus auch *bursts* von Ereignissen einer anderen Leitfähigkeitsstufe auf. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass dennoch einzelne Helices die durch die Porenstege gebildete Diffusionsschranke überwinden. So kommen weitere Moleküle innerhalb einer Pore hinzu oder verlassen diese. Außerdem stehen die in der Membran befindlichen Peptide in einem dynamischen Gleichgewicht mit Peptiden in der wässrigen Phase und auf der Membranoberfläche lokalisierten Peptiden, die nicht inseriert sind. Auch dies kann ein möglicher Grund für eine wechselnde Anzahl von Peptiden innerhalb einer Pore und somit auch für Einzelkanalereignisse mit einer anderen Leitfähigkeitsstufe sein.

Der Stromverlauf bei Einzelkanalmessungen an peptidischen Ionenkanälen mit mehreren Leitfähigkeitsstufen entspricht im allgemeinen einer Stufenfunktion, in der durch das An- bzw. Abdiffundieren einzelner Helices in der Helix-Bündel-Struktur zwischen benachbarten Leitfähigkeitsstufen gewechselt wird<sup>59, 137</sup>. Das Peptid LS3 zeigte dagegen ein eher untypisches Verhalten. So traten Ereignisse der Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-5}$  mit 6 bis 10 Monomeren pro Bündel nahezu ausschließlich ausgehend vom geschlossenen Zustand auf. Übergänge zwischen diesen Leitfähigkeitsstufen konnten nur extrem selten beobachtet werden. Die Leitfähigkeitsstufen  $G_{6-8}$ , welche Helix-Bündeln mit 11 bis 14 Monomeren pro Bündel entsprechen, traten dagegen ausschließlich ausgehend von einer bestehenden Leitfähigkeitsstufe auf. Die Stufen  $G_6$  und  $G_8$  wurden dabei bevorzugt ausgehend von der Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  mit 9 Monomeren pro Bündel gebildet. Ausgehend von  $G_5$  mit 10 Monomeren pro Bündel erfolgten dagegen ausschließlich Übergänge zu  $G_7$  oder höheren Leitfähigkeiten im Bereich von 1.5 – 2.1 nS, denen keine weitere eindeutige Leitfähigkeitsstufe zugeordnet werden konnte. Bei den beobachteten Übergängen zwischen zwei Leitfähigkeiten wird also jeweils eine Öffnungsstufe übersprungen. Diese Beobachtung legt nahe, dass das Peptid LS3 in der Lipiddoppelschicht zum Teil als Dimer vorliegt und die beobachteten Übergänge zwischen unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen, ausgehend von einer bestehenden Helix-Bündel-Struktur, aus dem Ein- bzw. Austreten eines LS3-Dimers resultieren. Zhong et al. führten MD-Simulationen der hexameren Helix-Bündel-Struktur von LS3 durch<sup>142</sup>. Die Simulationen zeigten, dass das Hexamer in Abwesenheit eines

Potentials nicht stabil ist, stattdessen bilden sich drei Dimere aus. Innerhalb eines Dimers sind die beiden Helices so angeordnet, dass die Leucinreste benachbarter Helices ineinander greifen und die Serinreste Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, welche sehr wahrscheinlich die Stabilität der Struktur begründen. In Gegenwart eines elektrischen Feldes ist die hexamere Struktur stabil. Diese wird jedoch weniger aus sechs Monomeren sondern wiederum aus drei Dimeren gebildet. Die Simulationen von Zhong et al. sprechen demnach für das Vorliegen von LS3-Dimeren. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Gruppe Oktan verwendete, um die hydrophobe Umgebung der Lipidmembran nachzuahmen. Sansom et al. beobachteten dagegen in MD-Simulationen des LS3-Hexamers in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) ohne appliziertes Membranpotential ein stabiles Hexamer, in dem sich keine Dimere abzeichneten<sup>82</sup>. Daraus kann geschlossen werden, dass LS3 möglicherweise eine Tendenz zur Bildung von Dimeren besitzt, die durch Lösungsmittelreste in der Lipidmembran verstärkt wird. Das Vorliegen von LS3-Dimeren würde auch erklären, warum Übergänge zwischen den Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-5}$  nur extrem selten beobachtet werden konnten. Falls LS3 zu großen Teilen als Dimer vorliegt, nimmt die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine für das entsprechende Helix-Bündel nötige Anzahl an Peptiden in der Membran findet, drastisch zu. So müssen beispielsweise zum Erreichen der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  lediglich 4 Dimere statt 8 Monomere in der Membran aufeinandertreffen. Bei den Leitfähigkeitsstufen  $G_{6-8}$  scheint dagegen eine zur Bündelbildung nötige Anzahl an Peptiden erreicht zu sein, bei der die Wahrscheinlichkeit, dass sie sich in der Membran treffen, selbst im Falle von Dimeren gering ist. Die entsprechenden Helix-Bündel-Strukturen werden nur durch Andiffundieren weiterer Helices an ein bestehendes Bündel ausgebildet.

Die Betrachtung der relativen Häufigkeiten von Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_{1-5}$  lässt dagegen nicht auf LS3-Dimere schließen. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_2$ , die durch ein Helix-Bündel bestehend aus einer ungeraden Anzahl an Peptiden gebildet wird, ist mit einem Anteil von 8 % in der entsprechenden Histogrammanalyse weitaus weniger häufig vertreten als die Leitfähigkeiten  $G_1$  und  $G_3$  mit einem Anteil von 37 % bzw. 19 %. Das Helix-Bündel mit 6 bzw. 8 Monomeren tritt demnach häufiger auf als ein Bündel mit 7 Monomeren. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  mit 9 Monomeren stellt allerdings mit einer Häufigkeit von 37 % einen großen Anteil der

Ereignisse dar, wohingegen der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_5$  mit 10 Monomeren pro Bündel verschwindend gering ist. Bei dieser Betrachtung darf allerdings nicht vernachlässigt werden, dass das Auftreten der einzelnen Öffnungsstufen eine Abhängigkeit vom Experiment zeigte. Dies äußerte sich, wie oben bereits erwähnt, darin, dass im Verlauf eines Experiments zunächst *bursts* von Ereignissen einer Leitfähigkeitsstufe auftraten, gefolgt von *bursts* mit Ereignissen einer anderen Leitfähigkeitsstufe. Die Absolutwerte der relativen Häufigkeiten der Leitfähigkeiten unterliegen dementsprechend Schwankungen. Allgemeine Tendenzen können den Werten jedoch entnommen werden. Ein Betrachtung der relativen Häufigkeiten der Leitfähigkeitsstufen  $G_{6-8}$  in der entsprechenden Histogrammanalyse ist nicht sinnvoll, da sie wie bereits beschrieben zu unterschiedlichen Anteilen ausgehend von den Leitfähigkeitsstufen  $G_4$  und  $G_5$  hervorgingen, welche wiederum deutlich unterschiedliche Häufigkeiten aufwiesen.

Neben der Leitfähigkeit von LS3 wurde auch die mittlere Öffnungsdauer der Kanäle in nano-BLMs ermittelt. Einzelkanalereignisse, die keinen reinen Übergang zwischen dem geschlossenen Zustand und der Öffnungsstufe aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt, um mögliche Effekte auf die Öffnungsdauer auszuschließen, die aus dem An- oder Abdiffundieren von LS3-Molekülen im Helix-Bündel resultieren könnten. Das heißt, dass in der Bestimmung Ereignisse mit Übergängen zu den Leitfähigkeitsstufen  $G_{6-8}$  nicht berücksichtigt und lediglich Einzelkanalereignisse der Leitfähigkeitsstufe  $G_{1-5}$  einbezogen wurden. Dabei konnte keine signifikante Abhängigkeit der Öffnungsdauer von der Höhe der Leitfähigkeit erfasst werden. Auch die Peptide Alamethicin und das Zervamicin Zrv-IIB zeigen keine signifikante Abhängigkeit der Öffnungsdauer bzw. der Übergangsrate zu einem Bündel mit kleinerer Anzahl an Monomeren von der Leitfähigkeitsstufe<sup>59, 137</sup>.

Die Öffnungsdauer von LS3 in nano-BLMs zeigte eine monoexponentielle Verteilung. Die mittlere Öffnungsdauer betrug  $(3.6 \pm 0.1)$  ms und ist demnach doppelt so groß wie die mittlere Öffnungsdauer in klassischen BLMs unter analogen Messbedingungen. In Abschnitt 6.4.1 wurde der Einfluss von Lösungsmittelresten auf die Diffusion in klassischen BLMs diskutiert. Verglichen mit den Ergebnissen von LS3 in klassischen BLMs stimmt die mittlere Öffnungsdauer von LS3 in nano-BLMs wesentlich besser mit der von DeGrado et al. ermittelten mittleren Öffnungsdauer von 3 bis 8 ms überein. DeGrado und seine Mitarbeiter erhielten

diese Ergebnisse wie zuvor beschrieben für Untersuchungen von LS3 in klassischen BLMs, die über die *Montal-Müller-Technik* präpariert und somit nur einen geringen Lösungsmittelanteil enthielten<sup>79</sup>. Eine mögliche Ursache für die längere Öffnungsdauer in nano-BLMs könnte daher darin liegen, dass diese verglichen mit den in dieser Arbeit verwendeten klassischen BLMs nach Montal und Müller weniger Lösungsmittelreste enthalten. Weiskopf et al. untersuchten mit FRAP-Experimenten die laterale Beweglichkeit von Lipiden in micro-BLMs<sup>143</sup>. Dabei diente poröses Silizium mit einer Porengröße von 7  $\mu\text{m}$  als Substrat. Die Herstellung der Membranen erfolgte analog zur Präparation von nano-BLMs. Sie ermittelten einen immobilen Anteil von  $(15 \pm 5) \%$  und einen mittleren effektiven Diffusionskoeffizienten von  $(14 \pm 1) \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dieser Wert entspricht gut dem Diffusionskoeffizienten einer klassischen BLM nach Montal und Müller und zeigt, dass das Diffusionsverhalten der in dieser Arbeit verwendeten nano-BLMs durchaus mit dem der von DeGrado et al. eingesetzten klassischen BLMs vergleichbar ist. Es muss allerdings angemerkt werden, dass Weiskopf et al. davon ausgehen, dass zwei Diffusionskoeffizienten vorliegen, einer für die frei beweglichen Lipide überhalb der Poren und einer für die Lipide auf den Porenstegen, welche aufgrund der Wechselwirkungen mit der immobilisierten unteren Monoschicht eine geringere Beweglichkeit aufweisen. Der von ihnen ermittelte Diffusionskoeffizient entspricht dann dem über die beiden Diffusionskoeffizienten gemittelten Wert<sup>143</sup>. Eine weitere Ursache für die in nano-BLMs beobachtete höhere Öffnungsdauer könnte wiederum in der verglichen mit klassischen BLMs deutlich kleineren Fläche der freitragenden Membran innerhalb einer Pore und des durch die Porenstege eingeschränkten Diffusionsraums der Peptide liegen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelkanalmessungen wurden sowohl bei nano-BLMs als auch bei klassischen BLMs alle Datensätze vor der Digitalisierung mit einem 1 kHz 4-Pol-Tiefpass-Bessel-Filter gefiltert. Die in nano-BLMs durchgeführten Messungen wurden vor der Auswertung zur Verminderung des deutlich höheren Rauschens verglichen zu den Messungen in klassischen BLMs zusätzlich mit einem 500 Hz Gauß-Tiefpassfilter bearbeitet. Im folgenden soll deutlich gemacht werden, dass die Unterschiede in den mittleren Öffnungsdauern in den beiden Membransystemen nicht aus dem zusätzlichen Filtern im Falle der nano-BLMs resultieren. Bei Einzelkanalmessungen ist das Filtern des Stromsignals zum

einen zur praktischen Datenanalyse nötig und zum anderen unvermeidbar, da das Signal bei der Verwendung eines A/D-Wandlers zur Vermeidung von Alias-Effekten, welche ein verfälschtes Signal hervorrufen würden, gefiltert werden muss. Der Frequenzgang eines Filters wird durch den Durchlassbereich und den Sperrbereich bestimmt. Alle Frequenzen innerhalb des Durchlassbereichs sollen möglichst ungedämpft übertragen werden. Die Dämpfung innerhalb des Sperrbereichs kann jedoch nicht mit der Grenzfrequenz plötzlich erfolgen, sondern setzt erst allmählich ein. Auf diese Weise entsteht eine Durchlasskurve, die im Durchlassbereich möglichst geradlinig ist und zum Sperrbereich hin mehr oder weniger stark steil abfällt. Bei Tiefpassfiltern erstreckt sich der Durchlassbereich von 0 Hz bis zur angegebenen Grenzfrequenz  $f_c$ . Die effektive Grenzfrequenz zweier aufeinanderfolgender Gauß-Filter ist gegeben durch:

$$\frac{1}{f_c^2} = \frac{1}{f_1^2} + \frac{1}{f_2^2} \quad (6.2)$$

mit den jeweiligen Grenzfrequenzen  $f_1$  und  $f_2$  der einzelnen Filter. Das Ansprechverhalten eines Bessel-Filters wird gut durch das eines Gauß-Filters beschrieben<sup>136</sup>. Gl. 6.2 kann daher auch zur Abschätzung der effektiven Grenzfrequenz verwendet werden, wenn das Signal, wie in dieser Arbeit, nach dem Filtern mit einem Bessel-Filter zusätzlich mit einem Gauß-Filter bearbeitet wurde. Für die Messungen in nano-BLMs ergibt sich demnach nach Gl. 6.2 eine effektive Grenzfrequenz von 447 Hz. Die Anstiegszeit  $t_r$  eines Filters beschreibt die Zeit, die nötig ist, um zwischen der Dämpfung von Frequenzen im Sperrbereich zum ungedämpften Durchlassen von Frequenzen im Durchlassbereich umzuschalten. Üblicherweise wird sie über den Bereich zwischen 10 %igem und 90 %igem Durchlass definiert. Die Anstiegszeit  $t_r$  eines Gauß- bzw. Bessel-Filters ist gegeben durch<sup>136, 144</sup>:

$$t_r = \frac{0.3321}{f_c} \quad (6.3)$$

Colquhoun und Sigworth zeigten, dass die Öffnungsdauer eines Einzelkanalereignisses mindestens  $1.3 \cdot t_r$  betragen muss, um sicherzustellen, dass die Öffnungsdauer korrekt bestimmt wird<sup>136, 144</sup>. Bei den Messungen in klassischen BLMs ergibt sich daraus eine Auflösung von 0.43 ms, im Falle der nano-BLMs 0.97 ms. Die ermittelten mittleren Öffnungsdauern von LS3 liegen in beiden



Membransystemen deutlich über diesen Schwellenwerten. Die Unterschiede in den mittleren Öffnungsdauern in den beiden Membransystemen resultieren daher nicht aus der unterschiedlichen Datenbearbeitung. Des Weiteren zeigten Colquhoun und Sigworth, dass die Dauer einer Kanalöffnung mindestens  $2 \cdot t_r$  betragen muss, damit auch die Stromamplitude zuverlässig bestimmt wird<sup>136, 144</sup>. Bei kürzeren Ereignissen erreicht die Stromamplitude nicht ihr Maximum. Diese Angabe entspricht bei den verwendeten Filtern einer Öffnungsdauer von 0.66 ms in klassischen BLMs und 1.49 ms in nano-BLMs. Die Amplitude kann allerdings als korrekt angesehen werden, wenn ein Einzelkanalereignis ein Plateau zeigt, da daraus deutlich wird, dass der Maximalwert über mehrere Datenpunkte erreicht wurde.

Neben den für Einzelkanalereignisse typischen Rechteckstimpulsen konnten ausgehend von einer Öffnungsstufe auch kurze Strompulse mit undefinierter Stromamplitude beobachtet werden. Diese wurden auch in klassischen BLMs beobachtet, traten allerdings bei nano-BLMs wesentlich häufiger auf. Eine quantitative Betrachtung der Stromamplituden oder der Dauer dieser Strompulse ist aufgrund ihrer Kürze entsprechend der oben beschriebenen Richtlinien zur korrekten Bestimmung von Stromamplituden und Öffnungsdauern nicht möglich. Es wurden zwar zur Orientierung Stromamplituden angegeben, jedoch ist anzunehmen, dass diese selbst ohne zusätzliches Filtern des digitalisierten Signals nicht die exakten Stromamplituden wiedergeben. Die Ursache dieser Strompulse ist unklar. Es könnte sich dabei um eine schnelle Dynamik des kanalbildenden Bündels handeln, bei der die Pore für kurze Zeit aufgeweitet wird. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich lediglich um Messartefakt handelt. In der Literatur wurden keine vergleichbaren Beobachtungen beschrieben.

Ein weiterer Unterschied von LS3 in nano-BLMs verglichen mit den Messungen in klassischen BLMs stellte das gelegentliche Auftreten von Ereignissen dar, bei denen das Rauschen während der Kanalöffnung stark anstieg. Diese Ereignisse traten auch ähnlich eines *bursts* von regulären Einzelkanalereignissen innerhalb bestimmter Zeitspannen gehäuft auf, wobei meist unmittelbar zuvor oder danach ein *burst* von Ereignissen definierter Öffnungsstufe erfolgte. Pawlak et al. beobachteten im Zuge von Einzelkanalmessungen mit Melittin ebenfalls, dass Perioden, in denen definierte Einzelkanalereignisse auftraten, unterbrochen wurden von Zeitspannen in denen

schlecht definierte und stark fluktuierende Leitfähigkeitsänderungen auftraten<sup>126</sup>. Ereignisse dieser Art könnten aus einem schnellen, zeitlich nicht aufgelösten Wechsel zwischen unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen des Peptids LS3 resultieren. Dies wäre beispielsweise durch die Wechselwirkung eines Helix-Bündels mit weiteren Peptiden denkbar, die nicht zur Bildung eines stabilen Bündels führt. Da Ereignisse mit erhöhtem Rauschen während der Kanalöffnung in nano-BLMs nur gelegentlich und meist bei höheren LS3-Konzentrationen auftraten, ist es nicht verwunderlich, dass diese in klassischen BLMs, in denen die Aktivität von LS3 deutlich geringer war, nicht zu beobachten waren.

## 6.5 Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3

### 6.5.1 bpy\*-LS3 in klassischen BLMs

Die Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in klassischen BLMs wurden unter analogen Messbedingungen wie bei der Charakterisierung des Peptids LS3 untersucht. Es wurden Membranen aus DPhPC bei einem Membranpotential von +200 mV und 0.5 M KCl als Elektrolyt verwendet. Im Gegensatz zum Peptid LS3 konnten allerdings im Falle des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 nur in Ausnahmefällen Einzelkanalereignisse mit einer definierten Leitfähigkeitsstufe beobachtet werden. Im allgemeinen traten lediglich kurze undefinierte Stromamplituden auf. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Detergentien oder Melittin gemacht, welche die Struktur der Lipiddoppelschicht stören. Das Peptid Melittin besitzt, wie bereits erwähnt, lytische Eigenschaften und bildet nur unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. einer sehr hohen Elektrolytkonzentration von 5 M NaCl, Ionenkanäle mit diskreten Leitfähigkeiten aus<sup>59,63</sup>.

Die mit dem rezeptorfunktionalisierten Peptid bpy\*-LS3 durchgeführten *release*-Messungen zeigten, dass das Peptid in Abwesenheit einer Transmembranspannung im Gegensatz zu Melittin keine permeabilisierenden Effekte auf Lipidmembranen ausübt. Bei Einzelkanalmessungen liegt allerdings ein Membranpotential vor, welches bei spannungsgesteuerten peptidischen Ionenkanälen die Triebkraft der Peptidinsertion in die Lipiddoppelschicht darstellt.  $\alpha$ -Helices besitzen ein zur Helixachse paralleles makroskopisches Dipolmoment mit einer positiven Partialladung am *N*-Terminus des Peptids und einer negativen Partialladung am *C*-Terminus. Es resultiert aus der Aneinanderreihung der mikroskopischen Dipolmomente der einzelnen Peptidbindungen<sup>2</sup>. In Gegenwart einer Membranspannung orientieren sich die Peptidhelices entsprechend ihrem helicalen Dipolmoment in der Lipiddoppelschicht so, dass der Helix-Dipol antiparallel zum elektrischen Feld angeordnet ist<sup>59</sup>. Während der hier durchgeführten Einzelkanalmessungen wurde das Membranpotential an der Seite der Membran, an

der die Peptidzugabe, erfolgte positiv gehalten. Bei einem negativen Potential an dieser Seite konnten im Falle des Peptids LS3 keine Einzelkanalereignisse beobachtet werden. Die Insertion der Peptide muss also über den *N*-Terminus erfolgen. Im Falle des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 bedeutet dies, dass im Zuge der Insertion die am *N*-Terminus befindliche Rezeptorfunktion durch die Lipiddoppelschicht treten muss. Bei den UV-spektroskopischen Untersuchungen zur Komplexierung der Rezeptorfunktion bpy\* in Mizellen und Vesikeln konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorfunktion stark mit einer hydrophoben Phase wechselwirkt (vgl. 6.1). Es ist daher denkbar, dass beim Durchtritt der Rezeptorfunktion durch die Membran Unregelmäßigkeiten in der Lipiddoppelschicht auftreten, die zu einer Destabilisierung der Membran führen und daraus die beobachteten undefinierten Stromamplituden resultieren.

Um die Lipiddoppelschicht zu stabilisieren, wurde in analogen Messungen versucht die Membranen durch einen Cholesterinanteil zu stabilisieren. Es ist bekannt, dass Cholesterin die Viskosität von Lipidmembranen erhöht<sup>108, 109</sup>. Für das Peptid Alamethicin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Cholesterin-Anteil in der Lipiddoppelschicht aufgrund der geringeren Fluidität der Membran zu einer verlängerten Öffnungsdauer der Ionenkanäle führt<sup>59, 145</sup>. Im Falle des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 konnten in Membranen bestehend aus DPhPC/Cholesterin (7:3) häufiger Einzelkanalereignisse beobachtet werden als in reinen DPhPC-Membranen. Der Cholesterinanteil scheint demnach durch die Versteifung der Membran eine Stabilisierung zu bewirken, so dass sich die Rezeptorfunktion beim Durchtritt durch die Membran weniger störend auf ihre Struktur auswirkt. Wie die Messungen zeigen, kommt dieser Effekt allerdings nur in geringem Maße zum Tragen. Wie bei den Messungen in reinen DPhPC-Membranen traten wiederum in großem Maße Zeitspannen auf in denen nur unspezifische Stromamplituden beobachtet wurden.

### 6.5.2 bpy\*-LS3 in nano-BLMs

Bei Einzelkanalmessungen des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in den robusteren nano-BLMs bestehend aus DPhPC konnten im Gegensatz zu den Messungen in klassischen BLMs unter analogen Messbedingungen die für Ionenkanäle charakteristischen Rechteckstimpulse beobachtet werden.

Für das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 konnten in nano-BLMs vier Leitfähigkeitsstufen  $G_1 = (134 \pm 20)$  pS,  $G_2 = (181 \pm 15)$  pS,  $G_3 = (225 \pm 27)$  pS und  $G_4 = (373 \pm 63)$  pS ermittelt werden. Anhand des *Zylinder-Modells* zur Beschreibung der Kanalstruktur und einer vereinfachten theoretischen Betrachtung der Leitfähigkeiten von Helix-Bündeln konnte für das Peptid LS3 gezeigt werden, dass sich die unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen in nano-BLMs ausgehend von einer hexameren Struktur für die niedrigste Leitfähigkeitsstufe aus einer kontinuierlich steigenden Anzahl an Monomeren im Helix-Bündel ergeben. Eine entsprechende Betrachtung für das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 zeigte, dass auch in diesem Fall die höheren Leitfähigkeiten, ausgehend vom Hexamer, auf der Bildung von Helix-Bündel-Strukturen mit einer kontinuierlich steigenden Anzahl an Monomeren basieren. Das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 bildet demnach Helix-Bündel-Strukturen mit 6 bis 9 Monomeren pro Bündel. Eine Auftragung der bestimmten Leitfähigkeiten als Funktion der Monomeranzahl im Bündel zeigte wie im Falle des Peptids LS3 einen für peptidische Ionenkanäle typischen Verlauf.

Die vier beobachteten Leitfähigkeitsstufen des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 liegen verglichen zu den ersten vier Leitfähigkeitstufen des Peptids LS3 in nano-BLMs um 33 pS, 38 pS, 15 pS bzw. 12 pS höher. Der nach dem einfachen Modell der Leitfähigkeit errechnete effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  von LS3-Kanälen beträgt lediglich 20 – 26 % des nach dem Zylindermodell berechneten Porenradius  $r_{\text{calc}}$ . Entsprechend der höheren Leitfähigkeiten des Peptids bpy\*-LS3 betrug der errechnete effektive Porenradius  $r_{\text{eff}}$  von Helix-Bündeln des Peptids bpy\*-LS3 20 – 29 % des nach dem *Zylinder-Modell* berechneten Radius  $r_{\text{calc}}$ . Geht man davon aus, dass der mögliche Aggregationsgrad des Peptids LS3 durch die angebrachte Rezeptorfunktion nicht beeinflusst wird, so bedeutet dies, dass die jeweiligen Helix-Bündel-Strukturen des Peptids bpy\*-LS3 verglichen zu denen des Peptids LS3

aufgeweitet sind. Dies kann aus dem Platzbedarf der Rezeptorfunktion am *N*-Terminus des Peptids resultieren. Im Falle der kleineren Helix-Bündel mit 6 ( $G_1$ ) bzw. 7 ( $G_2$ ) Peptiden pro Bündel ist der Unterschied zwischen den Leitfähigkeiten von bpy\*-LS3 und LS3 gravierender als bei den größeren Bündeln mit 8 ( $G_3$ ) bzw. 9 ( $G_4$ ) Peptiden pro Bündel. Bei größeren Aggregaten wirkt sich der sterische Anspruch der Rezeptorfunktion demnach weniger stark auf die Helix-Bündel-Strukturen aus. Duclohier et al. brachten, um die Diffusion von Alamethicin in Lipiddoppelschichten zu untersuchen, Fluoresceinisocyanat über eine Glycin-Brücke an den *C*-Terminus des Peptids an<sup>146</sup>. Das farbstoffmarkierte Alamethicinderivat wies bei Einzelkanalmessungen ein analoges Aggregationsverhalten wie natürliches Alamethicin auf. Allerdings konnte die Gruppe auch beobachten, dass die Leitfähigkeiten aufgrund des sterischen Anspruchs des angebrachten Farbstoffs um 8 – 26 % höher lagen als die der entsprechenden Helix-Bündel des Peptids ohne Farbstoff.

Die relativen Häufigkeiten mit denen die Leitfähigkeitsstufen  $G_{1-4}$  des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 auftraten entsprachen in etwa den beobachteten Häufigkeiten der entsprechenden LS3-Leitfähigkeiten. Die Leitfähigkeitsstufen  $G_1$  und  $G_4$  konnten am häufigsten beobachtet werden, wohingegen die Stufen  $G_2$  und  $G_3$  weniger häufig auftraten.

Neben Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_{1-4}$  konnten für das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 auch Ereignisse mit höheren Leitfähigkeiten von bis zu 10.2 nS detektiert werden, denen keine weitere Leitfähigkeitsstufen zu geordnet werden konnte. Im Bereich von 0.5 – 2 nS war eine breite Verteilung von Ereignissen gegeben, deren Häufigkeit zu höheren Leitfähigkeiten hin konstant abnahm. Die höheren Leitfähigkeitsstufen  $G_{5-8}$  des Peptids LS3 mit 10 bis 13 Monomeren pro Bündel erstreckten sich über den Leitfähigkeitsbereich bis ca. 1.1 nS. Im Falle des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 nimmt die Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  mit einem Breiteparameter von 63 pS bereits eine deutlich breitere Verteilung ein als im Falle des Peptids LS3 mit einem Breiteparameter von 33 pS. Daher kann man davon ausgehen, dass auch das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 Aggregate mit mehr als 9 Monomeren pro Bündel bildet, die jeweiligen Leitfähigkeitsstufen allerdings so breit verteilt sind, dass sie nicht mehr differenziert werden können.

Aufgrund der Acylierung des *N*-Terminus der Peptidhelices durch die Ankopplung der Rezeptorfunktion und der damit verbundenen verringerten elektrostatischen Abstoßung der Peptidhelices im Helix-Bündel, war für das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 eine verlängerte Öffnungsdauer der Ionenkanäle verglichen zum Peptid LS3 zu erwarten. DeGrado et al. untersuchten beispielsweise die Kanaleigenschaften des am *N*-Terminus acetylierten LS3-Derivats Ac-LS3 und stellten fest, dass durch die verringerte elektrostatische Abstoßung die mittlere Öffnungsdauer auf ca. 200 ms steigt<sup>147, 148</sup>. In der Tat besaßen die Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 zum Teil eine verlängerte Öffnungsdauer. Die Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse wies allerdings eine exponentielle Verteilung 3. Ordnung auf. Dies konnte anhand der Linearisierung der Histogrammanalyse der Öffnungsdauer der Ereignisse belegt werden. Die ermittelten mittleren Öffnungsdauern betragen  $\tau_1 = (3.6 \pm 0.2)$  ms,  $\tau_2 = (15.1 \pm 0.6)$  ms und  $\tau_3 = (63 \pm 4)$  ms und zeigten keine Abhängigkeit von der Leitfähigkeitsstufe. Die beiden mittleren Öffnungsdauern  $\tau_2$  und  $\tau_3$  sind deutlich größer als die mittlere Öffnungsdauer von  $(3.6 \pm 0.1)$  ms der Ionenkanäle des Peptids LS3. Die mittlere Öffnungsdauer  $\tau_1$  stimmt allerdings entgegen den Erwartungen mit der des Peptids LS3 überein.

Im Allgemeinen werden mehrere mittlere Öffnungsdauern bei Ionenkanälen mit unterschiedlichen geöffneten Zuständen beobachtet. Die Kinetik der G-Protein aktivierten  $K^+$ -Kanäle, die entscheidend an der Signalübertragung beteiligt sind, wird beispielsweise durch drei geschlossene Zustände  $C_{0-2}$  und zwei geöffnete Zustände  $O_1$  und  $O_2$  des Kanals beschrieben<sup>149, 150</sup>. Übergänge zwischen den geschlossenen Zuständen erfolgen dabei durch sukzessive Bindung von  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine. Die geöffneten Zustände  $O_1$  und  $O_2$  werden jeweils aus den unterschiedlichen geschlossenen Zuständen  $C_1$  und  $C_2$  erreicht und weisen unterschiedliche mittlere Öffnungsdauern auf<sup>149</sup>. Die exponentielle Verteilung 3. Ordnung der Öffnungsdauer der Ionenkanäle des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 deutet daher auf das Vorliegen von drei unterschiedlichen Helix-Bündel-Populationen hin.

Die Öffnungsdauer eines peptidischen Ionenkanal wird durch die Wechselwirkung der einzelnen Peptidhelices im Helix-Bündel und durch die laterale Diffusion der

Peptide in der Lipidmembran bestimmt. Selbst die höchste der drei mittleren Öffnungsdauern des Peptids bpy\*-LS3 ist deutlich niedriger als die von DeGrado et al. für Ac-LS3 beobachtete mittlere Öffnungsdauer<sup>147</sup>. Die Gegenwart der Rezeptorfunktion im Helix-Bündel scheint demnach einen Effekt auf die Stabilität der Helix-Bündel-Strukturen auszuüben, der der verringerten elektrostatischen Abstoßung am *N*-Terminus der Peptidhelices entgegenwirkt. Das Auftreten verschiedener Helix-Bündel-Populationen mit unterschiedlichen mittleren Öffnungsdauern könnte aus einer unterschiedlichen Orientierung der Rezeptorfunktion im Bündel resultieren, zumal bereits gezeigt wurde, dass die Rezeptorfunktion stark mit Lipiddoppelschichten wechselwirkt (vgl. 6.1). Bezüglich der räumlichen Orientierung der Rezeptorfunktion sind in Anbetracht der möglichen Aggregationszahl der Peptide in den entsprechenden Helix-Bündel-Strukturen viele Permutationen möglich, die sich jeweils auf die Stabilität des Bündels und damit die Öffnungsdauer des Kanals auswirken können. Die drei ermittelten mittleren Öffnungsdauern scheinen jeweils Helix-Bündel-Strukturen widerzuspiegeln, in denen die Orientierung der Rezeptorfunktion verglichen zu Ac-LS3 eine mehr oder weniger starke Destabilisierung der Helix-Bündel-Struktur hervorruft. Dabei sind mehrere Erklärungsversuche denkbar. Zum einen könnten in Helix-Bündeln der Öffnungsdauer  $\tau_3$  die Rezeptoreinheiten zum Großteil in die wässrige Phase ragen und so die Wechselwirkungen der einzelnen Helices untereinander am wenigsten beeinflussen. In Helix-Bündeln der Öffnungsdauer  $\tau_1$  könnte dagegen ein Großteil der Rezeptorfunktionen in der Lipiddoppelschicht lokalisiert sein, so dass die Wechselwirkungen der einzelnen Helices stark gestört werden. Zum anderen ist es allerdings auch denkbar, dass in der Membran lokalisierte Rezeptorfunktionen quasi als Anker für die Peptide in der Lipiddoppelschicht fungieren. Aufgrund der eingeschränkten Diffusion der einzelnen Helices würde es dann zu längeren Öffnungsdauern  $\tau_3$  kommen. Ereignisse mit kürzerer Öffnungsdauer  $\tau_1$  würden dann aus Helix-Bündeln resultieren, in denen ein Großteil der Rezeptorfunktionen in die wässrige Phase ragt und dort aufgrund des sterischen Anspruchs die Dissoziation der Peptidhelices hervorruft. In beiden Modellen würden Helix-Bündel der Öffnungsdauer  $\tau_2$  eine Zwischenstufe darstellen. Da keinerlei Kenntnisse bezüglich der räumlichen Orientierung der Rezeptorfunktion des Peptids bpy\*-LS3 vorliegen sind beide Modelle gleich wahrscheinlich.



## 6.6 Modulation der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart von Ni(II)

In nano-BLMs konnten im Gegensatz zu klassischen BLMs Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 beobachtet werden. Sie boten somit die Möglichkeit die Kanaleigenschaften des Peptids in Gegenwart seines Liganden Ni<sup>2+</sup> zu charakterisieren.

Die Messungen in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> erfolgten unter analogen Bedingungen wie in Abwesenheit des Metallions. Es wurde also wiederum bei einem Membranpotential von +200 mV gearbeitet und 0.5 M KCl als Elektrolyt verwendet. Nachdem die Insertion des Peptids bpy\*-LS3 in die Lipiddoppelschicht erfolgt war und Einzelkanalereignisse beobachtet werden konnten, erfolgte die Zugabe von Ni<sup>2+</sup> zu beiden Seiten der Membran.

Da spannungsgesteuerte peptidische Ionenkanäle, wie unter 6.5.1 erläutert, entsprechend ihrem helicalen Dipolmoment in die Lipiddoppelschicht insertieren, war davon auszugehen, dass die Rezeptorfunktion des Peptids bpy\*-LS3 nach der Insertion an der *trans*-Seite der Membran lokalisiert ist, also an der zur Peptidzugabe und Membranpräparation entgegengesetzten Seite. Daher sollte zur Modulation der Kanaleigenschaften des Peptids bpy\*-LS3 prinzipiell die Anwesenheit des Metallions auf der *trans*-Seite der Membran ausreichen. Die Leitfähigkeit eines Ionenkanals ist allerdings abhängig von der Elektrolytkonzentration und wird auch durch Konzentrationsgradienten beeinflusst. Die Untersuchung der Leitfähigkeit von Ionenkanälen in Gegenwart eines Konzentrationsgradienten wird beispielsweise zur Bestimmung der Ionenselektivität eines Kanals ausgenutzt<sup>148, 151</sup>. Die Charakterisierung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart des Metallions erfolgte bei sehr kleinen Ni<sup>2+</sup>-Konzentration von 2.5 – 5.0 µM. Verglichen zur ursprünglichen Elektrolytkonzentration von 0.5 M KCl ergibt sich demnach durch die Ni<sup>2+</sup>-Zugabe keine signifikante Erhöhung der Elektrolytkonzentration. Um dennoch mögliche Effekte auf die Leitfähigkeit des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 basierend auf einem

Konzentrationsgradienten auszuschließen, erfolgte die Zugabe des Metallions auf beiden Seiten der Membran.

Die Untersuchungen zur Komplexierung der Rezeptorfunktion bpy\* mit Ni<sup>2+</sup> zeigten, dass die Komplexierung in der hydrophoben Umgebung einer Lipidmembran aufgrund einer starken Wechselwirkung der Rezeptorfunktion mit der Lipiddoppelschicht kinetisch retardiert ist. Zudem musste aufgrund einer langsameren Diffusion in den Poren des porösen Substrats mit einem zur Zugabe des Metallions verzögerten Eintreffen der Ni<sup>2+</sup>-Ionen an der Membran gerechnet werden. Daher erfolgten die Einzelkanalmessungen in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> erst einige Minuten nach Zugabe des Metallions.

Betrachtet man die Konzentrationsverhältnisse zwischen rezeptorfunktionalisiertem Peptid bpy\*-LS3 und Ni<sup>2+</sup>, so würde man in Anbetracht der ermittelten hohen Komplexbildungskonstanten der bpy\*-Ni<sup>2+</sup>-Komplexe davon ausgehen, dass das Peptid ausschließlich in 1:1-Komplexen mit dem Metallion vorliegt, da das Metallion im 2000 – 4000fachen Überschuss vorliegt. Lägen allerdings nur 1:1-Komplexe des Peptids bpy\*-LS3 vor, so kann man sehr wahrscheinlich davon ausgehen, dass es aufgrund der hohen elektrostatischen Abstoßung der Peptide und des enormen Platzbedarfs der komplexgebundenen Ni<sup>2+</sup>-Ionen nicht zur Bildung von Helix-Bündel-Strukturen kommt und folglich keine Einzelkanalereignisse beobachtet werden können. Sasaki et al. stellten beispielsweise eine mit Pyren markierte lipidähnliche Substanz PSBiPy mit einer 2,2'-Bipyridin-Kopfgruppe am Ende einer POE-Kette her und inkorporierten diese in Vesikel<sup>152</sup>. Nach Zugabe von Cu<sup>2+</sup> konnten sie eine Abnahme des Verhältnisses der Excimer- zur Monomerfluoreszenzemission des Pyrens beobachten. Dies resultierte daraus, dass sich die innerhalb der Lipidmatrix zunächst in Domänen organisierten PSBiPy-Moleküle nach Anbindung des Metallions aufgrund der elektrostatischen Abstoßung trennen und in die Lipidmatrix eintreten. Auch wenn im Zuge von Einzelkanalmessungen nur einzelne Moleküle betrachtet werden und im Gleichgewichtszustand einer Komplexbildung auch bei einem sehr großen Metallionen-Überschuss und hohen Komplexbildungskonstanten vereinzelt noch freie Liganden vorliegen, sollte im Falle der uneingeschränkten Komplexierung von bpy\*-LS3 dennoch die Aktivität des Ionenkanals drastisch sinken. Aus der Tatsache, dass trotzdem Einzelkanalereignisse auftraten, kann man folglich schließen, dass die

Komplexierung der in der Membran gebundenen Peptide mit dem Metallion nicht vollständig in der Bildung von 1:1-Komplexen resultiert. Dies kann nur auf einen Oberflächeneffekt zurückgeführt werden. UV-spektroskopisch konnte gezeigt werden, dass die Komplexierung der Rezeptorfunktion bpy\* in Mizellen bereits in Gegenwart äquimolarer Mengen Ni<sup>2+</sup> vollständig verläuft. Die Komplexierung in Vesikeln erfolgte zwar nicht vollständig, jedoch ist dies sehr wahrscheinlich auf den Einschluss eines Teils der bpy\*-Moleküle im Vesikelinneren zurückzuführen. In beiden Systemen läuft die Komplexbildung genau wie bei den nano-BLMs auf der Oberfläche der Aggregate ab, jedoch ist die Diffusion der Metallionen im Poreninneren des porösen Substrats eingeschränkt.

Aus der Untersuchung katalytischer Oberflächenreaktionen weiß man, dass die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Oberflächenbedeckung der Reaktanden ist. Der *Eley-Rideal-Mechanismus* einer oberflächenkatalysierten Reaktion beruht beispielsweise auf der Annahme, dass ein Reaktandenmolekül aus der Gasphase mit einem an der Oberfläche adsorbierten Molekül zusammenstößt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist in diesem Fall proportional zum Partialdruck der nicht adsorbierten Substanz und zum Bedeckungsgrad der adsorbierten Substanz<sup>153</sup>. Betrachtet man die Komplexierung des membrangebundenen Peptids bpy\*-LS3 mit Ni<sup>2+</sup> unter analogen Gesichtspunkten, so wird deutlich, dass die eingeschränkte Komplexbildung möglicherweise neben der eingeschränkten Diffusion der Metallionen in den Poren auf einer geringen Oberflächenbedeckung der Membran mit der Rezeptorfunktion beruhen kann<sup>†</sup>, zumal die Rezeptorfunktion auch mit der Membran wechselwirkt und innerhalb der Lipiddoppelschicht lokalisiert sein kann.

Die beobachteten Leitfähigkeiten der Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 lagen im gleichen Bereich wie die Leitfähigkeiten in Abwesenheit des Metallions. In der entsprechenden Histogrammanalyse waren zwar lediglich zwei Gaußverteilungen erkennbar, die auf die Leitfähigkeitsstufen  $G_1^{Ni^{2+}} = (149 \pm 34) \text{ pS}$  und  $G_2^{Ni^{2+}} = (363 \pm 61) \text{ pS}$  schließen ließen. Jedoch besaß auch eine nicht zu vernachlässigende Anzahl von Ereignissen

<sup>†</sup> Geht man fiktiv davon aus, dass die komplette porenüberspannende Membranfläche von 0.023 cm<sup>2</sup> von bpy-LS3-Peptiden mit einem Durchmesser von ca. 0.5 nm besetzt sein könnte, so ergibt sich in Anwesenheit von 6 – 10 bpy\*-LS3-Peptiden, die im Rahmen von Einzelkanalmessungen durchschnittlich beobachtet werden, ein Bedeckungsgrad der Rezeptorfunktion in der Größenordnung von 10<sup>-12</sup> – 10<sup>-13</sup>.

Leitfähigkeiten im Bereich von 220 – 280 pS, die anhand der angepassten Gaußkurven nicht erfasst wurden und keine eindeutige Verteilung aufwiesen. Die Leitfähigkeitsstufe  $G_2^{\text{Ni}^{2+}}$  stimmt sehr gut mit der in Abwesenheit des Metallions beobachteten Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  von  $(373 \pm 63)$  pS überein und die Leitfähigkeitsstufe  $G_1^{\text{Ni}^{2+}}$  liegt zwischen den Leitfähigkeitsstufen  $G_1$  und  $G_2$  in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ . Da in Abwesenheit des Metallions im Bereich bis 500 pS vier Leitfähigkeitsstufen des Peptids bpy\*-LS3 beobachtet werden konnten, wurden die Parameter einer Gaußfunktion 4. Ordnung an die Daten der Histogrammanalyse der Leitfähigkeiten in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  angepasst, wobei die in Abwesenheit des Metallions beobachteten Leitfähigkeitsstufen vorgegeben wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  praktisch nicht definiert war. Die Anpassung einer Gaußfunktion 3. Ordnung unter nicht Berücksichtigung dieser Leitfähigkeitsstufe beschreibt die Daten gleich gut, woraus geschlossen wurde, dass der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$ , sofern man von unveränderten Leitfähigkeitsstufen in Gegenwart des Metallions ausgeht, verschwindend gering ist. Jedoch wiesen die so ermittelten Leitfähigkeitsstufen  $G_i^{\text{Ni}^{2+}} = (134 \pm 27)$ ,  $G_{ii}^{\text{Ni}^{2+}} = (181 \pm 36)$  und  $G_{iv}^{\text{Ni}^{2+}} = (225 \pm 87)$  eine breitere Verteilung auf als in Abwesenheit des Metallions.

Letztlich kann aufgrund der unterschiedlichen Betrachtung der Leitfähigkeiten nicht eindeutig geklärt werden, ob die Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  zu einer Veränderung der Leitfähigkeitsstufen des Peptids bpy\*-LS3 führt oder ob die Leitfähigkeitsstufen lediglich eine stärkere Streuung aufweisen und mit einer anderen Wahrscheinlichkeit auftreten. Sofern ein Teil der bündelbildenden Peptide komplex gebunden ist, könnte es aufgrund der daraus resultierenden starken elektrostatischen Abstoßung zu einer beträchtlichen Aufweitung der Helix-Bündel-Struktur kommen. In diesem Fall könnten die beobachteten Leitfähigkeitsstufen  $G_1^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $G_2^{\text{Ni}^{2+}}$  aus Helix-Bündeln mit 6 bzw. 7 Monomeren pro Bündel resultieren. Im Falle einer deutlichen Aufweitung der Helix-Bündel-Strukturen in Anwesenheit des Metallions sollte allerdings die Wechselwirkung der Peptidhelices und somit die Stabilität des Helix-Bündels abnehmen. Dies müsste sich letztlich in kürzeren Öffnungsdauern der Einzelkanalereignisse niederschlagen, zumal bekannt ist, dass bereits der Austausch

einzelner Aminosäuren in peptidischen Ionenkanälen die Stabilität beeinflusst und zu kürzeren Öffnungsdauern führt<sup>59, 137</sup>. Es konnten allerdings in Gegenwart des Metallions keine signifikanten Veränderungen der mittleren Öffnungsdauern des Peptids beobachtet werden. Daher ist anzunehmen, dass die Leitfähigkeitsstufen des Peptids durch Anbindung des Metallions nicht verändert werden. Die breitere Verteilung der Leitfähigkeitsstufen in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> kann daraus resultieren, dass es durch die größere räumliche Ausdehnung einer komplexgebundenen Rezeptorfunktion zu stärkeren Fluktuationen vor dem Porenausgang kommt, wodurch der Ionenstrom durch die Pore beeinflusst wird.

Unabhängig davon, welchen Aggregationsgrad die Helix-Bündel in Gegenwart des Metallions besitzen, zeigten sich doch deutliche Unterschiede in den relativen Häufigkeiten mit denen die Leitfähigkeiten in Ab- und Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> auftreten. Wie im Vorangegangenen erläutert, ist allerdings davon auszugehen, dass die Leitfähigkeitsstufen des Peptids bpy\*-LS3 durch die Gegenwart des Metallions nicht beeinflusst werden. Abb. 6.1 zeigt graphisch die Unterschiede der relativen Häufigkeiten mit der Einzelkanalereignisse einer Leitfähigkeitsstufe in Ab- und Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> auftraten. In Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> nahm der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_4$  verglichen mit dem des Peptids in Abwesenheit des Metallions drastisch von 47 % auf 18.5 % ab. Ereignisse der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$ , deren Anteil in Abwesenheit des Metallions lediglich 12 % betrug, traten praktisch nicht mehr auf. Dagegen zeigten die Leitfähigkeitsstufen  $G_1$  und  $G_2$  eine deutliche Zunahme der Häufigkeit von insgesamt 41 % auf 81.5 % für  $G_i^{Ni^{2+}}$  und  $G_{ii}^{Ni^{2+}}$ .

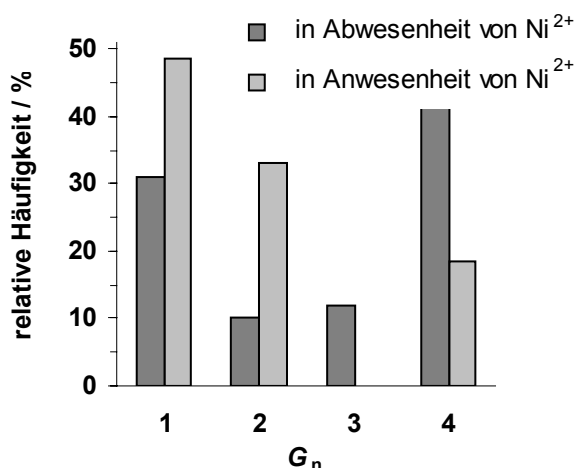


Abb. 6.1: Relative Häufigkeiten der Leitfähigkeitsstufen des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Ab- und Anwesenheit von  $2.5 - 5.0 \mu\text{M Ni}^{2+}$  in nano-BLMs. Der Anteil an Ereignissen der Leitfähigkeitsstufe  $G_3$  ist in Anwesenheit von  $Ni^{2+}$  verschwindend gering ( $U_m = +200 \text{ mV}$ , Elektrolyt:  $0.5 \text{ M KCl}$ ).

Die beobachteten Verschiebungen der relativen Häufigkeiten mit denen Einzelkanalereignisse einer bestimmten Leitfähigkeitsstufe auftreten, können damit begründet werden, dass es in Gegenwart von  $Ni^{2+}$ , sofern die Rezeptorfunktion in die wässrige Phase ragt zur Komplexierung der rezeptorfunktionalisierten Peptide bpy\*-LS3 in der Membran kommt. Geht man aufgrund des hohen  $Ni^{2+}$ -Überschusses davon aus, dass 1:1-Komplexe gebildet werden, so erscheint es aufgrund der damit verbundenen starken elektrostatischen Abstoßung als äußerst unwahrscheinlich, dass Helix-Bündel aus komplexgebundenen Peptiden gebildet werden können. Die Helix-Bündel-Bildung sollte nur möglich sein, sofern nicht-komplexierte Peptide aufeinandertreffen oder zumindest ein Teil der bündelbildenden Peptide nicht-komplexiert ist. Daraus resultiert zwangsläufig, dass die Anzahl der zur Helix-Bündel-Bildung fähigen Peptiden in der Lipiddoppelschicht sinkt und damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass die den Leitfähigkeitsstufen  $G_3$  und  $G_4$  entsprechenden größeren Aggregate gebildet werden, geringer ist.

Bei der Analyse der Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in Gegenwart von  $Ni^{2+}$  zeigte sich, dass die Gegenwart des Metallions keinen Einfluss auf die mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{1-2}$  der Ionenkanäle des Peptids bpy\*-LS3 ausübt. In Gegenwart des Metallions konnten zwei mittleren Öffnungsdauern  $\tau_1^{Ni^{2+}}$  und  $\tau_2^{Ni^{2+}}$  von  $(4.4 \pm 0.2) \text{ ms}$  und  $(15 \pm 2) \text{ ms}$  ermittelt werden, die sehr gut mit den in Abwesenheit von  $Ni^{2+}$  bestimmten mittleren Öffnungsdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von  $(3.6 \pm 0.2) \text{ ms}$  und  $(15.1 \pm 0.6) \text{ ms}$  übereinstimmen.

Der geringe Unterschied in den mittleren Öffnungsdauern  $\tau_1^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_1$  ist nicht signifikant. Verwendet man bei der Histogrammanalyse zur Bestimmung von  $\tau_1^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_2^{\text{Ni}^{2+}}$  beispielsweise anstelle von 3 ms- Intervallen des Wertebereichs 5 ms Intervalle, so betragen  $\tau_1^{\text{Ni}^{2+}}$  und  $\tau_2^{\text{Ni}^{2+}}$  ( $3.9 \pm 0.1$ ) ms und ( $16 \pm 1$ ) ms.

Es konnte auch belegt werden, dass Ereignisse mit einer mittleren Öffnungsdauer  $\tau_3^{\text{Ni}^{2+}}$  im Bereich der mittleren Öffnungsdauer  $\tau_3$  von ( $63 \pm 4$ ) ms des Peptids in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  existieren. Allerdings traten Ereignisse mit längerer Öffnungsdauer in Anwesenheit des Metallions weniger häufig auf, wodurch eine eindeutige Bestimmung von  $\tau_3^{\text{Ni}^{2+}}$  nicht möglich war.

In Abb. 6.2 sind die relativen Häufigkeiten dargestellt, mit denen in Ab- und Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  Einzelkanalereignisse des rezeptorfunktionalisierten Peptids *bpy*\*-LS3 mit Öffnungsdauern in unterschiedlichen Zeitintervallen auftraten. Die Zeitintervalle wurden entsprechend den linearen Bereichen nach Linearisierung der Daten der Histogrammanalyse der Öffnungsdauer des Peptids in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  gewählt. Es wird deutlich, dass in Gegenwart des Metallions die Häufigkeit von Einzelkanalereignissen mit Öffnungsdauern über 15 ms abnimmt und dementsprechend der relative Anteil an Ereignissen mit Öffnungsdauern unter 15 ms steigt.

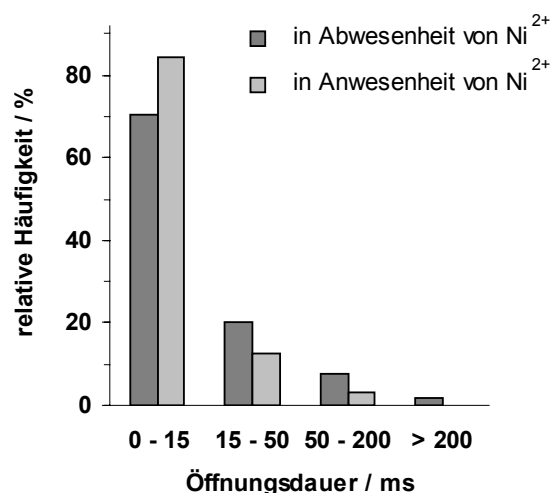


Abb. 6.2: Verteilung der Öffnungsdauern von Einzelkanalereignissen des rezeptorfunktionalisierten Peptids *bpy*\*-LS3 in unterschiedlichen Wertebereichen in Ab- und Anwesenheit von 2.5 – 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  in nano-BLMs. Im Wertebereich ab 200 ms befanden sich in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  0.2 % der Ereignisse ( $U_m = +200$  mV, Elektrolyt: 0.5 M KCl).

In Abwesenheit des Metallions liegt keine Korrelation zwischen der Öffnungsdauer und der Leitfähigkeitsstufe der Ionenkanäle vor. Daher kommt als mögliche Ursache für das Vorliegen von drei unterschiedlichen mittleren Öffnungsdauern des rezeptorfunktionalisierten Peptids, wie unter 6.5.2 erläutert, eine unterschiedliche Anordnung der Rezeptorfunktionen im Helix-Bündel in Betracht. Dabei wurden zwei Modelle erwogen, die zum Auftreten von drei unterschiedlichen Helix-Bündel-Populationen führen könnten. Für Ereignisse der mittleren Öffnungsdauer  $\tau_3$  käme demnach zum einen eine Orientierung der Mehrzahl der Rezeptorfunktionen der bündelbildenden Peptide in der Lipiddoppelschicht in Frage, die dort als quasi hydrophober Anker die Diffusion der Peptide in der Membran einschränken. Zum anderen ist allerdings auch denkbar, dass ein Großteil der Rezeptorfunktionen in die wässrige Phase ragen und die Wechselwirkung der bündelbildenden Peptide am wenigsten beeinträchtigt wird. In Anbetracht der Tatsache, dass in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$  deutlich weniger Ereignisse mit längerer Öffnungsdauer auftraten als in Abwesenheit des Metallions, erscheint letztere Möglichkeit der Orientierung der Rezeptorfunktion am wahrscheinlichsten. Durch die Komplexierung der in die wässrige Phase ragenden Rezeptorfunktionen wird in diesem Fall aufgrund der starken elektrostatischen Abstoßung der komplexierten Rezeptorfunktionen die Wahrscheinlichkeit, dass Helix-Bündel-Strukturen gebildet werden, kleiner und die relative Häufigkeit mit der Einzelkanalereignisse einer längerer Öffnungsdauer auftreten sinkt. In Kongruenz zu dem Modell steigt die relative Häufigkeit mit der Helix-Bündel einer kurzen Öffnungsdauer auftreten. Die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Helix-Bündels, in dem ein Großteil der Rezeptorfunktionen in der Lipiddoppelschicht lokalisiert sind, sollte durch die Gegenwart des Metallions nicht beeinflusst werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Gegenwart von  $2.5 - 5.0 \mu\text{M Ni}^{2+}$  eine Modulation der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 in nano-BLMs bewirkt und die Assemblierung der Peptidhelices durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen gesteuert werden kann. Die Komplexierung des Peptids bpy\*-LS3 erfolgt jedoch aufgrund der geringen Hydrophilie der Rezeptorfunktion und der starken Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht nur teilweise.



Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich ein Bipyridin-funktionalisiertes Ionenkanal bildendes Peptid als Biosensor für Ni<sup>2+</sup> eignet. Biosensoren haben verglichen zu den meisten anderen Analyseverfahren die Vorteile, dass sie hochspezifisch und schnell auf die Gegenwart eines Analyten reagieren und zudem kosteneffizient und leicht anwendbar sind. Für viele Schwermetalle, wie Blei, Chrom, Cadmium, Kupfer, Zink und Quecksilber wurden in den letzten Jahren Biosensoren basierend auf Enzymen, nicht-enzymatischen Proteinen, Antikörpern und ganzen Zellen entwickelt<sup>154</sup>. Die Detektionsgrenzen von unterschiedlichen Schwermetallionen liegen bei Biosensoren basierend auf Enzymen in der Regel im Bereich von 0.02 – 10 µM. Unter Verwendung von nicht-enzymatischen metallbindenden Proteinen konnten Detektionsgrenzen im pico- bis femtomolaren Bereich und unter Verwendung von Antikörpern im nanomolaren Bereich erzielt werden. Bei Biosensoren basierend auf ganzen Zellen erstreckt sich die Detektionsgrenze über den mikro- bis nanomolaren Bereich<sup>154</sup>. Zum Nachweis von Ni<sup>2+</sup> sind in der Literatur nur sehr wenige biosensorische Methoden zu finden. Van der Lelie et al. veränderten beispielsweise das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* gentechnisch so, dass der Bakterienstamm spezifisch auf Ni<sup>2+</sup> in einem Detektionsbereich von 0.1 – 6.0 mM reagiert<sup>154, 155</sup>. Verma et al. beschrieben 2006 einen Biosensor zur Detektion von Ni<sup>2+</sup> basierend auf der Hemmung der Urease-Aktivität durch das Metallion in immobilisierten *Bacillus sphaericus* MTCC 5100-Zellen<sup>156</sup>. Der Detektionsbereich lag bei 0.03 – 0.68 nM. Die Ni<sup>2+</sup>-Konzentration von 2.5 – 5.0 µM für die eine Veränderung der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten *bpy*\*-LS3 beobachtet werden konnte, liegt in einem Konzentrationsbereich, der für eine Vielzahl von Biosensoren typisch ist. Durch eine Erhöhung der Hydrophilie der Rezeptorfunktion wäre auch eine geringere Detektionsgrenze vorstellbar. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Messungen und vor allem der Auswertung der gewonnenen Daten deutlich größer als bei anderen biosensorischen Systemen. Zudem ist eine Konzentrationsbestimmung der Ni<sup>2+</sup>-Ionen nicht möglich. Das entwickelte System ist demnach als Biosensor nicht von Nutzen. Es zeigt allerdings, dass die Kanaleigenschaften eines peptidischen Ionenkanals durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen modifiziert werden können und stellt somit einen ersten Schritt in der Entwicklung von Biosensoren basierend auf solchen Systemen dar.



## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System auf Basis  $\alpha$ -helicaler amphipatischer Peptidhelices zu etablieren, dessen Kanaleigenschaften durch Wechselwirkung mit einem in der wässrigen Phase befindlichen Liganden moduliert werden können. Als Peptidkomponente wurde die Sequenz  $\text{H}_2\text{N}-(\text{LSSLLSL})_3-\text{CONH}_2$  (LS3) verwendet. Die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung basierte auf der Komplexbildung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit 2,2'-Bipyridin, welches über einen Alkylspacer kovalent an die Peptidhelix gebunden war.

Zunächst wurde das Peptid LS3 mittels automatisierter Festphasensynthese unter Anwendung der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik synthetisiert. Zur Anbindung der Rezeptorfunktion an den *N*-Terminus der Peptidhelix wurde ein 2,2'-Bipyridin-Derivat (bpy\*) mit einem Alkylspacer und endständiger Carboxylfunktion hergestellt, so dass das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 erhalten wurde.

Für das Peptid LS3 wurde bei Einzelkanalmessungen an klassischen BLMs in 0.5 M KCl bei einem Membranpotential von +200 mV eine Leitfähigkeit von  $(106 \pm 28)$  pS und einer mittleren Öffnungsdauer von  $(1.82 \pm 0.01)$  ms ermittelt. In nano-BLMs, welche die Poren von porösem Aluminiumoxid mit Porendurchmessern von 60 nm überspannen, wurden dagegen acht Leitfähigkeitsstufen im Bereich von  $(101 \pm 19)$  pS bis  $(1011 \pm 53)$  pS identifiziert und die mittlere Öffnungsdauer betrug  $(3.6 \pm 0.1)$  ms. Das Auftreten von höheren Leitfähigkeitsstufen wurde auf eine durch die Porenstege des Substrats räumlich eingeschränkte Diffusion der Peptide in nano-BLMs zurückgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Leitfähigkeitsstufen von LS3 aus der Aggregation von 6 – 13 Monomeren resultieren. Die längere mittlere Öffnungsdauern in nano-BLMs kann auf einem geringeren Lösungsmittelanteil oder dem eingeschränkten Diffusionsraum basieren.

Die Komplexbildung des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 mit  $\text{Ni}^{2+}$  wurde UV-spektroskopisch belegt. Anhand der Rezeptorfunktion bpy\* wurde gezeigt, dass der angebrachte Alkylspacer verglichen zu 2,2'-Bipyridin lediglich eine gewisse Destabilisierung des 3:1-Komplexes von bpy\* mit  $\text{Ni}^{2+}$  verursacht. In Mizellen oder

Vesikeln ist aufgrund einer starken Wechselwirkung der Rezeptorfunktion mit der hydrophoben Phase die Komplexbildung kinetisch retardiert.

Das rezeptorfunktionalisierte Peptid bpy\*-LS3 zeigte in klassischen BLMs lediglich ein Detergenz-ähnliches Verhalten, das auf eine Destabilisierung der Membran durch den Durchtritt der Rezeptorfunktion zurückgeführt werden kann. In die mechanisch stabileren nano-BLMs konnte bpy\*-LS3 erfolgreich inkorporiert werden. Die bei einem Membranpotential von +200 mV in 0.5 M KCl ermittelten Leitfähigkeitsstufen betragen  $G_1 = (134 \pm 20)$  pS,  $G_2 = (181 \pm 15)$  pS,  $G_3 = (225 \pm 27)$  pS und  $G_4 = (373 \pm 63)$  pS und resultierten ausgehend von einer hexameren Struktur aus Helix-Bündeln mit bis zu 9 Monomeren. Die Öffnungsdauer der Ionenkanäle wies eine exponentielle Verteilung 3. Ordnung auf mit drei mittleren Öffnungsdauern von  $\tau_1 = (3.6 \pm 0.2)$  ms,  $\tau_2 = (15.1 \pm 0.6)$  ms und  $\tau_3 = (63 \pm 4)$  ms, die unabhängig von der Leitfähigkeitsstufe auftraten. Dies lässt auf das Vorliegen von drei Helix-Bündel-Populationen schließen, die sich in der räumlichen Orientierung der Rezeptorfunktionen unterscheiden.

In Gegenwart von 2.5 – 5.0  $\mu\text{M Ni}^{2+}$  konnte in nano-BLMs eine Modulation der Kanaleigenschaften des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3 induziert werden. Zum einen nahm der Anteil an Ereignissen mit höherer Leitfähigkeit ab. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass sich komplexierte Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht abstoßen, wodurch die Zahl der zur Bündelbildung fähigen Peptide abnimmt. Zum anderen konnte eine Abnahme der Häufigkeit von Ereignissen mit längerer Öffnungsdauer beobachtet werden. Es wurde geschlossen, dass diese Abnahme auf Helix-Bündeln basieren, in denen ein Großteil der Rezeptorfunktion in die wässrige Phase ragt. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der komplexierten Peptide sinkt somit die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von längeren Ereignissen.

Durch die Komplexbildung zwischen kovalent an ein amphipatisches Peptid gebundenem 2,2'-Bipyridin und  $\text{Ni}^{2+}$  konnte die Assemblierung der Peptide zu Helix-Bündeln modifiziert werden. Das entwickelte System könnte somit neue Perspektiven für die Entwicklung maßgeschneiderter Sensoren bieten.

# 8 Literaturverzeichnis

1. Stryer, L., *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verlag: Heidelberg, 1996.
2. Lehninger, *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum, Akad. Verlag: Heidelberg, 1998.
3. Winter, R., Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen. *Chem. Unserer Zeit* **1990**, 24, 71-81.
4. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, 175, 720-31.
5. MacDonald, R. C. et al., Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large, Unilamellar Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1061, 297-303.
6. Schmidt, C.; Mayer, M.; Vogel, H., A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3137-40.
7. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press: San Diego, 1991.
8. Sackmann, E., Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* **1996**, 271, 43-8.
9. Fuchs, H., Atomic Force and Scanning Tunneling Microscopies of Organic Surfaces. *J. Mol. Struct.* **1993**, 292, 29-47.
10. Janshoff, A.; Galla, H.-J.; Steinem, C., Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4164-95.
11. Sackmann, E., Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* **1996**, 271, 43-8.
12. Jass, J.; Tjarnhage, T.; Puu, G., From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys. J.* **2000**, 79, 3153-63.
13. Blodgett, K., Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 1007-22.

14. Roberts, G. G., *Langmuir-Blodgett Films*. Plenum Press: New York, 1990.
15. Langmuir, I.; Schaefer, V. J., Activities of Urease and Pepsin Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 1351-60.
16. Florin, E.; Gaub, E., Painted Supported Lipid Membranes. *Biophys. J.* **1993**, 64, 375-83.
17. Terrettaz, S. et al., Protein Binding to Supported Lipid Membranes: Investigation of the Cholera Toxin-Ganglioside Interaction by Simultaneous Impedance Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance. *Langmuir* **1993**, 9, 1361-9.
18. Tanaka, M.; Sackmann, E., Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface. *Nature* **2005**, 437, 656-63.
19. Krishna, G. et al., Thethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: The Interfacial Capacitance. *Langmuir* **2001**, 17, 4858-66.
20. Raguse, B. et al., Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* **1998**, 14, 648-59.
21. Lang, H.; Duchl, C.; Vogel, H., A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir* **1994**, 10.
22. Tien, H. T.; Ottova-Leitmannova, A., *Membrane Biophysics as Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes*. Elsevier: Amsterdam, 2000.
23. Mueller, P. et al., Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature* **1962**, 194, 979-80.
24. Lakey, J. H.; Pattus, F., The Voltage-Dependent Activity of Escherichia coli Porins in Different Planar Bilayer Reconstitutions. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 303-8.
25. Fahey, P. F.; Webb, W. W., Lateral Diffusion in Phospholipid Bilayer Membranes and Multilamellar Liquid Crystals. *Biochemistry* **1978**, 17, 3046-53.
26. Palmeri, A.; Pepe, I. M.; Rolandi, R., Channel-Formation Activity of the Lantibiotic Nisin on Bilayer Lipid Membranes. *Thin Solid Films* **1996**, 284 - 285, 822-4.
27. Montal, M.; Mueller, P., Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, 69, 3561-6.

28. Montal, M.; Korenbrot, J. I., Incorporation of Rhodopsin Proteolipid into Bilayer Membranes. *Nature* **1973**, 246, 219-21.
29. Montal, M., Asymmetric Lipid Bilayers. Reponse to Multivalent Ions. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 298, 750-4.
30. Fertig, N. et al., Stable Integration of Isolated Cell Membrane Patches in a Nanomachined Aperture. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 1218-20.
31. Fertig, N. et al., Microstructured Glass Chip for Ion-Channel Electrophysiology. *Phys. Rev. E* **2001**, 64, 040901(R).
32. Fertig, N. et al., Activity of Single Ion Channel Proteins Detected with a Planar Microstructure. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81, 4865-7.
33. Fertig, N.; Blick, R. H.; Behrends, J. C., Whole Cell Patch Clamp Recording on a Planar Glass Chip. *Biophys. J.* **2002**, 82, 3056-62.
34. Ogier, S. D. et al., Suspended Planar Phospholipid Bilayers on Micromachined Supports. *Langmuir* **2000**, 16, 5696-701.
35. Cheng, Y. et al., Single Ion Channel Sensitivity in Suspended Bilayers on Micromachined Supports. *Langmuir* **2001**, 17.
36. Wilk, S. J. et al., Teflon<sup>TM</sup>-Coated Silicon Apertures for Supported Lipid Bilayer Membranes. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, 85, 3307-9.
37. Osborn, T. D.; Yager, P., Formation of Planar Solvent-Free Phospholipid Bilayers by Langmuir-Blodgett Transfer of Monolayers to Micromachined Apertures in Silicon. *Langmuir* **1995**, 11, 8-11.
38. Peterman, M. C. et al., Ion Channels and Lipid Bilayer Membranes Under High Potentials Using Microfabricated Apertures. *Biomed. Microdevices* **2002**, 4, 231-6.
39. Schmidt, C.; Mayer, M.; Vogel, H., A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3137-40.
40. Favero, G. et al., Membrane Supported Bilayer Lipid Membranes Array: Preparation, Stability and Ion-Channel Insertion. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 460, 23-34.
41. Favero, G. et al., Mixed Hybrid Bilayer Lipid Membrane Incorporating Valinomycin: Improvements in Preparation and Functioning. *Microchem. Journal* **2003**, 74, 141-8.
42. Hennessy, C.; Steinem, C., Pore-Spanning Lipid Bilayers Visualized by Scanning Force Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 112, 8085-6.

43. Hennesthal, C.; Drexler, J.; Steinem, C., Membrane-Suspended Nanocompartments Based on Ordered Pores in Alumina. *ChemPhysChem* **2002**, 3, 885-9.
44. Drexler, J.; Steinem, C., Pore-Suspending Lipid Bilayers on Porous Alumina Investigated by Electrical Impedance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 11245-54.
45. Römer, W.; Steinem, C., Impedance Analysis and Single-Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. *Biophys. J.* **2004**, 86, 955-65.
46. Römer, W. Impedance Analysis and Single Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. Dissertation, Universität Regensburg, 2004.
47. Horn, C.; Steinem, C., Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin Adsorbed on Nano-Black Lipid Membranes. *Biophys. J.* **2005**, 89, 1046-54.
48. Horn, C. Aktivität lichtaktivierter Proteine adsorbiert an funktionalisierten nanoporösen Aluminaten. Dissertation, Universität Regensburg, Regensburg, 2005.
49. Schmitt, E. K.; Vrouwenraets, M.; Steinem, C., Channel Activity of OmpF Monitored in Nano-BLMs. *Biophys. J.* **2006**, 91, 2163-71.
50. Schmitt, E. K. Charakterisierung von porenüberspannenden Membranen und Einzelkanalmessungen an OmpF inseriert in nano-BLMs. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2005.
51. Unwin, N., Nicotinic Acetylcholine Receptor at 9 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 1101-24.
52. Buchanan, S. K.,  $\beta$ -Barrel Proteins from Bacterial Outer Membranes: Structure, Function and Refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 455-61.
53. Montal, M., Protein Folds in Channel Structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 499-510.
54. Mingarro, I.; von Heijne, G.; Whitley, P., Membrane-Protein Engineering. *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 432-7.
55. Futaki, S., Peptide Ion Channels: Design and Creation of Function. *Biopolymers* **1998**, 47, 75-81.
56. Doyle, D. A. et al., The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **1998**, 280, 69-77.



57. Martinac, B., Mechanosensitive Ion Channels: Molecules of Mechanotransduction. *J. Cell Sci.* **2004**, 117, 2449-60.
58. Keusgen, M., Biosensors: New Approaches in Drug Discovery. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 433-44.
59. Sansom, M. S., The Biophysics of Peptide Models of Ion Channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, 55, 139-235.
60. Cafiso, D. S., Alamethicin: A Peptide Model for Voltage Gating and Protein-Membran Interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, 23, 141-65.
61. Yin, P. et al., A Tethered Bilayer Sensor Containing Alamethicin Channels and its Detection of Amiloride Based Inhibitors. *Biosens. Bioelectr.* **2003**, 18, 389-97.
62. Bezrukov, S. M.; Vodyanoy, I.; Parsegian, V. A., Counting Polymers Moving Through a Single Ion Channel. *Nature* **1994**, 370, 279-81.
63. Bechinger, B., Structure and Functions of Channel-Forming Peptides: Magainins, Cecropins, Melittin and Alamethicin. *J. Membrane Biol.* **1997**, 156, 197-211.
64. Terrettaz, S. et al., Immunosensing by a Synthetic Ligand-Gated Ion Channel. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1740-3.
65. Terrettaz, S.; Mayer, M.; Vogel, H., Highly Electrically Insulating Tethered Lipid Bilayers for Probing the Funktion of Ion Channel Proteins. *Langmuir* **2003**, 19, 5567-69.
66. Wallace, B. A., Common Structural Features in Gramicidin and Other Ion Channels. *BioEssay* **2000**, 22, 227-34.
67. Wallace, B. A., Gramicidin Channels and Pores. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1990**, 19, 127-57.
68. Cornell, B. A. et al., A Biosensor that Uses Ion-Channel Switches. *Nature* **1997**, 387, 580-3.
69. Cornell, B. A. et al., Tethered-Bilayer Lipid Membranes as a Support for Membrane-Active Peptides. *Biochem Soc Trans* **2001**, 29, 613-7.
70. Woodhouse, G. et al., The Ion Channel Switch Biosensor. *J. Mol. Recognition* **1999**, 12, 328-34.
71. Lucas, S. W.; Harding, M. M., Detection of DNA via an Ion Channel Switch Sensor. *Anal. Biochem.* **2000**, 282, 70-9.
72. Lee, S.-K. et al., Ion Channel Switch Array. *Indust. Biotechn.* **2005**, 1, 26-31.

73. Gouaux, J. E. et al., Subunit Stoichiometry of Staphylococcal Alpha-Hemolysin in Crystals and on Membranes: A Heptameric Transmembrane Pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 12828-31.
74. Walker, B. et al., Assembly of the Oligomeric Membrane Pore Formed by Staphylococcal Alpha-Hemolysin Examined by Truncation Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21872-6.
75. Walker, B. et al., A Pore-Forming Protein with a Metal-Actuated Switch. *Prot. Eng.* **1994**, 7, 655-62.
76. Braha, O. et al., Simultaneous Stochastic Sensing of Divalent Metal Ions. *Nature Biotech.* **2000**, 18, 1005-7.
77. Bayley, H.; Braha, O.; Gu, L.-Q., Stochastic Sensing with Protein Pores. *Adv. Mater.* **2000**, 12, 139-42.
78. Gu, L.-Q. et al., Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter. *Nature* **1999**, 398, 686-90.
79. Lear, J. D.; Wasserman, Z. R.; DeGrado, W. F., Synthetic Amphiphilic Peptide Models for Protein Ion Channels. *Science* **1988**, 240, 1177-81.
80. Akerfeldt, K. S. et al., Synthetic Peptides as Models for Ion Channel Proteins. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 191-7.
81. Kohn, W. D.; Mant, C. T.; Hodges, R. S.,  $\alpha$ -Helical Protein Assembly Motifs. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2583-6.
82. Randa, H. S. et al., Molecular Dynamics of Synthetic Leucine-Serine Ion Channels in a Phospholipid Membrane. *Biophys. J.* **1999**, 77, 2400-10.
83. Chung, L. A.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F., Fluorescence Studies of the Secondary Structure and Orientation of a Model Ion Channel Peptide in Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1992**, 31, 6608-16.
84. Jakubke, H.-D., *Peptide: Chemie und Biologie*. Spektrum, Akad. Verlag: Heidelberg, 1996.
85. Fields, G. B. et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant, G. A., Ed. Oxford University Press: Oxford, 2002; pp 93-219.
86. Wellings, D. A.; Atherton, E., Standard Fmoc Protocols. In *Solid Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzymology)*, Fields, G. B., Ed. Acad. Press: San Diedo, 1997; Vol. 289, pp 44-67.

87. James, I. W., Linkers for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahed.* **1999**, *55*, 4855-946.
88. Albericio, F.; Carpino, L. A., Coupling Reagents and Activation. In *Solid Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzymology)*, Fields, G. B., Ed. Acad. Press: San Diedo, 1997; Vol. 289, pp 104-26.
89. Kaiser, E. et al., Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-8.
90. Guy, C. A.; Fields, G. B., Trifluoroacetic Acid Cleavage and Deprotection of Resin-Bound Peptides Following Synthesis by Fmoc Chemistry. In *Solid Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzymology)*, Fields, G. B., Ed. Acad. Press: San Diego, 1997; Vol. 289, pp 67-83.
91. Pearson, D. A. et al., Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide Synthesis. *Tetrahed. Lett.* **1989**, *30*, 2739-42.
92. Mohler, D. L.; Chen, D.; Reddy, V. B., A Facile Synthesis of Homologous 4,4'-Dialkanoic Acid Substituted 2,2'-Bipyridines. *Synthesis* **2002**, *6*, 745-8.
93. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1995.
94. Holleman, A. E.; Wiberg, N., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter: Berlin, 1995.
95. Gilliam, A. E.; Hey, D. H.; Lambert, A., The Absorption Spectra of the Phenylpyridines and Pyridyldiphenyls. *J. Chem. Soc.* **1941**, 364-7.
96. Mason, S. F., The Electronic Spectra and Optical Activity of Phenanthroline and Dipyridyl Metal Complexes. *Inorg. Chim. Acta Reviews* **1968**, *2*, 89-109.
97. Förster, T.; König, E., Absorptionsspektren und Fluoreszenzeigenschaften konzentrierter Lösungen organischer Farbstoffe. *Z. Elektrochem.* **1957**, *61*, 344-8.
98. Schwarz, G.; Zong, R.-T.; Popescu, T., Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1110*, 97-104.
99. Ende, D.; Mangold, K.-M., Impedanzspektroskopie. *Chem. Unserer Zeit* **1993**, *27*, 134-40.

100. Molecular Devices Corporation, The Axon CNS Guide to Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques.  
[http://www.axon.com/manuals/Axon\\_Guide.pdf](http://www.axon.com/manuals/Axon_Guide.pdf)
101. Neher, E., Nobel lecture. Ion channels for Communication Between and Within Cells. *Neuron* **1992**, 8, 605-12.
102. Penner, R., A Practical Guide to Patch Clamping. In *Single-Channel Recording*, Sakmann, B.; Neher, E., Eds. Plenum Press: New York, 1995; pp 3-30.
103. Jessensky, O. Untersuchungen zum Porenwachstum in 6H-Siliziumkarbid und anodischem Aluminiumoxid. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle, 1997.
104. Masuda, H.; Fukuda, K.; Gösele, U., Self-Organized Formation of Hexagonal Pore Structures in Anodic Alumina. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, 145, 3735-40.
105. Jessensky, O.; Müller, F.; Gösele, U., Self-Organized Formation of Hexagonal Pore Structures in Anodic Alumina. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, 145, 3735-40.
106. Li, A. P. et al., Hexagonal Pore Arrays with 50 - 450 nm Interpore Distance Formed by Self-Organization in Anodic Alumina. *J. Appl. Physics* **1998**, 84, 6023-26.
107. Perrin, D. D., *Organic Ligands*. Pergamon Press: Oxford, 1979; Vol. 22.
108. Bloom, M.; Mouritsen, O. G., The Evolution of Membranes. In *Structure and Dynamics of Membranes*, Lipowsky, R.; Sackmann, E., Eds. Elsevier: Amsterdam, 1995; pp 65-95.
109. El-Sayed, M. Y.; Guion, T. A.; Fayer, M. D., Effect of Cholesterol on Viscoelastic Properties of Dipalmitoylphosphatidylcholine Multibilayers as Measured by a Laser-Induced Ultrasonic Probe. *Biochemistry* **1986**, 25, 4825-32.
110. Winter, R.; Noll, F., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner: Stuttgart, 1998.
111. Sillén, L. G.; Martell, A. E., *Stability Constants of Metal-Ion-Complexes*. Chemical Society: London, 1964.
112. Sillén, L. G.; Martell, A. E., *Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Supplement No 1*. Chemical Society: London, 1971.

113. Richard, A. et al., Fusogenic Supramolecular Vesicle Systems Induced by Metal Ion Binding to Amphiphilic Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 15279-84.
114. Liebermann, M.; Sasaki, T., Iron(II) Organizes a Synthetic Peptide into Three-Helix Bundles. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1470-1.
115. Ghadiri, M. R.; Soares, C.; Choi, C., A Convergent Approach to Protein Design. Metal Ion-Assisted Spontaneous Self-Assembly of a Polypeptide into a Triple-Helix Bundle Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 825-31.
116. Liebermann, M.; Tabet, M.; Sasaki, T., Dynamic Structure and Potential Energy Surface of a Three-Helix Bundle Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116.
117. Mutz, M. W. et al., Conformational Dependence of Electron Transfer Across De Novo Designed Metalloproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 9521-6.
118. Case, M. A. et al., Stereoselection in Designed Three-Helix Bundle Metalloproteins. *Chirality* **1998**, 10, 35-40.
119. Gochin, M.; Khorosheva, V.; Case, M. A., Structural Characterization of a Paramagnetic Metal-Ion-Assembled Three-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11018-28.
120. Gochin, M.; Guy, R. K.; Case, M. A., A Metallopeptide Assembly of the HIV-1 gp41 Coiled Coil is an Ideal Receptor in Fluorescence Detection of Ligand Binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5325-8.
121. Moriyasu, M.; Hashimoto, Y., Kinetic Study of the Fast Equilibrium by Means of High-Performance Liquid Chromatography. V. Stepwise Complex Formation of the Nickel(II) Ion with 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 57.
122. Coetzee, J. F.; Gilles, D. M., Binary and Ternary Complex Formation of Nickel(II) in Methanol. Further Evidence for Outer-Sphere Stabilization and Other Factors Contributing to Ligand Substitution Kinetics in Nonaqueous Solvents. *Inorg. Chem.* **1976**, 15, 405-8.
123. Reinsborough, V. C.; Robinson, B. H., Micellar Catalysis of Metal Complex Formation. Part 2. - Kinetics of the Reaction between  $\text{Ni}^{2+}_{\text{aq}}$  and Various Neutral Bidentate Ligands in the Presence of Sodium Dodecylsulfate Micelles in Aqueous Solutions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1978**, 75, 2395-405.
124. Miyake, Y. et al., Metal-Ligand Complex Formation in the Presence of Micelles. Part 2. - Kinetics of the Reaction between Copper(II) and 1-

- Phenylbutane-1,3-dione (Benzoylacetone) in the Presence of Non-ionic Micelles of Polyoxyethylene n-Dodecyl Ether. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, 88, 1285-90.
125. Dathe, M. et al., Proline at Position 14 of Alamethicin is Essential for Hemolytic Activity, Catecholamine Secretion From Chromaffin Cells And Enhanced Metabolic Activity in Endothelial Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1370, 175-83.
126. Pawlak, M. et al., Template-Assembled Melitin: Structural and Funktional Characterization of a Designed, Synthetic Channel-Forming Protein. *Prot. Sci.* **1994**, 3, 1788-805.
127. Henn, F. A.; Thompson, T. E., Properties of Lipid Bilayer Membranes Separating Two Aqueous Phases: Composition Studies. *J. Mol. Biol.* **1968**, 31, 227-35.
128. Andrews, D. M.; Haydon, D. A., Electron Microscope Studies of Lipid Bilayer Membranes. *J. Mol. Biol.* **1968**, 32, 149-50.
129. Pagano, R. E.; Ruyschaert, J. M.; Miller, I. R., The Molecular Composition of Some Lipid Bilayer Membranes in Aqueous Solution. *J. Membrane Biol.* **1972**, 10, 11-30.
130. Rich, M.; Brody, S. S., A Quantitative Comparison of Chlorophyll Bilayers Formed With and Without Solvent. *Photochem. and Photobiol.* **1981**, 33, 271-4.
131. Tien, H. T. et al., Supported Bilayer Lipid Membranes as Ion and Molekular Probes *Anal. Sci.* **1998**, 14, 3-18.
132. Tien, H. T.; Dawidowicz, E. A., Black Lipid Films in Aqueous Media: A New Type of Interfacial Phenomenon. Experimental Techniques and Thickness Measurements. *J. Colloid Interf. Sci.* **1966**, 22, 438-53.
133. Fujiwara, H.; Fujiwara, M.; Ishiwata, T., Dynamics of the Spontaneous Formation of a Planar Phospholipid Bilayer: A New Approach by Simultaneous Electrical and Optical Measurements. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 6768-74.
134. Benz, R. et al., Electrical Capacity of Black Lipid Films and of Lipid Bilayers Made From Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 394, 323-34.
135. Colquhoun, D.; Hawkes, A. G., The Principles of the Stochastic Interpretation of Ion-Channel Mechanism. In *Single-Channel Recording*, Sakmann, B.; Neher, E., Eds. Plenum Press: New York, 1995; pp 397-482.

136. Colquhoun, D.; Sigworth, F. J., Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In *Single-Channel Recording*, Sakmann, B.; Neher, E., Eds. Plenum Press: New York, 1995; pp 483-587.
137. Balaram, P. et al., The Properties of Ion Channels Formed by Zervamicins. *Eur. Biophys. J.* **1992**, 21, 117-28.
138. Mutter, M. et al., Strategies for the de novo Design of Proteins. *Tetrahed.* **1988**, 44, 771-85.
139. Montal, M.; Montal, M. S.; Tomich, J. M., Synporins - Synthetic Proteins that Emulate the Pore Structure of Biological Ionic Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 6929-33.
140. Montal, M. O. et al., Design, Synthesis and Functional Characterization of a Pentameric Channel Protein that Mimics the Presumed Pore Structure of the Nicotinic Cholinergic Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, 320, 261-6.
141. Groves, J. T.; Boxer, S. G., Electric Field-Induced Concentration Gradients in Planar Supported Bilayers. *Biophys. J.* **1995**, 69, 1972-5.
142. Zhong, Q. et al., Molecular Dynamics Study of the LS3 Voltage-Gated Ion Channel. *FEBS Lett.* **1998**, 427, 267-70.
143. Weiskopf, D. et al., Micro-BLMs on Highly Ordered Porous Silicon Substrates: Rupture Process and Lateral Mobility. *Langmuir* **2007**, 23, 9134-9.
144. Colquhoun, D., Practical Analysis of Single Channel Records. [www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/](http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/)
145. Cernescu, A.; Luchian, T., Biophysical Changes Induced by Cholesterol on Phosphatidylcholine Artificial Biomembranes Containing Alamethicin Oligomers. *Central European Journal of Physics* **2006**, 4, 155-67.
146. Helluin, O. et al., Lateral Diffusion and Conductance Properties of a Fluorescein-Labelled Alamethicin in Planar Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1330, 284-92.
147. Kienker, P. K.; DeGrado, W. F.; Lear, J. D., A Helical-Dipole Model Describes the Single-Channel Current Rectification of an Uncharged Peptide Ion Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 4859-63.
148. Kienker, P. K.; Lear, J. D., Charge Selectivity of the Designed Uncharged Peptide Ion Channel Ac-(LSSLLSL)3-CONH<sub>2</sub>. *Biophys. J.* **1995**, 68, 1347-58.

149. Nemeč, J.; Wickman, K.; Clapham, D. E., G $\beta\gamma$  Binding Increases the Open Time of IKACH: Kinetic Evidence for Multiple G $\beta\gamma$  Binding Sites. *Biophys. J.* **1999**, 76, 246-52.
150. Han, J.; Kang, D.; Kim, D., Properties and Modulation of the G Protein-Coupled K<sup>+</sup> Channel in Rat Cerebellar Granule Neurons: ATP versus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Physiol.* **2003**, 550.3, 693-706.
151. Hille, B., *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3 ed.; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland.
152. Pincus, J. L. et al., Selective Fluorescence Detection of Divalent and Trivalent Metal Ions with Functionalized Lipid Membranes. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 2938-45.
153. Atkins, P. W., *Physikalische Chemie*. VCH: Weinheim, 1996.
154. Verma, N.; Singh, M., Biosensors for Heavy Metals. *Biometals* **2005**, 18, 121-9.
155. Tibazarwa, C. et al., A Microbial Biosensor to Predict Bioavailable Nickel in Soil and its Transfer to Plants. *Environ. Pollut.* **2001**, 113, 19-26.
156. Verma, N.; Singh, M., A *Bacillus sphaericus* Based Biosensor for Monitoring Nickel Ions in Industrial Effluents and Foods. In *J. Autom. Meth. Manag. Chem.*, 2006; Vol. 2006, pp 1-4, Article ID 83427.



# A Anhang

## A.1 Spektren

### A.1.1 Synthese des Peptids LS3

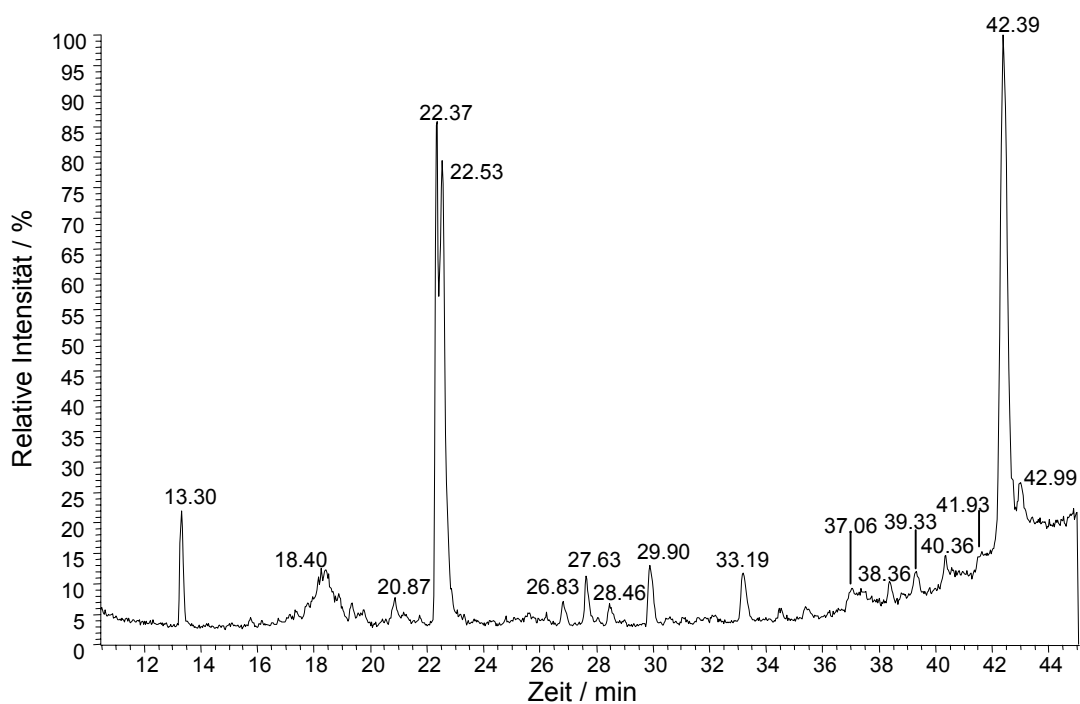


Abb. A.1: LS3 1-Synthese: LC/MS-Kopplung des Rohprodukts.

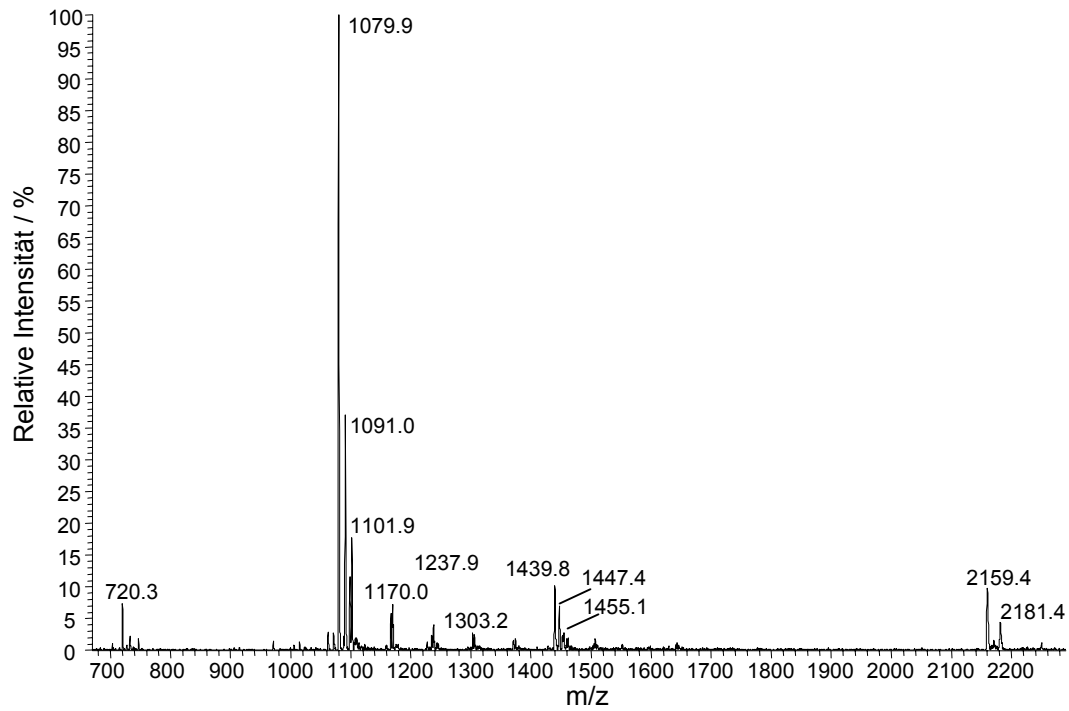


Abb. A.2: ESI+ der LC/MS-Kopplung des Rohprodukts der LS3 1-Synthese (Retentionszeit: 42.23 – 42.59 min).

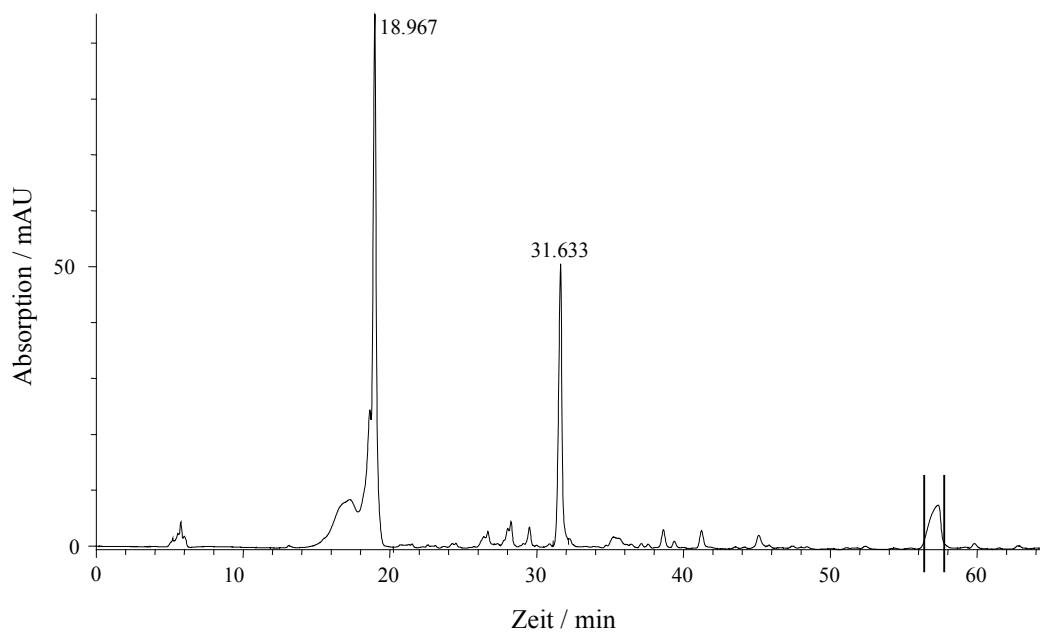


Abb. A.3: Chromatogramm eines typischen präparativen HPLC-Laufs zur Aufreinigung von LS3 1. Das Peptid eluierte bei einer Retentionszeit von 56 – 58 min (markierter Bereich).

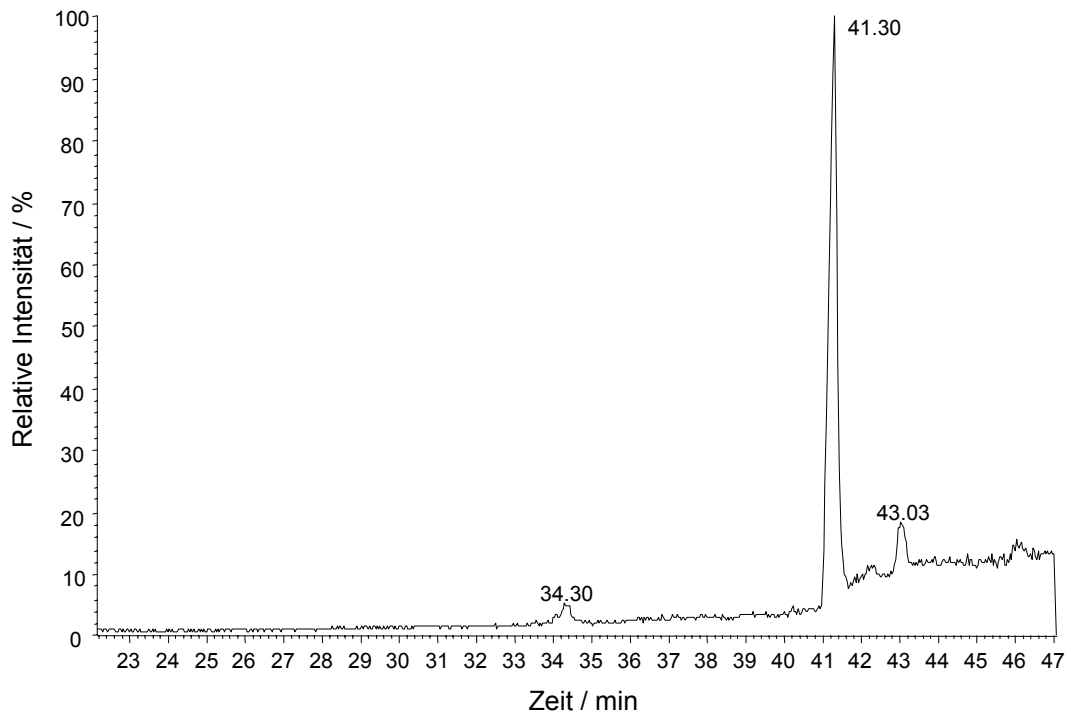


Abb. A.4: LC/MS-Kopplung von LS3 1.

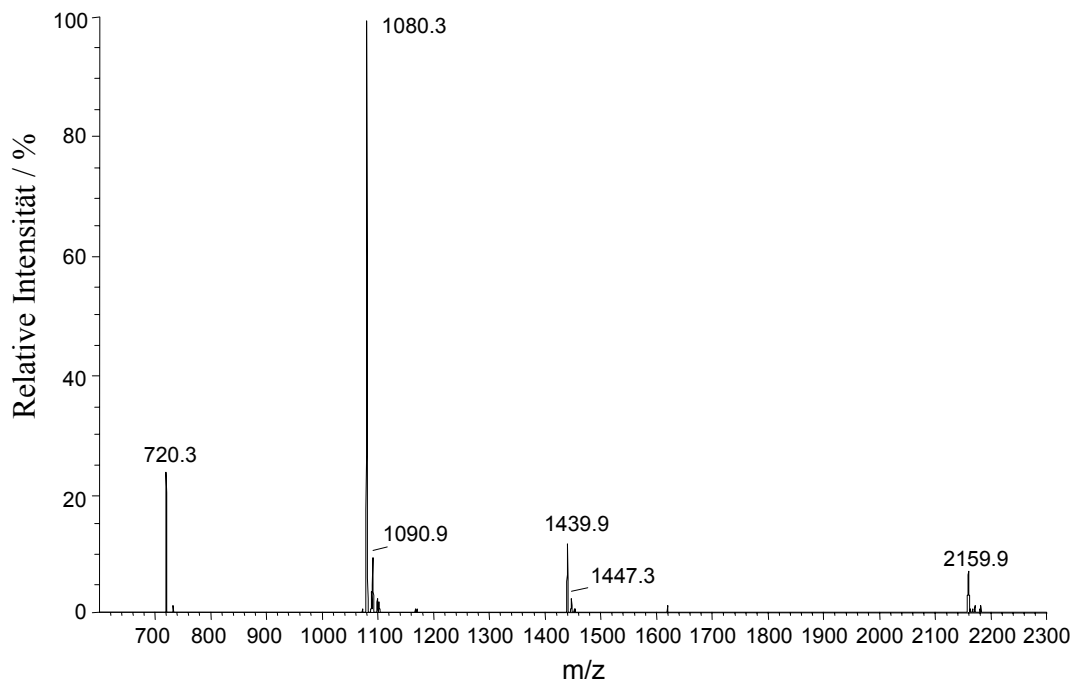


Abb. A.5: ESI+ der LC/MS-Kopplung von LS3 1 (Retentionszeit: 41.03 – 41.43 min).

## A.1.2 Synthese der Rezeptorfunktion bpy\*

### 4'-Methyl-4-(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin (**3**)

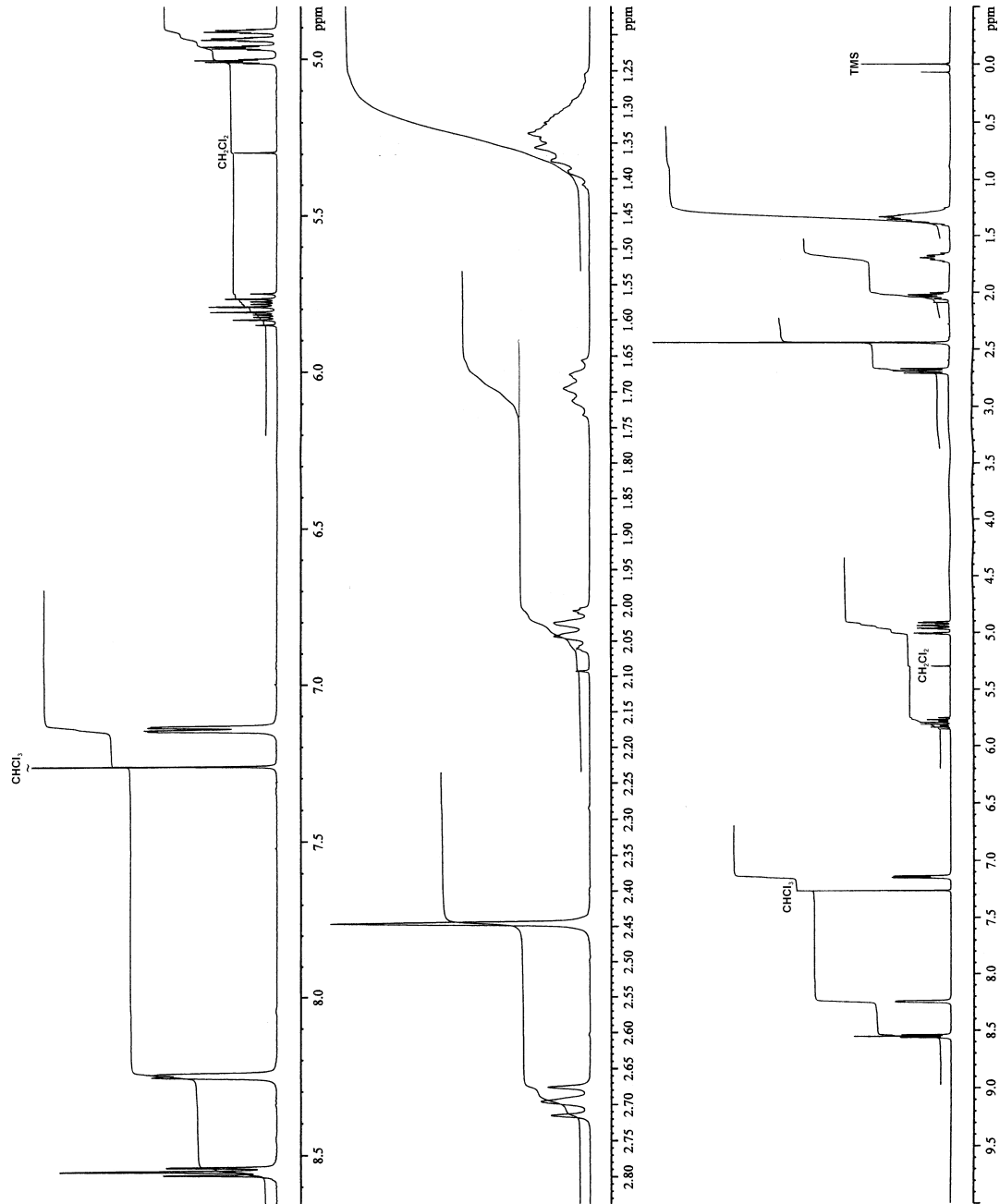


Abb. A.6:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 4'-Methyl-4-(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin **3**.

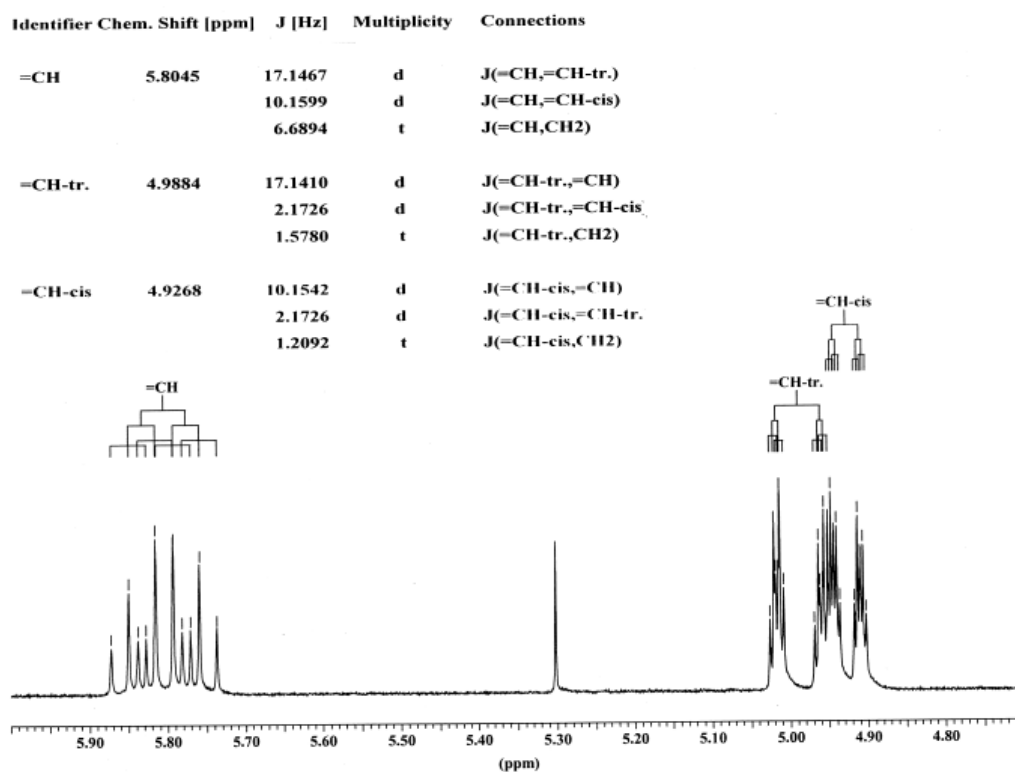


Abb. A.7: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 4'-Methyl-4-(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin **3** und Zuordnung der Kopplungen der Allylgruppe.

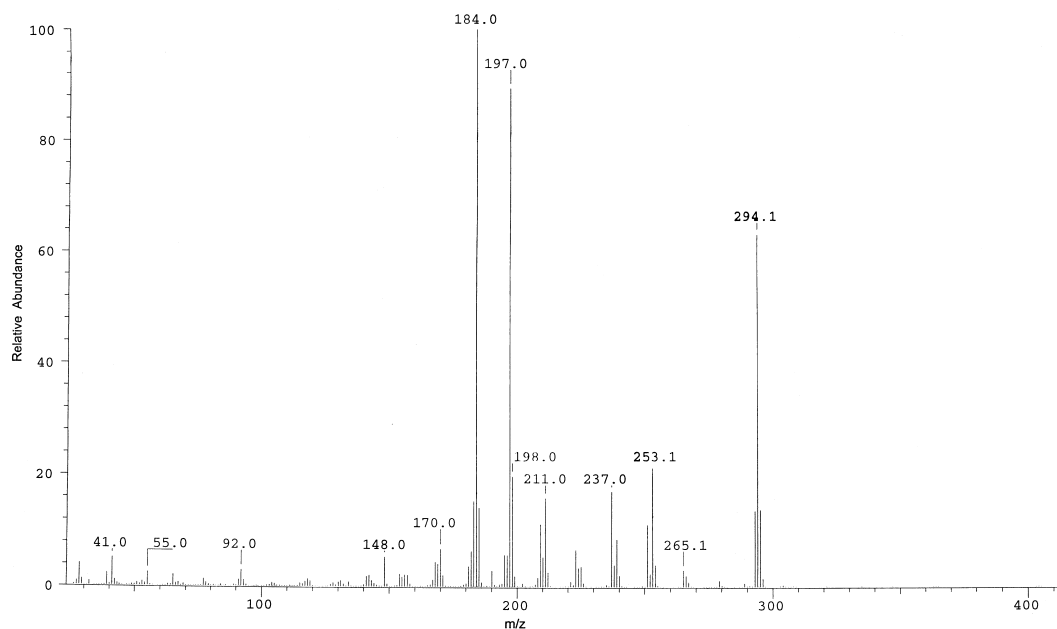


Abb. A.8: EI MS (70 eV) von 4'-Methyl-4-(non-8-enyl)-2,2'-bipyridin **3**.

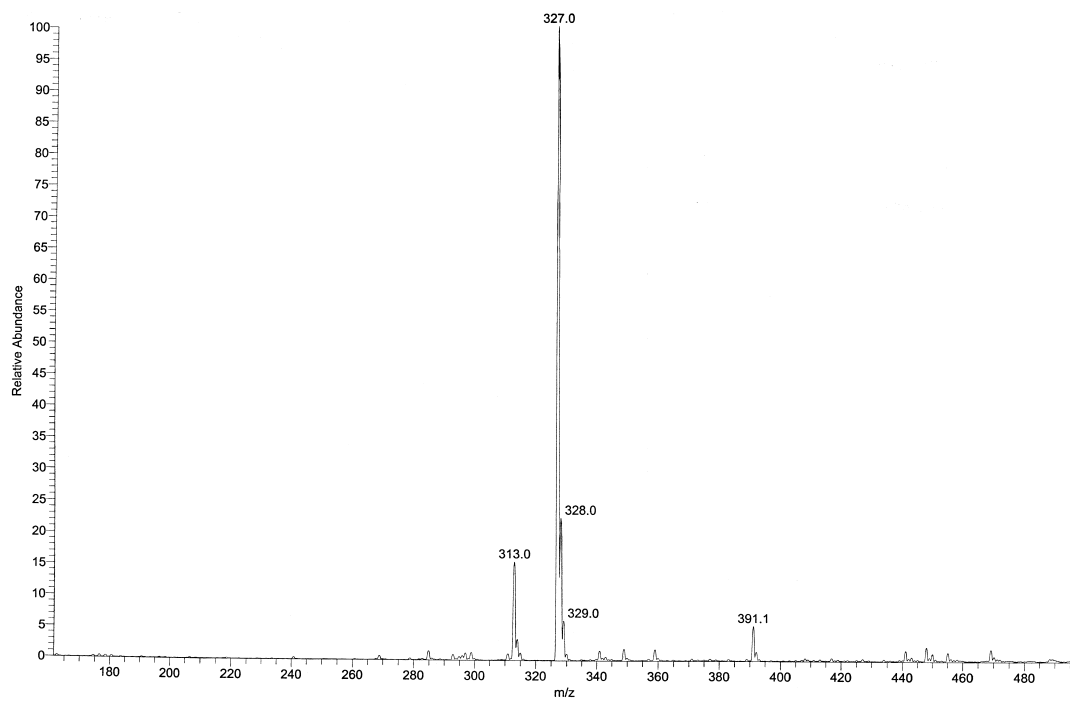
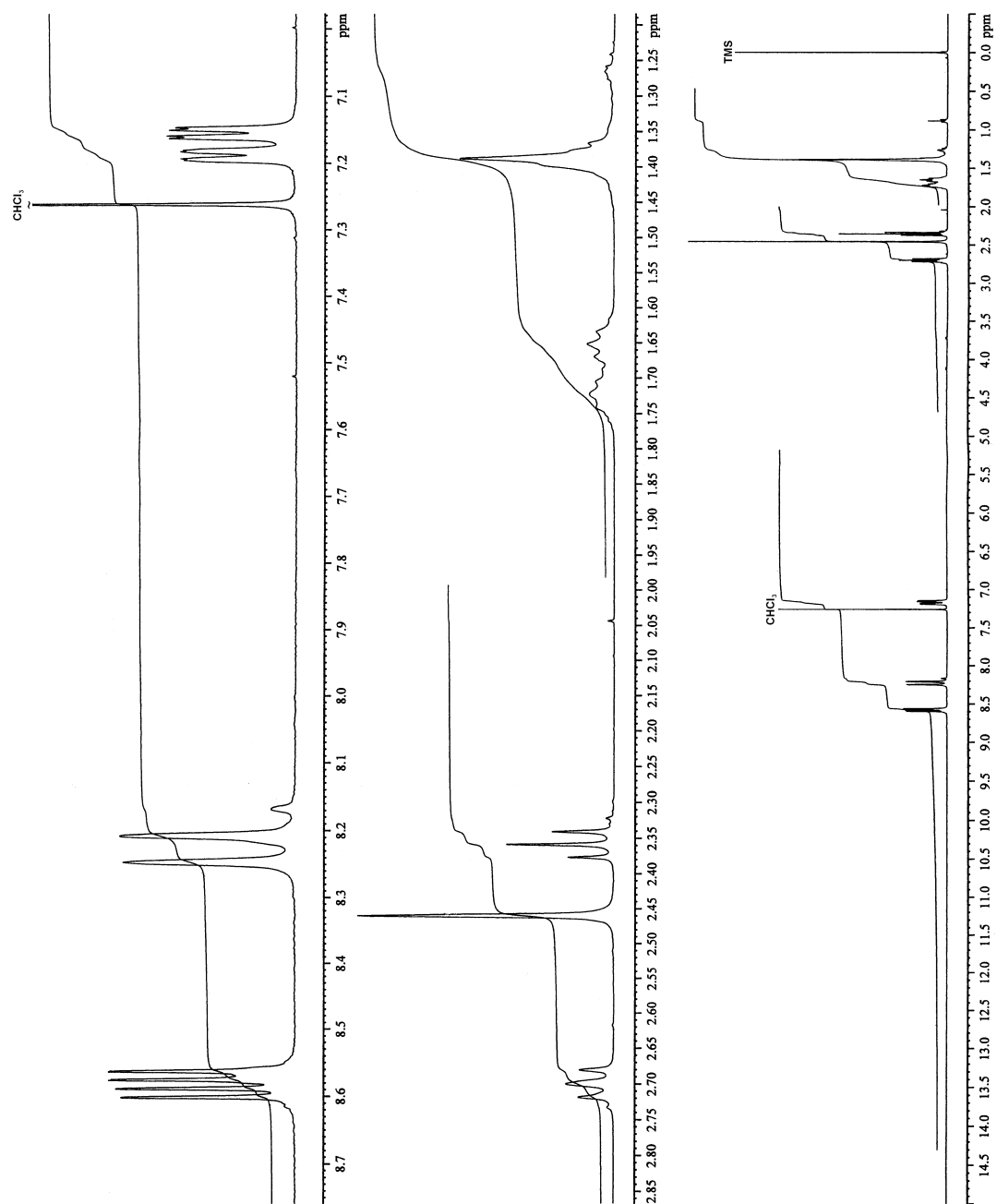
**8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäuremethylester 4**

Abb. A.9: ESI+ MS von 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäuremethylester 4.

**8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, 5)**Abb. A.10:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, 5).

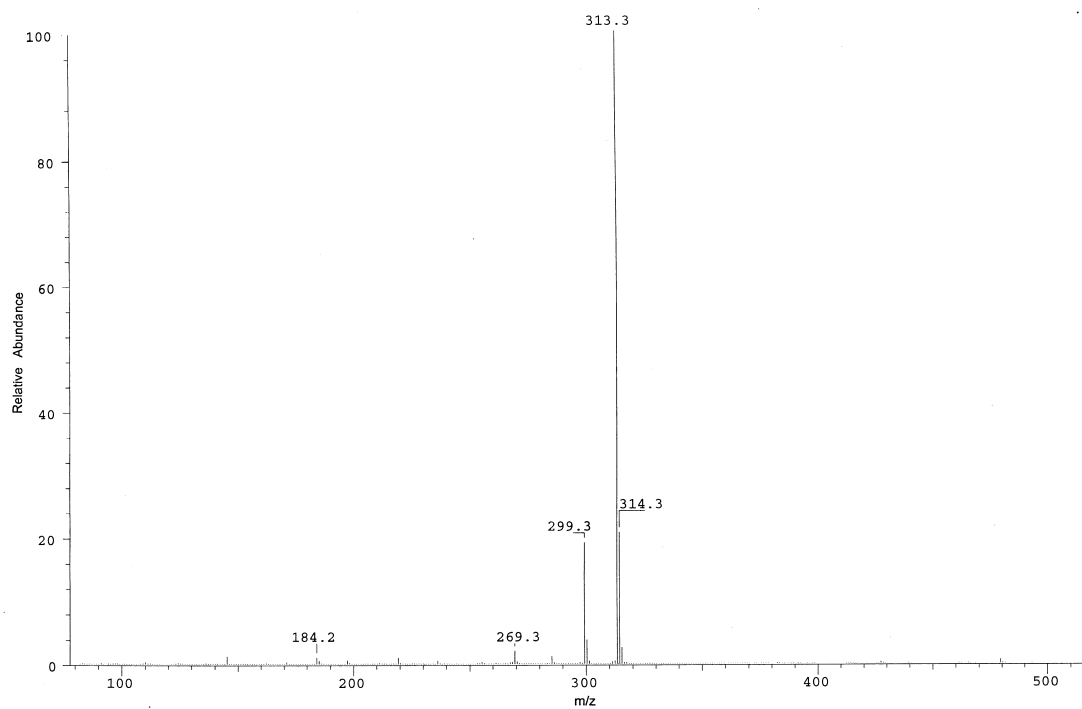


Abb. A.11:CI MS von 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure (bpy\*, **5**).



### A.1.3 Synthese des rezeptorfunktionalisierten Peptids bpy\*-LS3

#### 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäurepentafluorphenolester (6)

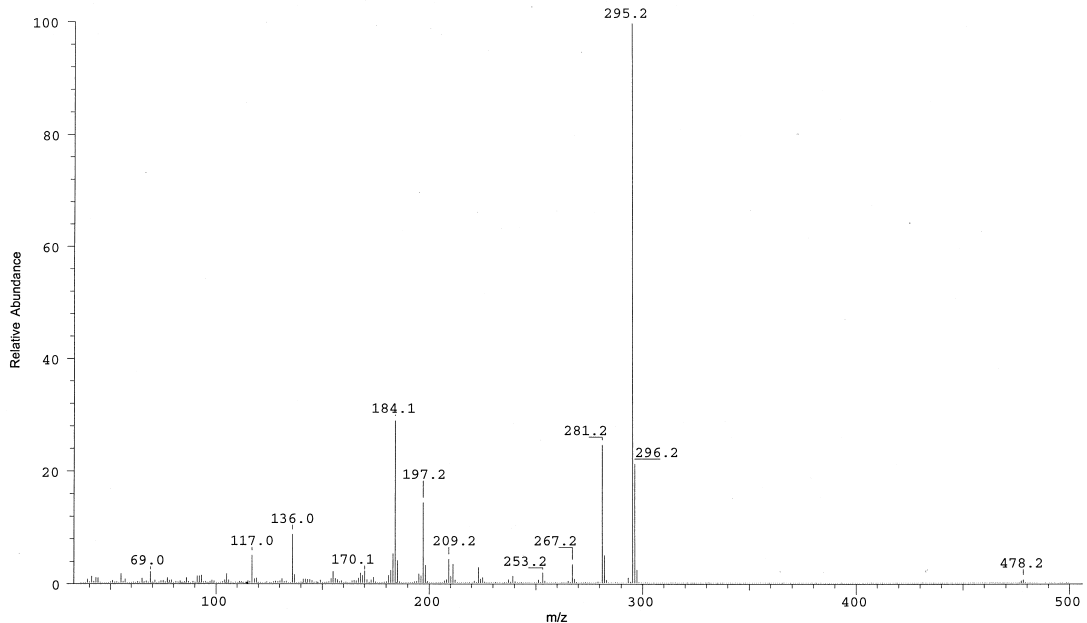


Abb. A.12: EI MS (70 eV) von 8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäurepentafluorphenolester **6**.

#### bpy\*-LS3 (7)

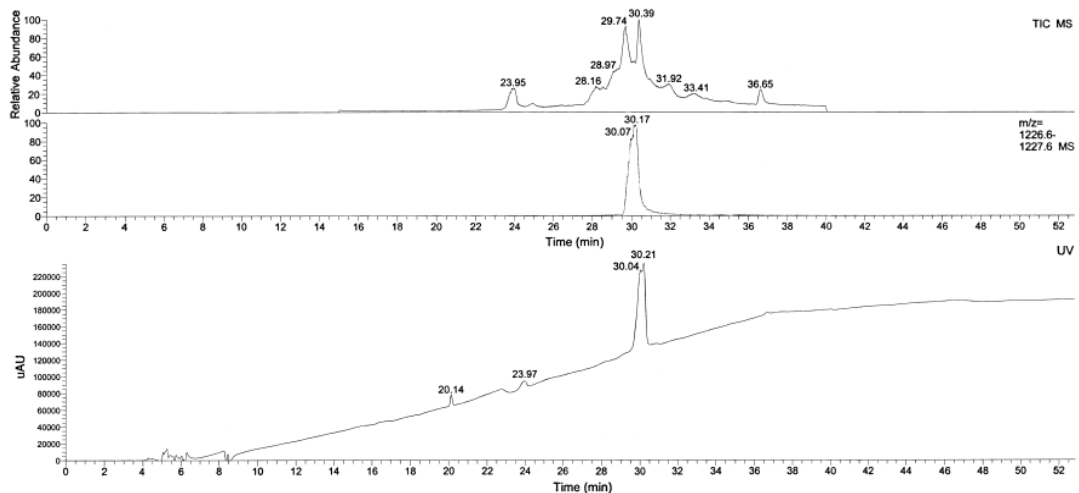


Abb. A.13: bpy\*-LS3 **7**: LC/MS-Kopplung des Rohprodukts der Synthese von bpy\*-LS3 **7**. Oben: Chromatogramm unter Massendetektion. Mitte: Chromatogramm unter Detektion des Massenpeaks  $m/z = 1226.6 - 1227.6$  [M+2H]<sup>2+</sup>. Unten: Chromatogramm unter UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 220 nm.

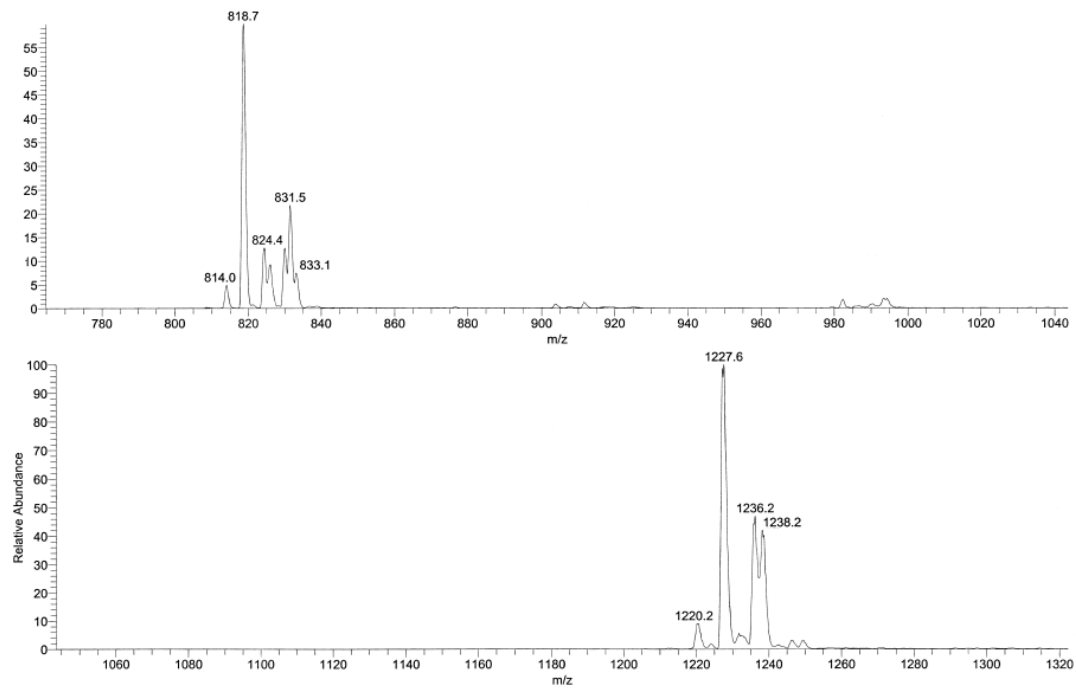


Abb. A.14: ESI+ MS von bpy\*-LS3 (7) (Retentionszeit: von 29.87 – 30.41 nm).

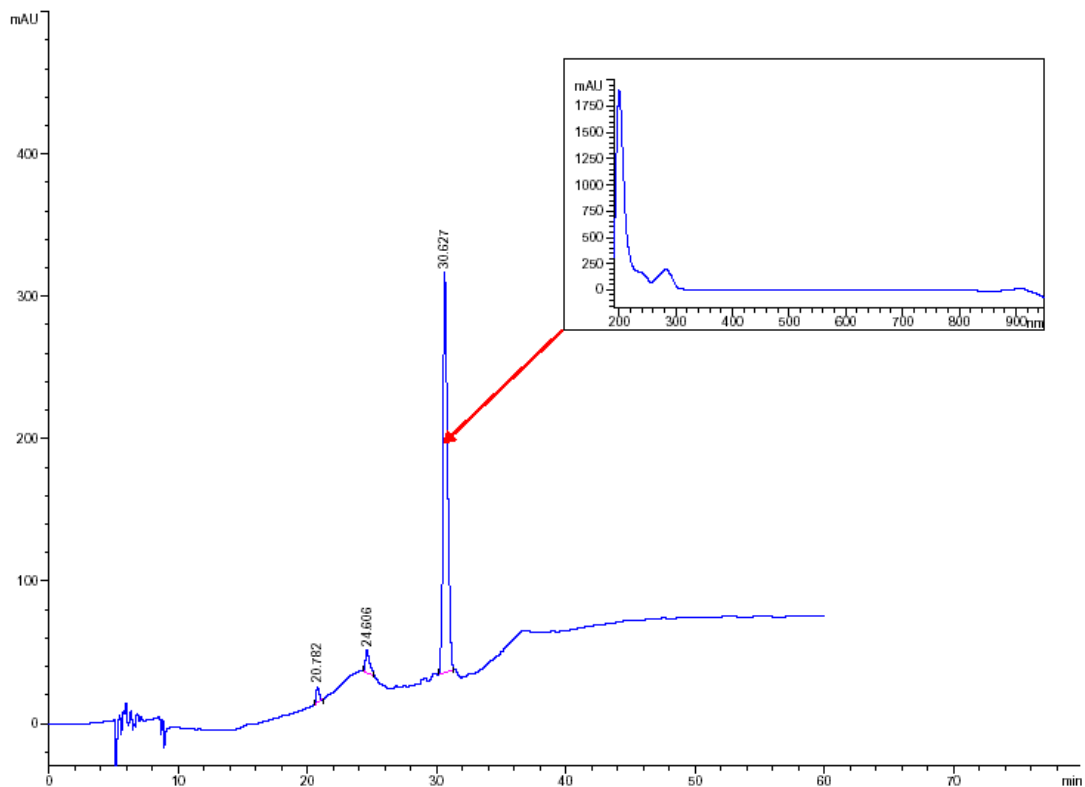


Abb. A.15: Chromatogramm eines typischen quantitativen HPLC-Laufs zur Aufreinigung von bpy\*-LS3 (7). Das Peptid eluierte bei einer Retentionszeit von 30.627 min. Ebenfalls abgebildet ist das UV-Spektrum des Peaks.

## A.2 Zusätzliche Tabellen

Tab. A.1: Übersicht über die Ergebnisse der LC/MS-Kopplung des Rohprodukts der LS3 1-Synthese.

Retentionszeit /min	Intensität / % <sup>♦</sup>	m/z [M+H] <sup>+</sup>	m/z [M+2H] <sup>2+</sup>	Bezeichnung	M / Da
13.30	21	678.4	-	M <sub>1</sub>	677.4
22.37	86	1256.0	628.6	M <sub>2</sub>	1255.0
26.83	7	-	966.9	M <sub>3</sub>	1931.8
27.63	12	-	1023.7	M <sub>4</sub>	2045.4
28.46	7	1958.7	980.0	M <sub>5</sub>	1957.7
29.90	13		1023.8	M <sub>6</sub>	2045.6
33.19	12	2072.2	1036.7	M <sub>7</sub>	2071.2
38.36	10	1229.0	615.3	M <sub>8</sub>	1228.0
39.33	12	-	936.6	M <sub>9</sub>	1871.2
40.36	15	1269.1	635.0	M <sub>10</sub>	1268.1
42.39	100	2159.4	1079.9	M	2158.4

Tab. A.2: Zusammenfassung der Parameter der Exponentialfunktionen 3. Ordnung von Histogrammanalysen unterschiedlicher Intervallbreite zur Bestimmung der mittleren Öffnungsdauern  $\tau_{\text{exp},i}$  für bpy\*-LS3 in nano-BLMs.

Intervallbreite: 2 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
18	3.7	0.3	5	16	5	0.3	79	89
Intervallbreite: 5 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
28	2.7	0.2	16	13	1	1.2	64	20
Intervallbreite: 10 ms								
$A_1$	$\tau_{\text{exp},1}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},1})$ / ms	$A_2$	$\tau_{\text{exp},2}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},2})$ / ms	$A_3$	$\tau_{\text{exp},3}$ / ms	$\sigma(\tau_{\text{exp},3})$ / ms
35	3.1	0.6	25	14	2	2	69	20

<sup>♦</sup> Es ist zu berücksichtigen, dass während der Messung die Basislinie anstieg.

### A.3 Symbolverzeichnis

$A$	Absorption, Amplitude, Analyt, Fläche
$A_c^*$	Absorption des komplexierten Liganden
$A_L^*$	Absorption des freien Liganden
$A_\infty^*$	Absorption im Gleichgewichtszustand bei möglichst vollständiger Komplexierung
$C$	geschlossener Zustand, Kapazität
$c$	Konzentration
$C_m$	Membrankapazität
$d$	Schichtdicke
$\varepsilon$	molarer dekadischer Absorptionskoeffizient
$F$	Fluoreszenz
$F_0$	Grundfluoreszenz
$F_{\text{norm}}$	normierte Fluoreszenz
$F_T$	Maximalfluoreszenz nach Tritonzugabe
$f$	Frequenz
$f_c$	Grenzfrequenz
$\Theta$	Phasenwinkel
$G$	Leitfähigkeit
$G_{\text{EKE}}$	Leitfähigkeiten der Einzelkanalereignisse
$G_\alpha$	mobile Gramicidin-Halbkanäle
$G_T$	immobilisierte Gramicidin-Halbkanäle
$I$	Intensität des austretenden Lichtstrahls
$I_0$	Intensität des eintretenden Lichtstrahls
$I_m$	Transmembranstrom
$K$	Komplexbildungskonstante
$k$	Geschwindigkeitskonstante, Übergangsrate
$l$	Länge einer Pore
$m/z$	Masse/Ladungs-Verhältnis
$N$	Anzahl der Peptide in einem Helix-Bündel
$O$	geöffneter Zustand
$R$	Radius einer Peptidhelix, Widerstand

$R_E$	Eingangswiderstand
$R_e$	Elektrolytwiderstand
$R_m$	Membranwiderstand
$R_p$	Porenwiderstand
$r$	Radius einer Pore
$r_{\text{calc}}$	nach Zylindermodell errechneter Porenradius
$r_{\text{eff}}$	anhand der Leitfähigkeiten errechneter Porenradius
$\rho$	spezifischer Widerstand
$S_0$	Singulettgrundzustand
$S_1$	erster angeregter Singulettzustand
$\sigma_G$	Breiteparameter, Standardabweichung der Leitfähigkeit
$\sigma_\tau$	Standardabweichung der mittleren Öffnungsdauer
$T_1$	erster angeregter Triplettzustand
$\tau$	mittlere Öffnungsdauer
$\tau_{\text{exp}}$	mittlere Öffnungsdauer aus der Anpassung einer Exponentialfunktion
$\tau_{\text{lin}}$	mittlere Öffnungsdauer aus linearer Regression
$t$	Zeit
$t_r$	Anstiegszeit eines Filters
$U$	Spannung
$U_m$	Transmembranspannung
$\omega$	Kreisfrequenz
$x_L$	molarer Anteil des freien Liganden
$Z$	Impedanz
$Z^{\text{Im}}$	Imaginärteil der Impedanz (Blindwiderstand)
$Z^{\text{Re}}$	Realteil der Impedanz (Wirkwiderstand)

## A.4 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
$\alpha$ HL	$\alpha$ -Hemolysin
BLM	<i>black lipid membrane</i>
bpy*	8-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)-octansäure
CD	Circulardichroismus
CI	chemische Ionisation
CT	<i>charge transfer</i>

DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPSTE	Dipalmitoylphosphatidylthioethanol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
F <sub>ab</sub>	Anitkörper-Fragment
Fmoc	Fluorenyl-9-methoxycarbonyl
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
ICS	<i>ion channel switch</i>
IS	Impedanzspektroskopie
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LMCT	<i>ligand to metal charge transfer</i>
LS3	H <sub>2</sub> N-(LSSLLSL) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MLCT	<i>metal to ligand charge transfer</i>
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , kernmagnetische Resonanz
ODT	Octadekanthiol
o-POE	Octyl-Polyoxyethylen
PADA	4-(2-Pyridylazo)- <i>N,N'</i> -Dimethylanilin
POE	Polyoxyethylen
POPC	1-Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PEG	Polyethylenglycol
PS	Polystyrol
SA	Streptavidin

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSM	<i>solid supported membrane</i>
tBLM	<i>tethered black lipid membrane</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton-X	[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol]ethoxylat
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i> , sichtbarer Bereich des Spektrums

## A.5 Chemikalien

Acetanhydrid	Merck (Darmstadt)
Aceton	Merck (Darmstadt)
ACN	Merck (Darmstadt)
8-Brom-1-octen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>n</i> -Butyllithium	Merck (Darmstadt)
5(6)-Carboxyfluorescein	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CDCl <sub>3</sub>	Merck (Darmstadt)
Chrom(VI)-oxid	Merck (Darmstadt)
DCM	Merck (Darmstadt)
<i>n</i> -Dekan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DIC	Merck (Darmstadt)
DIEA	Merck (Darmstadt)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Diisopropylamin	Merck (Darmstadt)
4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMF	Merck (Darmstadt)
DPhPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPTE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Eisessig	Merck (Darmstadt)

Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylacetat	Merck (Darmstadt)
Fmoc-Leu-OH	Advanced ChemTech (Giessen)
Fmoc-Ser( <sup>t</sup> Bu)-OH	Advanced ChemTech (Giessen)
HBTU	Advanced ChemTech (Giessen)
Hexan	Merck (Darmstadt)
HOBt·H <sub>2</sub> O	Fluka (Neu-Ulm)
Kaiser-Testkit	Fluka (Neu-Ulm)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kieselgel	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck (Darmstadt)
Natriumsulfat	Merck (Darmstadt)
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Octyl-Polyoxyethylen	Bachem (Weil am Rhein)
Oxalsäure-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Ortho-Phosphorsäure, 85 %ig	Merck (Darmstadt)
Pentafluorphenol	Merck (Darmstadt)
Piperidin	Fluka (Neu-Ulm)
POPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Pyridin	Merck (Darmstadt)
Quecksilber(II)-chlorid	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure, 95 –97 %	Merck (Darmstadt)
Stickstoff	Linde (München)
TentaGel-S RAM Fmoc	Advanced ChemTech (Giessen)
TFA	Riedel-de Haën (Seelze)
THF	Merck (Darmstadt)
TIS	Merck (Darmstadt)
Tris/HCl	USB (Cleveland, USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)



## A.6 Materialien

Aluminiumfolie, 0.5 mm Dicke	Goodfellow Cambridge Limited (Huntingdon, England)
Au-Target	Elektronen Optik Service (Dortmund)
DC-Platten	Merck (Darmstadt)
Kalrez O-Ringe	DuPont Dow Elast. (Newark, USA)
Pinsel Stärke 5	Pelikan (Hannover)
Polycarbonatmembranen	Armantis (Mannheim)
Schleifpapier P100	AEG (Frankfurt am Main)
Schwingquarz-Kristall für MTM10	Elektronen Optik Service (Dortmund)
Sephadex G25-Säule	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Silber-Draht, Ø 1.0 mm, gegläht	Goodfellow Cambridge Limited (Huntingdon, England)

## A.7 Geräte

### Synthese

Model 90 Tabletop Synthesizer	Advanced ChemTech (Giessen)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge Typ 00902	Christ (Hanau)
Rotationsverdampfer	Heidolph (Schwabach)
Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-2 LD	Christ (Osterode)

### *Voltage Clamp-Anlage*

Kammer BCH-22A	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, GmbH (March-Hugstetten)
Küvette CD22A-200	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, GmbH (March-Hugstetten)
A/D-Wandler DigiData 1322A	Axon Instruments (Union City, CA, USA)
Amplifier Axopatch 200B	Axon Instruments (Union City, CA, USA)

### Impedanzspektroskopie

Impedanz/Gain-Phase Analyzer SI 1260	Solartron Instr. (Farnborough, USA)
--------------------------------------	-------------------------------------

Dielectric Interface 1296

Solartron Instr. (Farnborough, USA)

**Ätzapparatur**

Keithley 2400 Source Meter

Keithley Instr. (Cleveland, USA)

Tektronix PS 280 DC Power Supply

Tektronix Inc. (Beaverton, USA)

Tektronix EA-PS 9300-00 DC

Tektronix Inc. (Beaverton, USA)

Power Supply

Ecoline RE 104

Lauda GmbH (Königshofen)

**Sputter-Anlage**

Sputter Coater 108 auto

Cressington (Watford, USA)

Thickness Controller mtm 20

Cressington (Watford, USA)

**UV- und Fluoreszenzspektroskopie**

Quarzglasküvette

Hellma GmbH (Mühlheim/Baden)

Cary 50 Scan UV-Visible

Varian (Darmstadt)

Spectrophotometer

Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer

Varian (Darmstadt)

**Reinstwasseranlage**

Milli Q RO 10 Plus

Millipore (Eschborn)

Milli Q plus 185

Millipore (Eschborn)

**Sonstige Geräte**

pH-Meter Knick 761 Calimatic

Knick (Berlin)

Vakuumtrockenschrank VD 23

Binder (Tuttlingen)

Plasma Cleaner PDC 32G-2

Harrick (New York, USA)

# Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle

Prof. Dr. Claudia Steinem für die interessante Aufgabenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und ganz besonders für die uneingeschränkte Unterstützung.

Dr. R. Vasold und seinen Mitarbeitern von der HPLC-Abteilung der Universität Regensburg für die Reinigung der Peptide.

Dr. K. K. Mayer und seinen Mitarbeitern, insbesondere Josef Kiermaier, von der MS-Abteilung der Universität Regensburg für die MS- und LC/MS-Messungen.

Dr. T. Burgemeister und seinen Mitarbeitern von der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die Messungen.

Prof. Dr. Andreas Janshoff vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz und seinem ganzen Arbeitskreis für die fachlichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Workshops in Nierstein und Oberwesel.

Allen aktuellen, sowie ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises in Göttingen und Regensburg für die gute Zusammenarbeit.

Meinem Laborkollegen Alexander Herrig, der immer einen Spruch auf den Lippen hatte, dafür, dass er jeden Tag im „*sunshine lab*“ zu einem Erlebnis machte und immer da war, wenn es ans „Messen“ ging.

Natascha für die aufbauenden Worte, für das unermüdliche Korrekturlesen der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und ganz besonders dafür, dass sie mir immer eine so gute Freundin war.

Daniela Weiskopf für ihre Hilfsbereitschaft, die „Eillieferungen“ nach Regensburg und dafür, dass sie mir zeitweise ein Dach über dem Kopf gegeben hat.

Eva Schmitt für die sehr gute Zusammenarbeit rund um die „Nanos“, die konstruktiven Diskussionen und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Den technischen Angestellten, insbesondere Hans-Georg und Jutta, für die stete Hilfsbereitschaft und die unterstützenden Arbeiten.

Alex, Manuela, Christian, Katja, Winni und Natascha für die wunderschöne Zeit in Regensburg, die Grillabende („G & G“) und sonstigen Aktivitäten.

Natascha und Manuela für ihren Einfallsreichtum bezüglich „neuer Seminarthemen“ und die lustigen Gespräche.

Meinen Studienfreunden Julia, Hannes, Tobi, Steve, ... für eine super Studienzeit und die unvergesslichen Feiern.

Simon für seine liebevolle Unterstützung, sein Verständnis, den Spaß, den wir zusammen haben und dafür, dass er mich so glücklich macht.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern dafür, dass sie immer hinter mir gestanden haben und ohne deren Beistand all dies nicht möglich gewesen wäre. Es ist gut zu wissen, dass man immer einen Platz hat, zu dem man zurückkehren kann.

# Lebenslauf

**Name** Claudia Pilz  
**geboren** 25. Dezember 1977  
**Eltern** Peter und Marianne Pilz (geb. Wittmann)

## Schulbildung

Sep 1984 – Jul 1988 Grundschule, Steinsberg-Eitelbrunn  
Sep 1988 – Jun 1998 Werner-von-Siemens-Gymnasium, Regensburg  
Allgemeine Hochschulreife am 26. Juni 1998

## Studium

Okt 1998 – Sep 2003 Studium der Chemie an der Universität Regensburg  
Vordiplom im Fach Chemie am 26. Oktober 2000  
Jan 2003 – Sep 2003 Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem  
Diplom im Fach Chemie am 19. September 2003

## Tätigkeiten

Okt 2003 – Mär 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg  
Apr 2006 – Jul 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität, Göttingen

## Dissertation

Beginn der Dissertation am 01. Oktober 2003 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem  
Weiterführung der Dissertation am 01. April 2006 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität, Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem

