

Charakterisierung der Wechselwirkung amphiphiler und polyphiler Moleküle mit Modellmembranen mittels Festkörper-NMR

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Chemie, Physik und Mathematik
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Anja Achilles

geboren am 10. Juli 1982 in Halle (Saale)

Halle (Saale), 25. November 2014

Datum der öffentlichen Verteidigung

30. März 2015

Gutachter

1. Prof. Dr. Kay Saalwächter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Dariush Hinderberger, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Daniel Huster, Universität Leipzig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
2. Grundlagen der NMR-Spektroskopie	5
2.1. Kernspin im Magnetfeld	5
2.2. Dichteoperator und Zeitentwicklung	7
2.3. Spinwechselwirkungen und Hamiltonoperatoren	9
2.3.1. Chemische Verschiebung	10
2.3.2. Dipolare Wechselwirkung	11
2.3.2.1. Darstellung der dipolaren Wechselwirkung mittels sphärischer Tensoren	15
2.3.2.2. Ordnungsparameter	17
3. 2D-Experimente zur Bestimmung homo- und heteronuklearer, dipolarer Restkopplungen	21
3.1. Das 2D-Experiment	22
3.2. Die DIPSHIFT-Sequenz	23
3.3. Die recoupled-DIPSHIFT-Sequenz	27
3.4. ^1H -Doppelquanten-NMR-Spektroskopie	31
3.4.1. Anregung von Doppelquantenkohärenzen	33
3.4.2. Normierte ^1H -Doppelquanten-Aufbaukurven	35
3.4.3. Doppelquanten-Seitenbanden-Spektren	37
4. Biologische Membranen und Modellmembranen	43
4.1. Aufbau und Phasenverhalten von Phospholipiden	43
4.2. NMR-Charakterisierung von Phospholipiden	46
4.2.1. NMR-Spektren von Phospholipiden	46
4.2.2. ^{13}C - ^1H Ordnungsparameter in Phospholipiden	49
4.2.3. Einfluss von Cholesterol auf die lokale Lipiddynamik	52
5. Wechselwirkung niedermolekularer Polyphile mit Modellmembranen	59
5.1. Das niedermolekulare Polyphil C12/12	59
5.2. C12/12 in der Modellmembran DPPC	64
5.2.1. Vorbetrachtungen	64
5.2.2. NMR-Untersuchungen an Mischungen aus C12/12 und DPPC	66
5.2.2.1. Quantitative Protonenspektren	66
5.2.2.2. Temperaturabhängige ^{13}C -Spektren	70
5.2.2.3. Dynamikmessungen an den Lipid-Polyphil-Mischungen	74
5.3. C12/12 in der Modellmembran DOPC	84
5.3.1. Vorbetrachtungen	84

5.3.2. NMR-Spektren und Dynamikmessungen	85
5.4. Zusammenfassung	89
6. Einfluss amphiphiler und polyphiler Blockcopolymerer auf Modellmembranen	91
6.1. Amphiphile und polyphile Blockcopolymerer	91
6.2. Wechselwirkung der Blockcopolymerer mit der Modellmembran DMPC	94
6.2.1. Vorbetrachtungen	94
6.2.2. NMR-Messungen an den Polymer-Lipid-Mischungen	95
6.2.2.1. ¹ H- und ¹³ C-Spektren der untersuchten Proben	95
6.2.2.2. Untersuchung der molekularen Dynamik der Polymer-Lipid-Mischungen	102
6.3. Zusammenfassung	112
7. Zusammenfassung und Ausblick	115
A. Anpassung der Dephasierungskurve einer CH₂-Gruppe	I
B. Probenpräparation	V
B.1. Reine Lipidproben	V
B.2. Mischungen aus Lipid und anderen Molekülen	V
B.3. Zersetzung von Phospholipiden	VI
C. Experimentelle Details	IX
C.1. Allgemeine Parameter	IX
C.2. DIPSHIFT und recoupled DIPSHIFT	IX
C.3. ¹ H-DQ-Aufbaukurven	X
C.4. DQ-Seitenbanden-Spektren	X
C.5. 2D-NOESY-Spektren	XIII
D. Datenauswertung der ¹H-DQ-Aufbaukurven der Lipid-Polymer-Mischungen	XVII
Literaturverzeichnis	XXI
Publikationsliste	XLI

Abkürzungsverzeichnis

FID	Free Induction Decay - gemessene Signalfunktion
MAS	Magic Angle Spinning - schnelle Probenrotation unter dem magischen Winkel
PAS	Principal Axes System - Hauptachsensystem eines Tensors
LF	Laboratory Frame - Laborkoordinatensystem
cs	chemical shift - Chemische Verschiebung
SLF	Separated Local Field - Experimente
DIPSHIFT	Dipolar and Chemical Shift Correlation - Pulssequenz
BaBa	Back-to-Back - Pulssequenz
TMSI	Trimethylsulfoniumiodid
DQ	Doppelquanten
MQ	Multiquanten
NQ	Nullquanten
EQ	Einquanten
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
MLV	Multilamellare Vesikel
SUV	kleine (small) unilamellare Vesikel
GUV	große unilamellare Vesikel
PPO	Poly(propylenoxid)
PGMA	Poly(glycerolmethacrylat)
PEO/PEG	Poly(ethylenoxid)/Poly(ethylenglycol)
GP	amphihiles Blockcopolymer PGMA-PPO-PGMA
FGP	polyphiles Blockcopolymer F-PGMA-PPO-PGMA-F
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy - Pulssequenz

1 | Einleitung

Der menschliche Körper besteht aus ungefähr 100 Billionen Zellen, wobei jede dieser Zellen eine bestimmte Funktion besitzt [1, 2]. Allen Zellen gemeinsam ist eine Zellmembran, welche die Grenze zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle bildet und eine Vielzahl von Aufgaben erfüllt. Sie stabilisiert die Zelle und reguliert als Barriere, welche Moleküle in die Zelle hinein und auch hinaus gelangen, um die Funktion der Zelle aufrecht zu erhalten. Daher stellen Zellmembranen einen wesentlichen, wenn nicht sogar den wichtigsten Baustein für das Leben dar. Dies wurde bereits vor über einhundert Jahren erkannt und ist seitdem Gegenstand der Forschung [3].

Im Wesentlichen besteht eine Zellmembran aus einer Doppelschicht, die aus verschiedenen Lipiden aufgebaut ist und in die Proteine, sowie Cholesterol ein- bzw. angelagert sind [4]. Die Membranproteine übernehmen dabei ebenfalls vielfältige Funktionen in der Membran; sie spielen vor allem beim Stoffaustausch über die Membran hinweg eine bedeutende Rolle, z.B. als Ionenkanäle und Transporter [5, 6].

Dass die Membran und deren Proteine richtig zusammenarbeiten ist enorm wichtig, da viele Krankheiten durch Fehlfunktionen innerhalb der Membran entstehen. Beispielsweise werden Krankheiten wie Mukoviszidose oder auch Epilepsie durch Fehlfunktionen von Ionenkanälen verursacht bzw. begünstigt [7, 8]. Ein anderes Beispiel ist die Signalübertragung an den Todesrezeptoren der Zellen. Ist diese gestört, kann der programmierte Zelltod von geschädigten Zellen nicht ausgeführt werden und es kommt zum unkontrollierten Zellwachstum, was letztendlich die Entstehung von Tumoren fördert [9]. Eine ungeplante Signalübertragung an diesen Rezeptoren ist bei vielen degenerativen Krankheiten für das Zellsterben verantwortlich [10].

Um die Funktionsweise der Membran und ihrer Bestandteile beeinflussen bzw. Defekte eventuell beheben zu können, wird seit mehr als dreißig Jahren auf dem Gebiet synthetischer Ionenkanäle geforscht [11–15]. Im Vordergrund stehen Moleküle mit einem starren Rückgrat deren Länge der Dicke der Membran entspricht, und die einen Ionentransport ermöglichen [16, 17]. Eine viel versprechende Gruppe stellen einfache strukturelle Verbindungen dar, die „Aplosspan“ genannt werden. Diese Moleküle bilden in der Membran Kanäle bzw. Poren und zeigen ein klassisches Schließverhalten oder sogar Ionenselektivität [18, 19]. Aber auch andere stäbchenförmige Moleküle, bestehend aus einem Rückgrat mit mehreren Phenylringen, können in der Membran als synthetische Ionenkanäle bzw. Poren agieren [20–23]. Diese so genannten Bolapolyphile, d.h. Moleküle mit einer hydrophoben Einheit und zwei hydrophilen Endgruppen, stellen durch die Möglichkeit zur Porenbildung ebenfalls potentielle Kandidaten für den Ionentransport dar [13, 24]. Des Weiteren erwiesen sich Makrozyklen verschiedener Moleküle als funktionierende Poren in der Membran, z.B. als transmembrane Wasserkanäle [23, 25], wobei einige dieser Makrozyklen über nicht-kovalente Bindungen ihre Größe an die des zu transportierenden Stoffes anpassen können [26]. Wieder andere Moleküle zeigten einen durch Spannung kontrollierbaren Stofftransport [27].

Es gibt viele Ansätze, Fehlfunktionen von Membranproteinen durch synthetische Moleküle zu beheben. Es ist jedoch auch von großer Wichtigkeit, zu verstehen, wie diese synthetischen Moleküle mit den Lipidmolekülen wechselwirken. Diese Wechselwirkung für ein bestimmtes, synthetisches Molekül zu untersuchen, stellt ein Teilgebiet dieser Arbeit dar.

Ein weiteres großes Forschungsgebiet im Zusammenhang mit Membranen beschäftigt sich mit dem Arzneimitteltransport. Vor allem für Medikamente bildet die Zellmembran die erste Barriere, um an ihren Wirkungsort zu gelangen. Dies stellt eine besondere Herausforderung dar, da nicht jeder Stoff ohne Weiteres die Membran passieren kann. Daher bietet die Entwicklung und Synthese neuartiger Arzneiträgerstoffe eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu überwinden und so Medikamente schneller zum Ziel transportieren zu können. Auch hier gibt es Ansätze, welche so genannte faziale, amphiphile Moleküle benutzen, um Arzneimittel zu transportieren. Das amphiphile Molekül bildet mit dem zu transportierenden Stoff gemischte Aggregate und könnte so die Membranbarriere überwinden [28]. Auf dem Gebiet des Arzneimitteltransports hat sich jedoch eine andere Gruppe von Molekülen von großer Bedeutung erwiesen: die Poloxamere oder auch Pluronic[®] [29–31]. Dies sind synthetische Blockcopolymere, welche aus Blöcken mit unterschiedlicher Philie aufgebaut sind. Für Membranen konnte eine erhöhte Permeabilität für bestimmte Medikamente festgestellt werden, sobald ein Poloxamer in der Membran vorhanden ist [32–37]. Auch können durch supramolekulare Polymere je nach hydrophiler Blocklänge entweder hydrophobe oder hydrophile Stoffe transportiert werden [38]. Kovalente Verbindungen von Lipiden und Polymeren zeigten eine erhöhte Aufnahme von Arzneistoffen, welche so über die Membranbarriere hinweg transportiert werden können [39].

Ein anderer, interessanter Einfluss von Poloxameren auf Membranen wird allgemein als „Membran-Versiegelungs-Effekt“ bezeichnet. Hierbei zeigte sich, dass hydrophilere Poloxamere dazu neigen, sich dort oberflächlich in die Membran einzubauen, wo die Packungsdichte der Lipidmoleküle verringert ist [40–45]. Dies ist vor allem bei beschädigten Zellen der Fall. Normalisiert sich der Zustand der Membran, werden die Polymermoleküle wieder aus der Membran „herausgedrückt“ [43], oder können durch Änderung der Temperatur kontrolliert aus der Membran entfernt werden [46].

Eine weitere sehr bedeutende Anwendung von amphiphilen Polymeren in der Arzneimittelforschung sind sogenannte Multidrug-Resistenzen. Dies sind Resistenzen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen, wie sie z.B. in Tumorzellen gefunden werden. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften sind die Polymere in der Lage mit der Membran zu wechselwirken und so deren Eigenschaften zu verändern. Dies beeinflusst unter anderem auch die Funktion der Transporter, welche in den Mechanismus der Resistenz eingebunden sind [34, 37, 47]. Daher bietet der Einsatz amphiphiler Polymere Möglichkeiten, solche Resistenzen zu überwinden und die Wirkung von Arzneimitteln zu verbessern.

Wird den amphiphilen Polymeren ein weiteres Strukturelement, wie z.B. Fluorketten, zugefügt, bietet dies ebenfalls Ansatzpunkte für den Medikamententransport durch Membranen [48, 49], da durch den Einbau der fluorierten Polymere unter anderem die Permeabilität der Membran erhöht wird [50–52]. Weiterhin wurde durch den Einbau fluorierter Polymere bzw. fluorierter Anteile in Liposomen eine verbesserte Langzeitstabilität dieser Liposomen gefunden [53–56]. Auch mit fluorierten Molekülen ist es möglich, Arzneimittelresistenzen zu überwinden [33]. Ein gezielter Einbau von Membranproteinen ist mit Hilfe fluorierter, amphiphiler Moleküle ebenso erreichbar [57].

All diesen Anwendungen für synthetische Moleküle in Membranen ist gemeinsam, dass der zu Grunde liegende Wechselwirkungsmechanismus zwischen den einzelnen

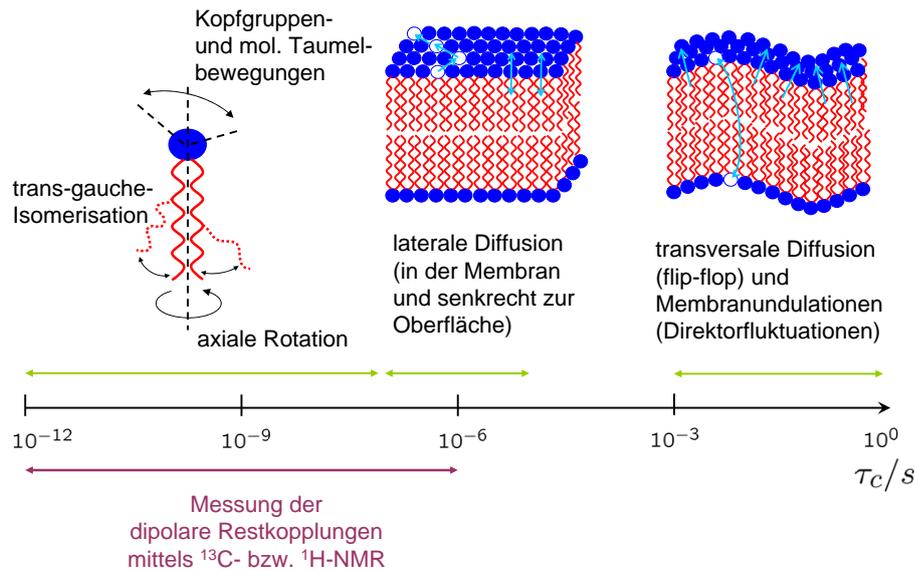


Abbildung 1.1.: Molekulare Bewegungen von Lipidmolekülen in der Doppelschicht überspannen eine sehr großen Zeitbereich und spiegeln somit die dynamischen Eigenschaften der Membran wider.

Komponenten nicht vollständig verstanden ist. Welche Einflüsse auf die Struktur der Membran oder die Dynamik gibt es durch den Einbau der Gastmoleküle? Ändern sich die Eigenschaften der Membran durch den Einbau synthetischer Moleküle und wenn ja, in welcher Weise? Wie ordnen sich die Gastmoleküle in der Membran an? In dieser Arbeit wurden diese Fragen für ausgewählte Substanzen untersucht und im Rahmen der erzielten Ergebnisse beantwortet.

Die Membran selber stellt ein dynamisches Gebilde dar, in dem sich eine sehr breite Zeitskala der molekularen Bewegungen finden lässt (s. Abb. 1.1) [58–60]. Die schnellsten molekularen Bewegungen sind Kettenisomerisationen mit Korrelationszeiten im Bereich von ca. $\tau_c \approx 10^{-12} - 10^{-11}$ s. Für Korrelationszeiten im Bereich $\tau_c \approx 10^{-9} - 10^{-7}$ s können molekulare Rotationen sowie Wackel-/Taumelbewegungen gefunden werden. Die laterale Diffusion in der Lipiddoppelschicht findet im Zeitbereich von ca. $\tau_c \approx 10^{-6}$ s statt. Die langsamsten Bewegungen in der Membran sind einerseits die so genannten Flip-Flop-Prozesse (auch: transversale Diffusion) und andererseits die Undulationsbewegung der Doppelschicht an sich. Dies finden mit Korrelationszeiten von Millisekunden bis Sekunden statt. Aufgrund dieser Vielzahl an Bewegungen besitzt die Membran eine dynamische Struktur [61, 62]. Durch den Einbau bzw. die Wechselwirkung mit Fremdmolekülen können sowohl die Struktur als auch die Dynamik der Lipidmoleküle, aber auch der Membran im Ganzen, verändert sein [63, 64]. Um dies zu untersuchen, bietet die Festkörper-NMR vielfältige Möglichkeiten, da sie einen großen Zeitbereich von Bewegungen abdeckt [65] und auch für Strukturuntersuchungen sehr gut geeignet ist [61, 66]. Daher hat sich die NMR-Spektroskopie in den letzten Jahrzehnten zu einer der wichtigsten Methoden für Struktur- und Dynamikuntersuchungen biologischer Moleküle entwickelt [66]. Viele dieser Untersuchungen benutzten Deuterium-NMR zur Bestimmung von Ordnungsparmetern [59, 60, 67–70]. Eine ebenfalls sehr viel genutzte Methode zur Ermittlung der Wechselwirkung amphiphiler Moleküle in Modellmembranen ist die Fluoreszenzspektroskopie [22, 35, 37, 71–74]. Ein wesentlicher Nachteil dieser beiden Methoden ist jedoch, dass sie auf spezielle markierte Moleküle angewiesen sind, die wiederum die Eigenschaften der Membran beeinflussen können [75]. Es ist generell von Vorteil, die zu untersuchenden Proben so wenig wie möglich zu modifizieren, um eventuell daraus resultierende Einflüsse

zu umgehen. Diesen Vorteil bieten unter anderem NMR-Untersuchungen an Protonen und Kohlenstoffkernen in natürlicher Häufigkeit.

Oft werden die Einflüsse auf die Modellmembran auch mit Hilfe von ^{31}P -NMR untersucht. Da Phosphor aber nur in einem molekularen Abschnitt der Lipide vorkommt, können nur Aussagen über die Beeinflussung bzw. Wechselwirkungen in diesem Bereich getroffen werden [69, 70]. Kohlenstoffatome und Protonen sind dagegen in allen molekularen Bereichen der Lipidmoleküle vorhanden und bieten daher eine gute Basis zur Charakterisierung der Wechselwirkungen, sowohl an der Oberfläche der Membran als auch im Inneren. Die Entwicklung der mehrdimensionalen NMR-Experimente liefert Möglichkeiten, verschiedene NMR-Wechselwirkungen innerhalb eines Experimentes gleichzeitig zu detektieren [76, 77]. Durch die Ermittlung der dipolaren Restkopplung zwischen verschiedenen Kernen ist es möglich, die Struktur und Dynamik von Molekülen zu untersuchen [78–81]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits das DIPSHIFT-Experiment verwendet und weiterentwickelt [82], und andererseits Protonen-Doppelquanten-Experimente, um strukturelle und dynamische Informationen der Lipid- und der Gastmoleküle zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkung neuer synthetisierter, amphiphiler und polyphiler Moleküle mit Modellmembranen mittels Festkörper-NMR zu charakterisieren. Dazu werden im Kapitel 2 die Grundlagen der NMR-Spektroskopie näher erläutert. In Kapitel 3 wird anschließend auf die zweidimensionalen Experimente eingegangen, die in dieser Arbeit benutzt wurden. Nachfolgend werden in Kapitel 4 die Eigenschaften von Modellmembranen auf Basis von NMR-Ergebnissen beschrieben, um im Weiteren eventuell vorhandene Unterschiede zu den Eigenschaften in Anwesenheit von Gastmolekülen erkennen zu können. In Kapitel 5 und 6 werden die synthetischen, amphiphilen Moleküle bzw. Blockcopolymere und deren Wechselwirkung mit Modellmembranen, nach bisherigem Kenntnisstand, erstmals systematisch mit Hilfe von NMR-Messungen untersucht. Eine Zusammenfassung findet sich im Anschluss an diese Ausführungen.

2 | Grundlagen der NMR-Spektroskopie

2.1 | Kernspin im Magnetfeld

Eine intrinsische Eigenschaft von Atomkernen ist ihr Eigendrehimpuls I , auch Kernspin genannt, der mit einem magnetischen Moment μ über die Beziehung

$$\mu = \gamma I \quad (2.1)$$

verknüpft ist. Der Proportionalitätsfaktor γ wird als gyromagnetisches Verhältnis bezeichnet und ist eine kernspezifische Konstante. Da der Kernspin ein Drehimpuls ist, also einen Vektor darstellt, wird er durch einen Betrag und eine Richtung charakterisiert. Die Richtung des Kernspins wird dabei als Polarisationsrichtung bezeichnet.

Befindet sich eine Probe im Gleichgewicht (ohne äußere Einwirkungen), so ist die Verteilung der vorhandenen magnetischen Momente isotrop. Das heißt, es sind alle Orientierungen gleich wahrscheinlich und es existiert keine bevorzugte Polarisationsrichtung (s. Abb. 2.1(a)). Wird die Probe in ein äußeres Magnetfeld B_0 gebracht, so wirkt auf die Spins ein Drehmoment D , welches senkrecht auf den beiden erzeugenden Vektoren μ und B_0 steht:

$$D = \mu \times B_0, \quad (2.2)$$

mit der zugehörigen Energie

$$E_{\text{magn}} = -\mu \cdot B_0 = -|\mu| |B_0| \cos \angle(\mu, B_0). \quad (2.3)$$

Für eine parallele Ausrichtung der beiden Größen wird die Energie des Systems auf längeren Zeitskalen (jenseits der sog. Spin-Gitter-Relaxationszeit) minimal. Als Konsequenz ist die isotrope Orientierungsverteilung der Spins im angelegten Magnetfeld nicht mehr gegeben und eine makroskopische Magnetisierung in Richtung des angelegten Magnetfeldes entsteht (s. Abb. 2.1(b)). Die Energien der Spinzustände spalten dabei in $2(I + 1)$ unterschiedliche Niveaus auf, was als Kern-Zeeman-Effekt bezeichnet wird [83]. Das wirkende Drehmoment führt dazu, dass die Spins auf kurzen Zeitskalen eine Präzessionsbewegung um die Richtung des äußeren Magnetfeldes B_0 beginnen. Der Winkel des Kreiskegels ist dabei von der ursprünglichen Polarisationsrichtung der einzelnen Spins abhängig. Die Frequenz, mit der die Spins ihre Präzessionsbewegung ausführen, heißt Larmorfrequenz ω_0 und hängt vom angelegten Magnetfeld B_0 in der Form

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (2.4)$$

ab. Bei dieser Präzessionsbewegung handelt es sich um einen Nichtgleichgewichtszustand, der direkt nach dem Einbringen der Probe in das Magnetfeld vorhanden ist. Für längere Zeiten geht das System in einen Gleichgewichtszustand (parallele oder antiparallele Orientierung) über, so dass die Spins wegen des fehlenden Drehmoments keine Präzessionsbewegung mehr ausführen.

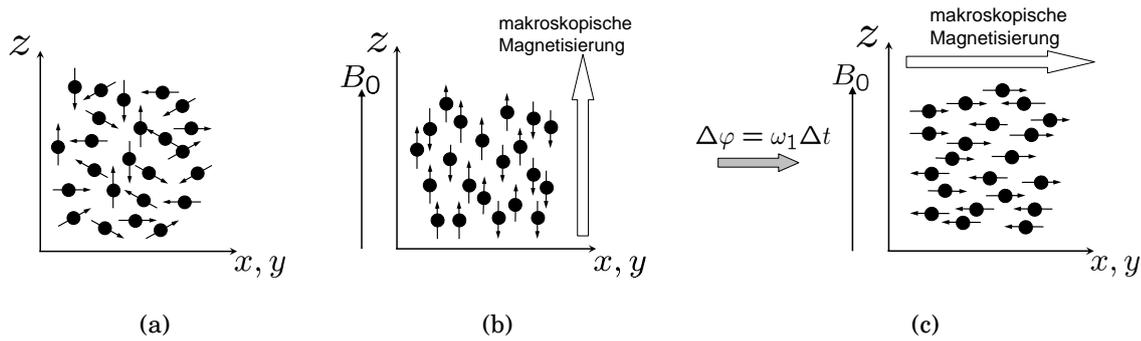


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Orientierungsverteilung der Spins: (a) Ohne Magnetfeld sind die Spins isotrop verteilt; es gibt keine Vorzugsrichtung. (b) Wird ein externes Magnetfeld B_0 in z -Richtung angelegt, bildet sich eine Vorzugsrichtung der Spinorientierungen aus. In der Summe ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung in Richtung des angelegten Feldes. (c) Durch Einstrahlen eines weiteren Feldes (z.B. ein Hochfrequenzpuls) mit einer Frequenz $\omega_1 = \omega_0$ für die Zeit Δt , ändert sich die Orientierung der Spins um den Winkel $\Delta\varphi = \omega_1 \Delta t$. In der Darstellung entspricht dieser Winkel gerade 90° . Die bevorzugte Polarisationsrichtung ist nach dem Puls die x - oder y -Richtung, also senkrecht zum angelegten Magnetfeld B_0 .

Organische Materialien bestehen zu einem großen Teil aus Protonen und Kohlenstoffatomen. Für die NMR spielen nur die Isotope mit Kernspin $I \neq 0$ eine Rolle. Da die Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich an Kernen mit $I = 1/2$ durchgeführt wurden, beziehen sich die folgenden Betrachtungen nur auf diese so genannten Spin-1/2-Kerne.

Wie bereits erwähnt, führt das Einbringen der Probe in ein Magnetfeld zum Aufspalten der Energieniveaus in $2(I + 1)$ verschiedene Werte. Diese Aufspaltung durch den Zeeman-Effekt bildet die Basis für die NMR-Spektroskopie. Durch Einstrahlen einer geeigneten Hochfrequenzwelle ist es möglich, Kohärenzen zwischen den zu den Energien gehörenden Spinzuständen zu erzeugen. Die Hochfrequenzwelle führt zu einer Änderung der bevorzugten Polarisationsrichtung der Spins um einen Winkel $\Delta\varphi$ abhängig von der Dauer Δt der Hochfrequenzeinstrahlung ($\Delta\varphi = \omega_1 \cdot \Delta t$), wobei ω_1 der Nutationsfrequenz des eingestrahlenen Feldes entspricht. Die Dauer der Einstrahlung wird meist so gewählt, dass sich die Orientierung der Polarisationsrichtung um einen Winkel von 90° dreht (s. Abb. 2.1(c)). Dies führt dazu, dass die makroskopische Magnetisierung um die Richtung des eingestrahlenen Magnetfeldes präzediert. Bei dieser klassischen, bildhaften Beschreibung handelt sich um ein Modell, welches der Veranschaulichung dient und keine exakte Darstellung der Spinzustände repräsentiert. Für die Betrachtung dieser Zustände ist eine quantenmechanische Beschreibung notwendig (s. Kap. 2.2).

Während die makroskopische Magnetisierung entlang der z -Achse als longitudinal bezeichnet wird, wird die Magnetisierung in einer Ebene senkrecht zum äußeren Magnetfeld transversal genannt. Die makroskopische Magnetisierung ist zwar sehr klein, kann jedoch gemessen werden, da sie mit der definierten Frequenz ω_1 oszilliert. Diese präzedierende, transversale Magnetisierung induziert einen elektrischen Strom, der mit Hilfe einer Hochfrequenz-Spule detektiert werden kann. Dieses Signal wird in der NMR-Spektroskopie als FID (*Free Induction Decay*) bezeichnet. Durch die Fluktuationen der lokalen Magnetfelder am Ort der Kernspins verlieren die Spins ihre Phasenbeziehung in der transversalen Ebene. Das in der Spule induzierte Signal wird kleiner und langfristig Null. Es nimmt mit der Zeitkonstante T_2 ab, welche als transversalen Relaxationszeit bezeichnet wird. Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, dass die Relaxationszeit, die

das System benötigt, um nach einer Störung seinen Gleichgewichtszustand wieder zu erreichen, mit T_1 bezeichnet und longitudinale Relaxation genannt wird.

2.2 | Dichteoperator und Zeitentwicklung

Neben dem skizzierten Vektorbild der NMR, darf nicht vergessen werden, dass es sich bei dem Kernspin um eine quantenmechanische Größe handelt. Daher ist es notwendig die Dynamik eines Spin-Ensembles unter einer bestimmten Wechselwirkung anhand quantenmechanischer Betrachtungen zu ermitteln.

In der Quantenmechanik wird der Zustand eines Systems durch die Gesamtwellenfunktion $|\Psi\rangle$ beschrieben. Eine physikalische Messgröße Q entspricht dem Erwartungswert des zugehörigen Operators \hat{Q} :

$$Q = \langle \Psi | \hat{Q} | \Psi \rangle . \quad (2.5)$$

Die Gesamtwellenfunktion $|\Psi\rangle$ lässt sich im Allgemeinen als eine Superposition der Eigenzustände des Operators \hat{Q} darstellen. Für einen Kernspin ($I=1/2$) beispielsweise sind dies die Eigenzustände $|\alpha\rangle = |\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\rangle$ und $|\beta\rangle = |\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}\rangle$. Eine Messung am System liefert stets einen Eigenwert des Operators, wobei es grundsätzlich nicht möglich ist, vorherzusagen, welcher Eigenwert tatsächlich gemessen wird; dies unterliegt der Statistik. Das gilt ebenso für die Kernspins, weshalb ohne eine Messung nicht festgelegt werden kann, in welchem Zustand sich dieser befindet ($|\alpha\rangle$, $|\beta\rangle$ oder einer Superposition). Eine Darstellung wie in Abb. 2.1 gezeigt, ist somit immer nur als Modell zu verstehen und spiegelt nicht die Wirklichkeit wider. Befindet sich der Spin z.B. im Eigenzustand $|\alpha\rangle$ und wird die z-Komponente des Drehimpulses gemessen¹, liefert dies mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% stets den Eigenwert 1/2. Für Superpositionszustände, welche sich aus den Eigenzuständen der Spins und deren Wahrscheinlichkeiten ergeben, ist der Spin in einem Zustand maximaler Unbestimmtheit (alle Eigenzustände sind gleich wahrscheinlich). Auch in diesem Fall hat eine Messung zur Folge, dass ein Eigenwert erhalten wird, aber es ist nicht bestimmt, welcher. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines der beiden Eigenzustände beträgt jeweils 50%.

Um den Zustand eines Systems zu beschreiben, ist es prinzipiell möglich, über alle Einzelzustände des Ensembles zu summieren, was jedoch aufgrund der großen Anzahl an Einzelspins ($\approx 10^{23}$) nicht praktikabel ist. Da das Ensemble als quantenmechanische Gesamtheit aufgefasst werden kann, wird der Dichteoperator $\hat{\rho}(t)$ eingeführt. Mit diesem kann der Quantenzustand eines Ensembles beschrieben werden, ohne die Spinzustände im Einzelnen betrachten zu müssen.

Mit der Entwicklung der Wellenfunktion $|\Psi(t)\rangle$ in einer vollständigen, orthonormalen Basis der Eigenfunktionen $|\psi_i\rangle$,

$$|\Psi(t)\rangle = \sum_i c_i(t) |\psi_i\rangle , \quad (2.6)$$

und den Koeffizienten $c_i = \langle \psi_i | \Psi \rangle$, ergibt sich der Dichteoperator zu

$$\hat{\rho}(t) = \sum_{i,j} \overline{c_i(t)c_j^*(t)} |\psi_i\rangle \langle \psi_j| . \quad (2.7)$$

Die $\rho_{i,j}(t) = \overline{c_i(t)c_j^*(t)}$ definieren dabei die Elemente der Dichtematrix [77]. Die Diagonalelemente der Dichtematrix ($i=j$) werden als Populationen der Spinzustände bezeichnet.

¹Diese Komponente entspricht in diesem Fall dem Operator \hat{Q} .

Sind die Populationen der einzelnen Spinzustände unterschiedlich, entsteht longitudinale Magnetisierung. Die Nicht-Diagonalelemente der Dichtematrix werden als Kohärenz bezeichnet. Sie stellen Superpositionszustände zwischen den Eigenzuständen $|\Psi_i\rangle$ und $|\Psi_j\rangle$ dar. Eine solche Kohärenz kann durch Einstrahlen eines Hochfrequenzpulses erzeugt werden. Dadurch kann sich die Quantenzahl des Spinzustandes ändern. Entspricht diese Änderung dem Wert eins, wird durch die Kohärenz transversale Magnetisierung charakterisiert. Ist die Änderung der Spinquantenzahl größer als eins, werden durch die Nicht-Diagonalelemente der Dichtematrix so genannte Multiquantenkohärenzen repräsentiert, die keiner (direkt) messbaren Magnetisierung entsprechen und somit nur indirekt beobachtbar sind (s. Kap. 3.4).

Wird ein System im thermischen Gleichgewicht betrachtet, befindet sich dieses System mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in einem seiner möglichen Eigenzustände. In der Hochtemperatur-Näherung ist die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung der verschiedenen Eigenzustände durch die Boltzmann-Verteilung gegeben. Der entsprechende Dichteoperator im thermischen Gleichgewicht bei einer Temperatur T lautet:

$$\hat{\rho}_{\text{GGW}} = \frac{1}{Z} e^{-\frac{\hat{H}}{kT}}, \quad (2.8)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k und der kanonischen Zustandssumme Z , die über

$$Z = \text{Sp}(e^{-\frac{\hat{H}}{kT}}) \quad (2.9)$$

definiert ist. Die Dichtematrix eines Systems ist im thermischen Gleichgewicht diagonal und es existieren folglich keine Kohärenzen zwischen den verschiedenen Eigenzuständen.

Für die in der NMR verwendeten Magnetfelder kann die Zeeman-Wechselwirkung als dominante Interaktion angenommen werden, deren Hamiltonoperator die Form $\hat{H} = \omega_0 \hat{I}_z$ besitzt. Im Rahmen der Hochtemperatur-Näherung ist der Dichteoperator $\hat{\rho}$ im thermischen Gleichgewicht durch

$$\hat{\rho}_{\text{GGW}} \approx \frac{1}{Z} \left(\hat{\mathbb{1}} + \frac{\hbar\omega_0}{kT} \hat{I}_z \right) \quad (2.10)$$

gegeben.

Unter Annahme einer Wechselwirkung \hat{H} kann sich der Zustand des Spinsystems ändern und über die Bewegungsgleichung des Dichteoperators beschrieben werden. Aus der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung folgt der Zusammenhang

$$\frac{d}{dt} \hat{\rho}(t) = -i [\hat{H}, \hat{\rho}(t)], \quad (2.11)$$

welcher als Liouville-von-Neumann-Gleichung bekannt ist. Die formale Lösung dieser Differentialgleichung (2.11) lautet für einen zeitabhängigen Hamiltonoperator:

$$\hat{\rho}(t) = \hat{U}(t) \hat{\rho}(0) \hat{U}(t)^{-1}, \quad (2.12)$$

mit dem Propagator $\hat{U}(t) = \hat{T} e^{\int_0^t dt' \hat{H}(t')}$. Der Dyson-Zeitordnungsoperator \hat{T} gewährleistet die chronologische Reihenfolge der vorkommenden Operatoren. Ist der Zustand eines Spinsystems zu einem Zeitpunkt $t = 0$ bekannt, kann daraus der Zustand des Systems zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt $t > 0$ bestimmt werden. Dies ist jedoch wegen der Zeitabhängigkeit des Hamiltonoperators im Allgemeinen sehr kompliziert. Wird

angenommen, dass der Hamiltonoperator in kleinen Zeitintervallen zeitunabhängig ist, kann die zeitliche Entwicklung des Dichteoperators durch

$$\hat{\rho}(t_1 + t_2 + \dots + t_n) = e^{-i(\hat{H}_n t_n)} \dots e^{-i(\hat{H}_2 t_2)} e^{-i(\hat{H}_1 t_1)} \hat{\rho}(0) e^{i(\hat{H}_1 t_1)} e^{i(\hat{H}_2 t_2)} \dots e^{i(\hat{H}_n t_n)} \quad (2.13)$$

beschrieben werden, wobei die \hat{H}_n die für das jeweilige Zeitintervall wirkenden Hamiltonoperatoren sind. Ausgehend von Gleichung (2.12) kann die Zeitentwicklung eines Spinsystems $\hat{\rho}(t)$ unter einer Wechselwirkung beschrieben werden. Dazu muss der entsprechende Hamiltonoperator zu jeder Zeit t bekannt sein. Mittels *average Hamiltonian*-Ansatz [84] kann die Zeitentwicklung des Ausgangszustandes eines Ensembles, $\rho(0)$, unter einem effektiven (zeitunabhängigen) Hamiltonoperator betrachtet werden, der den gleichen Effekt auf das Spinsystem hat, wie alle wirkenden Hamiltonoperatoren über die gesamte Zeit. Der effektive Hamiltonoperator für das gesamte Zeitintervall $[0, t]$ ist als die Summe der wirkenden Hamiltonoperatoren für die einzelnen Zeitabschnitte (t_1, t_2, \dots, t_n) definiert,

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \sum_{i=1}^{\infty} \hat{H}_i, \quad (2.14)$$

wobei die \hat{H}_i Terme höherer Ordnung genannt werden und die Vertauschungen der Hamiltonoperatoren zu verschiedenen Zeitpunkten beinhalten. Da die Anteile der Terme höherer Ordnung sehr klein sind, ist es ausreichend, sich auf die nullte Ordnung zu beschränken². Der mittlere Hamiltonian, der auf das Spinsystem wirkt, ist damit nur durch den Term

$$\hat{H}_0 = \frac{1}{t} \int_0^t \hat{H}(t') dt' \quad (2.15)$$

gegeben. Dieser Ansatz wird oft bei NMR-Experimenten verwendet, bei denen es Zeitabschnitte gibt, in denen nur Hochfrequenzpulse wirken und andere Zeitabschnitte, während derer andere Wechselwirkungen dominieren. Es ist damit möglich, die zeitliche Entwicklung des Spinsystems unter Einwirkung einer bestimmten Wechselwirkung zu ermitteln.

2.3 | Spinwechselwirkungen und Hamiltonoperatoren

Befindet sich eine Probe im Magnetfeld, ist der Zeeman-Effekt die dominierende Wechselwirkung. Liegt das Magnetfeld in z-Richtung an, kann diese Wechselwirkung durch einen Hamiltonoperator der Form

$$\hat{H}_0 = -\gamma B_0 \cdot \hat{I} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \quad (2.16)$$

ausgedrückt werden. Obwohl der Zeeman-Effekt überwiegt, beeinflussen auch andere Wechselwirkungen die Spins in der Probe und damit ihr NMR-Spektrum. Sie verursachen lokale Felder, die zusätzlich zum angelegten Magnetfeld wirken. In der Festkörper-NMR von Spin-1/2-Systemen spielen dabei zwei Mechanismen eine bedeutende Rolle, die chemische Verschiebung und die dipolare Wechselwirkung. Die (ebenfalls vorhandene) skalare Kopplung ist vergleichsweise klein und wird von der Dipolkopplung überdeckt. Die quadrupolare Wechselwirkung existiert nur für Kerne mit $I > 1/2$ und wird hier nicht weiter betrachtet.

²Dies Näherung kann angewendet werden, wenn die Zeitdauer der Pulse bzw. eines Abschnittes sehr klein ist gegenüber der inversen Frequenz der vorhandenen Wechselwirkung.

Um den Einfluss einer Wechselwirkung auf ein Spinsystem zu untersuchen, ist es notwendig, den entsprechenden Hamiltonoperator der Wechselwirkung zu kennen. Die durch lokale elektrische und magnetische Felder verursachten Wechselwirkungen, wie die chemische Verschiebung und die dipolaren Kopplungen, können als Ausdruck einer zusätzlichen Störung auf das Spinsystem, beschrieben durch den Hamiltonoperator \hat{H}_{int} , betrachtet werden,

$$\hat{H}_{\text{ges}} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{\text{int}} , \quad (2.17)$$

wobei

$$\hat{H}_{\text{int}} = \hat{H}_{\text{cs}} + \hat{H}_{\text{D}} \quad (2.18)$$

die Hamiltonoperatoren für die chemische Verschiebung \hat{H}_{cs} , und die dipolare Wechselwirkung \hat{H}_{D} , beinhaltet. In säkularer Näherung³ beeinflussen nur Teile von \hat{H}_{int} das Spinsystem, die dieselben Eigenfunktionen besitzen wie der Zeeman-Hamiltonian \hat{H}_0 , was dann der Fall ist, wenn die beiden Operatoren miteinander vertauschen:

$$[\hat{H}_0, \hat{H}_{\text{int}}] = 0 . \quad (2.19)$$

Im Folgenden werden die chemische Verschiebung und die dipolare Kopplung, sowie deren Hamiltonoperatoren näher betrachtet.

2.3.1 | Chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung ist eine Wechselwirkung, die ihren Ursprung in den Elektronen der Moleküle hat. Die Elektronen erzeugen durch ihre Bewegung magnetische Felder, welche eine räumliche Ausdehnung besitzen und daher die Spins vom äußeren Magnetfeld abschirmen. Das lokale Feld, B_{lok} , am Ort des Spins ist direkt proportional zum angelegten, äußeren (B_0) sowie zum induzierten (B_{ind}) Magnetfeld und ändert damit die Präzessionsfrequenz der betroffenen Kerne [65]:

$$B_{\text{lok}} = B_0 + B_{\text{ind}} \quad (2.20)$$

mit

$$B_{\text{ind}} = -\underline{\sigma} \cdot B_0 . \quad (2.21)$$

Der Tensor $\underline{\sigma}$ beschreibt die Wechselwirkung der chemischen Verschiebung und wird durch eine (3x3)-Matrix repräsentiert. Die unterschiedlichen, induzierten Magnetfelder führen zu verschiedenen Resonanzfrequenzen der einzelnen Kerne. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, aus dem NMR-Spektrum Informationen über die molekulare Struktur einer Probe zu erhalten. Betrachten wir Gleichung (2.19) genauer, wird deutlich, dass eine Wechselwirkung eine Komponente in Richtung des angelegten Magnetfeldes besitzen muss, um das Spinsystem zu beeinflussen. Um den Beitrag einer Wechselwirkung zum Gesamthamiltonoperator zu bestimmen, ist es daher notwendig, ein einheitliches Bezugssystem zu wählen. Dieses wird gewöhnlich so gewählt, dass das angelegte Magnetfeld die z-Richtung definiert. Alle zusätzlichen Wechselwirkungen werden ebenfalls in diesem so genannten Laborkoordinatensystem (LF - *Laboratory Frame*) betrachtet. Der Wechselwirkungstensor ist aber meist in seinem Hauptachsensystem (PAS - *Principal*

³Säkulare Näherung bedeutet, dass der Hamiltonoperator der zu betrachteten Wechselwirkung mit dem Zeeman-Hamiltonoperator vertauscht. Nicht-vertauschende Anteile des Hamiltonians werden vernachlässigt.

Axis System) definiert. Der säkulare Hamiltonoperator für die chemische Verschiebung im Laborkoordinatensystem ergibt sich damit zu

$$\hat{H}_{cs} = \gamma B_0 \sigma_{zz} \hat{I}_z = \gamma \omega_{cs} \hat{I}_z . \quad (2.22)$$

Die Größe σ_{zz} bezeichnet die z-Komponente des Tensors der chemischen Verschiebung im Laborkoordinatensystem. Die zugehörige Frequenz der chemischen Verschiebung ist durch $\omega_{cs} = B_0 \sigma_{zz}$ gegeben. Mit den Hauptachsenwerten σ_{11} , σ_{22} und σ_{33} , sowie der isotropen chemischen Verschiebung σ_{iso} , können folgenden Abkürzungen definiert werden:

$$\begin{aligned} \sigma_{iso} &= (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3, \\ \eta &= (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{iso}) \\ \delta &= (\sigma_{33} - \sigma_{iso}) . \end{aligned} \quad (2.23)$$

Die Größen η und δ heißen Asymmetrie- und Anisotropieparameter und charakterisieren den anisotropen Teil der chemischen Verschiebung σ_{aniso} und sind über

$$\omega_{cs} = \omega_0 \sigma_{zz} = \omega_0 \left(\underbrace{\sigma_{iso} + \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \beta - 1 - \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha)}_{\sigma_{aniso}} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \right) . \quad (2.24)$$

mit σ_{zz} verknüpft. Die Winkel α und β sind die Polarwinkel der Rotation vom Hauptachsensystem des Tensors ins rotierende Koordinatensystem. Der Winkel θ beschreibt die Orientierung des Tensors im Laborkoordinatensystem. Anhand von Gleichung (2.24) wird deutlich, dass es zu einem gegebenen Winkelpaar (θ, φ) , d.h. einer bestimmten Orientierung des Tensors, genau eine Frequenz im Spektrum gibt. Im Gegensatz dazu sind in einem Festkörper alle Orientierungen vertreten. Das NMR-Spektrum ist deshalb typischerweise sehr breit und besitzt eine charakteristische Form, die als Pulverspektrum bezeichnet wird (s. Abb. 2.2 (a)) [85]. Wegen der schnellen molekularen Bewegungen besteht in Flüssigkeiten keine Orientierungsabhängigkeit. Der anisotrope Anteil in Gl. (2.24) wird Null, so dass in den Spektren nur die isotrope chemische Verschiebung gemessen wird. Diese Art von schnellen Bewegungen sind im starren Festkörper nicht gegeben. Um dennoch hoch aufgelöste Spektren zu erhalten, wird die schnelle Probenrotation unter dem magischen Winkel (*Magic Angle Spinning* - MAS) verwendet (s. Abb. 2.2 (b)) [86, 87]. Wird der Winkel θ zwischen der Rotationsachse der Probe und dem äußeren Magnetfeld so gewählt, dass er dem magischen Winkel ($\theta_m = 54.74^\circ$) entspricht, wird der anisotrope Anteil der chemischen Verschiebung in Gl. (2.24) Null. Im Spektrum erscheint nur eine schmale Linie bei der isotropen chemischen Verschiebung $\omega_0 \sigma_{iso}$ (s. Abb. 2.2 (c)).

2.3.2 | Dipolare Wechselwirkung

Die dipolare Wechselwirkung basiert, anders als die chemische Verschiebung, auf den von den Kernen erzeugten lokalen Magnetfeldern. Da die Kerne ein magnetisches Moment besitzen, wird im Raum, der den Kern umgibt, ein lokales Magnetfeld generiert, welches die anderen Kerne in der Umgebung spüren (s. Abb. 2.3). Jeder Kern erfährt somit einen Einfluss durch die lokalen Magnetfelder der ihn umgebenden Kerne. Diese gegenseitige Wechselwirkung kann sowohl intramolekularer (mit Kernen des selben Moleküls) als auch intermolekularer (mit Kernen anderer Moleküle) Natur sein. Die Stärke dieser Wechselwirkung hängt vom Abstand der wechselwirkenden Spins zueinander ab. Zusätzlich besteht auch eine Abhängigkeit von der molekularen Orientierung des Ver-

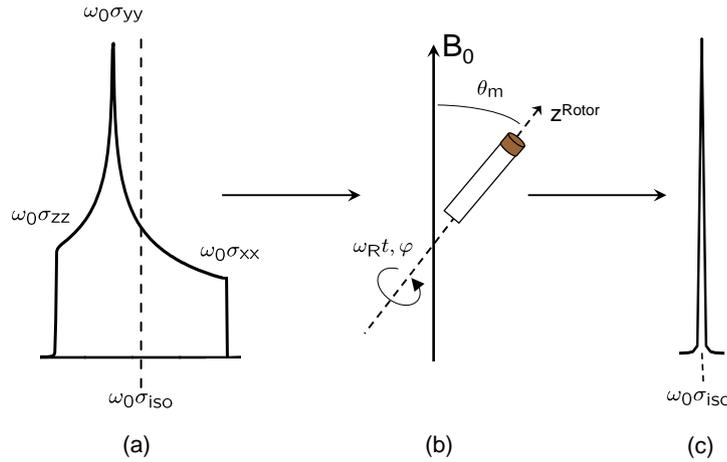


Abbildung 2.2.: (a) Im Festkörper trägt jede molekulare Orientierung mit einer einzelnen Frequenz zum Spektrum bei. Die einzelnen Frequenzen überlagern sich und das so genannte Pulverspektrum entsteht. (b) Unter MAS bzw. durch schnelle molekulare Bewegungen wird die Anisotropie der chemischen Verschiebung beseitigt und im Spektrum verbleibt eine Linie bei der isotropen chemischen Verschiebung $\omega_0\sigma_{iso}$ (c).

bindungsvektors der wechselwirkenden Spins in Bezug auf das äußere Magnetfeld B_0 (s. Abb. 2.3). Der dieser Wechselwirkung entsprechende Hamiltonoperator kann aus der klassischen Beschreibung der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei punktförmigen Dipolen und der Beziehung zwischen magnetischem Moment und Spin (Gl. (2.1)) hergeleitet werden [83, 88]:

$$\hat{H} = \frac{\mu_0\gamma_I\gamma_S\hbar}{4\pi} \left(\frac{\hat{I} \cdot \hat{S}}{r_{IS}^3} - \frac{3(\hat{I} \cdot \mathbf{r})(\hat{S} \cdot \mathbf{r})}{r_{IS}^5} \right). \quad (2.25)$$

Dabei ist μ_0 die magnetische Feldkonstante, γ_I und γ_S bezeichnen die gyromagnetischen Verhältnisse für die wechselwirkenden Kerne mit Spin I und Spin S im Abstand r_{IS} . Durch Transformation der Gleichung ins Laborkoordinatensystem (Ausmultiplizieren der Skalarprodukte und Einsetzen von Kugelkoordinaten), wird ein Ausdruck für den Hamiltonoperator der dipolaren Wechselwirkung erhalten, der sich aus sechs Anteilen zusammensetzt:

$$\hat{H} = D_{IS}(A + B + C + D + E + F). \quad (2.26)$$

Die Konstante D_{IS} beinhaltet alle Vorfaktoren aus Gleichung (2.25), sowie den Abstand r_{IS} . Die Anteile aus Gleichung (2.26) sind wie folgt definiert:

$$\begin{aligned} A &= (1 - 3\cos^2\theta)\hat{I}_z \cdot \hat{S}_z, \\ B &= \frac{1}{4}(1 - 3\cos^2\theta)(\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) = \frac{1}{2}(1 - 3\cos^2\theta)(\hat{I}_z \hat{S}_z - \hat{I} \cdot \hat{S}), \\ C &= -\frac{3}{2}\sin\theta \cos\theta e^{-i\varphi}(\hat{I}_z \hat{S}_+ + \hat{I}_+ \hat{S}_z), \\ D &= -\frac{3}{2}\sin\theta \cos\theta e^{i\varphi}(\hat{I}_z \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_z), \\ E &= -\frac{3}{4}\sin^2\theta e^{-2i\varphi}(\hat{I}_+ \hat{S}_+), \\ F &= -\frac{3}{4}\sin^2\theta e^{2i\varphi}(\hat{I}_- \hat{S}_-), \end{aligned} \quad (2.27)$$

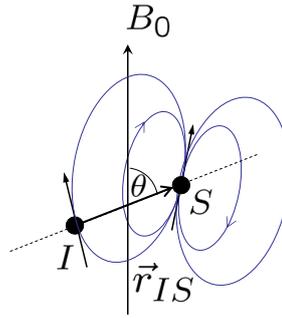


Abbildung 2.3.: Veranschaulichung der Dipolkopplung: Die von den Kernen I und S generierten, lokalen Magnetfelder besitzen eine räumliche Ausdehnung und beeinflussen sich gegenseitig. Wegen der Übersichtlichkeit ist nur das von S generierte Feld dargestellt. Die Stärke der Wechselwirkung hängt dabei vom Abstand r_{IS} und der Orientierung der Spins zueinander, sowie von der Orientierung des Vektors r_{IS} in Bezug auf das äußere Magnetfeld (Winkel θ) ab.

mit den Leiteroperatoren $\hat{I}_{\pm} = (\hat{I}_x \pm i\hat{I}_y)$ bzw. $\hat{S}_{\pm} = (\hat{S}_x \pm i\hat{S}_y)$, sowie den Polarwinkeln θ und φ .

Für die dipolare Wechselwirkung werden zwei Fälle unterschieden, für die sich jeweils ein anderer säkularer Hamiltonoperator der Wechselwirkung ergibt. Für den Fall, dass die beiden wechselwirkenden Spins derselben Kernsorte angehören, wird von homonuklearer dipolarer Kopplung gesprochen. Der zugehörige säkulare Hamiltonoperator wird aus Gleichung (2.26) abgeleitet. Dazu muss die Vertauschungsrelation der Terme A - F mit dem Zeemann-Hamiltonian, \hat{H}_0 (s. Gl. (2.16)), betrachtet werden. Nur die Terme A und B vertauschen mit diesem und beeinflussen daher das betrachtete Spinsystem. Der säkulare Hamiltonoperator für die homonukleare, dipolare Wechselwirkung lautet demnach:

$$\begin{aligned}\hat{H}_D^{ij} &= -D_{ij} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) (3 \hat{I}_z^i \hat{I}_z^j - \hat{I}_i \cdot \hat{I}_j) \\ &= -D_{ij} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) (2 \hat{I}_z^i \hat{I}_z^j - (\hat{I}_+^i \hat{I}_-^j + \hat{I}_-^i \hat{I}_+^j)) \\ &= -\omega_D (2 \hat{I}_z^i \hat{I}_z^j - (\hat{I}_+^i \hat{I}_-^j + \hat{I}_-^i \hat{I}_+^j)),\end{aligned}\quad (2.28)$$

wobei $\omega_D = D_{ij} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1)$ die dipolaren Frequenz bezeichnet. Um zu verdeutlichen, dass beide Spins derselben Kernsorte angehören, wurde die Bezeichnung \hat{I}^i und \hat{I}^j für die beiden Spins der Kerne i und j gewählt. Die dipolare Kopplungskonstante D_{ij} beschreibt die Abhängigkeit der Wechselwirkung von den Kerneigenschaften und dem Abstand r_{ij} der beiden miteinander wechselwirkenden Kerne:

$$D_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \gamma^2 r_{ij}^{-3} . \quad (2.29)$$

Für ein Spinpaar äquivalenter Kerne sind die beiden gyromagnetischen Verhältnisse gleich, d.h. $\gamma = \gamma_i = \gamma_j$. Für die homonukleare, dipolare Wechselwirkung können in Gleichung (2.28) zwei Anteile unterschieden werden. Der erste Term, $\hat{I}_z^i \hat{I}_z^j$, wird als statischer Anteil bezeichnet. Dieser beschreibt die Wechselwirkung des Spins I^i mit dem dipolaren Feld des Spins I^j , welche zu einer Änderung der Energieeigenwerte der Zustände im System führt. Abhängig von der Orientierung der beiden Spins zueinander (parallel oder

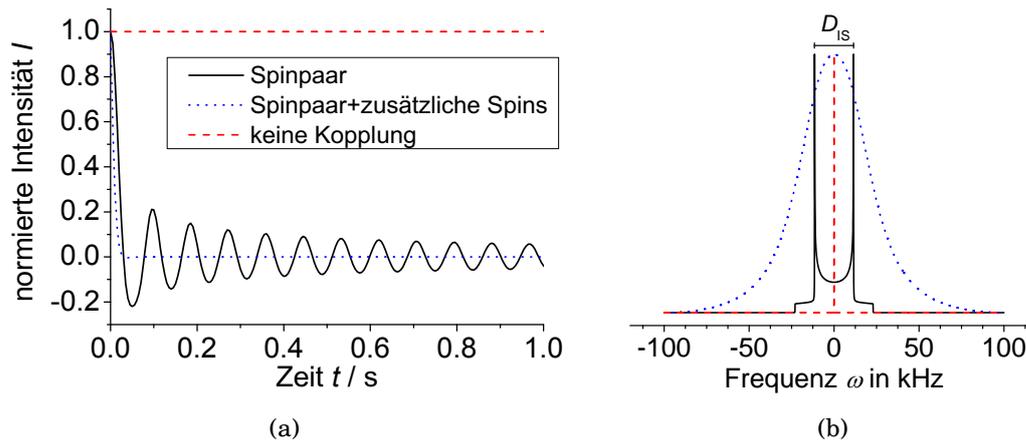


Abbildung 2.4.: (a) Simulierte FID-Zeitsignale und (b) daraus resultierende Spektren unter dipolarer Kopplung ($D_{IS} = 23 \text{ kHz}$, $r_{IS} = 1.095 \text{ \AA}$). Für ein Spinpaar ergibt sich das typische Pulverspektrum, mit einer Aufspaltung proportional zu D_{IS} . (schwarze, durchgezogene Linie). Werden zusätzliche Kopplungen zu umgebenden Spins betrachtet, überlagern sich die Zeitsignale und das Gesamtsignal zeigt einen schnelleren Abfall (blaue, gepunktete Linie). Im Spektrum wirkt sich dies als Linienverbreiterung aus, welche für heteronukleare Kopplung inhomogen, für homonukleare Kopplung hingegen homogen ist, d.h. eine selektive Sättigung bestimmter Frequenzen ist im homonuklearen Fall nicht möglich. Im Fall eines idealen, ungekoppelten Systems ($D_{IS} = 0$) (rote, gestrichelte Linien) zeigt das Zeitsignal keinen Abfall. Charakteristisch hierfür ist eine schmale Resonanzlinie (δ -Funktion) im Spektrum.

antiparallel), gibt es zwei unterschiedliche Beiträge $E_D = \pm \hbar \omega_D$ zu den Energieniveaus des Gesamtsystems und damit zur Larmorfrequenz ω_0 der Kerne in der Form [83, 85]

$$\omega(\theta) = \omega_0 \pm \omega_D . \quad (2.30)$$

Je nach Ausrichtung der beiden Spins zueinander, ergibt sich für jede der beiden Möglichkeiten ein typisches Spektrum mit der Abhängigkeit vom Winkel $(3 \cos^2 \theta - 1)$, welche sich zum so genannten Pulverspektrum überlagern (s. Abb. 2.4). Im Fall der homonuklearen Kopplung überwiegt jedoch der Einfluss des zweiten Terms, $(\hat{I}_+^i \hat{I}_-^j + \hat{I}_-^i \hat{I}_+^j)$, auf das Spektrum. Dieser Ausdruck wird als Austauschterm interpretiert und führt dazu, dass die entarteten Eigenzustände des Systems gemischt werden. Die zugehörigen Eigenfunktionen für das Systems ergeben sich dann aus Linearkombinationen dieser entarteten Zustände. Dies hat zur Folge, dass die Energieniveaus weiter aufspalten und im Spektrum zusätzliche Frequenzen auftreten. Dieser Austauschterm ändert für ein Spinpaar nur die Aufspaltung der Linien, welche um den Faktor $3/2$ vergrößert wird. Die qualitative Form des Spektrums bleibt zunächst erhalten. Wechselwirken mehr als zwei Spins miteinander, wie beispielsweise in einer Pulverprobe, und werden Kerne mit großer natürlicher Häufigkeit, z.B. Protonen, untersucht, führt die weitere Aufspaltung der einzelnen Energieniveaus zu einer erheblichen Verbreiterung der Resonanzlinien im Spektrum.

Wie oben erwähnt, existiert noch ein zweiter Fall der dipolaren Wechselwirkung im Festkörper. Dieser betrifft die Kopplung zwischen Kernen unterschiedlicher Art, d.h. $\gamma_I \neq \gamma_S$. Ausgehend von den Gleichungen (2.26) und (2.27) wird der Hamiltonoperator für die heteronukleare, dipolare Kopplung abgeleitet. Auch hier gilt, dass der Hamiltonoperator der Wechselwirkung in erster Näherung die gleichen Eigenfunktionen besitzt wie der Zeeman-Hamiltonian, und Anteile, die nicht mit diesem vertauschen, vernachlässigt werden können. Für die heteronukleare Kopplung zeigt sich, dass nur Term A mit dem

Zeeman-Hamiltonian vertauscht. Der säkulare Hamiltonoperator für zwei miteinander koppelnde Spins I und S verschiedener Spezies ergibt sich damit zu:

$$\hat{H}_D^{IS} = -D_{IS} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) 2\hat{I}_z \hat{S}_z . \quad (2.31)$$

Dass Term B vernachlässigt werden kann, ist damit zu erklären, dass der so genannte Austauschterm (auch „flip-flop“-Term) die Spinzustände mischt. Sind die Larmorfrequenzen der beiden koppelnden Kernspezies sehr ähnlich, wie im homonuklearen Fall, ist es möglich, dass das dipolare Feld des einen Spins das magnetische Moment des anderen Spins umdreht und umgekehrt. Da sich beide Polarisierungen in entgegen gesetzter Richtung ändern, bleibt die Energie des Systems dabei unverändert. Sind die Larmorfrequenzen der beiden wechselwirkenden Kerne hingegen sehr unterschiedlich, wie im Falle heteronuklear koppelnder Kerne, ist dieser „flip-flop“-Mechanismus energetisch unterdrückt und Term B aus Gleichung (2.27) hat keinen Einfluss auf das Spinsystem. Das Spektrum eines heteronuklear, dipolar koppelnden Spinpaares ist, wie oben beschrieben, ein Pulverspektrum mit einer typischen Aufspaltung proportional zur dipolaren Kopplungskonstante D_{IS} (s. Abb. 2.4).

2.3.2.1. Darstellung der dipolaren Wechselwirkung mittels sphärischer Tensoren

Zur Beschreibung einer Wechselwirkung unter Rotation, z.B. MAS, ist es sinnvoll eine andere Darstellung der Wechselwirkungstensoren und -operatoren heranzuziehen. Da sphärische Tensoren spezielle, vergleichsweise kompakt beschreibbare Rotationseigenschaften besitzen, ist es zweckmäßig, den Hamiltonoperator als Linearkombination solcher Tensoren darzustellen. Dazu wird der Hamiltonoperator in einen Ortsanteil A_{lm} und einen Spinoperatoranteil $\hat{T}_{l(-m)}$ zerlegt [89]:

$$\hat{H}_D = -2\hat{I} \cdot \underline{D} \cdot \hat{S} = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=-l}^l (-1)^m A_{lm} \hat{T}_{l(-m)} \quad (2.32)$$

Wird die Summation ausgeführt und die Säkularapproximation angewandt, ergibt sich für die dipolare Wechselwirkung wegen der dann resultierenden Axialsymmetrie des Tensors im Hauptachsensystem und der Tatsache, dass die dipolare Kopplung keinen isotropen Wert besitzt, nur ein verbleibender Term der Form

$$\hat{H}_D = A_{20}^{LF} \hat{T}_{20} , \quad (2.33)$$

wobei A_{20}^{LF} den Ortsanteil des sphärischen Tensors im Laborkoordinatensystem (LF) und \hat{T}_{20} den Spinoperatoranteil darstellt. Stimmt die Orientierung des Hauptachsensystems (PAS) des Wechselwirkungstensors mit dem Laborkoordinatensystem überein, entspricht der Ortsanteil gerade $A_{20}^{LF} = A_{20}^{PAS} = \sqrt{6}D_{IS}$. Für alle anderen Orientierungen ist es notwendig, die Tensorausrichtung mit Hilfe der Eulerwinkel, bezogen auf das Laborkoordinatensystem, zu beschreiben. Dies wird durch Transformation des Tensors aus dem Hauptachsensystem ins Laborkoordinatensystem erreicht. Dazu wird in kartesischen Koordinaten eine Rotationsmatrix \underline{R} benutzt und von links und rechts an die zu transformierende Matrix multipliziert. Diese Art der Rotation ist aber für komplexe Problemstellungen ungeeignet. Aufgrund der Symmetrieeigenschaften der sphärischen Tensoren ist eine Rotation auf Basis dieser Tensoren einfacher als in kartesischen Koordi-

naten. Der Zusammenhang zwischen der Rotation im kartesischen Raum und dem Raum der Tensoren 2. Stufe ist durch

$$\hat{\underline{T}}_{lm}^{\text{LF}} = \hat{\underline{R}}(\alpha, \beta, \gamma) \hat{\underline{T}}_{lm}^{\text{PAS}} \hat{\underline{R}}^{-1}(\alpha, \beta, \gamma) = \sum_{m'} \hat{\underline{T}}_{lm'}^{\text{PAS}} D_{m'm}^l(\alpha, \beta, \gamma) \quad (2.34)$$

gegeben [85]. Dabei bezeichnet $\hat{\underline{R}}(\alpha, \beta, \gamma)$ den Operator der Rotation (bzw. eine Rotationsmatrix), der den Tensor $\hat{\underline{T}}_{lm}^{\text{PAS}}$ mittels der Eulerwinkel vom Hauptachsensystem ins Laborkoordinatensystem transformiert. Die Elemente der Wigner-Rotationsmatrizen $D_{m'm}^l(\alpha, \beta, \gamma)$ werden durch die reduzierten Wigner-Rotationsfunktionen $d_{m'm}^l(\beta)$ über

$$D_{m'm}^l = e^{(-iam')} d_{m'm}^l(\beta) e^{(-i\gamma m)} \quad (2.35)$$

definiert [85]. Die Größen α , β und γ heißen Eulerwinkel. Der Spinoperatoranteil \hat{T}_{lm} kann ganz analog transformiert werden, was für Berechnungen des mittleren Hamiltonoperators von Vorteil ist.

Im nicht-statischen Fall können beim Übergang vom Hauptachsensystem ins Laborkoordinatensystem eine oder mehrere Rotationen des Wechselwirkungstensors notwendig sein. So verkompliziert sich beispielsweise die Beschreibung unter MAS wegen der zeitabhängigen makroskopischen Rotation der Probe weiter. Durch eine Gleichung analog zu (2.33) wird der Hamiltonoperator der dipolaren Kopplung in sphärischer Tensorschreibweise unter MAS beschrieben. Der Unterschied besteht im Wesentlichen in der Zeitabhängigkeit des Ortsanteils A_{20}^{LF} ,

$$\hat{H}_{\text{D,MAS}}(t) = A_{20}^{\text{LF}}(t) \hat{T}_{20}. \quad (2.36)$$

Der effektive Hamiltonoperator unter MAS für die dipolare Wechselwirkung wird mittels Gleichungen (2.15) und (2.36) durch Integration des Ortsanteils erhalten:

$$\hat{\underline{H}}_0 = \frac{1}{t} \int_0^t \hat{H}_{\text{D,MAS}}(t') dt' = \frac{1}{t} \hat{T}_{20} \int_0^t A_{20}^{\text{LF}}(t') dt'. \quad (2.37)$$

wobei $A_{20}^{\text{LF}}(t)$ durch die dipolare Frequenz $\omega_{\text{D}}^{\text{IS}}(t)$ eines koppelnden Spinpaares, I und S , über

$$A_{20}^{\text{LF}}(t) = \sqrt{6} \omega_{\text{D}}^{\text{IS}}(t), \quad (2.38)$$

gegeben ist. Die dipolare Frequenz

$$\omega_{\text{D}}^{\text{IS}}(t) = D_{\text{IS}} \left[\frac{1}{2} \sin^2 \beta (\cos(2\gamma - 2\omega_{\text{R}} t)) + \frac{1}{\sqrt{2}} \sin 2\beta (\cos(\gamma - \omega_{\text{R}} t)) \right], \quad (2.39)$$

ist dabei durch die Eulerwinkel β und γ sowie die Rotationsfrequenz ω_{R} bestimmt. Für die heteronukleare, dipolare Kopplung ist der Ortsanteil nur durch die Frequenz $\omega_{\text{D}}^{\text{IS}}(t)$ und einen vereinfachten Spinoperatoranteil gegeben (s. Gl. (2.31)). Die mittleren zeitabhängigen Hamiltonoperatoren sind damit für die homonukleare Dipolkopplung (d.h., für $I = S = I^{ij}$) durch

$$\hat{\underline{H}}_{\text{D,MAS}}^{ij}(t) = \frac{1}{t} 2 \sqrt{\frac{2}{3}} \Phi_{\text{D}}^{ij}(t) \hat{T}_{20} \quad (2.40)$$

und für die heteronukleare Dipolkopplung (d.h., für $I \neq S$) mittels

$$\hat{\underline{H}}_{\text{D,MAS}}^{\text{IS}}(t) = \frac{1}{t} \Phi_{\text{D}}^{\text{IS}}(t) 2 \hat{I}_z \hat{S}_z \quad (2.41)$$

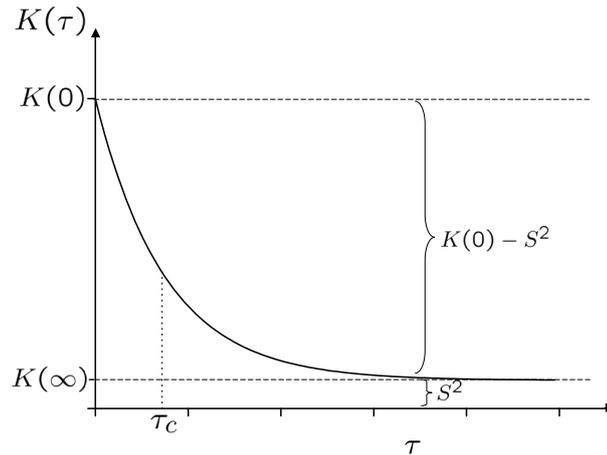


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung der Korrelationsfunktion (Gleichung (2.44)). Für die Zeit $\tau = 0$ ergibt sich $K(0)$, für lange Zeiten ($\tau \rightarrow \infty$) nähert sich die Korrelationsfunktion ihrem quadratischen Mittelwert $K(\infty)$ an.

gegeben, wobei die Phase Φ_D über

$$\Phi_D(t) = \int_0^t \omega_D(t') dt' \quad (2.42)$$

definiert ist. Mit Hilfe der hier abgeleiteten Gleichungen kann die dipolare Kopplung aus experimentellen Messungen bestimmt und somit Informationen über die Struktur und Dynamik eines Systems gewonnen werden.

2.3.2.2. Ordnungsparameter

Wird in einer Probe eine dipolare Kopplung bestimmt, die nicht dem aus der reinen Geometrie errechneten Wert entspricht (s. Gl. (2.29)), ist im Allgemeinen ein dynamischer Prozess dafür verantwortlich. Die dipolare Frequenz des Spinsystems ändert sich in Abhängigkeit der Orientierung des Verbindungsvektors der koppelnden Spins (s. z.B. Gl. (2.28)). Eine molekulare Bewegung ändert die Orientierung dieses Verbindungsvektors. Dadurch wird eine gegenüber dem statischen Wert reduzierte dipolare Kopplungsstärke gemessen.

Meist sind die stattfindenden Bewegungsprozesse stochastischer Natur und werden mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion $K(\tau)$ charakterisiert,

$$K(\tau) = \langle f^*(t) \cdot f(t + \tau) \rangle, \quad (2.43)$$

die den Zustand des Systems für verschiedene Zeitpunkte t und $(t + \tau)$ miteinander korreliert. Hängt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Zustandes nicht von der Zeitrichtung ab, kann der Bewegungsprozess häufig durch eine Autokorrelationsfunktion der Form

$$K(\tau) = K(0)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} + K(\infty) \quad (2.44)$$

beschrieben werden (s. Abb. 2.5) [90]. Die Größe τ_c heißt Korrelationszeit und ist ein Maß für die Zeitskala des zugrunde liegenden Bewegungsprozesses. Die Werte für $\tau = 0$ und $\tau \rightarrow \infty$ sind durch $K(0) = \langle f(t)^2 \rangle_t$, den Ausgangszustand, und $K(\tau \rightarrow \infty) = \langle f(t) \rangle_t^2$, den Grenzwert des Systems für lange Zeiten, gegeben (s. Abb. 2.5). Ist keine Einschränkung

der molekularen Bewegung vorhanden, wird das System für sehr lange Zeiten keine Korrelation mehr zu früheren Zeitpunkten besitzen und $K(\infty)$ strebt gegen Null. Ist die Dynamik hingegen eingeschränkt, wird das System auch für sehr lange Zeiten nie isotrop; es besteht immer eine (restliche) Korrelation. Das Maß für diese Anisotropie ist der Grenzwert der Korrelationsfunktion für sehr lange Zeiten τ normiert auf den Ausgangspunkt. Dieser Quotient

$$S^2 = \frac{K(\infty)}{K(0)} \quad (2.45)$$

wird als (dynamischer) Ordnungsparameter eines Systems bezeichnet. Alternativ wird oft auch $S = \sqrt{S^2}$ als Ordnungsparameter definiert und in der Praxis benutzt.

Wird der Ansatz der Beschreibung einer zufälligen Bewegung mittels Korrelationsfunktion auf ein System unter dipolarer Wechselwirkung übertragen, stellt sich die Frage nach der zugehörigen Korrelationsfunktion. Die dipolare Wechselwirkung wird durch einen Hamiltonoperator beschrieben, der sich aus Orts- und Spinoperatoranteil zusammensetzt (s. Gl. (2.33)). Da der Spinoperatoranteil zeitunabhängig ist, ist die Korrelationsfunktion nach Säkularapproximation nur durch den Ortsanteil des Hamiltonoperators im Laborkoordinatensystem, $A_{20}^{\text{LF}}(t)$, bestimmt und kann durch

$$K(\tau) = \left\langle A_{20}^{\text{LF}}(t) \cdot A_{20}^{\text{LF}}(t + \tau) \right\rangle_t \quad (2.46)$$

ausgedrückt werden⁴ [91–94]. Für den Ordnungsparameter S ergibt sich

$$S = \left\langle \frac{P_2(\cos(\alpha))D_{ij}}{D_{ij}} \right\rangle = \frac{\langle D_{ij} \rangle}{D_{ij}} = P_2(\cos(\alpha)), \quad (2.47)$$

für ein Paar koppelnder Spins i und j mit einer Kopplungskonstante D_{ij} , wobei die Klammern $\langle \dots \rangle$ für das so genannte Pulvermittel⁵ stehen. Das zweite Legendre-Polynom vom Winkel α , $P_2(\cos(\alpha))$, ist dabei als der Ordnungsparameter S definiert. Der reduzierte Wert $\langle D_{ij} \rangle = \langle P_2(\cos(\alpha))D_{ij} \rangle$ wird im Experiment gemessen, wenn ein molekularer Bewegungsprozess vorhanden ist, der die dipolare Kopplung mittelt. Das bedeutet, dass die statische, dipolare Kopplung D_{ij} um einen Faktor reduziert wird, welcher dem Ordnungsparameter für diesen Bewegungsprozess entspricht. Der Ordnungsparameter hängt dabei nur vom Winkel α ab, d.h., von der Orientierung des Verbindungsvektors der beiden koppelnden Spins zur Bewegungsachse des Moleküls. So liegt der Wertebereich für den Ordnungsparameter zwischen 1 für ein unbewegliches System über Null für eine isotrope Bewegung bis hin zu $-1/2$ für eine isotrope Bewegung senkrecht zur Bewegungsachse. Es ist nicht möglich, anhand des Ordnungsparameters Aussagen über die Korrelationszeit der Bewegung zu treffen. Ist der Ordnungsparameter bekannt, kann für bestimmte Modellbewegungen ein Zusammenhang zur Geometrie des Bewegungsprozesses hergestellt werden [95]. Beispiele für einfache Bewegungsgeometrien und die Abhängigkeit des Ordnungsparameters für das jeweilige Modell vom Winkel α sind in Abb. 2.6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass, gerade im Bereich kleiner Amplituden, die Kurven sehr eng bei einander liegen, so dass eine Zuordnung zu einem Bewegungsmodell nicht immer eindeutig ist. Des Weiteren ist es in den hier verwendeten Experimenten nur möglich, den Betrag

⁴Diese Beschreibung der Korrelationsfunktionen ist unter Relaxation nicht anwendbar, da die Säkularapproximation nicht genutzt werden kann und die Korrelationsfunktion mehrere Terme des Ortsanteils enthält.

⁵Es handelt sich hierbei um eine Mittelung über die Eulerwinkel. Für zeitabhängige Größen beinhaltet das Pulvermittel auch eine zeitliche Mittelung.

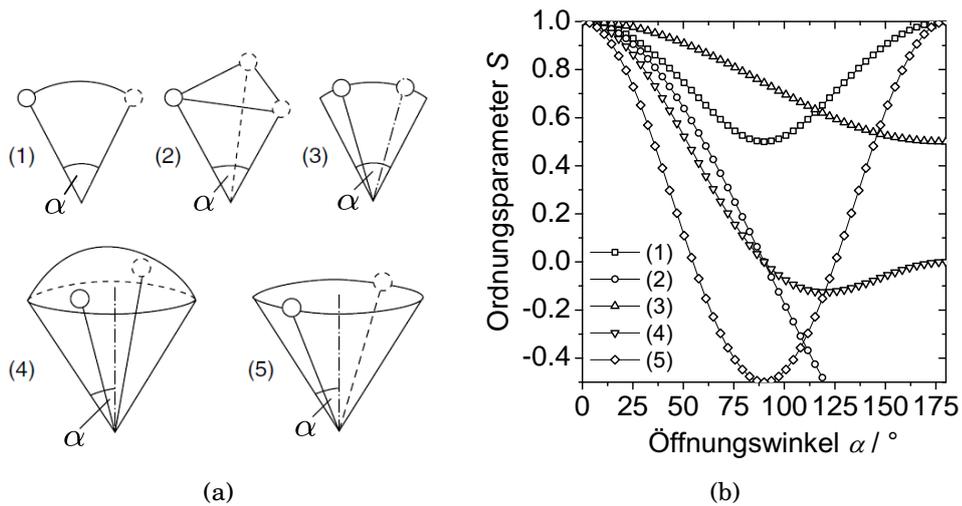


Abbildung 2.6.: (a) Ausgewählte Modelle für molekulare Bewegungen: (1) Zweiplatz-Sprung mit dem Winkel α zwischen den beiden Plätzen, (2) Dreiplatz-Sprung mit dem Winkel α zwischen je zwei Plätzen, (3) kontinuierliche Bewegung (Diffusion) auf einem Kreisbogen, wobei der maximale Winkel α überstrichen wird, (4) Diffusion innerhalb eines Kreiskegels mit dem Winkel α zur Rotationsachse, (5) kontinuierliche Bewegung auf einem Kreiskegel mit dem Winkel α zur Rotationsachse. (b) Abhängigkeit des Ordnungsparameters S vom Winkel α (aus [95]).

der dipolaren Kopplung zu ermitteln, so dass der Ordnungsparameter entweder positiv oder negativ sein kann. Dies sollte bei der Annahme von bestimmten Modellgeometrien ebenfalls berücksichtigt werden.

3 | 2D-Experimente zur Bestimmung homo- und heteronuklearer, dipolarer Restkopplungen

Eine der wichtigsten NMR-Wechselwirkungen in Festkörpern ist die dipolare Kopplung (s. Kap. 2.3.2). Ebenso wie strukturelle Informationen können auch dynamische Eigenschaften eines Probensystems ermittelt werden. Insbesondere wird durch (schnelle) molekulare Bewegungen die dipolare Kopplung reduziert und aus dem Vergleich von statischer und reduzierter Kopplung kann der dynamische Ordnungsparameter bestimmt werden (s. Kap. 2.3.2.2). Zur Messung reduzierter Kopplungen bzw. dynamischer Ordnungsparameter sind in der NMR verschiedene Experimente entwickelt worden, wie z.B. *separated-local-field* (SLF)-Experimente [96–100]. Mit diesen Pulssequenzen ist es möglich, die chemische Verschiebung und die dipolare Kopplung in einem Experiment zu messen. Zunächst wurden diese Experimente statisch durchgeführt [96,97], was den Nachteil hatte, dass sich die unterschiedlichen Resonanzen im Spektrum aufgrund der Anisotropie der Wechselwirkungen überlagerten. Dieses Problem konnte durch schnelle Probenrotation unter dem magischen Winkel (MAS) gelöst werden [101].

Für schnelle Bewegungen kann aus dem Ordnungsparameter die Amplitude der Bewegung ermittelt werden, während die Zeitskala der Bewegung nicht zugänglich ist. Schnell bedeutet hierbei, dass die Korrelationszeit der Bewegung, τ_c , viel kleiner ist als die inverse dipolare Frequenz, ω_D^{-1} , welche in der Größenordnung von ca. $50\mu\text{s}$ liegt. Finden hingegen molekulare Bewegungen statt, deren Korrelationszeit mit der inversen Kopplungskonstante vergleichbar ist ($\tau_c \approx \omega_D^{-1}$), wird von intermediären Bewegungen gesprochen. Die intermediären Bewegungen führen dazu, dass die Spins auf der Zeitskala des Experimentes ihre Phasenbeziehung untereinander verlieren und es somit zu einer T_2 -Relaxation kommt. Es ist jedoch möglich, diesen Effekt zu nutzen, um Informationen über die Korrelationszeit der Bewegung zu erhalten. Dazu werden experimentelle Daten mit Hilfe von analytischen Ansätzen und Modellbeschreibungen ausgewertet [78, 102]. Langsame Bewegungen mit Korrelationszeiten $\tau_c \gg \omega_D^{-1}$ spielen für die hier erwähnten Experimente keine Rolle, da sie auf einer wesentlich längeren Zeitskala stattfinden als die Experimente selbst.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pulssequenzen werden die untersuchten Wechselwirkungen in zwei verschiedenen Dimensionen dargestellt. Es handelt sich daher um zweidimensionale Experimente. Im Folgenden wird zunächst das allgemeine Schema eines solchen Experimentes erläutert, um danach auf die verwendeten Sequenzen näher einzugehen.

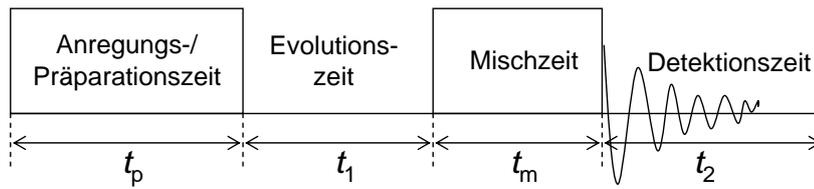


Abbildung 3.1.: Allgemeine Darstellung eines zweidimensionalen Experimentes. Dieses besteht aus der Präparationszeit t_p , der Evolutionszeit t_1 , einer Mischzeit t_m , sowie der Detektionszeit t_2 . [76, 77].

3.1 | Das 2D-Experiment

Zweidimensionale Experimente sind in der NMR-Spektroskopie zu einem sehr bedeutenden Werkzeug geworden. Es können so Informationen über ein Spinsystem erhalten werden, die in einem eindimensionalen Experiment nicht immer zugänglich sind. Beispielsweise ist es mit Hilfe zweidimensionaler Experimente möglich, die räumliche Nähe zwischen verschiedenen Spins zu ermitteln und damit Molekülstrukturen aufzuklären. Ganz allgemein kann ein zweidimensionales Experiment in vier Zeitabschnitte unterteilt werden (s. Abb. 3.1). Diese vier Zeitabschnitte sind die Präparationszeit t_p , die Evolutionszeit t_1 , die Mischzeit t_m und die Detektionszeit t_2 [76, 77].

Während der Präparationszeit wird das System angeregt, d.h. in einen Nichtgleichgewichtszustand gebracht. Dies kann durch einen einfachen Puls geschehen oder eine komplexe Pulsfolge beinhalten. In der darauffolgenden Evolutionszeit t_1 kann sich das Spinsystem unter einer (oder mehreren) Wechselwirkung(en) entwickeln. Das System befindet sich anschließend in einem von t_1 abhängigen Zustand. Dieser Zustand wird einer bestimmten Frequenz in der ω_1 -Dimension zugeordnet. Um das Verhalten des Systems unter der betrachteten Wechselwirkung beschreiben zu können, ist es notwendig, t_1 in verschiedenen Einzelexperimenten zu inkrementieren.

Die Mischzeit t_m kann einerseits ein Zeitintervall sein, andererseits können während dieser Zeit auch komplexere Pulsfolgen wirken, so dass verschiedene Prozesse, wie beispielsweise Magnetisierungsaustausch zwischen Spins¹ oder molekulare Bewegungen, beobachtet werden können. In dynamischen NMR-Experimenten wird daher das Verhalten des Spinsystems für verschiedene Mischzeiten untersucht, um so Informationen über die Zeitskala der Bewegung zu erhalten [103, 104].

Im letzten Abschnitt wird während der Zeit t_2 das Signal $S(t_1, t_2)$ mit den Phasen Φ_1 und Φ_2 für die Zeitabschnitte t_1 und t_2 detektiert,

$$S(t_1, t_2) = \langle S(t_1 + t_2) \rangle = \langle e^{i\Phi(t_1+t_2)} \rangle = \langle e^{i\Phi t_1} e^{i\Phi t_2} \rangle, \quad (3.1)$$

wobei die Klammern $\langle \dots \rangle$ das Pulvermittel darstellen. Das Gesamtsignal setzt sich aus den Signalen der Evolutions- und Detektionszeit zusammen und die Fouriertransformation dieses Signals liefert ein zweidimensionales Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$.

Je nach wissenschaftlicher Fragestellung sind nicht immer alle Abschnitte in einem 2D-Experiment vorhanden. Dies wird in den folgenden Erläuterungen, d.h. zu den in dieser Arbeit verwendeten, zweidimensionalen Experimenten, deutlich.

¹Dieser wird in Korrelationsexperimenten untersucht, wobei der Magnetisierungsaustausch durch Pulssequenzen oder molekulare Dynamik verursacht wird.

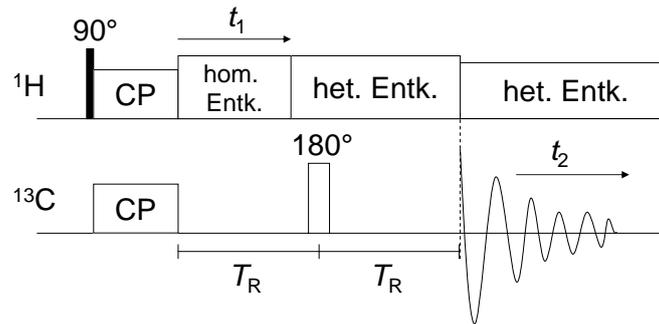


Abbildung 3.2.: Pulssequenz für das DIPSHIFT-Experiment. Nach der Anregung der Magnetisierung entwickelt sich diese unter dem Einfluss der heteronuklearen Dipolkopplung und der chemischen Verschiebung für die Zeit t_1 . Der 180° -Puls bei $t = T_R$ refokussiert vorhandene Verschiebungseffekte und sorgt für ein Echo nach einer weiteren Rotationsperiode. Die heteronukleare Entkopplung erfolgt bis über die Datenaufnahme hinaus, um den Einfluss dieser Kopplung auf das Signal zu beseitigen.

3.2 | Die DIPSHIFT-Sequenz

Eine häufig benutzte Pulssequenz aus der Familie der SLF-Experimente ist die DIPSHIFT (*DIPolar chemical SHIFT correlation*)-Sequenz. Diese Sequenz ist sowohl für Untersuchungen schneller als auch intermediärer Bewegungen sehr gut geeignet [78].

In Abb. 3.2 ist die DIPSHIFT-Pulssequenz dargestellt. Mit ihr kann die heteronukleare, dipolare Restkopplung eines Systems ermittelt werden. Die Sequenz beginnt mit der Anregung des Spinsystems, für welche es verschiedene Möglichkeiten gibt. Eine viel genutzte Methode im Festkörper ist der Polarisationsübertrag mittels Kreuzpolarisation [105, 106]. Dabei werden die Protonenspins angeregt und die Polarisation durch Einstrahlen bestimmter Frequenzen von den Protonen auf die Kohlenstoffkerne übertragen [107]. Diese Methode der Anregung ist vor allem dann von Vorteil, wenn die longitudinale Relaxationszeit der Kohlenstoffkerne sehr groß ist. Eine direkte Anregung würde deshalb zu langen Wartezeiten zwischen den Experimenten führen. Ist die Relaxationszeit kurz, ist es möglich, die Kohlenstoffkerne direkt anzuregen. Proben mit unterschiedlichen Mobilitäten besitzen meist auch unterschiedliche Relaxationszeiten. Je nach Mobilität einer Probe erweisen sich daher verschiedene Anregungsschemata als vorteilhaft [108, 109].

Nach der Anregung der Kernspins folgt die Evolutionszeit. In dieser Zeit, t_1 , kann sich das System unter dem Einfluss der heteronuklearen, dipolaren Wechselwirkung, sowie der chemischen Verschiebung entwickeln. Damit die Kopplung der Protonen untereinander (homonukleare Kopplung) das Signal nicht beeinflusst, ist es notwendig, diese Wechselwirkung zu unterbinden. Dies geschieht, indem eine geeignete Entkopplungssequenz verwendet wird [110–112]. Damit ist das Signal während der Zeit t_1 nur noch durch heteronukleare, dipolare Wechselwirkung zwischen Kohlenstoffkernen und Protonen beeinflusst². Die chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne wird durch einen π -Puls (180° -Puls) in der Mitte der Sequenz refokussiert [113]. Dies führt nach insgesamt zwei Rotationsperioden zu einem Signalecho, dessen Intensität nur durch die Stärke der heteronuklearen, dipolaren Wechselwirkung bestimmt ist. Je stärker die Kopplung, desto größer ist der Signalverlust für endliche Werte von $0 < t_1 < T_R$. Während der zweiten Hälfte der Sequenz soll sich das System nicht weiter unter heteronuklearer Kopplung entwickeln.

²Die dipolare Wechselwirkung ist dabei um einen für die jeweilige Sequenz spezifischen Skalierungsfaktor reduziert. Dieser muss bei der Datenanalyse berücksichtigt werden.

3. 2D-Experimente zur Bestimmung homo- und heteronuklearer, dipolarer Restkopplungen

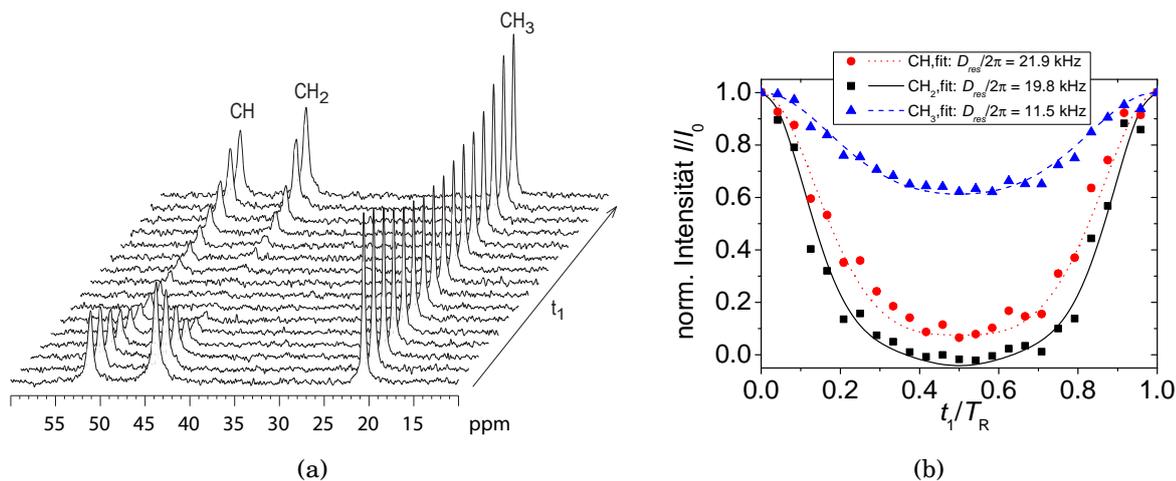


Abbildung 3.3.: (a) Intensitätsmodulation für die verschiedenen Werte von t_1 für CH-, CH₂- und CH₃-Resonanzen gemessen mittels DIPSIFT-Experiment an einer Mischung aus Alanin und Glyzin ($\nu_R = 5\text{ kHz}$). Die Modulation der Signalintensitäten ist in Abhängigkeit von t_1 für die einzelnen Molekülgruppen wegen ihrer unterschiedlichen Kopplung verschieden stark ausgeprägt. (b) Darstellung der (auf $I(t_1 = 0)$) normierten Signalintensitäten der CH-, CH₂- und CH₃-Resonanzen als Funktion von t_1/T_R für die Mischung aus Alanin und Glyzin, sowie die dazugehörigen Kurvenanpassungen (Gleichung (3.2)) und den daraus erhaltenen Werten für die jeweiligen heteronuklearen, dipolaren Kopplungskonstanten.

Deshalb wird auch in dieser Zeit in geeigneter Weise entkoppelt [114, 115] und darüber hinaus auch während der Detektionszeit fortgesetzt. Damit ergibt sich in der Zeit t_2 ein Signal, welches nur durch die chemischen Verschiebung beeinflusst ist. Die Evolutionszeit t_1 wird für verschiedene Experimente zwischen Null und einer Rotationsperiode inkrementiert. Als Folge ändert sich für jeden Zeitpunkt t_1 die detektierte Signalintensität, da mit länger werdendem t_1 der Einfluss der heteronuklearen, dipolaren Wechselwirkung zunimmt (s. Abb. 3.3). Durch das MAS wird der Einfluss der dipolaren Wechselwirkung in der zweiten Hälfte der Rotorperiode rückgängig gemacht (s. Kap. 3.3, Gl. (3.4)), so dass am Ende der Rotorperiode wieder die Ausgangsintensität erreicht wird. Es entstehen so genannte Rotorechos. Um aus dem Zeitsignal ein Spektrum zu erhalten, wird eine Fouriertransformation durchgeführt. In den beiden hier interessierenden Zeitintervallen, t_1 und t_2 , sind unterschiedliche (voneinander unabhängige) Wechselwirkungen aktiv, so dass es möglich ist, die beiden Signalanteile separat zu transformieren. Eine Fouriertransformation nach t_2 liefert die chemische Verschiebung im Spektrum in der Dimension ω_2 . Die jeweiligen Signalamplituden sind für jede Evolutionszeit t_1 in ihrer Intensität moduliert (s. Abb. 3.3(a)). Wird die Signalintensität in Abhängigkeit der Entwicklungszeit t_1 aufgetragen, ergibt sich eine so genannte Modulations- oder Dephasierungskurve. Eine anschließende Fouriertransformation bezüglich der Zeit t_1 liefert ein dipolares Spektrum, welches in der Aufspaltung des Signals Informationen über die dipolare Kopplungsstärke zwischen den wechselwirkenden Kernen enthält. Die beiden Fouriertransformationen ergeben somit ein zweidimensionales Spektrum, bei dem die beiden Wechselwirkungen je eine Dimension aufspannen [76]. Die Fouriertransformation nach t_1 ist jedoch nicht notwendig, da die Information über die Stärke der heteronuklearen Dipolkopplung bereits in der Modulationskurve der Signalintensitäten in Abhängigkeit von t_1 enthalten ist (s. Abb. 3.3(a)). So zeigen Modulationskurven für größere Restkopplungen einen stärkeren Signalverlust in Abhängigkeit der Evolutionszeit t_1 als solche für schwächere Restkopplungen. D.h., der Intensitätsverlust der Kohlenstoffsignale ist abhängig von der Stärke

der vorhandenen heteronuklearen Dipolkopplung zu den umgebenden Protonen. Diese Abhängigkeit kann mit Hilfe einer Formel ausgedrückt werden. Ausgehend von der Signalfunktion (FID),

$$\text{FID} = \langle \cos(\Phi_D^{\text{IS}}(t)) \rangle, \quad (3.2)$$

wird mit Hilfe der dipolaren Phase

$$\Phi_D^{\text{IS}}(t) = -D_{\text{IS}} \left[\frac{1}{4\omega_R} \sin^2 \beta \left(\sin(2\gamma - 2\omega_R t) - \sin(2\gamma) \right) - \frac{1}{\sqrt{2}\omega_R} \sin 2\beta \left(\sin(\gamma - \omega_R t) - \sin(\gamma) \right) \right] \quad (3.3)$$

die Modulationskurve für das DIPSHIFT-Experiment beschrieben. Diese entspricht, wegen der Refokussierung der chemischen Verschiebung, einem reinen, dipolaren FID, wobei dieser durch einen für die homonukleare Entkopplungssequenz charakteristischen Faktor skaliert ist [110–112]. Die Winkel β und γ sind die Eulerwinkel. Wegen der Axialsymmetrie des Dipoltensors besteht keine Abhängigkeit vom Eulerwinkel α . Eine Mittelung über alle möglichen Orientierungen und Zeiten ($\langle \dots \rangle$) liefert einen funktionellen Zusammenhang, mit welchem die Messdaten beschrieben und die Stärke der heteronuklearen dipolaren Kopplung, D_{IS} , bestimmt werden kann.

In Abb. 3.3(b) sind die DIPSHIFT-Dephasierungskurven für eine Mischung aus Alanin und Glyzin dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kurven für geringere Kopplungen, d.h. für die CH_3 -Gruppe, flacher sind als für stärkere Kopplungen, wie beispielsweise die der CH -Gruppe. Die Tiefe der Kurve ist somit ein Maß für die Stärke der im System vorhandenen Restkopplung. Die Kurvenanpassung für die CH - und die CH_2 -Gruppe liefert Werte, die nahezu der statischen Dipolkopplung entsprechen. Damit können molekulare Bewegungen dieser Gruppen im μs - bis ms -Zeitbereich ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung der Restkopplung für die CH_2 -Gruppe ist es notwendig, Gleichung (3.3) zu erweitern. Um die dipolare Phase einer CH_2 -Gruppe berechnen zu können, muss der Ortsanteil des Hamiltonoperators im Laborkoordinatensystem bekannt sein (s. Kap. 2.3.2). Hierbei ist zu beachten, dass zwei CH -Bindungen existieren und folglich zwei Tensoren mit unterschiedlichen Hauptachsensystemen betrachtet werden müssen, welche aber separat in das Laborkoordinatensystem transformiert werden können. Das Ergebnis ist eine Signalfunktion, die, unter der Annahme, dass beide Bindungen die gleiche Kopplung besitzen, eine mittlere dipolare Restkopplung für die CH_2 -Gruppe liefert, jedoch zwei verschiedene Phasen Φ_1 und Φ_2 beinhaltet (s. Anhang A). Diese Beschreibung vereinfacht sich etwas, wenn die CH_2 -Gruppe nicht starr ist, sondern eine uniaxiale Dynamik besitzt. In diesem Fall sind die beiden Einzeltensoren der Bindungen parallel und die Phasen Φ_1 und Φ_2 sind identisch. Die Signalfunktion kann dann durch den Ausdruck $\text{FID} = \langle \cos^2 \Phi \rangle$ beschrieben werden (s. Anhang A). Im Gegensatz dazu wird für die CH_3 -Gruppe eine reduzierte heteronukleare, dipolare Kopplung ermittelt. Auch in diesem Fall gilt nicht Gl. (3.2), sondern eine Gleichung der Form $\text{FID} = \langle \cos^3 \Phi \rangle$ (s. Anhang A). Es ist bekannt, dass die Protonen der Methylgruppe eine schnelle Bewegung um eine dreizählige Symmetrieachse ausführen (s. Abb. 3.4), weshalb die Phase Φ hier ebenfalls als eine für alle drei CH -Bindungen gemittelte Phase zu verstehen ist. Als Referenzkopplung für eine starre Probe wird die der CH -Gruppe aus Abb. 3.3 verwendet (ca. 22kHz). Es ergibt sich ein dynamischer Ordnungsparameter von 0.52 (s. Kap. 2.3.2.2). Ein passendes Modell für die Bewegung der CH_3 -Gruppe ist ein Dreiplatzsprung. Mit diesem Modell und dem Ordnungsparameter von 0.52 wird daraus der Sprungwinkel für die Protonen der Methylgruppe zu $\alpha \approx 120^\circ \pm 4^\circ$ bestimmt (s. Abb. 2.6). Dieser Sprungwinkel entspricht nicht dem einer idealisierten CH_3 -Gruppe von 109.5° . Dies kann einerseits durch die vereinfachte Beschreibung der Signalfunktion für eine CH_3 -Gruppe mit Hilfe einer effektiven Kopp-

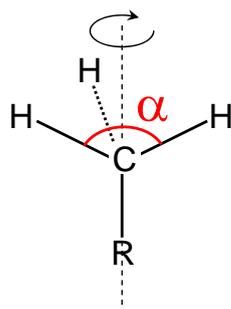


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der Methylgruppe. Als mögliches Modell für die molekulare Bewegung dieser Gruppe kann ein Dreiplatzsprung mit dem Sprungwinkel α um die angegebene Symmetrieachse angenommen werden.

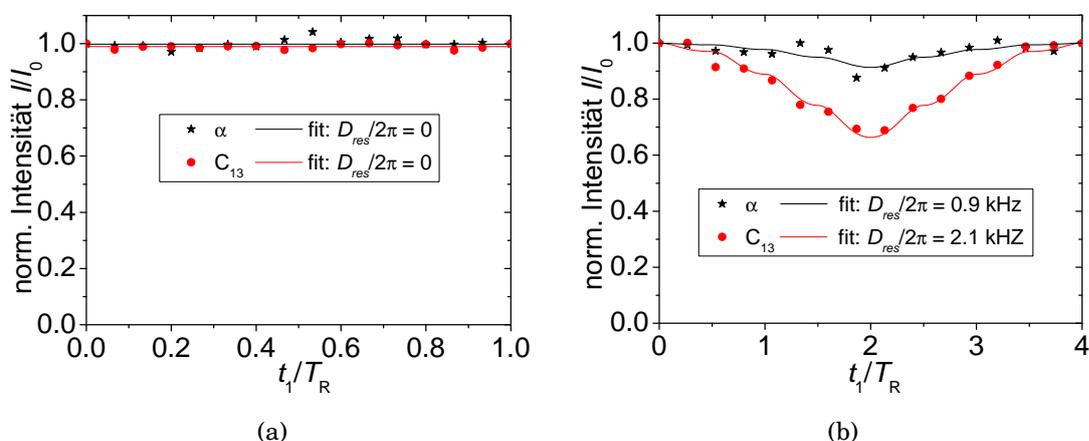


Abbildung 3.5.: Dephasierungskurven für zwei ausgewählte Kohlenstoffatome eines Lipids in der flüssig-kristallinen Phase, die (a) mit dem DIPSHIFT-Experiment und (b) mit dem recoupled-DIPSHIFT-Experiment gemessen wurden ($\nu_R = 5 \text{ kHz}$). Die aus der Kurvenanpassung erhaltenen Werte für die Restkopplung sind ebenfalls angegeben.

lung bedingt sein, anstatt drei einzelne CH-Bindungen zu betrachten. Es ist andererseits möglich, dass in der untersuchten Probe Abweichungen von der idealen Tetraedergeometrie vorhanden sind [116] bzw. schnelle Molekülschwingungen die dipolare Restkopplung beeinflussen [117, 118]. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass es mit Hilfe des DIPSHIFT-Experimentes einerseits möglich ist, strukturelle Informationen [119] und andererseits auch Informationen über molekulare Bewegungsgeometrien (bei Verwendung von geeigneten Modellen) zu erhalten [78].

Wird die DIPSHIFT-Sequenz auf Systeme mit geringer Bewegungsanisotropie angewendet, zeigen sich die Grenzen dieses Experiments. Als Beispiel für ein solches mobiles, nahezu isotropes System sind in Abb. 3.5(a) ausgewählte Modulationskurven einer Lipidprobe gezeigt. Die ermittelten heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen für die beiden dargestellten Kohlenstoffatome des Lipids sind im Vergleich zur Dipolkopplung für ein starres Molekül sehr stark reduziert bzw. Null (vgl. dazu die Kopplungen für CH bzw. CH_2 in Abb. 3.3(b)). So ist es nicht möglich, mittels des DIPSHIFT-Experimentes für die ausgewählten Kohlenstoffe Restkopplungen zu ermitteln. Das DIPSHIFT-Experiment liefert in diesem Fall keine verwertbaren Informationen.

3.3 | Die recoupled-DIPSHIFT-Sequenz

In Systemen, in denen die dipolare Kopplung in hohem Maß durch die vorhandene molekulare Bewegung reduziert wird, ist die aufsummierte Phase im DIPSHIFT-Experiment sehr klein (s. Abb. 3.5(a)). Das macht es unmöglich, die molekulare Bewegung in solchen Systemen mit diesem Experiment zu untersuchen, da eine Änderungen der dipolaren Kopplung die Dephasierungskurven nicht mehr wahrnehmbar beeinflusst. Dabei gehen die Informationen über die molekulare Struktur und Dynamik des Systems verloren.

Durch MAS wird die vorhandene dipolare Kopplung ebenfalls reduziert. Da eine hohe spektrale Auflösung aber notwendig ist, kann auf Probenrotation nicht verzichtet werden. Dennoch ist es möglich, die ausgemittelte Wechselwirkung und die damit verbundenen Informationen wieder zu gewinnen. Diese so genannte Wiedereinkopplung der Wechselwirkung kann durch Einstrahlen von Radiofrequenzpulsen auf eine der beiden koppelnden Spinspezies erreicht werden. Bekannte und viel genutzte Beispiele für solche Wiedereinkopplungssequenzen sind das REDOR-Experiment zur Wiedereinkopplung der heteronuklearen, dipolaren Wechselwirkung [120], das CODEX-Experiment zur Wiedereinkopplung der Anisotropie der chemischen Verschiebung [121], sowie die BaBa-Sequenz zur Wiedereinkopplung der homonuklearen, dipolaren Wechselwirkung [122]. Für die Untersuchung der Lipiddynamik wurde im Rahmen dieser Arbeit eine modifizierte Version der DIPSHIFT-Sequenz entwickelt; das so genannte recoupled-DIPSHIFT-Experiment [82]. Hierbei wird die dipolare Wechselwirkung in Anlehnung an das REDOR-Experiment durch 180° -Pulse wiedereingekoppelt und ist daher besser messbar.

Die verwendete Pulssequenz des recoupled-DIPSHIFT-Experiments ist in Abb. 3.6 dargestellt und funktioniert prinzipiell wie das ursprüngliche DIPSHIFT-Experiment. Die Magnetisierung der ^{13}C -Kerne wird auch hier entweder direkt angeregt oder per Polarisationstransfer von den Protonen auf die Kohlenstoffkerne übertragen. Anschließend entwickelt sich die Magnetisierung während der Zeit t_1 unter heteronuklearer Dipolkopplung. Die homonukleare Kopplung der Protonen untereinander wird durch eine geeignete Entkopplungssequenz unterbunden [110–112]. Um die schwachen und daher stärker gemittelten heteronuklearen Wechselwirkungen wiedereinzukoppeln, werden auf dem Kohlenstoffkanal 180° -Pulse eingestrahlt. In der Mitte der Sequenz wird ein 180° -Puls ausgelassen, um so den Einfluss von chemischer Verschiebung und Resonanzoffsets rückgängig zu machen. Das Signal wird anschließend, d.h. während der Zeit t_2 , aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgt wie im DIPSHIFT-Experiment, d.h. es werden Modulationskurven mit Hilfe eines analytischen Ausdrucks beschrieben und die Restkopplungen bestimmt.

Das Prinzip der Wiedereinkopplung beruht darauf, dass während der Evolutionszeit t_1 zusätzliche 180° -Pulse eingestrahlt werden. Unter MAS kann der Signalverlauf durch eine Sinusfunktion (bzw. Kosinusfunktion) beschrieben werden. Anschaulich ist dies in Abbildung 3.7 dargestellt. Die aufsummierte Phase entspricht der Fläche unter der Signalfunktion. In der ersten halben Rotorperiode nimmt die Phase zu. Ohne π -Puls kehrt sich das Vorzeichen der Funktion bei $T_R/2$ um und die Phase nimmt wieder ab (rote, gestrichelte Linie in Abb. 3.7), so dass sich die Gesamtphase über eine Rotorperiode zu Null aufsummiert:

$$\Phi(T_R) = \int_0^{T_R} \omega_D(t) dt = \int_0^{T_R/2} \omega_D(t) dt + \int_{T_R/2}^{T_R} \omega_D(t) dt = 0 . \quad (3.4)$$

3. 2D-Experimente zur Bestimmung homo- und heteronuklearer, dipolarer Restkopplungen

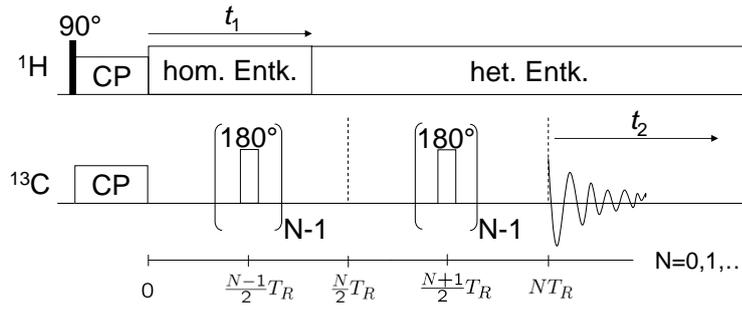


Abbildung 3.6.: Pulssequenz des recoupled DIPSHIFT-Experiments. Nach der Anregung der Kohlenstoffkerne entwickelt sich die Magnetisierung während der Zeit $0 < t_1 < NT_R$ einzig unter dem Einfluss der heteronuklearen, dipolaren Kopplung, wobei N die Anzahl der Wiedereinkopplungsperioden ist. Die homonukleare Kopplung wird während dieser Zeit beseitigt. Durch die 180° -Pulse bei Vielfachen von $T_R/2$ wird die (stark gemittelte) heteronukleare Kopplung wiedereingekoppelt. In der Mitte der Sequenz wird ein 180° -Puls ausgelassen, um Resonanzoffsets zu refokussieren. Während der Datenaufnahme t_2 wird heteronuklear entkoppelt, so dass auf die Spins nur die chemische Verschiebung wirkt.

Wird ein π -Puls bei $T_R/2$ eingestrahlt, entspricht dies einer Änderung des Vorzeichens der Funktion im Zeitintervall zwischen $T_R/2$ und T_R . Wird nun das Integral über die dipolare Frequenz $\omega_D(t)$ für eine Rotorperiode T_R berechnet, ist dieses nicht mehr Null (s. schwarze, durchgezogene Kurven in Abb. 3.7):

$$\Phi(T_R) = \int_0^{T_R} \omega_D(t) dt = \int_0^{T_R/2} \omega_D(t) dt + \int_{T_R/2}^{T_R} (-1) \omega_D(t) dt = 2 \int_0^{T_R/2} \omega_D(t) dt . \quad (3.5)$$

Durch Einstrahlen mehrerer π -Pulse kann eine weitere Vervielfachung der Gesamtphase erreicht werden. Zu einem beliebigen Zeitpunkt t_1 der Sequenz ist die aufsummierte Phase durch das Integral

$$\Phi(t_1) = \int_0^{t_1} (-1)^m \omega_D(t) dt \quad (3.6)$$

bestimmt, wobei der Exponent $m = \text{int}\{t_1/(T_R/2)\}$ die Anzahl der halben Rotationsperioden für ein gegebenes t_1 wiedergibt. Die maximal aufsummierte Phase für eine Sequenzlänge von N Rotorperioden ergibt sich zu:

$$\Phi_{\max}(NT_R/2) = N \int_0^{T_R/2} \omega_D(t) dt . \quad (3.7)$$

Die dipolare Phase ist dadurch scheinbar vergrößert und so auch die dipolare Kopplungsstärke der untersuchten Spins. Dies zeigt sich beim Vergleich der Modulationskurven zwischen DIPSHIFT- und recoupled-DIPSHIFT-Experiment an einem stärkeren Intensitätsverlust bei gleichem t_1 (s. Abb. 3.5). Die Kurven der Wiedereinkopplungssequenz besitzen eine deutliche Modulation, während die DIPSHIFT-Kurven keinen Abfall zeigen. Auch beim Vergleich der ermittelten Restkopplungsstärken ist der Vorteil des recoupled DIPSHIFT gegenüber der ursprünglichen DIPSHIFT-Sequenz zu erkennen. Für nur sehr schwach anisotrope Bewegungen liefert das DIPSHIFT-Experiment keine

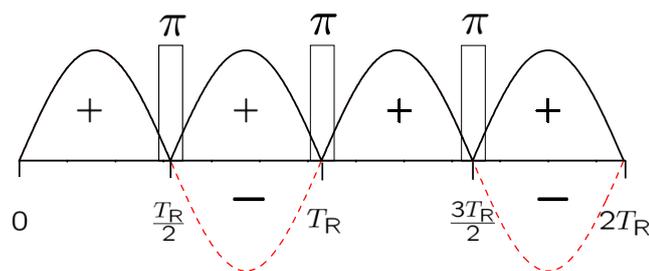


Abbildung 3.7.: Veranschaulichung der Wirkung von π -Pulsen zur Wiedereinkopplung einer Wechselwirkung unter MAS. Ohne π -Puls ist die aufsummierte Phase über eine vollständige Rotorperiode Null. Die Signalfunktion ist in einer halben Rotorperiode positiv (schwarz, durchgezogen) und in der anschließenden Hälfte negativ (rot, gestrichelt). Werden π -Pulse bei Vielfachen der Rotorperiode eingestrahlt, dreht sich das Vorzeichen der Signalfunktion für die folgende halbe Rotorperiode um und wird somit positiv (schwarze Kurve). Die Phasen addieren sich nach einer vollen Rotorperiode auf. Je mehr π -Pulse eingestrahlt werden, desto größer ist die aufsummierte Phase am Ende einer Pulssequenz.

messbaren Restkopplungen für die untersuchten Kohlenstoffresonanzen. Das recoupled DIPSHIFT-Experiment hingegen macht es möglich, Restkopplungen in diesen Systemen zu bestimmen.

Eine ähnliche Wiedereinkopplungssequenz wurde schon zu einem früheren Zeitpunkt von Hong *et al.* vorgeschlagen [123]. Die Umsetzung der Wiedereinkopplung basiert ebenfalls auf π -Pulsen, die auf dem Kohlenstoffkanal eingestrahlt werden. Der Unterschied zum recoupled DIPSHIFT-Experiment ist, dass die π -Pulse ihre Position in Abhängigkeit der Evolutionszeit t_1 ändern (s. Abb. 3.6). Weiterhin wird in diesem Experiment die homonukleare Entkopplung über eine konstante Zeit eingestrahlt. Das bedeutet, dass die Zeit, in der die heteronukleare Dipolkopplung wirkt, unabhängig von t_1 ist. Die Vergrößerung der Phase wird ausschließlich durch die Verschiebung der Pulse erreicht. Eine Eigenschaft solcher „constant-time“-Experimente ist, dass die durch intermediäre Bewegungen verursachte Relaxation für jeden Punkt der Dephasierungskurve gleich ist. Dies kann von Vorteil sein, da solche Relaxationseinflüsse durch Normierung beseitigt werden können. Die Normierung besteht darin, dass alle Intensitäten auf die Ausgangsintensität bei $t_1 = 0$ bezogen werden (s. Abb. 3.3(b) bzw. 3.5). Einen Nachteil stellt diese Art der Wiedereinkopplung nach Hong *et al.* dar, wenn intermediäre Bewegungen vorhanden sind. Diese können mit der „constant-time“-Variante des DIPSHIFT-Experimentes nicht detektiert werden und es gehen Informationen verloren. Insbesondere kann die Intensität durch die T_2 -Effekte für jeden Wert von t_1 stark reduziert sein. Das recoupled DIPSHIFT-Experiment bietet in diesem Zusammenhang einen Vorteil, da die Pulse feste Positionen haben und die Zeitdauer der homonuklearen Entkopplung (t_1) inkrementiert wird. Damit ist der Einfluss von intermediären Bewegungen, und damit auch der der Relaxation, für jeden Zeitpunkt t_1 unterschiedlich. D.h., zusätzlich zur heteronuklearen Dipolkopplung wird das Signal durch Relaxation reduziert. Mit zunehmender Evolutionszeit wird der Einfluss der intermediären Bewegungen auf das Signal größer. Finden molekulare Bewegungen auf intermediärer Zeitskala statt, ändert sich die dipolare Phase auf der Zeitskala des Experiments. Diese Änderung führt dazu, dass das Signal am Ende der Sequenz nicht refokussiert werden kann. Es findet eine Art T_2 -Relaxation im Spinsystem statt und die Intensität erreicht ihren Ausgangswert nicht wieder (s. Abb. 3.9(b)). Der Einfluss solcher intermediärer Bewegungen ist in Abb. 3.9 an der Modells substanz TMSI (Trimethylsulfoxoniumiodid) gezeigt. Für TMSI ist bekannt, dass die drei Methylgruppen eine

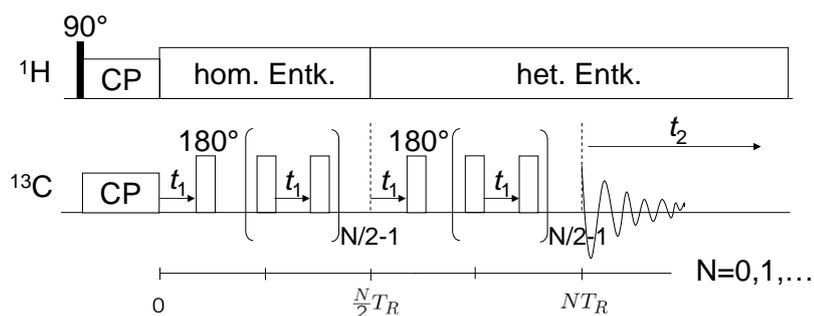


Abbildung 3.8.: Wiedereinkopplungssequenz von Hong *et al.* [123]. Die Wiedereinkopplung der dipolaren Wechselwirkung erfolgt ebenfalls durch 180° -Pulse auf dem Kohlenstoffkanal. Der Unterschied zum recoupled DIPSHIFT-Experiment besteht darin, dass die homonukleare Entkopplungssequenz für eine konstante Zeit ($t = NT_R$) eingestrahlt wird. Die Position der 180° -Pulse ändert sich jedoch in Abhängigkeit von t_1 .

Sprungbewegung ausführen [124]. Die für verschiedene Temperaturen aufgenommenen Dephasierungskurven zeigen daher deutliche Unterschiede. Für die tiefste, im Experiment verwendete Temperatur erreicht die Kurve nahezu ihren Ausgangswert. Verglichen mit der Zeitskala des Experimentes ist die Korrelationszeit für die Sprungbewegung bei dieser Temperatur sehr groß. Für hohe Temperaturen wird der Bewegungsprozess schnell im Vergleich zur experimentellen Zeitskala und die Kurven erreichen wieder ihren Ausgangswert. Für die mittleren untersuchten Temperaturen erreicht die molekulare Bewegung die intermediäre Zeitskala. Die Dephasierungskurven in Abb. 3.9(b) zeigen daher einen signifikanten Intensitätsverlust in der zweiten Hälfte des Experimentes. Unter Zuhilfenahme analytischer Ansätze kann genau dieser Effekt genutzt werden, um Informationen über Bewegungen auf der intermediären Zeitskala zu erhalten [78]. Dies ist mit dem Experiment von Hong *et al.* nicht möglich (s. Abb. 3.9(a)), wohl aber mit dem DIPSHIFT- und dem recoupled DIPSHIFT-Experiment [78, 82].

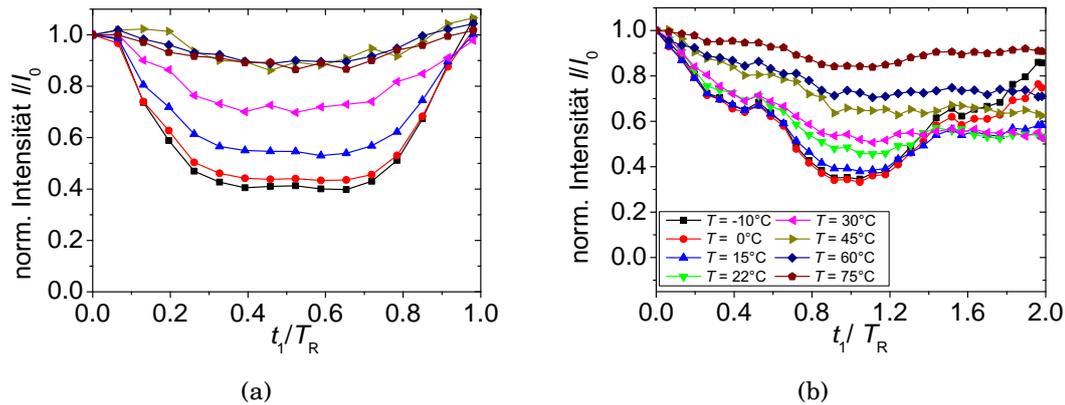


Abbildung 3.9.: Dephasierungskurven gemessen (a) mit der Sequenz nach Hong et al. [123] und (b) mit der recoupled DIPSHIFT-Sequenz [82] für die Modells substanz TMSI bei verschiedenen Temperaturen. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Bewegungsrate der Moleküle zu. Der Einfluss intermediärer Bewegungen ist in den Kurven des recoupled DIPSHIFT-Experiments anhand des Intensitätsverlusts bei $t_1 = T_R$ erkennbar, während diese Effekte in den Kurven in (a) nicht vorhanden sind.

3.4 | ^1H -Doppelquanten-NMR-Spektroskopie

Viele organische Stoffe bestehen zu einem großen Teil aus Protonen. Wegen ihrer großen natürlichen Häufigkeit und ihrem großen gyromagnetischen Verhältnis sind Protonen ideale Untersuchungsobjekte für die NMR-Spektroskopie. Allerdings besitzen sie im Festkörper eine starke dipolare Kopplung zu umgebenden Kernen, was zu breiten, nicht aufgelösten Spektren führt. Die ersten MQ-Experimente wurden an sehr kleinen und/oder mobilen Molekülen durchgeführt [125–127]. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in einem endlichen Spinsystem eine höchste Quantenordnung existiert (totale Spinkohärenz), welche, aufgrund fehlender dipolarer Kopplungen zu nicht an der Kohärenz beteiligten Spins, die höchste spektrale Auflösung liefert. Des Weiteren konnten für diese endlichen Spinsysteme gezeigt werden, dass die vorhandene intramolekulare, homonukleare, dipolare Kopplung genutzt werden kann, um Domänengrößen in Festkörpern zu bestimmen, wobei diese meist nur wenige Protonen beinhalteten. Eine Verbesserung der spektralen Auflösung ergibt sich durch Kombination der MQ-Experimente mit MAS [128]. Dies reduziert die starke homonukleare Kopplung der Protonen und liefert auch in starren Systemen aufgelöste NMR-Spektren. Es ist damit möglich, MQ-Experimente auch für einzelne molekulare Gruppen stark gekoppelter Spinsysteme durchzuführen und diese mit Fokus auf DQ-Kohärenzen zur Bestimmung der Kopplung benachbarter Spins zu benutzen.

Mit Hilfe des Dichteoperator-Formalismus wird eine Kohärenz zwischen zwei Eigenzuständen $|i\rangle$ und $|j\rangle$ als Nicht-Diagonalelement der Spindichtematrix definiert (s. Kap. 2.2). Im klassischen Bild der NMR kann eine Kohärenz als Übergang zwischen zwei Eigenzuständen $|i\rangle$ und $|j\rangle$, mit den zugehörigen magnetischen Quantenzahlen m_i und m_j , interpretiert werden. Als Kohärenzordnung p wird die Differenz der magnetischen Quantenzahlen der beiden Zustände definiert, d.h., $p = m_i - m_j$. Ist die Kohärenzordnung $p = \pm 1$, wird sie als Einquanten (EQ)-Kohärenz bezeichnet und entspricht transversaler, messbarer Magnetisierung. Für eine Differenz der magnetischen Quantenzahlen mit $|p| > 1$, wird von MQ-Kohärenzen gesprochen. So wird eine Kohärenz mit der Ordnung $p = 0$ als Nullquanten (NQ)-Kohärenz und mit $p = 2$ als Doppelquanten (DQ)-Kohärenz bezeichnet. Während EQ-Kohärenzen direkt messbar sind, können MQ-Kohärenzen nur

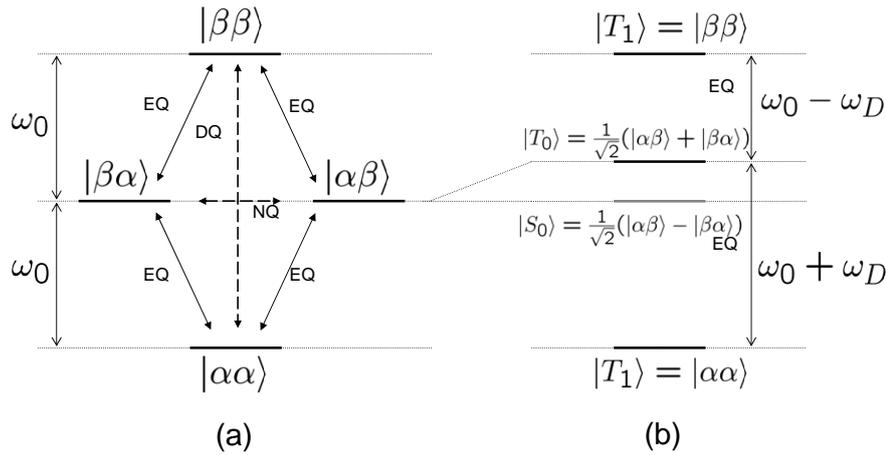


Abbildung 3.10.: Schematische Darstellung der Energieniveaus für ein System aus zwei gleichartigen Spins ($I = 1/2$): (a) Zeeman-Energieniveaus für ein ungekoppeltes Spinsystem. Zwei der vier Energieniveaus sind entartet. Vorhandene Kohärenzen (Übergänge zwischen den Niveaus) sind (messbare) Einquantenkohärenzen (EQ), sowie Null- und Doppelquantenkohärenzen (NQ, DQ). (b) Energieniveauschema für ein gekoppeltes Spinsystem ($\omega_0 \gg \omega_D$). Die Eigenzustände dieses Systems setzen sich aus den vier Zeeman-Eigenzuständen des ungekoppelten Systems zusammen. Durch die dipolare Kopplung verschieben sich die Energieniveaus der Tripletzustände im Vergleich zu den Zeeman-Energien. Es gibt zwei erlaubte EQ-Übergänge, die im Spektrum zu einer Aufspaltung der Resonanzlinie von $2\omega_D$ führen [129].

indirekt erfasst werden. Sie müssen mit Hilfe spezieller Pulssequenzen angeregt und in messbare Magnetisierung umgewandelt werden. In den ersten, so genannten „spin-counting“- Experimenten, wurde gezeigt, dass das Signal in einem Ensemble von Spins hauptsächlich von DQ-Kohärenzen dominiert wird, d.h. von der Kopplung eines Spinpaares. Erst für lange Anregungszeiten werden durch schwächere Kopplungen zu entfernteren Spins höhere Kohärenzordnungen erzeugt [125]. Diese hohen Kohärenzordnungen können vernachlässigt werden, wenn Messungen von dipolaren Kopplungen und nicht von Clustergrößen im Vordergrund stehen. Die folgenden Erläuterungen beziehen sich daher immer auf DQ-Kohärenzen.

Für zwei äquivalente Spins ($I = 1/2$) existieren im Magnetfeld vier mögliche Eigenzustände $|\alpha\alpha\rangle$, $|\alpha\beta\rangle$, $|\beta\alpha\rangle$ und $|\beta\beta\rangle$ (Zeeman-Produktzustände), wobei $|\alpha\rangle = |\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\rangle$ und $|\beta\rangle = |\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}\rangle$ die Wellenfunktion der Eigenzustände der Einzelspins bezeichnen. Sind die beiden Spins nicht gekoppelt, gibt es drei verschiedene Energieniveaus, die durch die Larmorfrequenz ω_0 getrennt sind (s. Abb. 3.10(a)). Besteht eine Kopplung zwischen den Spins, sind nicht alle vier Zeeman-Produktzustände Eigenfunktionen des Gesamt-Hamiltonoperators ($\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_D$). Es ist dennoch möglich, Eigenzustände in einer anderen Basis zu definieren, die auf der Zeeman-Produktbasis beruht. In dieser neuen Basis haben die vier Eigenzustände des Systems die Form $|T_1\rangle = |\alpha\alpha\rangle$, $|T_0\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle)$, $|T_{-1}\rangle = |\beta\beta\rangle$ (Tripletzustände) und $|S_0\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle)$ (Singulettzustand). Die sich für diese Zustände ergebenden Energieeigenwerte sind gegenüber denen des ungekoppelten System verschoben (s. Abb. 3.10(b)). Die Entartung der Zustände $|\alpha\beta\rangle$ und $|\beta\alpha\rangle$ wird aufgehoben und zwischen Singulett- und Tripletzuständen finden keine Übergänge statt. Daher gibt es nur zwei mögliche EQ-Übergänge, welche, bedingt durch die dipolare Kopplung, mit unterschiedlichen Frequenzen erfolgen (s. Abb. 3.10(b)). Dies äußert sich im Spektrum als Aufspaltung der Spektrallinie. Existieren mehrere Kopplungen im Spin-

system, überlagern sich die unterschiedlichen Frequenzen und es resultiert ein breites, nicht-aufgelöstes Spektrum (s. Abb. 2.4).

Wie im Fall homonuklearer Dipolkopplung DQ-Kohärenzen angeregt bzw. gemessen werden, soll im Folgenden im Zusammenhang mit der Wiedereinkopplungssequenz Back-to-Back (BaBa) erläutert werden.

3.4.1 | Anregung von Doppelquantenkohärenzen

Das einfachste Experiment zur Anregung von DQ-Kohärenzen ist eine Zwei-Puls-Sequenz [130]. Sie besteht aus zwei 90° -Pulsen mit gleicher Phase, getrennt durch eine Evolutionszeit τ_{DQ} , in der sich das System unter homonuklearer, dipolarer Kopplung entwickeln kann. Für ein Spinpaar kann die Entstehung von DQ-Kohärenzen mittels Produktoperatorformalismus [131] beschrieben werden. Als Ausgangszustand zum Zeitpunkt $t = 0$ wird für die Spins I^i und I^j eine Magnetisierung in z-Richtung angenommen:

$$\begin{aligned} \hat{I}_z^i + \hat{I}_z^j &\xrightarrow{90_x^\circ} -\hat{I}_y^i - \hat{I}_y^j \\ &\xrightarrow{\hat{H}_{\text{D}}\tau_{\text{DQ}}} (\hat{I}_y^i + \hat{I}_y^j) \cos(\Phi_{\text{DQ}}) - 2(\hat{I}_x^i \hat{I}_z^j + \hat{I}_x^j \hat{I}_z^i) \sin(\Phi_{\text{DQ}}) \\ &\xrightarrow{90_x^\circ} \underbrace{(\hat{I}_z^i + \hat{I}_z^j) \cos(\Phi_{\text{DQ}})}_{\text{Referenzterm}} + \underbrace{2(\hat{I}_x^i \hat{I}_y^j + \hat{I}_x^j \hat{I}_y^i) \sin(\Phi_{\text{DQ}})}_{\text{DQ-Term}}, \end{aligned} \quad (3.8)$$

wobei die Phase Φ_{DQ} durch die dipolare Wechselwirkung und die Evolutionszeit bestimmt ist. Der erste Term auf der rechten Seite in Gleichung (3.8) repräsentiert longitudinale Magnetisierung und wird im Folgenden als Referenzterm bezeichnet. Der zweite Term spiegelt die angeregten DQ-Kohärenzen wider. Da die DQ-Kohärenzen nicht direkt messbar sind, werden sie in geeigneter Weise und vorrangig in zweidimensionalen Experimenten untersucht. Die angeregten DQ-Kohärenzen müssen wieder in messbare EQ-Kohärenzen konvertiert werden. Dies geschieht, indem nach der Anregungssequenz eine so genannte Rekonversionssequenz eingestrahlt wird. Diese besitzt (meist) die gleiche Pulsabfolge wie die Anregungssequenz, unterscheidet sich aber in der Phase der Pulse. Die gesamte Pulssequenz ist so angelegt, dass die Hamiltonoperatoren für die Anregung (\hat{H}_{Anr}) und die Rekonversion (\hat{H}_{Rek}) der DQ-Kohärenzen gerade entgegengesetzt wirken. Durch Änderung der Pulsphase in der Rekonversionszeit in geeigneter Weise ergibt sich $\hat{H}_{\text{Rek}} = -\hat{H}_{\text{Anr}}$ und die Anregung der DQ-Kohärenzen wird während der Rekonversionszeit rückgängig gemacht [125]. Das Auslesen geschieht mit einem weiteren 90° -Puls. In einer Probe können außer DQ-Kohärenzen weitere, (meist ungewollte) Kohärenzen höherer Ordnung angeregt werden. Daher ist es notwendig, die gesuchten Kohärenzordnungen zu selektieren, was mit Hilfe eines geeigneten Phasenzklus geschehen kann [77].

Das Zweipuls-Experiment, wie oben beschrieben, ist dazu geeignet DQ-Kohärenzen unter statischen Bedingungen anzuregen. Dieses Experiment kann unter MAS nur bedingt angewendet werden, insbesondere nur für Anregungszeiten $\tau_{\text{DQ}} < \frac{T_{\text{R}}}{2}$ [132], da sich unter MAS das Vorzeichen im Ortsanteil des Hamiltonoperators in der zweiten halben Rotorperiode umkehrt und somit der DQ-Anregung entgegenwirkt. Mit der Baba-Sequenz ist die Anregung von DQ-Kohärenzen auch unter MAS möglich, wie im Folgenden gezeigt wird.

Die BaBa-Sequenz Die Anregung von DQ-Kohärenzen unter schneller Probenrotation (MAS) ist von besonderem Interesse und stellt gleichzeitig eine erhöhte Anforderung an die

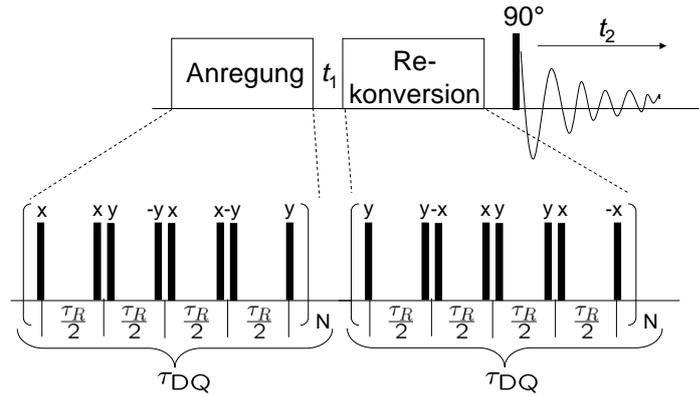


Abbildung 3.11.: Allgemeine 2D-Pulssequenz zur MQ-Spektroskopie (oben) und mögliches Anregungsschema für BaBa-DQ-Pulssequenz mit einer Anregungszeit von $2\tau_R$ (unten) [122]. Wiedereinkopplungssequenzen werden während der Anregungs- und Rekonversionszeit eingestrahlt.

verwendete Pulssequenz dar. Das MAS liefert wegen der (Aus-)Mittelung der vorhandenen anisotropen Wechselwirkungen eine hohe spektrale Auflösung. Dies führt aber auch dazu, dass die in diesen Wechselwirkungen vorhandenen Informationen (ganz oder teilweise) verloren gehen. Des Weiteren sind die Anregungs- und Rekonversionszeit unter MAS auf Werte kleiner als $\frac{\tau_R}{2}$ beschränkt, da MAS den Einfluss der Pulssequenz in der zweiten halben Rotorperiode umkehrt (s. Kap. (3.4)) und damit die Anregung von DQ-Kohärenzen wieder rückgängig macht. Deshalb ist es auch in diesen Experimenten notwendig, die durch MAS (aus)gemittelte Wechselwirkung wiedereinzukoppeln. Dazu werden zu bestimmten Zeitpunkten der Sequenz Pulse eingestrahlt, die die Ausmittelung der jeweiligen Wechselwirkung durch MAS verhindern. In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der ^1H -DQ-Kohärenzen die Wiedereinkopplungssequenz „BaBa“ (Back-to-Back) benutzt [122, 133]. Diese basiert darauf, dass die Wiedereinkopplungspulse unter MAS direkt hintereinander eingestrahlt werden, um die Sequenz besser mit der Probenrotation synchronisieren zu können [134] und somit einen reinen DQ-Hamiltonian zu erhalten. Es handelt sich bei der BaBa-Sequenz um ein zweidimensionales Experiment. Das allgemeine Schema zur Anregung von DQ-Kohärenzen sowie ein Basiszyklus der BaBa-Pulssequenz nach Feike *et al.* [122] ist in Abb. 3.11 dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz basiert auf diesem Experiment, bietet jedoch für lange Anregungszeiten wegen eines komplexen, übergeordneten Phasenzklus eine bessere Kompensation von Offset-Effekten [133].

Während der Anregungszeit τ_{DQ} werden DQ-Kohärenzen im Spinsystem durch eine geeignete Pulsfolge angeregt. Es wird in diesem Experiment keine Evolutionszeit t_1 zugelassen, da eine Evolution der angeregten Kohärenzen nicht gewollt ist. Während der Rekonversionszeit werden die DQ-Kohärenzen wieder in direkt beobachtbare EQ-Kohärenzen umgewandelt und können als Signal während der Zeit t_2 detektiert werden.

Im BaBa-Experiment werden zwei aufeinander folgende, um 90° phasenverschobene $\frac{\pi}{2}$ -Pulse bei jeder halben Rotorperiode eingestrahlt (s. Abb. 3.11). Dies führt dazu, dass, in Analogie zu den π -Pulsen im REDOR-Experiment, das Vorzeichen der dipolaren Phase jede halbe Rotorperiode invertiert wird (s. Abb. 3.7). Für die beiden Hälften einer Rotorperiode kann die jeweilige aufsummierte, dipolare Phase

$$\Phi_{\text{D}}(0, \tau_{\text{R}}/2) = -\frac{3D_{\text{ij}}}{\sqrt{2}\omega_{\text{R}}} \sin 2\beta \sin \gamma = -\Phi_{\text{D}}(\tau_{\text{R}}/2, \tau_{\text{R}}) . \quad (3.9)$$

berechnet werden (s. Gl. (3.3)). Diese unterscheiden sich wegen des MAS im Vorzeichen. Durch eine geeignete Wahl der Pulsphasen, wie z.B. in Abb. 3.11 dargestellt, kann der Spinanteil des Hamiltonoperators so manipuliert werden, dass er der Mittelung durch MAS entgegenwirkt und die dipolare Kopplung erhalten bleibt. Am Ende einer Rotorperiode hat sich die dipolare Phase verdoppelt (Prinzip der Wiedereinkopplung, Vgl. dazu Gl. (3.5) in Kap. 3.3).

Der mittlere Hamiltonoperator der BaBa-DQ-Sequenz für ein Spinpaar ist durch

$$\hat{H}_{\text{BaBa}} = \Phi_{\text{eff}}(\hat{T}_{22}^{\text{ij}} + \hat{T}_{2-2}^{\text{ij}}) \frac{1}{\tau_{\text{R}}} = \Phi_{\text{eff}}(\hat{I}_+^{\text{i}} \hat{I}_+^{\text{j}} + \hat{I}_-^{\text{i}} \hat{I}_-^{\text{j}}) \frac{1}{\tau_{\text{R}}} \quad (3.10)$$

gegeben [133] und stellt einen reinen DQ-Hamiltonian dar. Dabei sind $\Phi_{\text{eff}} = \frac{3}{2} \Phi_{\text{D}}(0, \tau_{\text{R}})$ die effektive, über eine Rotorperiode aufsummierte Phase, \hat{T}_{22} und \hat{T}_{2-2} die irreduziblen Tensoroperatoren und \hat{I}_+ und \hat{I}_- die so genannten Leiteroperatoren. Der Faktor $\frac{3}{2}$ resultiert bei der homonuklearen Wechselwirkung aus der Vertauschung des Hamiltonoperators mit dem Zeeman-Hamiltonian. Bei heteronuklearer Wechselwirkung ist dieser Faktor 1 und die Phase Φ_{eff} ergibt sich aus dem Ortsanteil des Hamiltonoperators (Gl. (3.3) und (2.38)).

Unter Wirkung des Hamiltonoperators in Gl. (3.10) werden im Spinsystem DQ-Kohärenzen angeregt, genauer (2n+2)-Quantenkohärenzen (n=0,1,...). Mit einem entsprechenden Phasenzklus können am Ende der Sequenz die gesuchten Kohärenzordnungen selektiert werden [77]. Im Fall des hier verwendeten vierstufigen Phasenzklus werden für die Referenzintensität die 4n-Kohärenzen und für die DQ-Intensität die (4n+2)-Kohärenzen selektiert [133, 135].

3.4.2 | Normierte ¹H-Doppelquanten-Aufbaukurven

Durch Einstrahlen der BaBa-Sequenz (s. Abb. 3.11) werden DQ-Kohärenzen entsprechend Gl. (3.8) angeregt und anschließend wieder in messbare Magnetisierung umgewandelt. Am Ende der Anregungszeit τ_{DQ} existieren sowohl longitudinale Magnetisierung als auch DQ-Kohärenzen (s. Gl. (3.8)). Nach der Rekonversion ergibt sich wieder longitudinale Magnetisierung, deren Vorzeichen von der Phase der Rekonversionspulse abhängt. Ist die Phase der Rekonversionspulse um $\Delta\varphi = \pm 90^\circ$ gegenüber denen der Anregungsphase verschoben, erhält die aus dem DQ-Term in Gl. (3.8) hervorgegangene z-Magnetisierung ein positives, bei einer Phasenverschiebung von $\Delta\varphi = 0$ bzw. $\Delta\varphi = 180^\circ$ ein negatives Vorzeichen. Der Beitrag aus dem Referenzterm bleibt, unabhängig von der Phasenverschiebung immer positiv. Für die Zweipuls-Sequenz ergibt sich nach der Rekonversion die Zusammensetzung des Signals in Abhängigkeit von der Phasenverschiebung, $\Delta\varphi$, zwischen Anregung und Rekonversion wie folgt [136] :

$$\text{Gl. (2.8)} \xrightarrow{(90^\circ)_{\varphi+\Delta\varphi} - \tau_{\text{DQ}} - (90^\circ)_{\varphi+\Delta\varphi}} \underbrace{(\hat{I}_z^{\text{i}} + \hat{I}_z^{\text{j}}) \cos^2 \Phi_{\text{DQ}}}_{\text{Referenzterm}} \pm \underbrace{(\hat{I}_z^{\text{i}} - \hat{I}_z^{\text{j}}) \sin^2 \Phi_{\text{DQ}}}_{\text{DQ-Term}}, \quad (3.11)$$

was ebenfalls unter der Wirkung der BaBa-Sequenz resultiert. Beim Messen wird über die Phase des Empfängers nun entweder (bei konstanter Receiverphase) der $\cos^2 \Phi_{\text{DQ}}$ - (Referenz-) oder (bei alternierender Receiverphase) der $\sin^2 \Phi_{\text{DQ}}$ - Term (DQ-Term) ausgewählt. D.h., in einem solchen DQ-Experiment können Referenz- und DQ-Intensität in einer Messung ermittelt werden.

Für ein Spinpaar wird im Langzeitmittel gleich viel Intensität auf den Referenzterm und den DQ-Term verteilt. Die Summe aus Referenz-, I_{Ref} , und DQ-Term, I_{DQ} , ergibt somit die gesamte Intensität und wird als Summenintensität, $SMQ = I_{\text{Ref}} + I_{\text{DQ}}$, bezeichnet.

Während der Anregungs- und Rekonversionszeit liegt transversale Magnetisierung vor, die durch Relaxationsprozesse beeinflusst sein kann. Diese Relaxation kann als eine zusätzliche Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten T_2^{DQ} angenommen werden. Wird die DQ-Intensität, I_{DQ} , auf die Summenintensität, SMQ , normiert, wird die so genannte normierte DQ-Intensität, I_{nDQ} , der Form

$$I_{\text{nDQ}} = \frac{I_{\text{DQ}}}{SMQ} = \left\langle \frac{\sin^2 \Phi_{\text{DQ}} \cdot \exp(-2\tau_{\text{DQ}}/T_2^{\text{DQ}})}{(\cos^2 \Phi_{\text{DQ}} + \sin^2 \Phi_{\text{DQ}}) \cdot \exp(-2\tau_{\text{DQ}}/T_2^{\text{DQ}})} \right\rangle = \langle \sin^2 \Phi_{\text{DQ}} \rangle \quad (3.12)$$

erhalten, wobei die Phase Φ_{DQ} die dipolare Kopplungsstärke enthält (s. Gl. (3.9)) und $\langle \dots \rangle$ das Ensemblemittel darstellt. Die in Abb. 3.12(a) dargestellten, für verschiedene homonukleare, dipolare Kopplungen D_{ij} simulierten Aufbaukurven für ein Spinpaar zeigen Oszillationen. Diese entsprechen der dipolaren Frequenz und sind nur für ein Spinpaar vorhanden. Für ein Ensemble an Spins überlagern sich die unterschiedlichen dipolaren Frequenzen, so dass die Oszillationen abnehmen bzw. verschwinden (s. Abb. 3.12(d)). Wegen der Normierung in Gl. (3.12) ist die erhaltene Funktion nicht mehr von Relaxation beeinflusst und nähert sich einem Wert von 0.5 an. Wird dieses Plateau nicht erreicht, kann es sich um ein System mit sehr schwachen dipolaren Kopplungen und/oder dominanten, nicht herausnormierbaren Relaxationseffekten aufgrund intermediärer Bewegungen handeln, wie z.B. eine Polymerschmelze [137]. Meist sind jedoch isotrope Anteile der Probe dafür verantwortlich, da diese Anteile keine Dipolkopplung besitzen und somit nicht zur Erzeugung von DQ-Kohärenzen beitragen. Die Protonen der isotropen Anteile liefern dennoch Beiträge zum Referenzsignal. Eine gleichmäßige Verteilung der Intensität auf DQ- und Referenzterm und die Normierung entsprechend Gl. (3.12) ist nicht mehr gegeben. Es ist daher notwendig, den Beitrag ungekoppelter Anteile, SMQ_{iso} , vor der Normierung zu bestimmen (s. Abb. 3.12(c)) und von der Summenintensität abzuziehen. Dazu werden die experimentellen Daten durch geeignete Funktionen angepasst [133, 138, 139]. Die normierte DQ-Intensität wird in solchen Fällen durch

$$I_{\text{nDQ}} = \frac{I_{\text{DQ}}}{(SMQ - SMQ_{\text{iso}})} \quad (3.13)$$

beschrieben (s. Abb. 3.12(d)). Damit ist es möglich, quantitative Aussagen über den jeweiligen Anteil gekoppelter und ungekoppelter Spins in der Probe zu treffen (s. Abb. 3.12(c)).

Ausgehend von Gleichung (3.8) kann die DQ-Intensität für kurze Anregungszeiten τ_{DQ} bzw. schwache Kopplungen durch

$$I_{\text{nDQ}} \propto \sin \Phi_{\text{DQ}} \cdot \sin \Phi_{\text{DQ}} \approx \Phi_{\text{DQ}} \cdot \Phi_{\text{DQ}} + \dots \approx D_{ij}^2 \tau_{\text{DQ}}^2 + \dots \approx \frac{\tau_{\text{DQ}}^2}{r_{ij}^6} + \dots, \quad (3.14)$$

angenähert werden. Für eine gegebene Probe kann damit aus dem Anfangsanstieg der DQ-Intensität in Abhängigkeit von der DQ-Anregungszeit die dipolare Kopplungskonstante, D_{ij} bzw. die Restkopplung eines Systems (s. Abb. 3.12(d)), und für eine starre Probe sogar der internukleare Abstand zwischen den beiden koppelnden Spins bestimmt werden [80]. Eine solche Beschreibung ist streng genommen nur für die Näherung eines Spinpaares gültig. Für ein Ensemble von koppelnden Spins ist eine analytische Darstellung nicht ohne Weiteres möglich, denn die unterschiedlichen Hamiltonoperatoren für die verschiedenen, koppelnden Spinpaare vertauschen nicht miteinander. Dies ist für die Messung von DQ-Kohärenzen jedoch weniger kritisch, wenn eine Pulssequenz verwendet wird, die

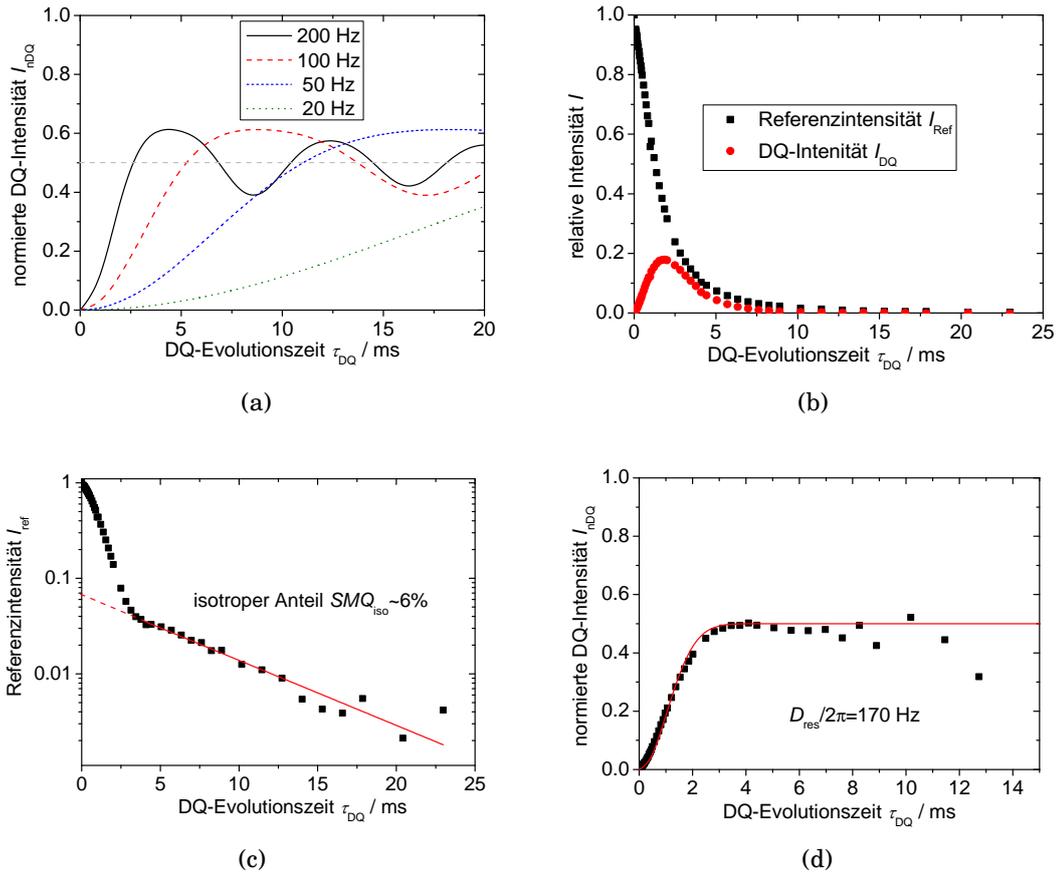


Abbildung 3.12.: (a) Berechnete Kurven für die normierte DQ-Intensität $I_{n,DQ}$ in Abhängigkeit von der DQ-Evolutionszeit für verschiedene dipolare Kopplungsstärken für ein Spinpaar (Gl. (3.12)). Eine stärkere Kopplung äußert sich dabei in einem größeren Anstieg der Kurve. (b) Referenz- und DQ-Intensität in Abhängigkeit von der DQ-Evolutionszeit gemessen an einer Gummiprobe am Niederfeldspektrometer (statische Messung). (c) Bestimmung des isotropen (ungekoppelten) Anteils aus der Referenzintensität. (d) Darstellung der aus den Rohdaten erhaltenen, normierten DQ-Aufbaukurve, sowie die aus der Kurvenanpassung ermittelte Restkopplung D_{res} (gemessen von F. Lange [140]).

durch einen reinen DQ-Hamiltonian beschrieben werden kann (wie die BaBa-Sequenz). Weiterhin wird unter MAS die Ausbildung höherer Kohärenzordnungen verhindert, so dass die Beschreibung eines Spinpaares verwendet werden kann [88]. Grundsätzlich werden jedoch in Multispinsystemen immer effektive Kopplungen bestimmt, welche nur bei isolierten Protonengruppierungen, beispielsweise CH_2 - oder CH_3 -Gruppen der Paarkopplung entsprechen. Um aus der normierten DQ-Kurve mittels Kurvenanpassung die Restkopplung des Systems ermitteln zu können, werden jedoch meist komplexere Funktionen benötigt und benutzt [141].

3.4.3 | Doppelquanten-Seitenbanden-Spektren

In dem bisher beschriebenen DQ-Experiment (s. Abb. 3.11) wird die Zeit t_1 zwischen der Anregung und der Rekonversion Null gesetzt, so dass eine Entwicklung der erzeugten DQ-Kohärenzen unter eventuell vorhandenen isotropen und anisotropen Wechselwirkungen nicht möglich ist. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, liefert die Auswertung des Anfangsanstiegs der DQ-Aufbaukurven die homonukleare, dipolare Restkopplung des Spinsystems. Da die DQ-Anregungszeit τ_{DQ} direkt proportional zur Restkopplung ist,

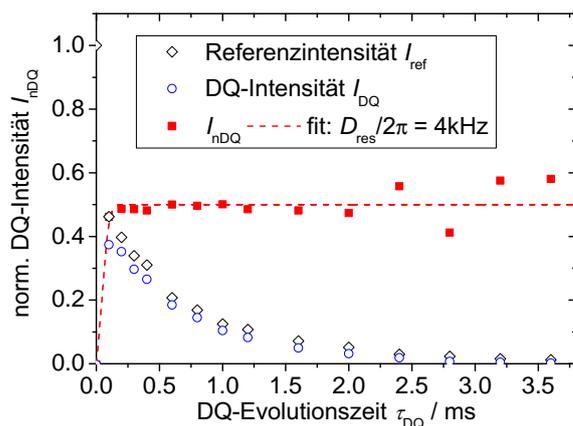


Abbildung 3.13.: DQ-Aufbaukurve für ein amphiphiles Molekül (C12/12, s. Kap. 5.1) mit großer Restkopplung, gemessen bei einer Rotationsfrequenz $\nu_R = 10\text{kHz}$. Die Aufbaukurve erreicht bereits mit dem zweiten Messpunkt das Plateau von 0.5, so dass ein Fit an den Anstieg kein aussagekräftiges Ergebnis liefern kann. Es ist ebenfalls erkennbar, dass die Referenzintensität, bedingt durch die große dipolare Restkopplung im System, eine schnelle Relaxation aufweist, ebenso wie die DQ-Intensität.

wird im Umkehrschluss für eine schwache Kopplung eine längere DQ-Anregungszeit notwendig. Das bedeutet, dass das Maximum der DQ-Intensität für große Kopplungen (in der Größenordnung der Rotationsfrequenz) schon für sehr kurze τ_{DQ} erreicht wird. Die normierte DQ-Aufbaukurve nähert sich bereits für sehr kurze Anregungszeiten dem Plateauwert von 0.5 an und aus dem Anfangsanstieg kann die dipolare Restkopplung nicht verlässlich ermittelt werden (s. Abb. 3.13).

Zur Bestimmung stärkerer Kopplungen ist eine andere experimentelle Vorgehensweise notwendig. Dazu wird die oben vorgestellte BaBa-Pulssequenz etwas modifiziert. Es wird ausgenutzt, dass am Maximum der DQ-Aufbaukurve die Anregung der DQ-Kohärenzen am größten ist und eine Zeit τ_{DQ} für die Anregung ausgewählt, welche sich im Plateau der normierten DQ-Aufbaukurve befindet ($\tau_{DQ} \gtrsim 2\tau_{DQ,max}$). Eine zusätzlich eingeführte Evolutionszeit t_1 (s. Abb. 3.11) bewirkt eine Entwicklung der DQ-Kohärenzen unter chemischer Verschiebung. Es ist damit möglich, über die Umgebung das Spinsystem zu charakterisieren [129]. Für verschiedene Werte von t_1 ergibt sich wiederum ein zweidimensionales Experiment. Hat während der Zeit t_1 eine Evolution (unter chemischer Verschiebung) stattgefunden, so ist das gemessene Signal durch diese Evolution in der Amplitude moduliert. Für qualitative Aussagen ist es ausreichend, das in t_1 rotorsynchronisierte 2D-Spektrum ($\Delta t_1 = N\tau_R$) auszuwerten, um Informationen über vorhandene dipolare Kopplungen und eine daraus resultierende räumliche Nähe der Kerne zu erhalten. In diesem 2D-DQ-EQ-Korrelationsspektrum existieren nur Signale (sowohl Diagonal- als auch Nichtdiagonalsignale), wenn die beobachteten Protonen dipolar gekoppelt sind und damit eine räumliche Nähe zueinander besitzen [142–144]. Im Unterschied dazu gibt es bei EQ-EQ-Korrelationsspektren, wie z.B. im NOESY- oder COSY-Experiment, denen meist Magnetisierungsübertrag zugrunde liegt, für alle Signale Diagonalpeaks [77]. In den DQ-EQ-Korrelationsspektren ist daher auch das Fehlen bestimmter Signale von besonderem Interesse. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die beiden betrachteten Protonen nicht in räumlicher Nähe zueinander befinden (Abstand größer als 0.4nm) [88]. Für längere Anregungszeiten könnten auch Signale für weiter entfernte Spins detektiert werden, experimentelle Imperfektionen dominieren jedoch und das Signal wird zu klein.

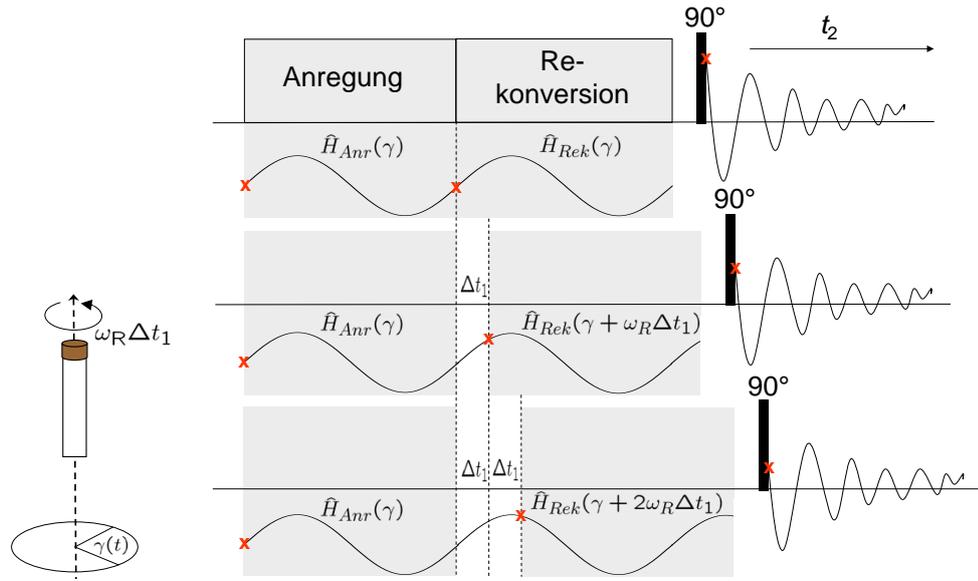


Abbildung 3.14.: Schematische Darstellung der Rotorkodierung im DQ-Experiment. Wird eine Evolutionszeit mit Inkrementen Δt_1 zwischen Anregung und Rekonversion der DQ-Kohärenzen eingeführt, wird der Hamiltonoperator der Rekonversion (\hat{H}_{Rek}) abhängig von t_1 . Die Phase zu Beginn der Rekonversionszeit unterscheidet sich von der Phase zu Beginn der Anregungszeit. Dies führt dazu, dass die Intensität des Signals in Abhängigkeit von $\omega_R \Delta t_1$ moduliert ist, was in der indirekten Dimension zum Erscheinen von Seitenbanden führt [88, 149].

Wird die Evolutionszeit in Intervallen kleiner als die Rotorperiode inkrementiert, führt dies zum Erscheinen von Seitenbanden [143, 145–148]. Diese Seitenbandenspektren können durch zwei verschiedene Mechanismen der Rotorkodierung hervorgerufen werden; durch das so genannte *rotor reconversion encoding (RRE)* und das *evolution rotor modulation (ERM)* [80, 88, 132, 147]. Beim RRE-Mechanismus, welcher bei schnellem MAS dominant und damit wichtiger ist, werden die Seitenbanden durch die Rotorkodierung des Ortsanteils des Hamiltonoperators während der Rekonversionszeit hervorgerufen. Das bedeutet, dass in der Rekonversionsperiode im Vergleich zur Anregungsperiode ein Phasenunterschied besteht. Für $t_1 \neq N\tau_R$ ist die Rotorphase zu Beginn der Anregungszeit eine andere als zu Beginn der Rekonversionszeit (s. Abb. 3.14). Der Hamiltonoperator der Anregungszeit ist unabhängig von t_1 , während in der Rekonversionszeit eine zusätzliche Phase $\omega_R \Delta t_1$ erscheint, welche zur Entstehung von Rotorechos führt. Diese Rotorechos ergeben nach Fouriertransformation bezüglich t_1 in der DQ-Dimension des 2D-Spektrums Seitenbanden bei Vielfachen der Rotationsfrequenz. Ausgehend von den Gleichungen (3.9) und (3.14) setzt sich das Zeitsignal für ein Spinpaar aus den Phasen $\Phi_{DQ}(0, \tau_R/2)$ und $\Phi_{DQ}(\tau_R/2 + t_1, \tau_R + t_1)$ zusammen, welche unter Zuhilfenahme von Gleichung (3.3) bestimmt werden können.

Für die Annahme eines isolierten Spinpaares unter der BaBa-Wiedereinkopplungssequenz mit einer Anregungs- bzw. Rekonversionszeit von $\tau_{Anr} = \tau_{Rek} = N\tau_R$, wobei $N = 0, 1, \dots$ die Anzahl der Wiedereinkopplungsperioden ist, kann das DQ-Zeitsignal wie folgt beschrieben werden [150]:

$$S(t_1, t_2 = 0) = \left\langle \sin(N\Phi_0) \cdot \sin(N\Phi_{t_1}) \right\rangle. \quad (3.15)$$

Die Klammern $\langle \dots \rangle$ kennzeichnen das Pulvermittel. Mit Hilfe von Gleichung (3.3) kann die Phase $\Phi_{t_1} = \frac{3D_{ij}}{\sqrt{2}\omega_R} \sin\beta \sin(\gamma + \omega_R t_1)$ berechnet und zusammen mit Gleichung (3.9),

3. 2D-Experimente zur Bestimmung homo- und heteronuklearer, dipolarer Restkopplungen

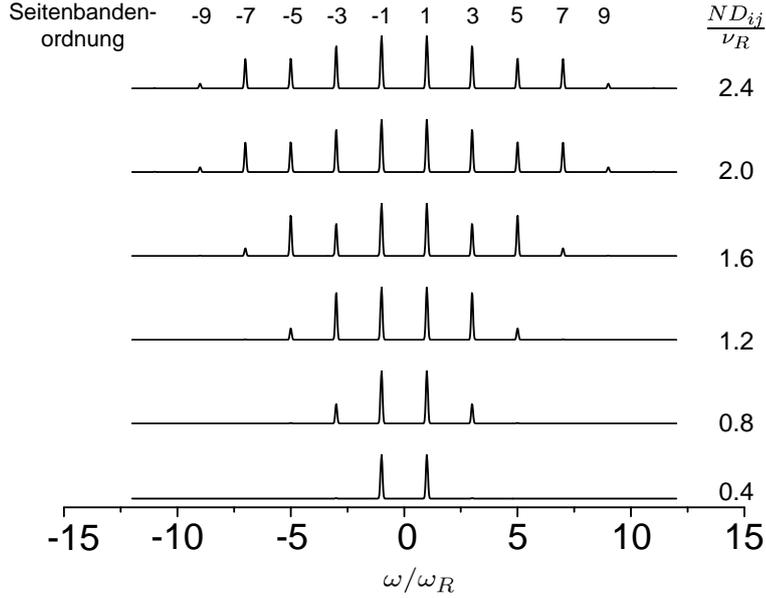


Abbildung 3.15.: Mit Hilfe von Gleichung (3.16) berechnete Seitenbandenmuster für verschiedene Verhältnisse ND_{ij}/ν_R . Für gegebene Werte der Wiedereinkopplungszeit $N\tau_R$ ist damit die dipolare Kopplung D_{ij} für ein Spinpaar (i,j) bestimmbar.

welches Φ_0 entspricht, in Gleichung (3.15) eingesetzt werden. Die Winkel β und γ sind die Eulerwinkel, die den dipolaren Wechselwirkungstensor aus dem Hauptachsensystem in das Rotorsystem überführen. Das Pulvermittel über die Winkel β und γ kann durch doppelte Summation angenähert und ausgerechnet werden. Für die DQ-Kohärenzen enthält das Seitenbandenspektrum nur Seitenbanden ungerader Ordnungen. Die Intensitäten I_{2k+1} der Seitenbanden ungerader Ordnung sind im Spektrum durch

$$I_{2k+1} = \frac{1}{2} \int_0^\pi \left[J_{2k+1} \left(N \frac{D_{ij}}{\nu_R} \frac{3}{\sqrt{2}} \sin 2\beta \right) \right]^2 \sin \beta d\beta \quad (3.16)$$

gegeben [151], wobei die J_{2k+1} Besselfunktionen ungerader Ordnung sind [152]. Daher existieren im Spektrum auch nur ungerade Ordnungen Seitenbanden. Aus Gleichung (3.16) ist zu erkennen, dass die Intensitäten der jeweiligen Seitenbandenordnung hauptsächlich durch die Anregungszeit (N/ν_R) und die homonukleare dipolare Kopplung D_{ij} zwischen den betrachteten Spins i und j bestimmt ist. Da die Anregungszeit konstant ist, kann aus diesen Spektren die dipolare (Rest-) Kopplung eines Spinpaares bestimmt werden. In Abb. 3.15 sind berechnete Seitenbandenspektren in Abhängigkeit des Produktes ND_{ij}/ν_R gezeigt. Es ist ersichtlich, dass je größer dieses Produkt wird, desto mehr Seitenbanden erscheinen im Spektrum. Für schwächere Kopplungen ist daher für die gleiche Anzahl an Seitenbanden eine längere Anregungszeit (Wiedereinkopplungszeit) notwendig. Um die maximal zur Verfügung stehende DQ-Intensität und möglichst viele Seitenbanden für eine gegebene Dipolkopplung zu erhalten, ist es ratsam Anregungszeiten im Plateau der DQ-Aufbaukurve zu wählen. Trotzdem dürfen Anregungs- und Rekonzentrationszeit nicht zu lang sein, um Einflüsse durch Relaxation zu vermeiden bzw. die vorhandene Intensität nicht auf zu viele Seitenbanden zu verteilen. Beides kann zu einem sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen. Für homonukleare DQ-Messungen wird empfohlen das Produkt ND_{ij}/ν_R kleiner als 3 zu wählen [88].

Der zweite Mechanismus zur Erzeugung von Seitenbanden in einem MQ-Spektrum ist das *evolution rotor modulation (ERM)*. Die Rotormodulation erfolgt, wenn sich die

erzeugten MQ-Kohärenzen während der Evolutionszeit t_1 unter einer anisotropen Wechselwirkung entwickeln. Für den Spezialfall eines isolierten Protonenpaares gibt es keine Entwicklung der DQ-Kohärenzen während t_1 , denn die Anisotropie der chemischen Verschiebung ist vernachlässigbar und es gibt keine dipolare Kopplung zu anderen Spins. Deshalb ist in diesem Fall keine anisotrope Wechselwirkung vorhanden. Sobald das betrachtete Spinpaar jedoch zu anderen, nicht an der Kohärenz beteiligten Spins dipolar koppelt, entwickeln sich MQ-Kohärenzen unter dieser Wechselwirkung. Die Ortsanteile der verschiedenen Hamiltonoperatoren werden dann ebenfalls durch die Probenrotation moduliert, was im Spektrum zum Erscheinen von Seitenbanden führt. Es ist nicht ohne Weiteres möglich, eine einfache analytische Beschreibung des Zeitsignals zu finden. Sind beide Mechanismen der Rotormodulation vorhanden, ist eine einfache Zerlegung des Signals nicht generell möglich und als Resultat erscheinen die Seitenbanden bei allen Vielfachen der Rotationsfrequenz im Spektrum. Die durch ERM hervorgerufenen Seitenbanden besitzen jedoch eine vergleichsweise geringe Intensität, was darauf hindeutet, dass der RRE-Mechanismus vorherrschend ist und der ERM-Mechanismus meist vernachlässigt werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Rotorkodierung des Hamiltonoperators der Rekonversionszeit im DQ-Experiment Seitenbanden ungerader Ordnung generiert werden. Weitere Wechselwirkungen führen zu zusätzlichen Seitenbanden. Im Fall von DQ-Kohärenzen sind dies Seitenbanden gerader Ordnung. Aus den gemessenen Seitenbandenspektren ist es möglich, die dipolare Kopplung in einem Spinsystem zu ermitteln und daraus Rückschlüsse über dessen molekulare Struktur und Dynamik zu ziehen.

4 | Biologische Membranen und Modellmembranen

Biologische Membranen stellen als Begrenzung von Zellen einen sehr wichtigen Bestandteil lebender Organismen dar. Sie sind komplexe, zweidimensionale Gebilde, die aus verschiedenen Komponenten, z.B. Lipiden und Proteinen, aufgebaut sind. Das Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson beschreibt Membranen als fluide Doppelschichten (s. Abb. 4.1), in der die verschiedenen Bausteine ein- oder angelagert sind [4]. Die Organisation der einzelnen Bausteine, sowie deren Möglichkeit sich in der Membran frei zu bewegen oder in Kompartimenten organisiert zu sein, macht die Vielfalt der Membranen aus und ist maßgeblich für deren biologische Funktionen verantwortlich [153, 154]. Die Komplexität erschwert jedoch Untersuchungen zum grundlegenden Verständnis der Eigenschaften und Funktionen von biologischen Membranen. Es bietet sich daher an mit so genannten Modellmembranen zu arbeiten, welche ausschließlich aus Lipiden bestehen und keine zusätzlichen Bausteine beinhalten. Mit diesen Modellen ist es zunächst möglich, die Eigenschaften der Membran an sich zu untersuchen. Eine der am häufigsten auftretenden Lipidspezies in Membranen sind die Phospholipide [156], welche weiter in die Glycerophospholipide und Phosphosphingolipide unterteilt werden. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit Glycerophospholipiden (kurz: Glycerolipide) gearbeitet wurde, werden im Folgenden nur deren Eigenschaften beschrieben. Im Weiteren werden die Glycerolipide der Einfachheit halber als Phospholipide bzw. als Lipide bezeichnet.

4.1 | Aufbau und Phasenverhalten von Phospholipiden

Glycerolipide sind, wie alle Lipide, amphiphile Moleküle. Sie bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe (Phosphatgruppe mit Rest), an die über eine Glycerolgruppe zwei hydrophobe Fettsäureketten (sn-1, sn-2) gebunden sind (s. Abb. 4.1). Je nach gebundenem Rest der Phosphatgruppe und den veresterten Fettsäuren tragen die Glycerolipide unterschiedliche Namen. Am häufigsten treten dabei die Phosphatidylcholine auf, deren Phosphatgruppe einen Cholin-Rest trägt. Zu dieser Gruppe gehören auch alle hier in der Arbeit verwendeten Phospholipide, wie DMPC (Di-myristoyl-phosphatidylcholin), DPPC (Di-palmitoyl-phosphatidylcholin) und DOPC (Di-oleoyl-phosphatidylcholin). Sie unterscheiden sich im Wesentlichen in der Länge der Alkylketten und im Vorhandensein von Doppelbindungen innerhalb der Ketten. Die Haupteigenschaften dieser synthetischen Lipide sind Tab. 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1.: *Eigenschaften der verwendeten Phospholipide (Molekulargewicht, Kettenlänge und Phasenumwandlungstemperatur in Wasserüberschuss). Bei der Angabe der Kettenlänge ist zusätzlich die Anzahl (0 oder 1) der vorhandenen Doppelbindungen (DB) pro Fettsäurekette angegeben.*

	DMPC	DPPC	DOPC
Molekulargewicht	677.933 g/mol	734.039 g/mol	786.113 g/mol
Kettenlänge:DB	14:0	16:0	18:1
Phasenübergang ($L_{\beta'}$ → L_{α})	23–24°C [157]	41–42°C [75, 158, 159]	-22 – -20°C [160, 161]

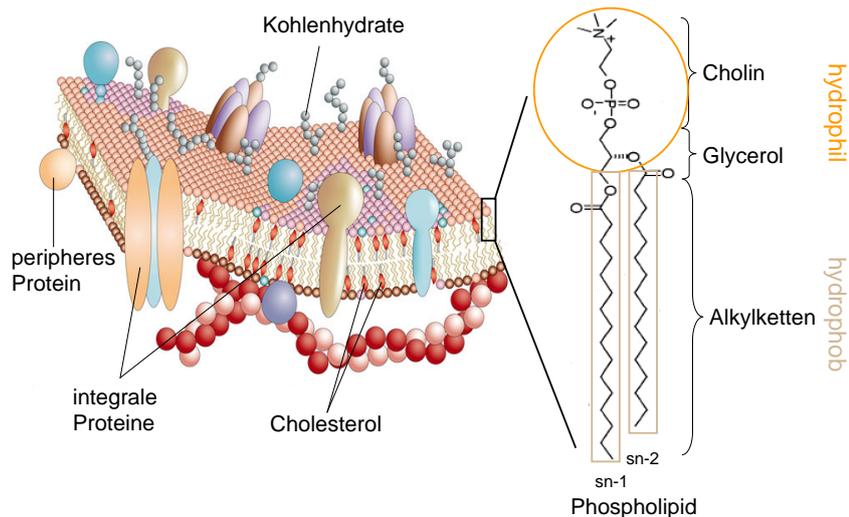


Abbildung 4.1.: Darstellung des Flüssig-Mosaik-Modells nach Singer und Nicolson. Die Membran wird als komplexe, zweidimensionale Flüssigkeit beschrieben, in der Proteine ein- oder angelagert sind (aus [4, 155]). Ein wesentlicher Bestandteil der Membran sind die Glycerolipide. Der Aufbau eines solchen Phospholipids ist schematisch am Beispiel (DMPC) gezeigt. Die Kopfgruppe wird vom Cholinmolekül gebildet, welches über das Glycerol mit den Alkylketten (sn-1 und sn-2) verbunden ist. Der amphiphile Charakter der Membran ist durch die unterschiedliche Polarität (hydrophil, hydrophob) der molekularen Bausteine der Lipidmoleküle gegeben.

Wegen ihres amphiphilen Charakters bilden Lipide in Wasser verschiedene Aggregate aus, so dass ihre molekulare Anordnung für die Moleküle entropisch am günstigsten ist [162, 163]. Dabei ordnen sich die Moleküle so an, dass die hydrophile Kopfgruppe zur wässrigen Phase hin und die hydrophoben Fettsäureketten von der wässrigen Phase weg orientiert sind. Je nach Form der Lipidmoleküle entstehen dabei Aggregate unterschiedlicher Formen, wie z.B. Mizellen oder Vesikel (s. Abb. 4.2) [164]. Aufgrund der relativ einfachen Präparationsweise (s. Anhang B) stellen insbesondere multilamellare Vesikel, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sehr gute Modellsysteme für biologische Membranen dar [165, 166].

Lipide zeichnen sich besonders durch ihre lyotropen (von der Wasserkonzentration abhängigen) und thermotropen (von der Temperatur abhängigen) Phasenumwandlungen aus [167]. In Abb. 4.3(a) ist die Phasenumwandlungstemperatur T in Abhängigkeit vom Wassergehalt einer Probe für das Modelllipid DMPC dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass oberhalb von ca. 30 Gewichtsprozent Wasser die Kurven konstant verlaufen. Das bedeutet, dass sich die Phasenumwandlungstemperatur oberhalb dieses Wertes nicht mehr ändert. Unterhalb von 30 Gewichtsprozent Wasser nimmt die Phasenumwandlungstemperatur mit wachsender Lipidkonzentration zu [168, 169]. Dabei hängen die Phasenumwandlungstemperaturen vom Aufbau des jeweiligen Lipids ab, d.h. von der Kopfgruppe, von der Länge der Alkylketten und auch von der Anzahl und Position der Doppelbindungen in den Alkylketten [166, 170–172]. In Abhängigkeit der Temperatur werden vier Lipidphasen gefunden, welche sich in ihrer Struktur und Dynamik unterscheiden.

Für tiefe Temperaturen bilden die Lipidmoleküle eine Kristallphase, L_c , die sich durch eine gestreckte all-trans Konformation der Alkylketten auszeichnet. Die einzelnen Lipidmoleküle ordnen sich in einem zweidimensionalen, orthorhombischen Gitter an und die Ketten sind in ihrer Beweglichkeit durch benachbarte Ketten sehr stark eingeschränkt [170]. Die Kristallstruktur von DMPC beispielsweise zeigt dabei zusätzlich zwei energetisch favorisierte Konformationen, die sich in der Orientierung der Kopfgrup-

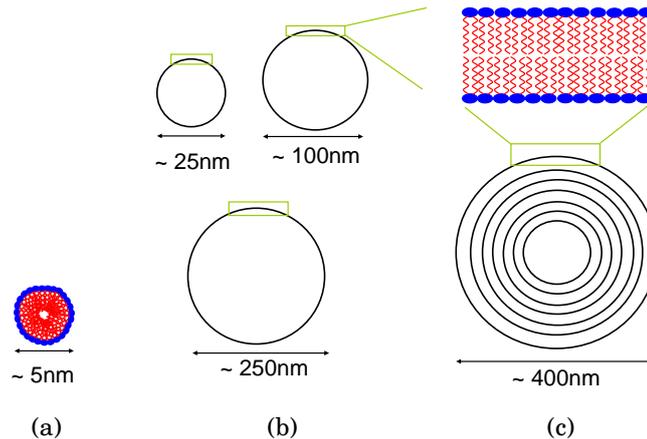


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung verschiedener Aggregate von Lipidmolekülen in Wasserüberschuss [166]. (a) Mizelle: die Alkylketten sind in das Innere der Mizelle orientiert und werden von den hydrophilen Kopfgruppen abgeschirmt. (b) Unilamellare Vesikel (ULV). Sie bestehen aus einer einzelnen Lipiddoppelschicht und existieren in verschiedenen Größen. (c) Multilamellare Vesikel: Sie bestehen aus mehreren Lipiddoppelschichten, welche zwiebelartig angeordnet sind.

pe unterscheiden [173]. In Molekulardynamik-Simulationen wurde gezeigt, dass auch in hydratisierten Doppelschichten noch mindestens zwei Konformationen vorhanden sind, welche sich in der Orientierung der Glycerolbindungen in Bezug auf die Membrannormale unterscheiden [68]. Für steigende Temperaturen schließt sich die so genannte Gelphase an, welche bei Phospholipiden nochmals in die $L_{\beta'}$ - und die $P_{\beta'}$ -Phase unterteilt wird (s. Abb. 4.3(a)). In beiden Phasen nehmen die Alkylketten eine gestreckte Konformation mit geringer Beweglichkeit ein, vergleichbar mit der kristallinen Phase, wohingegen die Kopfgruppen bereits eine hohe Mobilität besitzen [175]. In der $L_{\beta'}$ -Phase sind die Fettsäureketten der Lipidmoleküle um einen Winkel von ca. 30° gegen die Lamellennormale geneigt. Die Neigung entsteht aufgrund eines unterschiedlichen Flächenbedarfs von Kopfgruppe und Alkylketten. Dadurch ist es möglich, eine höhere Packungsdichte der Lipidmoleküle zu erzielen [170]. Der Übergang der Lipidmoleküle von der $L_{\beta'}$ - in die $P_{\beta'}$ -Phase ist in DSC-Experimenten messbar (s. Abb. 4.3(b)). Bei dieser so genannten Vorumwandlung erfolgt eine Umorientierung der Kopfgruppen der Lipidmoleküle, wodurch sich eine wellenartige Überstruktur ausbildet (s. Abb. 4.3(a)) [170, 176, 177]. Die $P_{\beta'}$ -Phase wird daher auch als „ripple“-Phase bezeichnet [171]. Die Ketten sind in dieser Phase in hexagonaler Packung angeordnet und annähernd so unbeweglich wie in der $L_{\beta'}$ -Phase. Die hohe Mobilität der Kopfgruppen bleibt auch in der $P_{\beta'}$ -Phase erhalten [170, 177].

Bei der so genannten Hauptphasenumwandlungstemperatur, T_m , gehen die Lipidmoleküle in die L_α -Phase, d.h. in einen flüssig-kristallinen Zustand, über. Es handelt sich dabei um einen Phasenübergang erster Ordnung, welcher einem Ordnungs-Unordnungsübergang der Alkylketten entspricht und sich ebenfalls mittels DSC-, aber auch mit Hilfe von NMR-Messungen erfassen lässt [128, 178]. Anhand des DSC-Thermogramms für DMPC (s. Abb. 4.3(b)) ist erkennbar, dass der Phasenübergang auf einen sehr engen Temperaturbereich beschränkt ist. Dies weist auf eine hohe Kooperativität des Übergangs hin, d.h. alle Lipidmoleküle gehen bei der gleichen Temperatur in die flüssig-kristalline Phase über [179]. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipidmoleküle „schmelzen auf“ und ihre Bewegungsfreiheit um die C-C-Bindungen nimmt zu. Daher zeichnet sich diese Phase durch eine sehr hohe Mobilität der Lipidmoleküle im Ganzen aus. Dennoch existiert auch in der flüssig-kristallinen Phase eine Restordnung. Es sind zwar innerhalb der Alkylketten vermehrt gauche-Konformationen vorhanden, jedoch treten diese

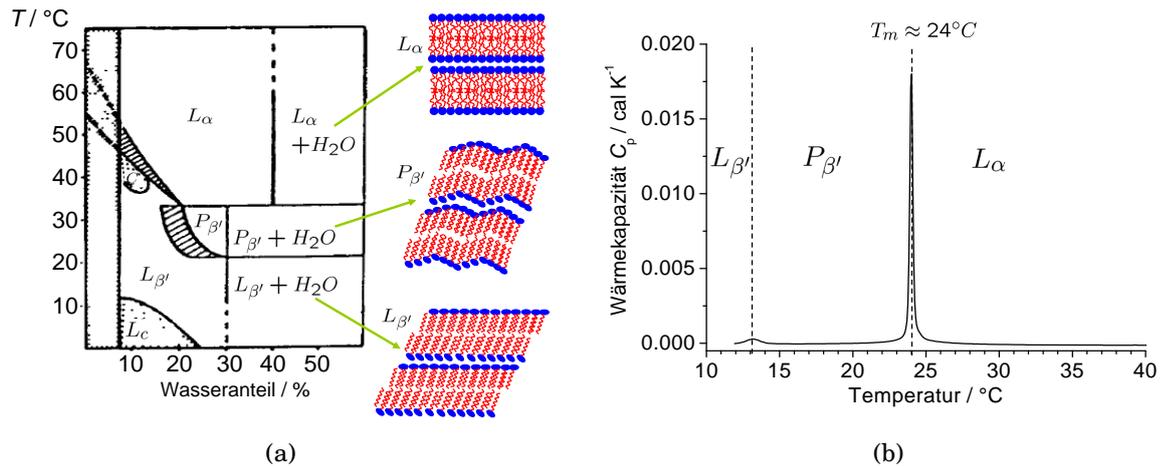


Abbildung 4.3.: (a) Phasendiagramm des Glycerolipids DMPC. Die Phasenumwandlungstemperatur ist in Abhängigkeit von der Wasserkonzentration dargestellt. Bei konstanter Temperatur ändert sich die Lipidphase in Abhängigkeit vom Wassergehalt (lyotropes Phasenverhalten). Für eine konstante Wasserkonzentration ändert sich die Lipidphase mit der Temperatur (thermotropes Phasenverhalten) (aus [170, 174]). Die einzelnen Phasen besitzen unterschiedliche Erscheinungsbilder. (b) DSC-Thermogramm für DMPC. Der Phasenübergang innerhalb der Gelphase ($P_{\beta'}$, $L_{\beta'}$), sowie der Übergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase (L_{α}) können in DSC-Messungen gefunden werden (DSC-Daten von C. Schwieger).

meist paarweise auf, um auch weiterhin eine parallele Packung der Ketten zu gewährleisten [180]. Dies führt zu einer Restordnung der Lipidketten, welche ebenfalls mit Hilfe von NMR-Messungen, insbesondere über die Bestimmung von dipolaren Restkopplungen, nachgewiesen werden kann (s. Kap. 4.2.1).

4.2 | NMR-Charakterisierung von Phospholipiden

4.2.1 | NMR-Spektren von Phospholipiden

Wie in Kap. 2.3 beschrieben, ist es mit Hilfe des NMR-Spektrums möglich, etwas über die molekulare Zusammensetzung einer Probe auszusagen. Synthetische Lipide, zu denen auch die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide zählen, sind in NMR-Untersuchungen hervorragend als Modellsubstanz für biologische Membranen geeignet, denn die chemischen Verschiebungen sind für beide Stoffe sehr ähnlich [181].

Für die verwendeten Lipidproben wurden temperaturabhängige ^1H - und ^{13}C -Spektren aufgenommen. Mit Hilfe dieser Spektren ist es möglich, einige Eigenschaften der Modellsubstanzen zu ermitteln. Diese werden im Folgenden für das Modelllipid DMPC bei einer Wasserkonzentration von ca. 50 Gewichts-% genauer beschrieben. Die Spektren wurden sowohl für Temperaturen unterhalb (18°C , 22°C) als auch oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur (25°C , 27°C) aufgenommen (s. Abb. 4.5). Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Grundlage der Literatur [103, 181, 182] und entspricht der Bezeichnung in Abb. 4.4. Dabei ist zu beachten, dass die beiden Einzelketten im Allgemeinen nicht getrennt beobachtet werden können und deshalb die Bezeichnungen der sn-1-Kette, soweit nicht anders angegeben, in den Spektren gewählt werden.

In den Protonenspektren für DMPC in Abb. 4.5(a) ist zu erkennen, dass unterhalb der Umwandlungstemperatur, d.h. in der Gelphase, nur die Signale α , β und γ der Kopfgruppe delektiert werden können. Die Signale der Alkylketten sind nicht sichtbar. Dies ist der

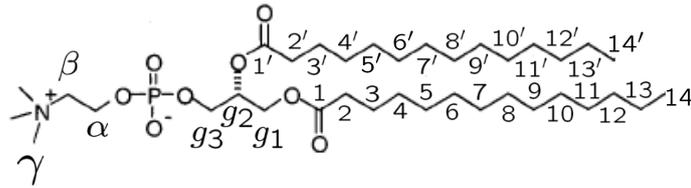


Abbildung 4.4.: Bezeichnung / Nummerierung der einzelnen Kohlenstoffatome im DMPC-Molekül. Die Nummerierung der Protonen(paare) erfolgt in gleicher Weise.

definierten Packung der Alkylketten in der Gelphase und der daraus resultierenden, geringen Mobilität geschuldet. Es sind starke homonukleare, inter- und intramolekulare Dipolkopplungen vorhanden, die zu einer erheblichen Linienverbreiterung im Spektrum führen [183, 184]. Die Kopfgruppe hingegen weist bereits in der Gelphase eine erhöhte Mobilität auf [177, 185–187]. Die vorhandenen Dipolkopplungen in diesem Molekülabschnitt werden durch die Bewegungen reduziert und es resultieren schmale Linien im Spektrum, wie in Abb. 4.5(a) sichtbar. Eine Änderung der Konformation äußert sich im Spektrum meist als eine Änderung der chemischen Verschiebung des betroffenen Kerns. Der Effekt der Linienverschiebung aufgrund sich ändernder Konformation ist als γ -gauche-Effekt bekannt [188]. Außerdem wird für die Kopfgruppe in den NMR-Spektren meist nur eine gemittelte Konformation gemessen. Dies zeigt sich im Spektrum in Abb. 4.5(c) daran, dass sich die chemische Verschiebung der Signale α , β und γ mit zunehmender Temperatur nicht ändert. Ebenso wie für die Alkylketten, zeigt sich anhand der verbreiterten Signale auch für das Glycerolrückgrat eine geringe Mobilität in der Gelphase, da dessen Signale (g_1 , g_2 und g_3) ebenfalls verbreitert sind (s. Abb. 4.5(a)). Dies ist vor allem bei der CH-Gruppe sichtbar (g_2 in Abb. 4.5(c)). Die leichte Linksverschiebung dieses Signals deutet auf eine Änderung der Konformation mit steigender Temperatur hin. Bei den beiden CH_2 -Gruppen (g_1 und g_3) ist diese Verschiebung jedoch nicht so deutlich ausgeprägt. Dass die CH-Gruppe des Glycerol empfindlich gegenüber Konformationsänderungen ist, wurde in der Literatur ebenfalls berichtet [189].

Weiterhin ist in den Protonenspektren ersichtlich, dass nicht alle Protonen der Alkylkette die gleiche chemische Verschiebung besitzen. Sie liegen somit in unterschiedlicher chemischer Umgebung vor, deren Ursache unterschiedliche molekulare Konformationen der einzelnen Lipidabschnitte sind. Es wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass die beiden Alkylketten eines Lipidmoleküls nicht äquivalent sind [170, 181, 185–187, 190]. Dies hängt damit zusammen, dass die Kopfgruppe im Molekül eine gauche-Konformation einnimmt und zur sn-2 Kette hin abgeknickt ist. Sie nimmt eine parallele Orientierung in Bezug auf die Membranoberfläche ein. Somit besitzen die oberen Kettensegmente eine andere chemische Umgebung im Vergleich zu den unteren. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die sn-2-Kette im Anfangsbereich nahezu parallel zur Membranoberfläche orientiert ist, während die sn-1-Kette im Anfangsteil um einen Winkel von ca. 12° zur Membrannormalen geneigt ist [59, 173]. Im Spektrum in Abb. 4.5(a) ist dies am Signal für die Protonen am zweiten Kohlenstoffatom sichtbar (Signale 2,2'). Auch wenn die Auflösung eine vollständige Separation der Signale nicht zulässt, ist deutlich, dass es sich um zwei Signale handelt, welche den beiden Einzelketten zugeordnet werden [190].

In Abb. 4.5 ist ebenfalls das direkt angeregte ^{13}C -Spektrum von DMPC, sowie die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Kohlenstoffatomen im Molekül dargestellt. Auch hier sind Unterschiede in den Signalen für die verschiedenen Temperaturen sichtbar. Bei der tiefsten, gemessenen Temperatur ist das Signal der Carboxy-Gruppe kaum sichtbar (s. Abb. 4.5(c), Signal 1), was auf geringe Mobilität in diesem Bereich des Lipids hindeutet.

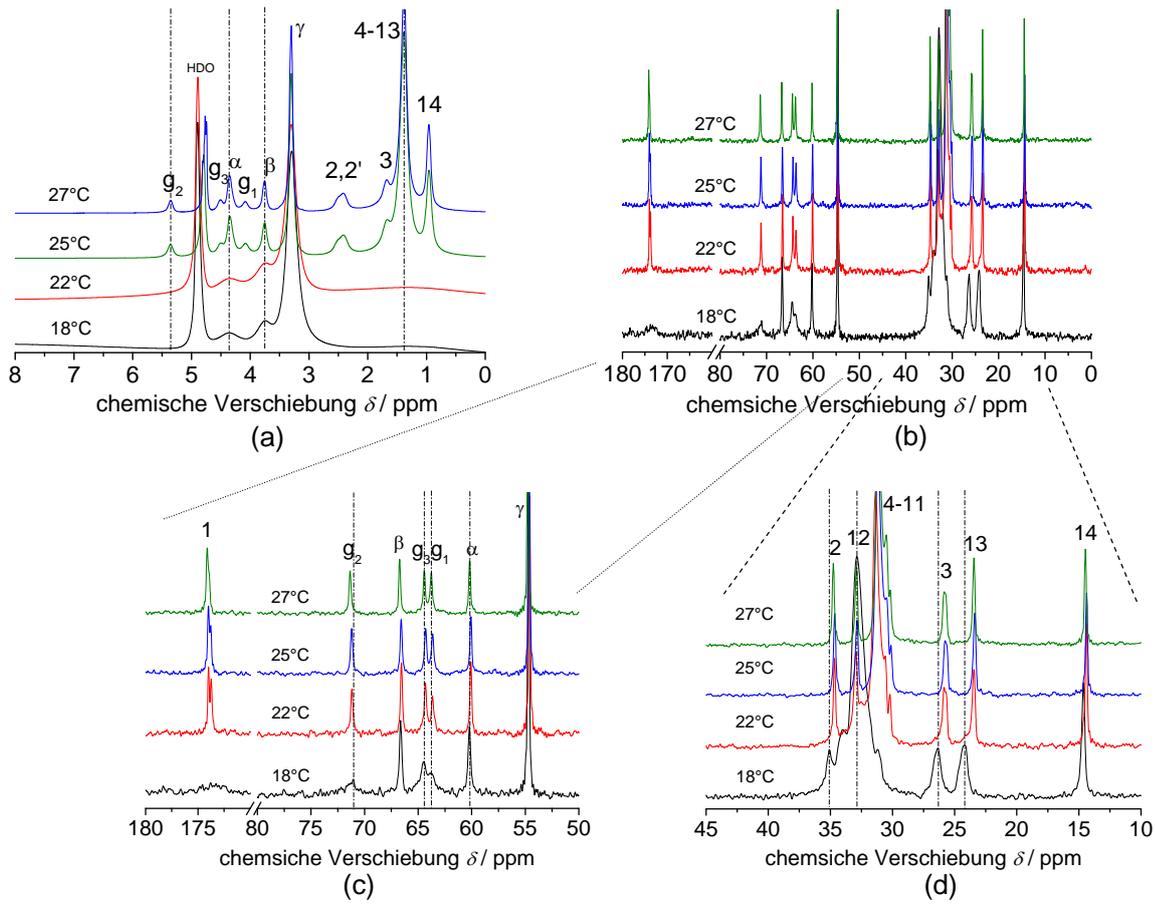


Abbildung 4.5.: Temperaturabhängige Spektren für DMPC. (a) Protonenspektren und (b) direkt angeregte ^{13}C -Spektren für verschiedene Temperaturen unterhalb (18°C , 22°C) und oberhalb (25°C , 27°C) der Phasenumwandlung ($\nu_R = 5\text{kHz}$). In (c) ist der Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum für Kopfgruppe und Glyceroleinheit, sowie in (d) für die Alkylketten gezeigt. Eine Zuordnung zu den einzelnen Protonen und Kohlenstoffatomen im Molekül erfolgte entsprechend Abb. 4.4.

Außerdem findet mit steigender Temperatur eine Aufspaltung der dieser Linie statt, welche ebenfalls auf die unterschiedlichen Konformationen im Anfangsbereich der beiden Alkylketten im Lipidmolekül hinweist. Oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur laufen beide Linien zusammen. Die Ursache dafür ist die erhöhte Mobilität der Alkylketten in der L_α -Phase. Sie führt dazu, dass im Mittel für beide Ketten dieselbe Konformation vorliegt und somit nur noch ein Signal gemessen werden kann.

In Abb. 4.5(d) ist der Ausschnitt aus dem Kohlenstoffspektrum für die Alkylketten des Lipids zu sehen, in welchem die Änderung der chemischen Verschiebung mit steigender Temperatur deutlich sichtbar ist. Diese Verschiebungen zeigen den Übergang der Alkylketten von der gestreckten all-trans- in die gauche-Konformation, d.h. den Phasenübergang der Alkylketten von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase [59, 189, 191]. Oberhalb von ca. 25°C befinden sich die Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase. Das bedeutet, dass die Ketten nicht mehr nur gestreckt sind, sondern gauche-Konformere besitzen und dies somit zu einer Änderung der chemischen Verschiebung führt. Die Änderung von der all-trans- zur gauche-Konformation beträgt theoretisch ca. 5 ppm [192]. Für die Alkylketten des Lipids wurden hier maximal 2 – 3 ppm gemessen. Daraus kann geschlossen werden, dass die L_α -Phase gemischte Konformationen der Alkylketten besitzt. In der flüssig-kristallinen Phase verbleibt eine Restordnung in den Ketten, d.h. nicht

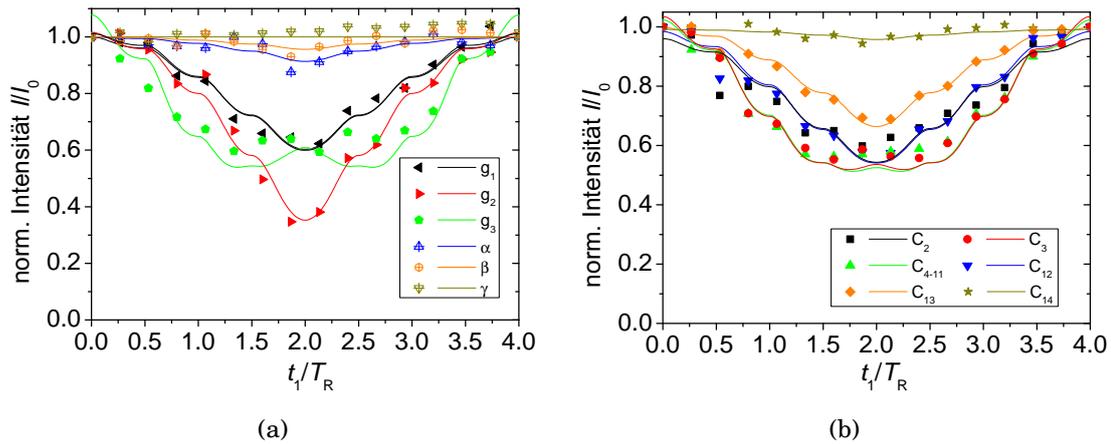


Abbildung 4.6.: Dephasierungskurven für (a) die Kopfgruppe und Glyceroleinheit, sowie für (b) die Alkylketten von DMPC gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$). Die durchgezogenen Linien sind die aus der Datenanpassung erhaltenen Kurven.

alle Bindungen befinden sich in einer gauche-Konformation, sondern im Mittel nur eine gewisse Anzahl [180], weshalb es möglich ist, diese Restordnung mit Hilfe von NMR zu untersuchen.

4.2.2 | ^{13}C - ^1H Ordnungsparameter in Phospholipiden

Zur Beschreibung der Dynamik eines Systems können die heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen zwischen den Kohlenstoffatomen und deren gebundenen Protonen herangezogen werden (s. Kap. 2.3.2). Für alle verwendeten Lipidproben wurden diese dipolaren Restkopplungen in der flüssig-kristallinen Phase, d.h. oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur, mittels der recoupled DIPSHIFT-Sequenz gemessen und die Ordnungsparameter berechnet (s. Kap. 2.3.2.2). Dies dient dem späteren Vergleich der gemessenen Ordnungsparameter im reinen Lipid mit denen bei Anwesenheit eines Gastmoleküls. Daraus können Rückschlüsse über den Einfluss der Gastmoleküle auf die Struktur und Dynamik der Lipidmoleküle in der Doppelschicht gezogen werden.

Die mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment gemessenen Dephasierungskurven für DMPC sind in Abb. 4.6 exemplarisch dargestellt und die Ergebnisse der Datenanpassung in Tabelle 4.2 für die drei untersuchten Lipide angegeben (Kurven für DPPC bzw. DOPC s. Anhang C.2). Die erhaltenen Daten stimmen, z.B. für DMPC, mit anderen, ebenfalls mittels NMR bestimmten, Restkopplungen bzw. Ordnungsparametern sehr gut überein [193, 194]. Die Messkurven und die zugehörigen Kurvenanpassungen zeigen unterschiedlich gute Übereinstimmung miteinander. So passen die Fitkurven für die Kopfgruppe, das g_1 - und g_2 -Kohlenstoff des Glycerols sowie die Kohlenstoffatome C_{13} und C_{14} der Ketten sehr gut zu den Messpunkten. Für die anderen Kohlenstoffatome gibt es etwas größere Abweichungen zwischen Fitfunktion und Messdaten. Die Messkurven fallen im Anfangsteil etwas stärker ab als die Fitfunktion. Eine Diskrepanz zwischen Messdaten und Fitfunktion liegt ebenfalls bei $t_1 = T_R/2$ vor. In diesem Bereich liegen die Messdaten oberhalb der analytischen Fitkurve. Dafür gibt es zwei mögliche Gründe; einerseits werden die Kurven für die CH_2 -Gruppen mit einem Modell für eine uniaxiale Dynamik angepasst und andererseits kann eine Verteilung von Restkopplungen eine Abweichung der theoretischen Beschreibung von den Messdaten bedingen. Dass für die Beschreibung der Messdaten die analytische Formel einer uniaxialen Dynamik in die Beschreibung

Tabelle 4.2.: Ordnungsparameter S_{CH} für die verschiedenen Kohlenstoffatome in (a) DMPC ($T = 34^\circ\text{C}$) (b) DPPC ($T = 47^\circ\text{C}$) und (c) DOPC ($T = 34^\circ\text{C}$) erhalten aus den Dephasierungskurven, welche mit dem recoupled DIPSHIFT-Experiment gemessen wurden ($\nu_R = 5\text{kHz}$, $N = 4$).

(a) DMPC		(b) DPPC		(c) DOPC	
C-Atom	S_{CH}	C-Atom	S_{CH}	C-Atom	S_{CH}
γ	0 ± 0	γ	0 ± 0	γ	0.01 ± 0.01
β	0.04 ± 0.01	β	0.07 ± 0.01	β	0.05 ± 0.01
α	0.05 ± 0.01	α	0.06 ± 0.01	α	0.07 ± 0.01
g_3	0.25 ± 0.02	g_3	0.23 ± 0.02	g_3	0.24 ± 0.02
g_2	0.19 ± 0.03	g_2	0.19 ± 0.01	g_2	0.19 ± 0.02
g_1	0.13 ± 0.01	g_1	0.13 ± 0.01	g_1	0.12 ± 0.01
C_2	0.14 ± 0.02	C_2	0.15 ± 0.01	C_2	0.13 ± 0.01
C_3	0.21 ± 0.02	C_3	0.20 ± 0.02	C_3	0.17 ± 0.01
C_4-C_{11}	0.21 ± 0.02	C_4-C_{13}	0.18 ± 0.01	$C_4-C_7, C_{12}-C_{15}$	0.11 ± 0.01
C_{12}	0.15 ± 0.01	C_{14}	0.12 ± 0.01	C_8, C_{11}	0.09 ± 0.01
C_{13}	0.11 ± 0.01	C_{15}	0.09 ± 0.01	C_9	0.10 ± 0.01
C_{14}	0.02 ± 0.01	C_{16}	0.02 ± 0.01	C_{10}	0.06 ± 0.01
				C_{16}	0.07 ± 0.01
				C_{17}	0.05 ± 0.01
				C_{18}	0.02 ± 0.01

eingeht, führt zu einem Fehler in der aus den Dephasierungskurven ermittelten Restkopplung. Wegen der hohen Mobilität der Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase stellt dieses Modell jedoch eine sehr gute Näherung zur Beschreibung der Messdaten dar, so dass der daraus resultierende Fehler vergleichsweise gering ist. Eine andere, wesentliche Ursache für die Abweichung ist jedoch, dass einige Messkurven nicht nur eine dipolare Restkopplung beinhalten, sondern mehrere, d.h. eine Verteilung von Restkopplungen [195]. Ein Hinweis darauf ist, dass die Messpunkte schneller an Intensität verlieren als die Fitkurven, was wiederum bedeutet, dass eine stärkere Kopplung zu Grunde liegt. Das Minimum (bzw. Maximum bei Kurven mit stärkerer Restkopplung) der Messkurven liegt im Vergleich allerdings höher als das der Fitfunktionen und deutet somit auf abweichende Kopplungen hin. Daher setzen sich die Messdaten wahrscheinlich aus Kurven zusammen, die stärker gekoppelte Bereiche der Probe widerspiegeln und Kurven, die schwächere bzw. unveränderte Kopplungen beinhalten. Am Besten lässt sich diese Vermutung an der recoupled DIPSHIFT-Kurve für die Kohlenstoffatome C_4 bis C_{11} erläutern. Diese acht Kohlenstoffe besitzen zwar alle eine unterschiedliche chemische Umgebung, jedoch ist der Bereich, in dem diese Resonanzen im Spektrum erscheinen, so gering, dass es zu Überlagerungen kommt (s. Abb. 4.5(d)). Es ist dabei in den hier erwähnten Experimenten nicht möglich, diese acht Resonanzen voneinander zu separieren. Daher kann nur das gesamte Signal im DIPSHIFT- und auch im recoupled DIPSHIFT-Experiment ausgewertet werden. Selbst wenn es für das jeweilige Kohlenstoffatom keine Verteilung von Dipolkopplungskonstanten gibt, sind in der dargestellten Kurve bereits acht verschiedenen Kopplungen enthalten [196, 197]. Auch für das Glycerol- g_3 ist an den Messkurven erkennbar, dass nicht nur eine Dipolkopplung zugrunde liegt. Im Vergleich von Messungen und Simulation von C-H Dipolkopplungen wurde gezeigt, dass die Messung dieser Kopplung für eine Methylengruppe im Allgemeinen nur eine (mittlere) Dipolkopplung liefert, während in der Simulation für beide Bindungen jeweils eine Dipolkopplung ermittelt werden kann [194]. Wird weiterhin betrachtet, dass die beiden Alkylketten eines Lipidmoleküls nicht äqui-

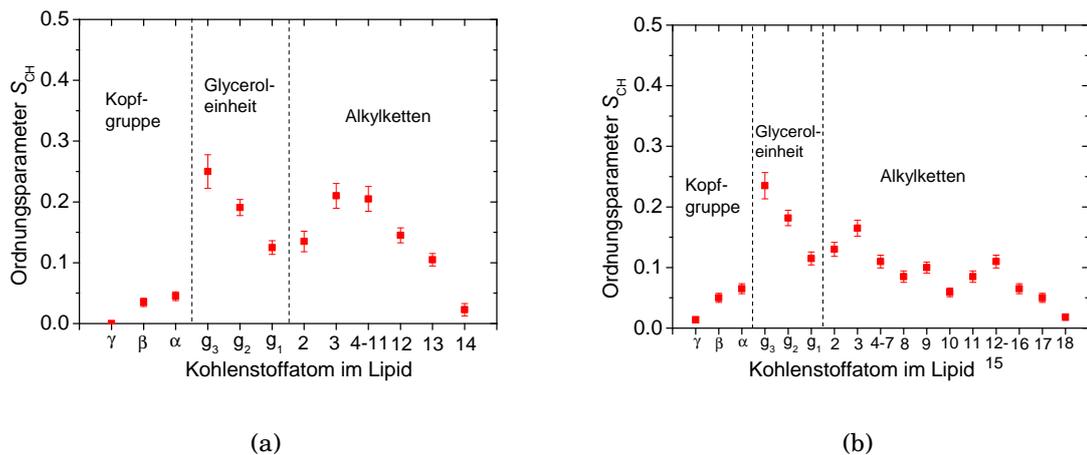


Abbildung 4.7.: Ordnungparameter S_{CH} der untersuchten Phospholipide (a) DMPC, (b) DOPC für die einzelnen Kohlenstoffatome im Lipidmolekül in der L_{α} -Phase. Das Ordnungparameterprofil für DPPC entspricht qualitativ dem für DMPC (s. Anhang C.1).

valent sind und auch die Kopfgruppenkonformation sich von Molekül zu Molekül leicht unterscheiden kann, ist die Annahme einer Verteilung von dipolaren Restkopplungen in den Lipidmolekülen eine wahrscheinliche Erklärung für die Abweichung der Messkurven von der Fitfunktion.

In Abb. 4.7 sind die in Tabelle 4.2 angegebenen Ordnungparameter der Kohlenstoffatome im Lipid dargestellt. Anhand dieser Profile können für die drei untersuchten Lipidproben (s. Abb. 4.7) einige allgemeine Schlussfolgerungen getroffen werden. Allen gemeinsam ist, dass die drei unterschiedlichen molekularen Abschnitte der Lipidmoleküle (Kopfgruppe, Glyceroleinheit und Alkylketten) unterschiedliche Ordnungparameter und daher eine unterschiedliche Anisotropie ihrer Dynamik aufweisen. Die Kohlenstoffatome der Kopfgruppe der Lipide besitzen die geringsten Ordnungparameter. Sie ist daher am wenigsten in ihrer Bewegung eingeschränkt, was auf eine schnelle, nahezu isotrope Rotation der Cholingruppe um die Membrannormale hinweist [186, 187]. Die am stärksten gekoppelten Gruppen im Lipid befinden sich in der Glyceroleinheit, dem Bindeglied zwischen Kopfgruppe und Fettsäureketten. Die Ordnungparameter der Glycerolgruppe sind vergleichbar mit denen der oberen Kettensegmente der Alkylketten [186], wobei der Gradient vom Glycerol- g_3 - zum Glycerol- g_1 -Kohlenstoff verläuft. Dies konnte auch mittels der hier benutzten Methode gemessen werden.

Weiterhin ist für die Alkylketten erkennbar, dass der Ordnungparameter vom Beginn der Ketten zum Kettenende hin abnimmt. Dies entspricht dem bekannten Mobilitätsgradienten in Lipidmolekülen, der sich, ausgehend vom Glycerolrückgrat, in beiden Richtungen zu den Molekülenden hin findet [190, 198, 199]. Bei den Alkylketten der drei untersuchten Lipidproben zeigt sich eine systematische Abweichung von diesem Mobilitätsgradienten beim Kohlenstoffatom C_2 . Der Ordnungparameter für dieses Kohlenstoffatom ist bei allen Messungen geringer als der für das nachfolgende, manchmal auch noch geringer als für andere Kohlenstoffatome in der Kette (z.B. für DMPC). Das ist wiederum damit zu begründen, dass mit Hilfe der verwendeten Messmethode (recoupled DIPSHIFT) immer nur eine mittlere Restkopplung bestimmt werden kann. Dies erschwert die Messung in Lipiden zusätzlich wegen der Ungleichheit der beiden Alkylketten, vor allem in deren Anfangsbereich [59, 173, 180, 190, 193, 197]. So wurde z.B. von Dvinskikh *et al.* gezeigt [193], dass bereits für ein Lipidmolekül die Kohlenstoffatome C_2 und C_2' der beiden Einzelketten

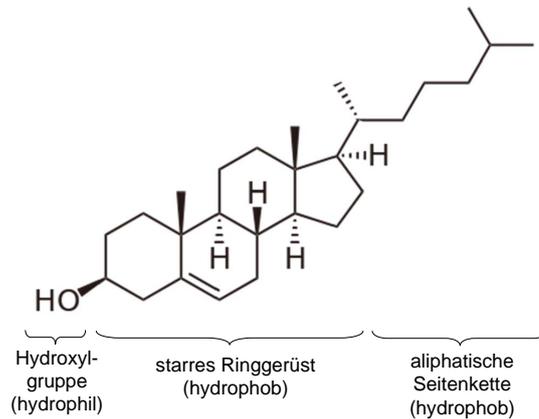


Abbildung 4.8.: Struktur des Cholesterol-Moleküls. Das Molekül kann in drei Abschnitte unterteilt werden, die den amphiphilen Charakter des Cholesterol ausmachen. Dabei sind die Seitenkette und das Ringsystem hydrophob, die OH-Gruppe hingegen ist hydrophil.

insgesamt drei verschiedene Ordnungsparameter besitzen. Dies wird damit erklärt, dass das Kohlenstoffatom der sn-1 Kette zu beiden gebundenen Protonen dieselbe, jedoch stärkere Kopplung aufweist, während es an der anderen Fettsäurekette (sn-2) wegen der Kopfgruppenkonformation schwächere, aber unterschiedliche dipolare Restkopplungen zu den beiden gebundenen Protonen besitzt. Einen ähnlichen Effekt hat die Kopfgruppenkonformation auch auf das Glycerol-1. Es wurde mittels proton-detected local-field (PDLF) NMR-Spektroskopie [190,200] gezeigt, dass für die beiden CH-Bindungen der CH₂-Gruppe verschiedene Ordnungsparameter existieren, da bei dieser Methode die Kopplung von den Protonen zu den ¹³C betrachtet wird. Dies ist jedoch mittels recoupled DIPSHIFT nicht erfassbar, da stets die Kopplung vom Kohlenstoffatom zu den Protonen detektiert wird und somit immer nur eine mittlere Kopplung des Kohlenstoffs zu beiden Protonen einer CH₂-Gruppe bestimmt werden kann. Der ermittelte Wert für die Ordnungsparameter der Kohlenstoffatome, die im Spektrum nicht separiert werden können (wie z.B. die Signale der mittleren Alkylkettensegmente) ist ebenfalls als Wert zu verstehen, welcher die mittlere Kopplung in diesem Bereich der Ketten widerspiegelt. Als Besonderheit sei bei DOPC noch die geringe dipolare Restkopplung um die Position des Kohlenstoffatoms C₁₀ zu bemerken. Dies hängt mit der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C₉ und C₁₀ zusammen, welche zur Erhöhung der Unordnung in den Alkylketten führt [201, 202] und mit einer Zunahme der Bewegungsfreiheit in der Nähe der Doppelbindung einhergeht. Dies äußert sich in einem reduzierten Ordnungsparameter. Ein sehr ähnliches Profil für den Ordnungsparameter in DOPC wurde ebenfalls mittels Messung der ¹³C-¹H heteronuklearen, dipolaren Restkopplung von Warschawski *et al.* erhalten [203], während die Profile der molekularen Ordnungsparameter aus Deuterium-Quadrupolaufspaltungen eine Abnahme des Ordnungsparameters an der Doppelbindung nicht aufweisen [202]. Zur Diskussion dieses Unterschiedes sei auf die Literatur verwiesen [203].

4.2.3 | Einfluss von Cholesterol auf die lokale Lipiddynamik

Cholesterol (auch Cholesterin) ist eine wesentliche Komponente biologischer Membranen und tritt dort in sehr hohen Konzentrationen auf (z.B. mehr als 50% in den Zellmembranen der Augenlinse) [204]. Es wird der Gruppe der Steroide zugeordnet und ist wegen seiner molekularen Bausteine (OH-Gruppe, aliphatische Seitenkette und starres Ringsystem) ebenfalls ein amphiphiles Molekül (s. Abb. 4.8). Da Cholesterol einen so bedeutenden Bestandteil von Zellmembranen darstellt, ist dessen Wechselwirkung mit Phospholipi-

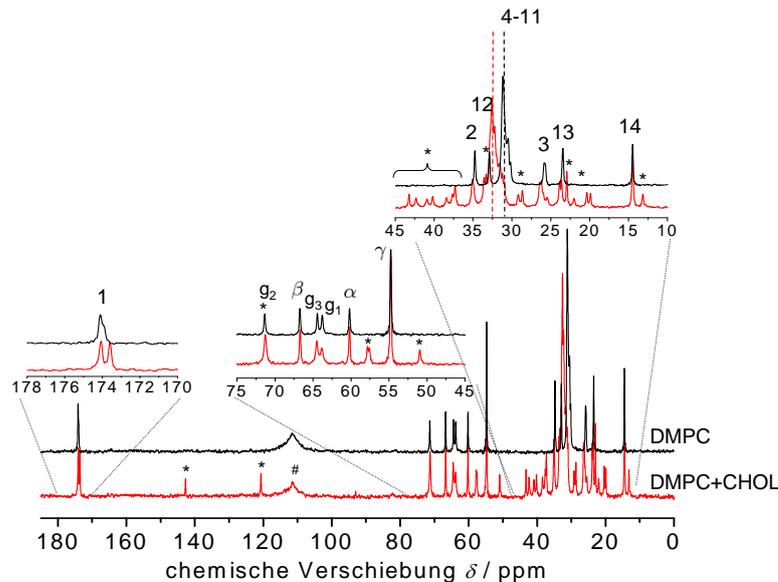


Abbildung 4.9.: ^{13}C -Spektren für DMPC bei einer Temperatur von $T = 27^\circ\text{C}$ und DMPC/Cholesterol (molares Verhältnis 2:1) bei einer Temperatur von $T = 30^\circ\text{C}$ ($\nu_R = 5\text{ kHz}$). Die Ausschnitte für die jeweiligen Bereiche des Spektrums sind in den Insets dargestellt. Die mit * gekennzeichneten Signale gehören zum Cholesterolmolekül. Das Signal mit der Kennzeichnung # stammt von dem im Rotor enthaltenen Teflonspacer.

den sehr wichtig und daher Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Cholesterol unter anderem die Permeabilität der Membran [205–207], sowie auch deren Fluidität beeinflusst [208, 209]. Dieser Einfluss entsteht durch den Einbau von Cholesterol in die Lipiddoppelschicht, hängt jedoch vom physikalischen Zustand der Membran selber ab [210, 211]. Beispielsweise wird in der Gelphase die Ordnung der Lipidmoleküle durch das Cholesterol gestört. In der flüssig-kristallinen Phase hingegen erhöht die Zugabe von Cholesterol die Ordnung der Lipidalkylketten, während die Kopfgruppe nur gering betroffen ist. Diese erhöhte Ordnung der Ketten in der flüssig-kristallinen Lipidphase äußert sich in einem zunehmenden Ordnungsparameter [59, 183, 194, 209, 210, 212, 213]. Darauf aufbauend kann Cholesterol sehr gut als Modellsubstanz für die Untersuchung des Einflusses von Fremdmolekülen auf die Lipidmembran genutzt werden. Für eine Mischung aus dem Lipid DMPC und Cholesterol im molaren Verhältnis 2:1 wurden die dipolaren Restkopplungen der Lipidmoleküle mit Hilfe des recoupled DIPSHIFT-Experiments bestimmt (s. Kap. 3.3). Ein erhöhter Ordnungsparameter der Lipidalkylketten sollte mit diesem Experiment ebenfalls messbar sein. In Abb. 4.9 ist zunächst das Kohlenstoffspektrum der DMPC/Cholesterol-Mischung im Vergleich zum reinen DMPC gezeigt, wobei es möglich ist, alle Signale dem Lipid und dem Cholesterol zuzuordnen. Da hier die Lipidkomponente untersucht werden soll, sind die Signale des Cholesterol mit * gekennzeichnet und nicht genauer benannt bzw. untersucht worden. Die Messtemperatur wurde dabei so gewählt, dass sie oberhalb der Hauptumwandlung des Lipids, d.h. in der L_α -Phase liegt, da dies die physiologisch relevante Phase der Membran ist. Beim genaueren Betrachten der einzelnen Bereiche des Spektrums der Mischung werden bereits einige Unterschiede bzw. Veränderungen im Vergleich zum reinen DMPC deutlich. Für die Carboxy-Linie (Signal 1) ist durch die Zugabe des Cholesterol eine Aufspaltung in zwei Signale zu erkennen. Diese sind den beiden Alkylketten des Lipids (sn-1 und sn-2) zuzuordnen, wobei die sn-2 Kette durch den Einbau des Cholesterol weniger betroffen ist als die sn-1 Kette [214]. Zunächst wurde

vermutet, dass diese Aufspaltung aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen vom Lipid zum Cholesterolmolekül verursacht wird [215]. Die Aufspaltung dieser Linie findet sich jedoch bereits in der Gelphase des reinen Lipids (s. Abb. 4.5), deutet sich aber auch in der L_α -Phase an und wird erst unter Zugabe hoher Konzentrationen Cholesterol ($> 30 \text{ mol}\%$) beobachtet [159]. Dies wiederum spricht gegen eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Lipid und Cholesterol, auch deshalb, weil die Kopfgruppe des Lipids eher dazu neigt, Wasserstoffbrücken zum umgebenden Wasser auszubilden [159]. Weiterhin kann geschlussfolgert werden, dass es unterhalb dieser Cholesterolkonzentration (ca. $30 \text{ mol}\%$) keine merklichen, konformellen Änderungen im Lipid gibt, welche durch Cholesterol verursacht werden. Durch den Einbau des Cholesterol wird besonders der Anfang der sn-1 Kette beeinflusst, so dass diese in ihrer Bewegung mehr eingeschränkt und daher in eine gestrecktere Konformation gezwungen wird. Im Gegensatz dazu behält die sn-2 Kette ihre parallele Orientierung in Bezug auf die Membranoberfläche bei [214].

In der Kopfgruppenregion des Spektrums, im Bereich zwischen 75 ppm und 45 ppm in Abb. 4.9, ist fast kein Unterschied zwischen den Signalen des reinen DMPC und der Mischung aus DMPC und Cholesterol zu erkennen. Die Kopfgruppenkonformation ist somit kaum vom Einbau des Cholesterols betroffen. Sie ist zwar weniger zur Membrannormalen hin abgeknickt, jedoch ist die Änderung sehr gering [215, 216].

Ein Unterschied wird in der Signalregion der Lipidalkylketten gefunden (s. Abb. 4.9), da diese in Anwesenheit von Cholesterol bei einer größeren chemischen Verschiebung im Spektrum erscheinen ($\Delta\delta \approx 1.8 \text{ ppm}$ bei den Signalen C_4 bis C_{11}). Dies deutet auf einen höheren Anteil an trans-Konformeren in den Alkylketten hin [59, 159, 184, 194, 217–219] und entspricht dem Bild der Wechselwirkung von Cholesterol mit der Lipidmembran, welches als Regenschirm-Modell beschrieben wird [218, 220]. Dabei legt sich das (eher hydrophobe) Cholesterol-Molekül unter die Lipidkopfgruppe, um den Kontakt mit dem Wasser zu vermeiden. Die Membran wird verdichtet (Kondensationseffekt) und die Alkylketten müssen deshalb eine gestrecktere Konformation einnehmen [161].

Um den Effekt eines Fremdmoleküls an einem System mit bekannten Eigenschaften zu untersuchen, wurden mit Hilfe des recoupled DIPSHIFT-Experiments die Restkopplungen für die Lipidmoleküle in Anwesenheit von Cholesterol gemessen. Die erhaltenen Dephasierungskurven für die verschiedenen Lipidabschnitte sind in Abb. 4.10 dargestellt. Wird zunächst das Profil der berechneten Ordnungsparameter der Lipidmoleküle im reinen DMPC mit dem der Moleküle in Anwesenheit von Cholesterol in Abb. 4.11 betrachtet, so ist zu erkennen, dass die Form des Profils im Wesentlichen erhalten bleibt, sich die mittleren Ordnungsparameter im Lipid jedoch vergrößern. Dieser Effekt ist im Bereich der Kopfgruppe des Lipids vergleichsweise gering. Dies entspricht auch dem in der Literatur bekannten Verhalten der Lipidmoleküle unter Einfluss von Cholesterol, wobei je nach Untersuchungsmethode unterschiedlich starke Effekte beobachtet werden. So wurde z.B. mit Hilfe von heteronuklearer, dipolarer Restkopplung und Molekulardynamik-Simulationen gefunden, dass die Konformation der Kopfgruppe unverändert bleibt und deren Dynamik nur sehr gering beeinflusst wird [194]. Dieses Verhalten kann mit Hilfe unserer Daten bestätigt werden. Relaxationszeitmessungen hingegen zeigen auch in der Kopfgruppenregion der Lipidmoleküle eine Änderung der Dynamik an. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die sehr schnellen Bewegungen der Lipidmoleküle ($\tau_c \approx 10^{-8} - 10^{-11} \text{ s}$) vorrangig durch die Anwesenheit des Cholesterol eingeschränkt werden, d.h. vor allem trans-gauche-Kettenisomerisationen [212, 215]. Die langsameren, kollektiven Kopfgruppenbewegungen sind nur in geringerem Ausmaß betroffen. Die Kohlenstoffatome der Kopfgruppe zeigen beim Einbau von Cholesterol kaum eine Änderung der Ordnungsparameter, wohingegen für die Kohlenstoffe der Glyceroleinheit und der Alkylketten eine signifikante Zunah-

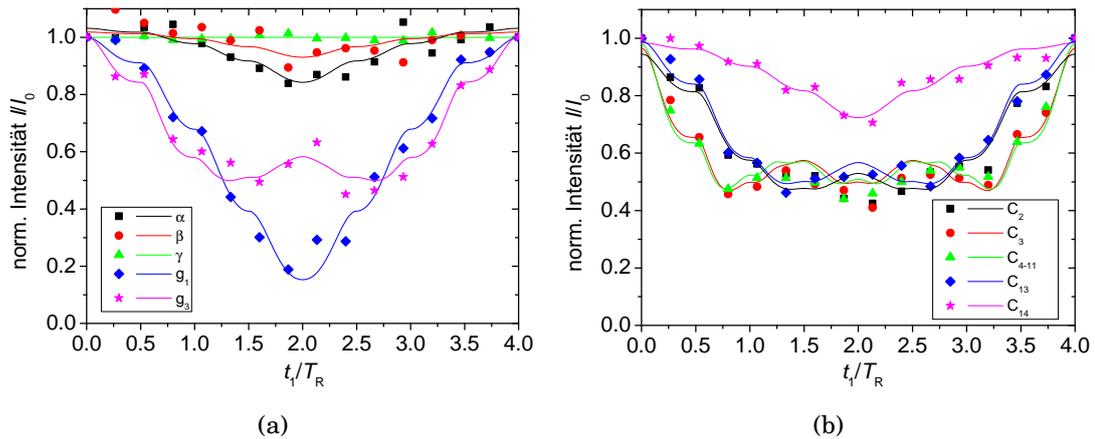


Abbildung 4.10.: Dephasierungskurven erhalten aus dem recoupled DIPSHIFT-Experiment für die Mischung DMPC:Cholesterol (2:1) für (a) die Kopfgruppe und die Glyceroleinheit, sowie (b) die Alkylketten der Lipidmoleküle ($T=34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$). Die durchgezogenen Linien entsprechen den jeweils an die Messdaten angepassten Fitfunktionen zur Bestimmung der mittleren, dipolaren Restkopplung.

me der Ordnungsparameter festgestellt wird (s. Abb. 4.11). Somit kann gesagt werden, dass der Einfluss von Cholesterol im Bereich des Glycerolrückgrats und der Ketten am größten ist. Dies deckt sich mit dem oben erwähnten Regenschirm-Modell, nach dem sich das Cholesterol unterhalb der Kopfgruppe anlagert und so gegen das Umgebungswasser abgeschirmt wird. Der Einbau von Cholesterol führt auch dazu, dass die Membran verdichtet und wegen der unbeweglicheren Ketten insgesamt steifer wird [161, 209]. Es werden daher auch die langsamen Kopfgruppenbewegungen (Undulationen) beeinflusst, was jedoch wegen der unterschiedlichen Zeitskalen von Bewegung und Experiment mit dem recoupled DIPSHIFT-Experiment nicht erfasst werden kann. Die Signale für das Glycerol g_2 -Kohlenstoff sowie für das C_{12} der Alkylkette konnten wegen der Überlappung mit Cholesterolsignalen nicht ausgewertet werden und sind daher in Abb. 4.11 für die Mischung nicht dargestellt [183].

Die in Abb. 4.10 dargestellten Dephasierungskurven für die Mischung DMPC/Cholesterol sollen nun genauer betrachtet werden. Es ist zu erkennen, dass die Messdaten für die Kopfgruppe eine gute Übereinstimmung mit der Fitfunktion aufweisen. Auch das Glycerol-Kohlenstoff g_1 kann durch die analytische Formel gut beschrieben werden. Eine etwas größere Abweichung zwischen Messdaten und Fitfunktion wird hingegen beim Glycerol- g_3 , sowie für die Alkylketten des Lipids gefunden. Eine solche Abweichung wurde auch schon im reinen DMPC erhalten (s. Kap. 4.2.2), sie ist aber in der Mischung mit Cholesterol stärker ausgeprägt. Eine Ausnahme bildet die Methylgruppe der Kette (C_{14}), bei der sich wieder eine gute Übereinstimmung zwischen Messung und Modell findet. Als Grund für die Abweichung wird hier ebenfalls eine heterogene Verteilung von dipolaren Kopplungskonstanten in der Mischung vermutet. Dies soll am Beispiel des Kohlenstoffatoms C_2 der Alkylkette näher erläutert werden. In Abb. 4.12 ist die Dephasierungskurve dieses Kerns, sowie die aus der Datenanpassung erhaltene Kurve mit der zugehörigen dipolaren Restkopplung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei Annahme einer einzelnen dipolaren Restkopplung für das ausgewählte Kohlenstoffatom die Form der Kurve durch das Modell nicht ausreichend beschrieben werden kann. Aus diesem Grund wurden für zwei verschiedene heteronukleare, dipolare Restkopplungen Kurven simuliert und zu unterschiedlichen Anteilen aufsummiert. Das Ergebnis ist ebenfalls in Abb. 4.12 dargestellt. Es wurde zunächst die aus der Datenanpassung des reinen Lipids erhaltene Restkopplung zu Grunde

C-Atom	S_{CH}
γ	0 ± 0
β	0.05 ± 0.01
α	0.07 ± 0.01
g_3	0.27 ± 0.02
g_2	-
g_1	0.27 ± 0.02
C_2	0.25 ± 0.03
C_3	0.42 ± 0.05
C_4-C_{11}	0.45 ± 0.04
C_{12}	-
C_{13}	0.26 ± 0.02
C_{14}	0.07 ± 0.01

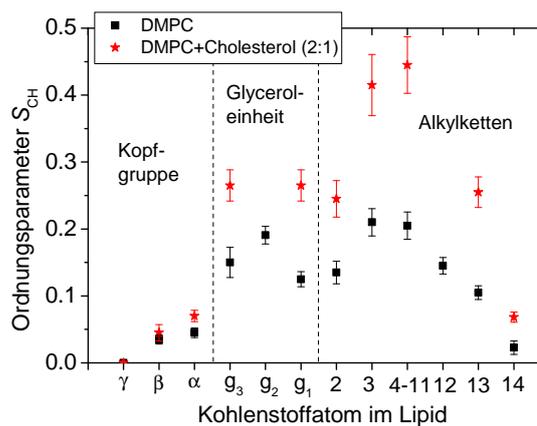


Abbildung 4.11.: Ordnungsparameter S_{CH} der Lipidmoleküle im DMPC und in der DMPC/Cholesterol-Mischung für die einzelnen Kohlenstoffatome im Lipid, sowie die Darstellung der ermittelten Ordnungsparameter.

gelegt und eine zweite, stärkere Kopplung (die aus der Mischung erhaltene Restkopplung) überlagert. Der Bereich um das Minimum wird durch diese Kurve wesentlich besser wiedergegeben, weicht hingegen im Anfangs- und Endteil etwas mehr ab. Es bleibt daher zu bemerken, dass es nicht generell möglich ist, die Messdaten für die heteronuklearen Dipolkopplungen der Lipidmoleküle mit nur einem Wert zu beschreiben. Wie in Abb. 4.12 gezeigt, sind auch zwei Kopplungen nicht immer ausreichend, um die Kurve adäquat zu beschreiben, was eine Verteilung von Restkopplungen sehr wahrscheinlich macht [221]. Die Ursache dieser Verteilung in der Lipid/Cholesterol-Mischung ist jedoch nicht eindeutig erklärbar. Es ist bekannt, dass Cholesterol zur Ausbildung einer neuen Phase, der sogenannten „flüssig-geordneten“ Phase führt [208, 211, 222, 223]. Diese zeichnet sich durch eine erhöhte Kettenpackungsdichte aus, wobei dennoch eine große laterale Mobilität der Lipidmoleküle vorhanden ist und die erhöhten Ordnungsparameter des Lipids in Anwesenheit von Cholesterol erklärt. Weiterhin wird in verschiedenen Untersuchungen vermutet, dass es durch Cholesterol in der Membran zur Domänenbildung kommt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starken Restkopplungen, wie sie die Messdaten zeigen. Die Lipidmoleküle in trans-Konformation würden aufgrund der Wechselwirkung mit Cholesterol eine erhöhte Restkopplung aufweisen. Im Vergleich dazu wäre die Restkopplung der nicht oder wenig wechselwirkenden Lipidmoleküle gar nicht oder nur gering erhöht. Untersuchungen zeigen jedoch, dass es in binären Mischungen von Lipid und Cholesterol für sehr hohe Cholesterolkonzentrationen (ca. 45 mol% Cholesterol) zur Kristallitbildung der Cholesterolmoleküle kommt [204, 224–226]. Diese Kristallite führen zu einer heterogenen Verteilung des Cholesterol in der Probe, was zu mehr oder weniger stark wechselwirkenden Regionen führen kann. Die hier verwendete Konzentration von 33 mol% liegt jedoch weit unterhalb dieser Mischbarkeitsgrenze, so dass eine homogene Verteilung von Cholesterol vorliegen sollte. In der Literatur konnte hingegen eine durch die Probenpräparation künstlich verursachte Phasenseparation nachgewiesen werden, welche durch ungleichmäßiges Verdampfen der Lösungsmittel entstehen kann [225, 226]. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Lösbarkeitsgrenze von Cholesterol in der Lipidmembran um einiges höher liegt (nämlich ca. 45 mol% Cholesterol, s.o.), wenn eine andere, reproduzierbare Präparationsmethode verwendet wird. Daher kann die Probenpräparation eine mögliche Ursache für eine eventuell vorhande-

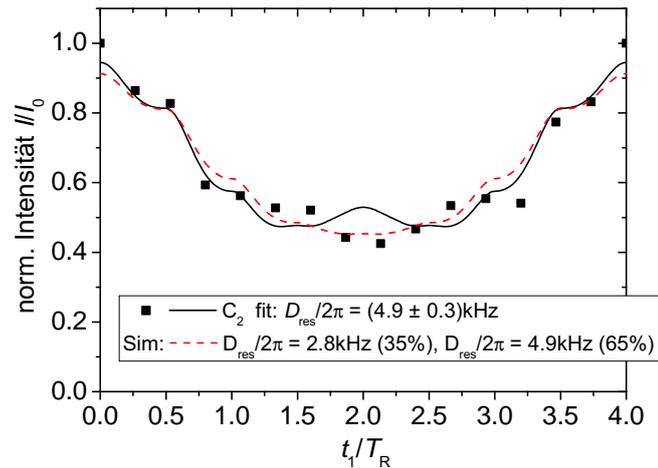


Abbildung 4.12.: *Dephasierungskurve für das Kohlenstoffatom C_2 der Lipidalkylketten in der Mischung aus DMPC und Cholesterol (molare Konzentration 2:1, $T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$, $N = 4$). Weiterhin sind aus zwei unterschiedlichen Restkopplungen, mit unterschiedlicher Wichtung, zusammengesetzte Kurven dargestellt (rot, gestrichelt bzw. blau, gepunktet). Dies soll die Heterogenität der zu Grunde liegenden Restkopplungen in der Probe verdeutlichen.*

ne Phasenseparation sein und somit zur Heterogenität der Probe und daher auch der Wechselwirkungen beitragen.

Eine andere Möglichkeit ist eine vermutete Koexistenz zweier fluider Lipidphasen; eine Cholesterol-reiche und eine Cholesterol-arme. Eine solche Koexistenz ist kontrovers [227] und wird in binären Mischungen für Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlung des Lipids und mittlere Cholesterol-Konzentrationen ($< 30\text{mol}\%$) gefunden [221, 228, 229]. Für die hier verwendete Messtemperatur von $T = 30^\circ\text{C}$ befindet sich das Lipid (DMPC) in der flüssig-kristallinen Phase. In Verbindung mit einer Cholesterol-Konzentration von $33\text{mol}\%$ sollte nur eine Phase vorliegen; die flüssig-geordnete Phase. Aber auch hier besteht die Möglichkeit einer durch Probenpräparation künstlich herbeigeführten Phasenseparation und somit einer heterogenen Verteilung des Cholesterol in der Doppelschicht.

Außerdem ist bekannt, dass es durch die Wechselwirkung der Lipide mit Cholesterol, wegen einer Kettenstreckung, zu einer Verdickung der Lipiddoppelschicht kommt und das Cholesterol eher heterogen in der Membran verteilt ist [230]. Daher ist die Streckung der Ketten in Bereichen mit und ohne Cholesterol mehr oder weniger ausgeprägt, was zu unterschiedlichen dipolaren Restkopplungen wegen der unterschiedlichen Wechselwirkung führen kann. Aber auch innerhalb der einzelnen Ketten sind die Wechselwirkungen mit den Cholesterolmolekülen unterschiedlich. Die hydrophoben Längenunterschiede in Cholesterol und Lipidketten führen dazu, dass es in der Mitte der Doppelschicht zur Bildung eines freien Volumens kommt, was zu unterschiedlicher Beweglichkeit in den Lipidketten führt [211]. Es ist aber anzunehmen, dass nicht ein einzelner Prozess für eine Verteilung von dipolaren Restkopplungen verantwortlich ist, sondern mehrere Ursachen dazu beitragen. Für eine genauere Charakterisierung sind systematische und weiterführende Untersuchungen dieser Wechselwirkung notwendig.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der recoupled DIPSHIFT-Sequenz die durch den Einbau des Cholesterol in die Membran erhöhten Ordnungsparameter der Lipidmoleküle bestimmt werden können. Aus dem Vergleich dieser Werte mit denen des reinen Lipids können Aussagen über die Dynamik der Lipidmoleküle in der Mischung und somit auch über die Wechselwirkung zwischen Lipid und Gastmolekül getroffen werden. D.h., findet eine Wechselwirkung ähnlich der des Cholesterol mit der

Membran statt, wird ein erhöhter Ordnungsparameter im Lipid erwartet. Dies soll nun im Folgenden auch für andere Systeme, bestehend aus Lipid und amphiphilen Gastmolekülen, untersucht werden, um die dort vorliegenden Wechselwirkungen zu charakterisieren.

5 | Wechselwirkung niedermolekularer Polyphile mit Modellmembranen

In diesem Kapitel wird die Wechselwirkung eines niedermolekularen polyphilen Moleküls in zwei unterschiedlichen Modellmembranen untersucht. Dabei werden zunächst die Eigenschaften des Polyphils selbst und im Weiteren interessante Effekte in der Membran beschrieben. Im Anschluss werden die NMR-Ergebnisse erläutert, welche sowohl Einblick in die Struktur als auch in die Dynamik der Membran und des Gastmoleküls geben.

5.1 | Das niedermolekulare Polyphil C12/12

Bei dem hier untersuchten Molekül C12/12 handelt es sich um ein amphiphiles Molekül, welches aus Untereinheiten unterschiedlicher Philie aufgebaut ist (s. Abb. 5.1(a)) [231]. Das Grundgerüst bildet ein steifes, hydrophobes Phenylen-Ethinylen-Rückgrat. An diesem sind an beiden Termini hydrophile Glycerolgruppen gebunden, welche eine Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen. Zudem sind an den gegenüberliegenden Seiten des zentralen Phenylrings im aromatischen Rückgrat zwei flexible Alkyl-Seitenketten angebracht, welche, wie das Rückgrat, hydrophob sind. Durch diesen Aufbau erhält das Molekül eine X-förmige Struktur (s. Abb. 5.1(b)). Die Länge der Seitenketten (hier 12 C-Atome für jede der beiden Ketten) ist dabei namensgebend, weshalb das Molekül die Bezeichnung C12/12 trägt. Da der Anteil an hydrophoben Bausteinen

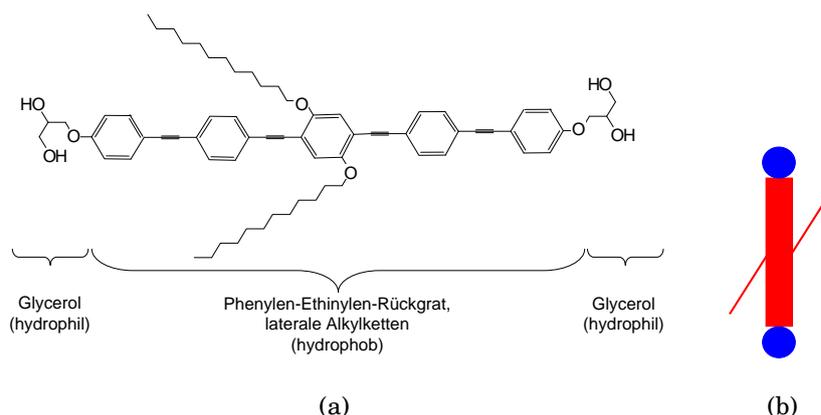


Abbildung 5.1.: (a) Struktur des C12/12-Moleküls mit den einzelnen Bausteinen und deren Philie. (b) Vereinfachte Darstellung des C12/12-Moleküls, an der die X-förmige Erscheinung deutlich wird.

überwiegt, zeigt das Molekül keine Wasserlöslichkeit und somit auch kein lyotropes Phasenverhalten. Die Länge des starren Phenylgerüsts (ca. 3nm) entspricht in etwa der hydrophoben Dicke einer Lipiddoppelschicht [60, 62]. Daher kann ein C12/12-Molekül die Membran durchspannen und ein Einbau in Richtung der Membrannormalen ist begünstigt. Bevor die Wechselwirkung dieser Moleküle in der Lipiddoppelschicht untersucht

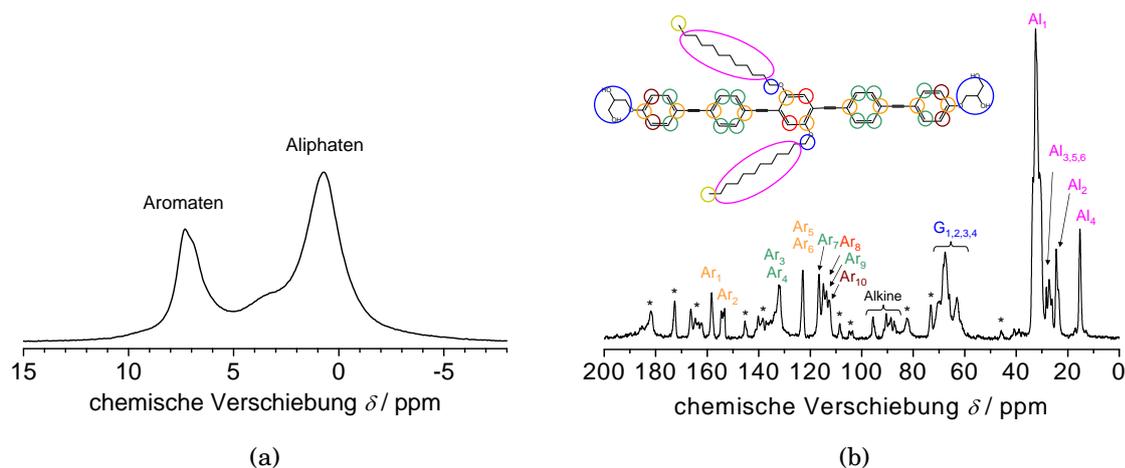


Abbildung 5.2.: (a) ^1H -Spektrum für C12/12 im kristallinen Zustand bei einer Rotationsfrequenz von $\nu_R = 30\text{kHz}$. Trotz der großen Rotationsfrequenz können nur die beiden Protonengruppen der Aromaten und Aliphaten aufgelöst werden. (b) ^{13}C -CP-Spektrum des kristallinen C12/12 ($\nu_R = 5\text{kHz}$, CP-Kontaktzeit $t_{\text{CP}} = 1.5\text{ms}$, $T = 30^\circ\text{C}$), sowie das C12/12-Molekül mit der Zuordnung der jeweiligen Signale zu den Positionen im Molekül. Die Zuordnung basiert auf den chemischen Verschiebungen eines Lösungsspektrums. Im Festkörper existieren jedoch Änderungen der chemischen Verschiebung aufgrund der definierten molekularen Packung und die Resonanzen überlagern sich sehr stark, so dass meist mehrere Kohlenstoffatome in einem Signal enthalten sind.

wird, ist es notwendig, NMR-Spektren der reinen C12/12-Substanz aufzunehmen, um dessen Signale in der Mischung mit einem Lipid zuordnen zu können. Aufgrund der kristallinen Struktur des C12/12 bis zu einer Temperatur von ca. 170°C ist es wegen der starken homonuklearen Dipolkopplungen nicht möglich, ein hoch-aufgelöstes Festkörper-Protonenspektrum zu erhalten. Es können auch bei großer Rotationsfrequenz lediglich die Signale für die aromatischen und die aliphatischen Protonen im Spektrum unterschieden werden (s. Abb. 5.2(a)). Im ^{13}C -Spektrum können die Signale der vorhandenen Kohlenstoffatome auf Basis eines Lösungsspektrums zugeordnet werden (s. Abb. 5.2(b)). Es ist auch hier nur möglich, die Signale einzelnen Gruppen von Kohlenstoffatomen zuzuordnen, wie an der farblichen Markierung am Molekül gezeigt (s. Abb. 5.2(b)). Dabei bezeichnen die Ar_i die Kohlenstoffatome an den Phenylringen, die Alkine sind die Kohlenstoffatome der Dreifachbindungen zwischen den Ringen und die G_i bezeichnen die Glycerol-Kohlenstoffatome. Des Weiteren sind durch die Al_i die Kohlenstoffatome der Alkylketten gegeben, die Sternchen zeigen Rotationsseitenbanden an.

Ausgehend vom Kohlenstoffspektrum des C12/12 wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen die Dynamik der Moleküle im Kristall mit Hilfe des DIPSHIFT- Experiments untersucht. Die gemessenen DIPSHIFT-Dephasierungskurven, sowie das C12/12-Molekül mit der Markierung der jeweiligen Kohlenstoffatome sind in Abb. 5.3 dargestellt. Anhand der Dephasierungskurven ist zu erkennen, dass die verschiedenen Kohlenstoffatome in den Ringen unterschiedlich starke Restkopplungen aufweisen. Außerdem besitzen die Kohlenstoffatome ohne direkt gebundene Protonen ($\text{ArC}_q\text{H}_2 = \text{Ar}_{1,2,5,6}$) ebenfalls eine heteronukleare, dipolare Restkopplung. Diese wird durch die räumliche Nähe der am jeweiligen Ring gebundenen Protonen verursacht und ist im Experiment messbar. Dies zeigt auch hier erneut den Einfluss der umgebenden, nicht direkt gebundenen Kerne, weshalb die angegebenen Kopplungen stets als Mittel zu verstehen sind. Bei genauerer Betrachtung der Dephasierungskurven der Kohlenstoffatome der Ringe mit direkt gebundenen Protonen ($\text{ArCH} = \text{Ar}_{3,4,7,8,9,10}$), lässt sich eine leicht asymmetrische Form der Kurven

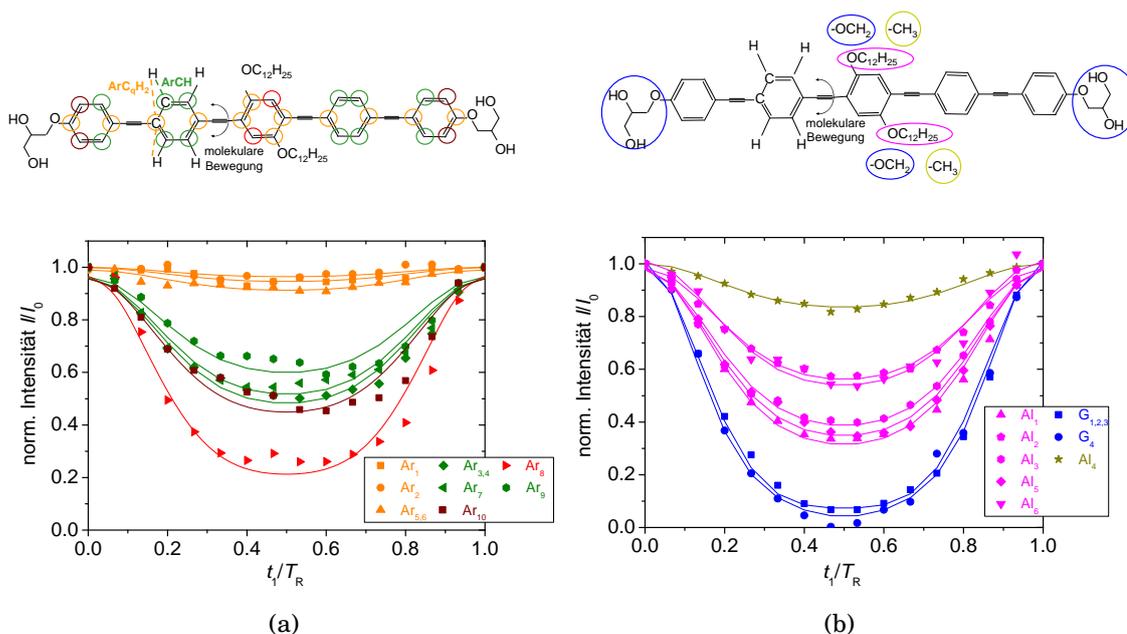


Abbildung 5.3.: Dephasierungskurven für (a) die aromatischen und (b) die aliphatischen Kohlenstoffatome, sowie die der Glycerolkopfgruppen im C12/12-Molekül. Die jeweiligen Kohlenstoffatome sind in der Strukturformel farblich markiert ($T = 30^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $t_{CP} = 2\text{ ms}$).

erkennen. Für Moleküle ähnlicher Struktur, d.h. mit einem starren Ringsystem und flexiblen Alkylketten wurde gezeigt, dass eine solche asymmetrische Form der DIPSHIFT-Dephasierungskurven durch ein anisotropes Pulvermittel bei kurzen CP-Kontaktzeiten entsteht und auch für längere Kontaktzeiten nicht ausgeschlossen ist [232]. Dies hängt damit zusammen, dass der Magnetisierungstransfer von den Protonen auf die Kohlenstoffatome unter Kreuzpolarisation für kurze Kontaktzeiten nicht gleichmäßig stattfindet. Dieser Magnetisierungstransfer unterliegt der Spindiffusion und ist am effizientesten, wenn ein Kohlenstoffatom von mehreren Protonen umgeben ist. Liegt jedoch ein eher isoliertes Spinpaar vor, wie es beispielsweise an Ringsystemen zu finden ist, kann der Magnetisierungstransfer unter MAS anisotrop sein. Das bedeutet, dass bestimmte Orientierungen im Pulver bevorzugt Magnetisierung erhalten, wohingegen andere nicht magnetisiert werden. Diese ungleichmäßige Verteilung der Magnetisierung äußert sich in asymmetrischen Dephasierungskurven, wie sie auch in der reinen C12/12-Probe gefunden wurden. Bei einer Temperatur von $T = 30^\circ\text{C}$ wurde die Messung für zwei verschiedene Kontaktzeiten ($600\ \mu\text{s}$ und 2 ms) durchgeführt, wobei der Effekt bei der längeren Kontaktzeit zwar schwächer, aber immer noch vorhanden ist.

Den größten Ordnungsparameter unter den aromatischen Kohlenstoffatomen weisen die Kohlenstoffatome Ar_8 am mittleren Phenylring auf. Dieser Ring ist durch die gebundenen Alkylketten in seiner Bewegung eingeschränkter als die anderen Ringe, so dass ein höherer Ordnungsparameter plausibel ist. Bei der höheren Messtemperatur war es nicht möglich die Signale von Ar_8 und Ar_9 voneinander zu unterscheiden, so dass für diese beiden Kohlenstoffatome nur ein mittlerer Ordnungsparameter angegeben werden kann. Für die Signale Ar_3 und Ar_4 verhält es sich ähnlich, wobei diese beiden Signale für die tiefere Messtemperatur nicht unterscheidbar waren, im Gegensatz zur hohen Messtemperatur von $T = 90^\circ\text{C}$. Für die Glycerolgruppen ist keine eindeutige Zuordnung möglich, so dass nur das gesamte Signal aller drei Gruppen ausgewertet werden konnte. Es ergab sich eine vergleichsweise starke Kopplung, ebenso wie für die $-\text{OCH}_2$ -Gruppen der Alkylketten. Die aus den gemessenen heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen

Tabelle 5.1.: Ordnungsparameter S_{CH} für die Kohlenstoffatome im C12/12-Molekül gemessen mittels DIPSHIFT-Experiment ($\nu_{\text{R}} = 5 \text{ kHz}$).

C-Atom	S_{CH}		C-Atom	S_{CH}	
	$T = 30^\circ\text{C}$	$T = 90^\circ\text{C}$		$T = 30^\circ\text{C}$	$T = 90^\circ\text{C}$
Ar ₁	0.93±0.13	1.03±0.14	G _{1,2,3} (CH ₂)	1.01±0.14	1.00±0.14
Ar ₂	0.77±0.12	0.80±0.12	G ₄ (CH ₂)	0.82±0.14	0.86±0.14
Ar ₃	0.61±0.04	0.60±0.04	Al ₁	0.61±0.06	0.54±0.04
Ar ₄	0.61±0.04	0.55±0.03	Al ₃	0.60±0.05	0.51±0.04
Ar _{5,6}	1.17±0.14	1.30±0.15	Al ₅	0.58±0.05	0.44±0.03
Ar ₇	0.58±0.04	0.54±0.03	Al ₆	0.46±0.05	0.44±0.03
Ar ₈	0.85±0.05	0.72±0.04	Al ₂	0.44±0.05	0.41±0.03
Ar ₉	0.51±0.03	0.72±0.04	Al ₄	0.32±0.02	0.30±0.02
Ar ₁₀	0.64±0.04	0.54±0.03			

berechneten Ordnungsparameter sind in Tabelle 5.1 angegeben und als Funktion der Position im Molekül in Abb. 5.4 dargestellt. Für die Berechnung der Ordnungsparameter ist eine Referenzkopplung notwendig (s. Kap. 2.3.2.2), welche im Allgemeinen die Dipolkopplung eines unbeweglichen Systems darstellt. Als Referenzkopplung für eine CH-Gruppe wurde der Wert $D_{\text{Ref}} = (22 \pm 1) \text{ kHz}$ benutzt und für die CH₂-Gruppe der Wert $D_{\text{Ref}} = (20 \pm 1) \text{ kHz}$ (s. Kap. 3.2). Für die quartären Kohlenstoffatome der Ringe, die keine direkt gebundenen Protonen besitzen, wurde mittels Simulationsprogramm die DIPSHIFT-Kurve berechnet. Dabei wurde der sich aus der Geometrie des Moleküls ergebende Abstand zwischen dem betrachteten Kohlenstoffatom und den beiden kopplenden Protonen ($r_{\text{CH}} = 2.14 \text{ \AA}$), sowie der Winkel zur Rotationsachse ($\angle(\text{CH}) = 86^\circ$), die in diesem Fall der Moleküllängsachse entspricht, als Parameter in die Simulation eingebunden. Ohne Annahme einer Bewegung ergibt sich daraus eine Referenzkopplung für diese molekulare Geometrie von $D_{\text{Ref}} = (3.0 \pm 0.2) \text{ kHz}$.

In Abbildung 5.4 ist zu erkennen, dass wegen der Ähnlichkeit der Ordnungsparameterprofile für die C12/12-Moleküle bei beiden Messtemperaturen die gleiche Dynamik angenommen werden kann. Dies entspricht der Erwartung, da C12/12 erst bei einer Temperatur von ca. 170°C in eine flüssig-kristalline Phase übergeht und unterhalb davon in kristalliner Form vorliegt. Die einzelnen molekularen Bereiche des C12/12 besitzen jedoch unterschiedliche Ordnungsparameter. Beispielsweise besitzen die Alkylketten der C12/12-Moleküle in der kristallinen Phase einen Ordnungsparameter kleiner als 0.6. Diese Ordnungsparameter spiegeln eine anisotrope Bewegung mit eher kleinen effektiven Bewegungsamplituden wider. Diese ist vermutlich dadurch begründet, dass die Alkylketten durch eine kompakte Packung der Ringsysteme im Kristall in ihrer Bewegungsamplitude eingeschränkt werden. Für die Glycerolgruppen, sowie auch die -OHC₂-Gruppen der Alkylketten ergeben sich vergleichsweise hohe Ordnungsparameter von $S \approx 1$ bzw. $S \gtrsim 0.8$. Das lässt darauf schließen, dass diese Gruppen entweder unbeweglich sind oder eine stark anisotrope Dynamik aufweisen. Es ist ebenfalls keines der einfachen Bewegungsmodelle passend, da die Bewegungsachse nicht bestimmbar ist. Deshalb können hier keine spezifischen Aussagen zur Dynamik gemacht werden. Dennoch sei darauf hingewiesen, dass diese Signale sowohl CH- als auch CH₂-Gruppen enthalten. Da das Signal G₄ bei der gleichen chemischen Verschiebung wie die Glycerol-CH₂-Gruppen (g₁ und g₃) der Lipide erscheint, wird vermutet, dass es sich bei diesem Signal ebenfalls um eine CH₂-Gruppe handelt. Die Dephasierungskurven wurden daher mit der entsprechenden Fitfunktion angepasst (s. Anhang A). Die Signale, welche den Gruppen G₁, G₂ und G₃ zugeordnet werden, sind im Spektrum stark verbreitert und überlagern sich. Eines dieser Signale

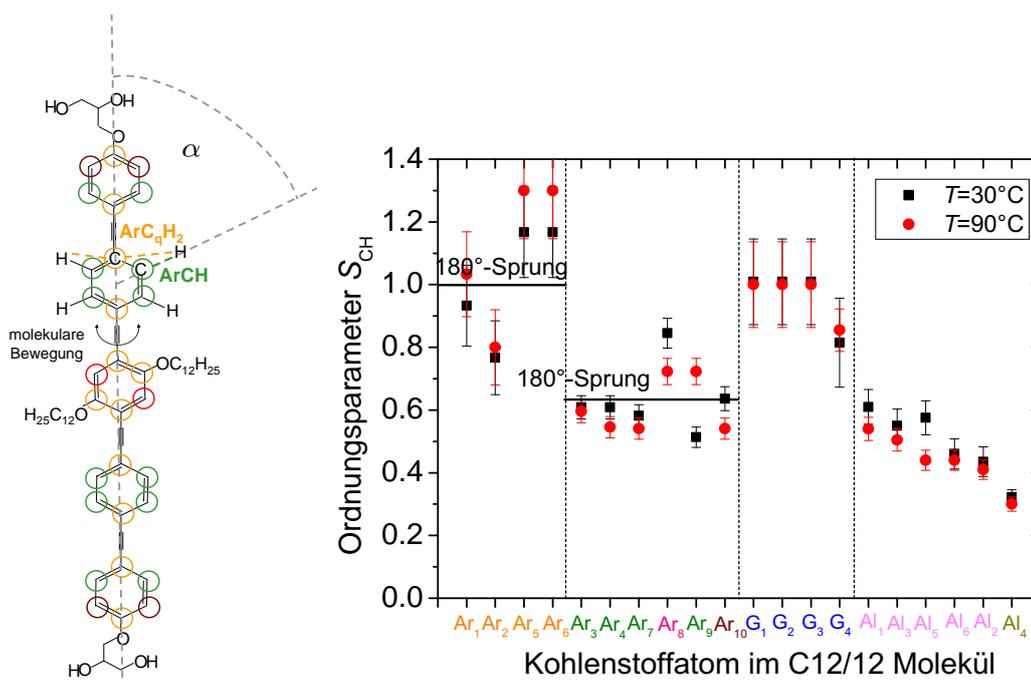


Abbildung 5.4.: Ordnungsparameter S_{CH} für die Kohlenstoffatome des reinen, kristallinen C12/12 bei $T = 30^\circ\text{C}$ und $T = 90^\circ\text{C}$.

gehört jedoch zur CH-Gruppe des Glycerols am C12/12. Die Dephasierungskurve konnte nur für das Gesamtsignal bestimmt werden und wurde, da mehr CH_2 -Gruppen enthalten sind, ebenfalls mit der dazu gehörenden Fitfunktion angepasst. Aufgrund dieser, nur näherungsweise gültigen Anpassungen ergeben sich die großen Wertebereiche für diese Gruppen in Tab. 5.1 bzw. Abb. 5.4.

Werden die Ordnungsparameter für die Kohlenstoffatome der Ringe betrachtet (Abb. 5.4), zeigt sich, dass die Kohlenstoffatome, welche über ein gebundenes Proton verfügen ($\text{Ar}_{3,4,7,8,9,10}$), im Mittel einen reduzierten Ordnungsparameter von $S \approx 0.6$ aufweisen. Anhand dieser ermittelten Ordnungsparameter, kann unter Hinzunahme einer Modellgeometrie (s. Kap. 2.3.2.2) die Dynamik der Ringe charakterisiert werden. Für einen Zweiplatz-Sprung der CH-Bindung am Ring ergibt sich dabei für $S = 0.63$ (s. Linie in Abb. 5.4) ein Reorientierungswinkel von ca. $2\alpha = 120^\circ$ mit der Moleküllängsachse als Bewegungsachse. Mit der gegebenen Geometrie des C12/12-Moleküls ist erkennbar, dass die maßgebliche Kopplung (genauer der Tensor der Dipolkopplung) zwischen den Kohlenstoffatomen der Ringe und ihren direkt gebundenen Protonen idealerweise einen Winkel von $\alpha = 60^\circ$ mit der Moleküllängsachse einschließt (s. Struktur in Abb. 5.4, ArCH). Für einen 180° -Sprung eines Phenylringes, ändert sich die Orientierung des Kopplungstensors somit um $2\alpha = 120^\circ$, was wiederum einen Ordnungsparameter von 0.63 ergibt. Es kann daher angenommen werden, dass die Phenylringe im Kristall des C12/12 180° -Zweiplatz-Sprünge ausführen. Dies ist eine für aromatische Ringe bekannte Dynamik [233, 234]. Da der mittlere Ring durch die gebundenen Alkylketten nur schwerlich in der Lage ist, einen 180° -Sprung durchzuführen, aber dennoch einen reduzierten Ordnungsparameter besitzt, kann eine zusätzliche Bewegung des gesamten Moleküls angenommen werden.

Werden nun die Ordnungsparameter der quartären Kohlenstoffatome betrachtet ($\text{Ar}_{1,2,5,6}$), welche die Nähe zu den beiden am Ring gebundenen Protonen spüren, ist erkennbar, dass diese ungefähr eins sind. Dies würde zunächst auf ein unbewegliches System hindeuten. Unter Einbeziehung der molekularen Geometrie der C12/12-Moleküle wird deutlich, dass der Tensor der dipolaren Kopplung zwischen den quartären Ring-

kohlenstoffen und den nächsten Protonen, eine nahezu senkrechte Orientierung zur Moleküllängsachse und damit zur Bewegungsachse einnimmt (s. Abb. 5.4, ArC_qH_2). Wird nun aus dem Ordnungsparameter mit Hilfe von Abb. 2.6 auf Seite 19 der Reorientierungswinkel dieser Kopplung bestimmt, ergibt sich für einen Zweiplatz-Sprung ein Winkel von ca. 180° . Das bedeutet, dass der Tensor der Dipolkopplung senkrecht auf der molekularen Bewegungsachse steht (s. Struktur Abb. 5.4). Der Zweiplatz-Sprung ist somit auch hier ein passendes Bewegungsmodell für die Dynamik der C12/12-Ringe.

Die für die beiden verschiedenen Gruppierungen der Ringkohlenstoffatome (ArCH und ArC_qH_2) ermittelten Ordnungsparameter ergeben somit ein konsistentes Bild von der molekularen Bewegung des C12/12-Rückgrates im Kristall. Aufgrund der starken Streuung der einzelnen Ordnungsparameter (bedingt durch ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis), sind die angegebenen Werte stets als Mittelwerte zu verstehen. Es ist natürlich möglich, dass auch hier nicht alle Moleküle dieselbe Dynamik besitzen und die Bewegungsamplitude etwas vom Idealfall abweichen kann, wie es die Messdaten zeigen.

5.2 | C12/12 in der Modellmembran DPPC

Nachdem im letzten Abschnitt die reine Substanz charakterisiert und dynamische Informationen gewonnen wurden, ist es von großem Interesse, die Wechselwirkung dieses polyphilen Moleküls mit Modellmembranen zu untersuchen. Obwohl C12/12 in Wasser unlöslich ist, zeigt es eine sehr gute Mischbarkeit mit Phospholipiden und darüber hinaus eine ungewöhnliche Selbstorganisation in der Membran. Es wird daher vermutet, dass diese Moleküle die Membran in ihren Eigenschaften in hohem Maß beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das polyphile Molekül C12/12 in Wechselwirkung mit zwei unterschiedlichen Modellmembranen (DPPC, DOPC) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Zunächst wird das System DPPC-C12/12 in zwei verschiedenen molaren Mischungsverhältnissen (10:1 bzw. 4:1) näher betrachtet.

5.2.1 | Vorbetrachtungen

Für große, unilamellare Vesikel, bestehend aus dem Phospholipid DPPC und dem polyphilen Molekül C12/12 in einem molaren Verhältnis von 10:1 (DPPC:C12/12), wurde in Fluoreszenzuntersuchungen eine unerwartete Selbstorganisation der C12/12-Moleküle in der Membran gefunden. Diese zeigt bei Raumtemperatur eine deutliche, makroskopische Phasenseparation mit sternenförmiger Erscheinung (s. Abb. 5.5(a)) [231]. Ein konzentrationsabhängiges, komplexes Phasenverhalten für Mischungen aus DPPC und C12/12 wurde ebenfalls in DSC-Messungen ermittelt [231]. In Abb. 5.5(b) sind die DSC-Kurven für verschiedene Konzentrationen DPPC:C12/12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass vier verschiedene Signale in den DSC-Kurven erscheinen, was auf ein komplexeres Phasenverhalten des Lipids in Anwesenheit von C12/12 hindeutet. Dies wird als Phasenseparation gedeutet, wobei wegen der Fluoreszenzbilder sicher angenommen werden kann, dass lipidreiche und C12/12-reiche Phasen vorhanden sind. Der Hauptphasenübergang (s. Kap. 4) der Lipidalkylketten (ca. 42°C für DPPC) bleibt anscheinend erhalten, das zugehörige Signal wird jedoch mit zunehmendem C12/12-Gehalt kleiner. Die Fläche unter diesem Signal entspricht der Umwandlungsenthalpie und ist im Allgemeinen proportional zu der Anzahl an Lipidmolekülen, die am Phasenübergang beteiligt sind [179]. Aber auch Grenzflächeneffekte bei verschiedenen großen Domänen beeinflussen die Umwandlungsenthalpie. Nimmt diese Umwandlungsenthalpie ab, kann davon ausgegangen werden, dass weniger Lipidmoleküle zum Signal beitragen, also einige Moleküle bei dieser Temperatur keinen

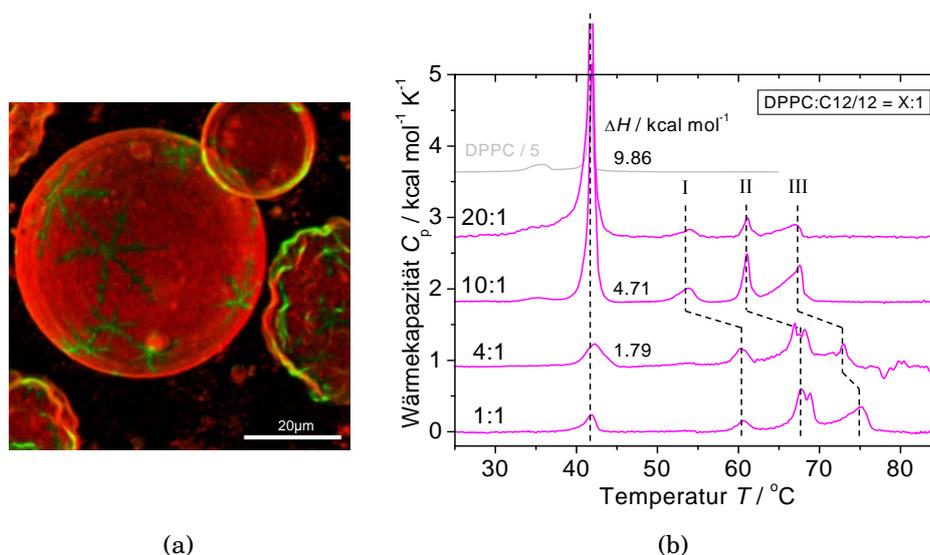


Abbildung 5.5.: (a) Fluoreszenzbild der Mischung DPPC:C12/12 (10:1) bei Raumtemperatur (Daten von S. Werner, aus [231]). Die vom Lipid stammenden Fluoreszenzsignale sind rot, die vom C12/12 erscheinen in grün. Die sechszählige Symmetrie der C12/12-Aggregate ist deutlich zu erkennen. (b) DSC-Kurven für verschiedene Mischungsverhältnisse von DPPC und C12/12 wie angegeben, sowie die Umwandlungsenthalpien des Hauptphasenübergangs für die untersuchten Mischungen (Daten von B.-D. Lechner, aus [231]). Zum Vergleich ist ebenfalls die DSC-Kurve von reinem DPPC mit der entsprechenden Umwandlungsenthalpie der Hauptphasenumwandlung gezeigt.

Phasenübergang besitzen oder aber Grenzflächeneffekte die Umwandlungsenthalpie verringern. Es zeigt sich weiterhin, dass die verschiedenen, zusätzlichen Phasenübergänge für die höheren C12/12-Konzentrationen um ca. 5 K zu höheren Temperaturen verschoben sind. Dies kann darauf hindeuten, dass unterschiedlich große Strukturen bzw. Domänen in den verschiedenen Mischungen vorliegen. Im Folgenden werden im Hinblick auf die mit NMR untersuchten Proben die molaren Verhältnisse von 10:1 und 4:1 (DPPC:C12/12) betrachtet.

Ein molares Verhältnis von 4:1 bedeutet, dass die C12/12-Moleküle einen Massenanteil von ungefähr 30% ausmachen und daher ein Lipidüberschuss existiert. Dass der Hauptumwandelungspeak des Lipids mit steigender C12/12-Konzentration an Intensität verliert, bedeutet, dass in den Mischungen nicht alle vorhandenen Lipidmoleküle bei dieser Temperatur ihren Phasenübergang besitzen. Es ist sehr wahrscheinlich, und die zusätzlichen Signale in den DSC-Kurven deuten daraufhin, dass die restlichen Lipidmoleküle in einer oder mehreren Phasen zusammen mit C12/12 existieren und erst bei höheren Temperaturen eine Phasenumwandlung zeigen. Dies kann näherungsweise durch die angegebenen Werte der Umwandlungsenthalpien ermittelt werden. So zeigt sich, dass für die 10:1-Mischung ca. 50% der Lipidmoleküle an der Hauptphasenumwandlung beteiligt sind und für die 4:1-Mischung ca. 20%. Das bedeutet ferner, dass mit steigender C12/12-Konzentration vermutlich mehr DPPC-Moleküle in separierten Domänen in der Gelphase stabilisiert werden. Diese DPPC-Moleküle gehen erst bei höheren, vermutlich bei den durch die zusätzlichen DSC-Signale angezeigten Temperaturen in die flüssig-kristalline Phase über. Oberhalb aller Phasenumwandlungen wird eine homogene Mischphase beider Komponenten angenommen.

5.2.2 | NMR-Untersuchungen an Mischungen aus C12/12 und DPPC

5.2.2.1. Quantitative Protonenspektren

Mittels Festkörper-NMR sollen nun die Eigenschaften der Mischungen aus DPPC und C12/12 untersucht werden. Dazu wurden temperaturabhängige Protonenspektren unter MAS bei einer Rotationsfrequenz von $\nu_R = 5 \text{ kHz}$ für die beiden Proben aufgenommen. Dies liefert schmale Linien für die mobilen Protonen in der Probe, da die starke homonukleare Dipolkopplung zu einem großen Teil gemittelt wird. Die Wartezeit zwischen zwei Scans betrug $dI = 8 \text{ s}$, was eine quantitative Auswertung der Spektren ermöglicht. In Abb. 5.6(a) ist das Protonenspektrum für das reine DPPC im Vergleich zu den beiden untersuchten DPPC-C12/12-Mischungen (10:1 und 4:1) dargestellt. Alle Lipidsignale können zugeordnet werden und sind entsprechend der Nomenklatur bezeichnet (s Kap. 4.2.1). Für die C12/12-Moleküle können die Signale der aromatischen Protonen im Bereich um 7 ppm detektiert werden, welche im Vergleich zu den Lipidsignalen wegen der geringeren Masse an C12/12 in den Mischungen kleiner, aber messbar sind. Andere Protonensignale des C12/12 können wegen zu geringer Intensitäten oder Überlagerungen mit Lipidresonanzen nicht zugeordnet werden. Um in der flüssig-kristallinen Phase bzw. oberhalb aller DSC-Umwandlungen zu messen, wurden die Proben auf eine Temperatur von $T = 75^\circ\text{C}$ geheizt. Für das reine DPPC wurde eine Messtemperatur von $T = 65^\circ\text{C}$ verwendet; es befindet sich also ebenfalls in der L_α -Phase. Das Wassersignal (HDO bei ca. 4.8 ppm – 4.5 ppm) in den Proben hat sich aufgrund der hohen Temperatur soweit verschoben, dass die Lipidsignale des g_1 - und des α -Kohlenstoffs davon überlagert werden. In den Spektren in Abb. 5.6 können leichte Verschiebungen in den Kopfgruppensignalen der Lipidsignale in den Mischungen im Vergleich zum reinen Lipid ausgemacht werden. Diese deuten auf geringe Konformationsänderungen in den Lipidmolekülen bei Anwesenheit der C12/12-Moleküle hin. Da die Spektren jedoch nur extern referenziert werden konnten (^1H -Linie von Adamantan bei 1.87 ppm), ist ein absoluter Vergleich der chemischen Verschiebungen schwierig. Es ist dennoch zu erkennen, dass sich die Signale für die Kopfgruppe und die Alkylketten unterschiedlich verhalten. Während die Kettenresonanzen keine bzw. kaum eine Änderung der chemischen Verschiebung besitzen, zeigen die Kopfgruppensignale eine leichte Verschiebung zu größeren ppm-Werten. Dies könnte darauf hindeuten, dass das C12/12 mehr mit der Kopfgruppe als mit den Alkylketten wechselwirkt. Die Verschiebung zu größeren chemischen Verschiebungen weist auf eine minimal erhöhte Ordnung in diesem Bereich der Lipidmoleküle hin. Anhand der beiden Signale der am Kohlenstoff C_2 gebundenen Protonen (bei ca. 2.4 ppm) ist auch hier deutlich die Ungleichheit der beiden Alkylketten im Anfangsbereich zu erkennen. Während die Auflösung im reinen DPPC keine Separation dieses Signals zeigt, ist sie in den Mischungen deutlich wahrnehmbar.

Zur Untersuchung des Phasenverhaltens und dessen Einfluss auf die Spektren wurden Protonenspektren für Temperaturen im Bereich von 20°C bis 75°C aufgenommen. Exemplarisch sind in Abb. 5.6(b) die Protonenspektren für drei Temperaturen dargestellt. Darin ist ersichtlich, dass in der Mischung, wie auch im Reinlipid, nur die Kopfgruppe unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur mobil ist [177, 185–187]. Die Alkylketten zeigen bei $T = 20^\circ\text{C}$ kein Signal (s. Kap. 4.2.1). Das Signal der Alkylkette hat bei $T = 50^\circ\text{C}$, also oberhalb der Phasenumwandlung des reinen DPPC, deutlich an Intensität gewonnen. Im Vergleich dazu zeigt das Spektrum bei $T = 75^\circ\text{C}$ eine nochmals erhöhte Intensität der Alkylkettensignale. Wegen der sehr großen Dipolkopplung der Protonen im starren Festkörper, sind die Signale dieser Proben im Allgemeinen sehr breit. Für mobile Proben hingegen werden schmale Signale gemessen. Die Intensität der gemessenen Protonensignale ist daher proportional zur Anzahl an mobilen Molekülen in der Probe [235]. Aus

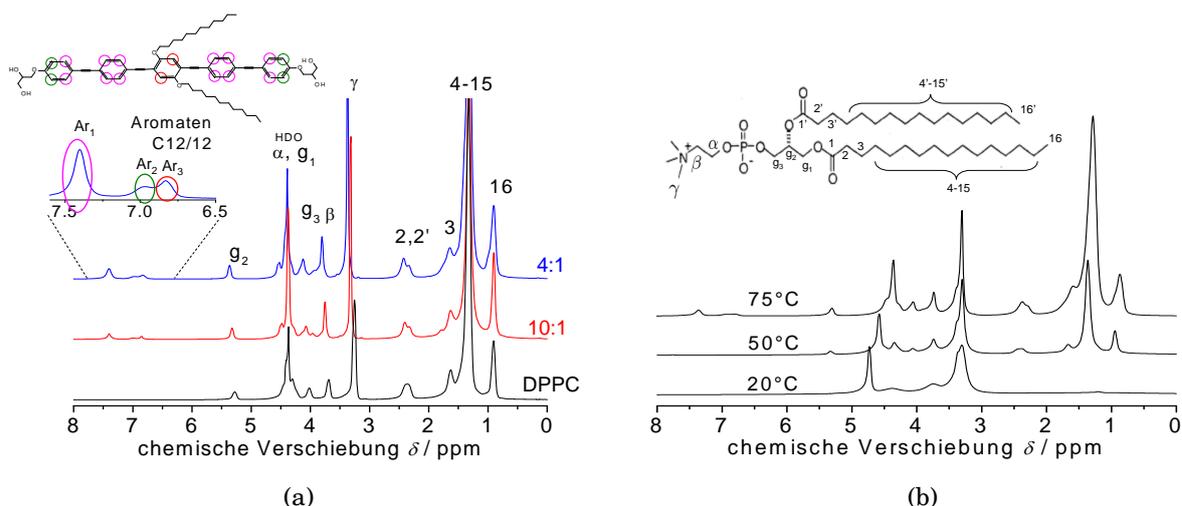


Abbildung 5.6.: (a) Protonenspektren für reines DPPC ($T = 65^\circ\text{C}$) sowie für die Mischungen mit C12/12 in den Konzentrationen 10:1 und 4:1 ($T = 75^\circ\text{C}$). Die Zuordnung der entsprechenden Signale zu den Protonen des Lipids und des C12/12 ist ebenfalls angegeben. (b) Protonenspektren für die 4:1 Mischung bei drei verschiedene Messtemperaturen ($\nu_R = 5\text{ kHz}$).

diesem Grund kann bereits aus dem Vergleich der drei Messtemperaturen und der graduellen Zunahme der Signalintensität geschlossen werden, dass die Lipidmoleküle erst nach und nach mobil werden und daher in den Mischungen sehr wahrscheinlich phasensepariert vorliegen. Durch die große Wartezeit zwischen den einzelnen Scans ist es möglich, die Intensitäten der einzelnen Signale quantitativ auszuwerten und die Anzahl der zum Signal beitragenden Protonen zu ermitteln. Dazu wurden die verschiedenen Bereiche der Spektren integriert und untereinander bzw. mit den Intensitäten der reinen Lipidprobe verglichen. Dabei ist zu bemerken, dass eine nicht zu vernachlässigende Intensität in den Rotationsseitenbanden der Protonenspektren enthalten ist [184]. Diese wurden daher, um die Gesamtintensität zu bestimmen, ebenfalls integriert. Als Referenzintegral für die Normierung der ermittelten Integrale wurde das Signal des Glycerol-2 Protons (g_2) bei einer Temperatur von $T = 50^\circ\text{C}$ gewählt. Dieses Signal erscheint im Spektrum bei einer chemischen Verschiebung, in dessen Nähe keines der C12/12-Signale liegt. Wegen der vielen Überlappungen im Spektrum kann das Integral der Alkylketten nicht als Referenz benutzt werden. Das Glycerolrückgrat weist zwar im Vergleich zur Alkylkette eine eingeschränkte Bewegung in der flüssig-kristallinen Phase auf, ändert seine Mobilität aber oberhalb der Hauptphasenumwandlung ebenfalls nicht mehr. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Intensität, welche im Reinlipid bei $T = 50^\circ\text{C}$ für g_2 bestimmt wird, sämtliche mobilen Protonen dieser Gruppe repräsentiert. So wurden die Integrale der g_2 -Protonen, Alkylketten und der C12/12-Aromaten für beide Mischungen aus DPPC und C12/12 bestimmt und auf das Referenzintegral bezogen. Die erhaltenen Integrale und die DSC-Kurven für die untersuchten Mischungen sind im Vergleich in Abb. 5.7 gegen die Temperatur aufgetragen.

Wird zunächst das reine Lipid betrachtet, ist zu erkennen, dass unterhalb der Phasenumwandlung der Lipide, d.h. für $T < 42^\circ\text{C}$, die Signalintensitäten sowohl für die Alkylketten als auch die Glycerolgruppe sehr gering sind. Dies zeigt, dass die Ketten unterhalb der Phasenumwandlung eher unbeweglich sind, wie bereits in Kap. 4.2.1 beschrieben. Mit Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur steigt die Intensität der beiden Gruppen auf ihren Maximalwert an. Das heißt, alle Lipidmoleküle werden an der Phasenumwandlung mobil und tragen zum Integral bei. Dass das Integral der Alkylketten etwas kleiner ist als eins, kann der für die Integration notwendigen Datenbearbeitung

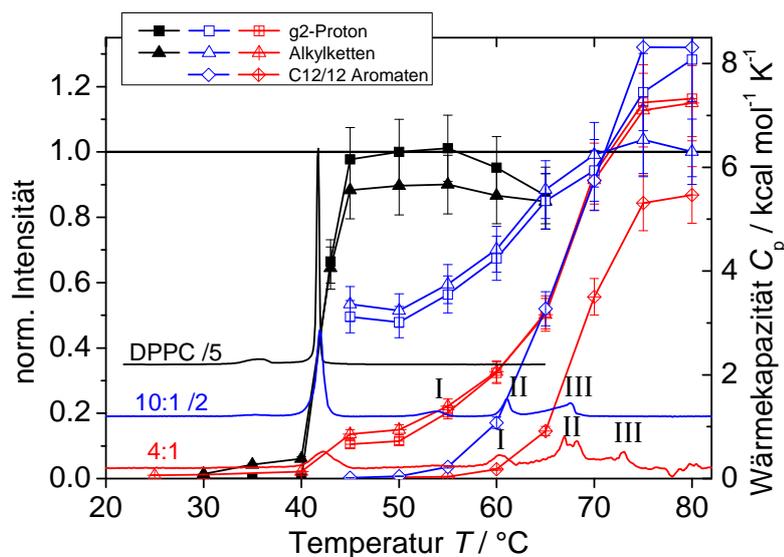


Abbildung 5.7.: Quantitative Protonenintegrale für das Glycerol- g_2 , die Alkylketten der Lipide, sowie die C12/12-Aromaten in Abhängigkeit der Temperatur für die beiden verschiedenen Konzentrationen (rot: 4:1, blau: 10:1). Als Referenzkurven sind die temperaturabhängigen Integrale für g_2 und die Alkylketten in reinem DPPC dargestellt. Die jeweiligen DSC-Thermogramme (Intensitäten skaliert) ebenfalls aufgetragen. (Die Daten für die Konzentration 10:1 wurden von Ruth Bärenwald gemessen und ausgewertet, DSC-Daten wurden von B.-D. Lechner gemessen.)

zugeschrieben werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine Korrektur der Basislinie im Spektrum erforderlich ist, welche von verschiedenen experimentellen Gegebenheiten abhängt und auf verschiedene Arten korrigiert werden kann. Zur Auswertung der hier gezeigten Integrale wurde stets eine lineare Basislinienkorrektur für die einzelnen Signale benutzt, um den durch starre Anteile hervorgerufenen, breiten Untergrund zu beseitigen. Anschließend wurde das verbleibende Signal der mobilen Anteile integriert. Da es sich hier um einen Vergleich verschiedener Proben handelt, ist davon auszugehen, dass auch die Basislinie für die unterschiedlichen Proben stets etwas anders ist. Durch verschiedene Ansätze konnte eine Fehlerabschätzung vorgenommen werden, welche durch die Fehlerbalken in Abb. 5.7 repräsentiert ist. Zusammenfassend wird für DPPC festgestellt, dass die Mobilität der Moleküle mittels Protonenspektren erfasst und quantifiziert werden kann. Der Phasenübergang wird bei ca. 40°C gefunden, was sehr gut mit der DSC-Kurve übereinstimmt. Temperaturabweichungen für unterschiedliche Messmethoden können durch verschiedenartige Kalibrierungen bedingt sein.

Darauf aufbauend werden nun die Integrale für die beiden Mischungen aus DPPC und C12/12 genauer betrachtet. Für die 4:1-Mischung ist zu erkennen, dass unterhalb der Hauptumwandlung der Lipide die Alkylketten ebenfalls unbeweglich sind. Für die 10:1-Mischung existieren hier keine Messpunkte, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Alkylketten ebenfalls unbeweglich sind. Das gleiche Verhalten zeigen auch die Glycerol- g_2 -Kerne unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur. Mit Erreichen der Temperatur des ersten zusätzlichen Umwandlungspeaks im DSC (I) steigt die Intensität der Alkylketten und die der g_2 -Protonen an. Mit zunehmender Temperatur ist ein stetiger Anstieg der Alkylketten-Intensität zu beobachten. Ein etwas stärkerer Anstieg der Intensität ist für die 4:1-Mischung zwischen 65°C und 75°C zu beobachten, wo auch die letzten beiden Umwandlung im DSC (II,III) zu sehen sind. Für die 10:1 Mischung ist dieser Anstieg weniger ausgeprägt. Die stetige Zunahme der Intensität ist ein Indiz für

die im Probensystem DPPC-C12/12 vorliegende Phasenseparation. Die Lipidmoleküle sind in den verschiedenen Phasen in ihrer Mobilität eingeschränkt und werden erst allmählich, mit zunehmender Temperatur, mobil. Weiterhin ist für die beiden Mischungen ein Unterschied im Integral der Alkylketten bzw. g_2 -Protonen direkt nach dem Phasenübergang zu erkennen. So werden an der Hauptphasenumwandlung des Lipids ca. 50% der Lipidmoleküle für die 10:1-Mischung und ca. 15 – 20% in der 4:1-Mischung mobil. Dies entspricht auch in etwa den aus den Umwandlungsenthalpien berechneten Anteilen des Lipids in der Mischung, welche bei dieser Temperatur mobil werden (s. Kap. 5.2.1). Die übrigen Lipidmoleküle liegen, vermutlich in C12/12-reichen Phasen, separiert vor. Anhand der molaren Verhältnisse und der ermittelten, mobilen Anteile der Probe kann die Anzahl der unbeweglichen Lipidmoleküle pro C12/12-Molekül berechnet werden. Diese beträgt bei der 10:1-Mischung in etwa 5.3 und bei der 4:1-Mischung ungefähr 3.5 Lipidmoleküle pro C12/12-Molekül. Dies stimmt sehr gut mit den aus den DSC-Enthalpien bestimmten Verhältnissen von 5.5:1 für die 10:1-Mischung und 4:1 für die 4:1-Mischung überein [231].

Mit zunehmender Temperatur nehmen die Integrale der Lipidsignale stetig zu. Der Kurvenverlauf der Lipidintegrale ist für beide Konzentrationen bis zu einer Temperatur von ca. 65°C gleich. Oberhalb dieser Temperatur steigt die Intensität in der 4:1-Mischung nochmals sprunghaft an, während es in der 10:1-Mischung einen weniger starken Anstieg gibt. Da in der 10:1-Mischung nach der zweiten Phasenumwandlung bereits mehr Lipidmoleküle mobil geworden sind, beträgt der Anteil, der am letzten Übergang mobil wird nur noch ca. 10%. Bei der 4:1-Mischung befanden sich nach dem zweiten Phasenübergang noch mehr Lipide in eingeschränkter Umgebung, so dass am letzten Übergang vergleichsweise mehr Moleküle frei werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Größe der phasenseparierten Domänen in den beiden Mischungsverhältnissen unterschiedlich ist bzw. unterschiedlich viele Lipidmoleküle in C12/12-reichen Phasen immobilisiert werden. Ein Indiz sind auch die aus den DSC-Kurven erhaltenen, unterschiedlichen Umwandlungsenthalpien (s. Abb. 5.5(b)). Es ist darüber hinaus zu erkennen, dass die Kurven der Lipidmoleküle über den ersten zusätzlichen DSC-Peak (I) hinweg jeweils parallel verlaufen. Daher wird angenommen, dass dieses Signal nicht von einem Übergang der Lipidmoleküle verursacht wird. Eine Interpretation zum ersten zusätzlichen Phasenübergang (I) ist allein aus diesen Daten nicht möglich, kann jedoch im Weiteren genauer charakterisiert werden (s. nächster Abschnitt).

Vom C12/12 sind lediglich die Signale der Ringprotonen im Spektrum auswertbar, welche in gleicher Weise bearbeitet und integriert wurden wie die Lipidsignale. Die Integrale sind ebenfalls in Abb. 5.7 aufgetragen, wobei es unterhalb der Lipidphasenumwandlung keine messbaren bzw. auswertbaren Signale gab. Die Integrale der C12/12-Aromaten zeigen für Temperaturen unterhalb des ersten zusätzlichen DSC-Umwandlungssignals (I) eine sehr geringe Intensität und somit auch nur einen geringen Anteil an mobilen Molekülen. Der Großteil der C12/12-Ringe ist immer noch stark gekoppelt und vermutlich unbeweglich, bis auf die im Kristall vorhandenen 180°-Sprünge (s. Kap. 5.1). Ab einer Temperatur von ca. 60–65°C sind die Signale der Aromatenringe des C12/12 im Spektrum deutlich erkennbar und ihre Intensität steigt mit zunehmender Temperatur weiter an. Das bedeutet, dass auch die C12/12-Moleküle nach und nach beweglich werden. Der größte Signalanstieg findet, je nach C12/12-Konzentration, um $T = 60 - 65^\circ\text{C}$ statt. Dies entspricht der Temperatur, bei der die Signale der Lipidalkylketten in den Mischungen einen (sprunghaften) Anstieg der Intensität aufweisen (s. Abb. 5.7). Bei weiter zunehmender Temperatur flachen die Kurven ab und es gibt keine weitere Zunahme der Intensität mehr. Oberhalb von ca. 70°C haben alle Integrale ihren Maximalwert erreicht. In der Probe existieren nur noch Moleküle mit hoher Mobilität. Dies deutet daraufhin, dass oberhalb

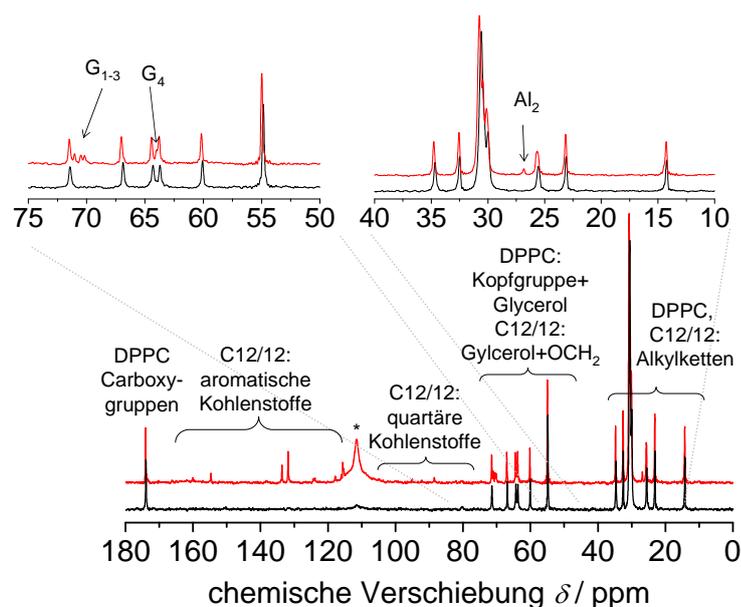


Abbildung 5.8.: Direkt angeregtes Kohlenstoffspektrum für die 4:1-Mischung aus DPPC und C12/12 bei $T = 75^\circ\text{C}$ ($\nu_R = 5\text{kHz}$) mit Zuordnung der Signale zu den Gruppen der beiden Substanzen. Das mit * markierte Signal stammt von dem im Rotor enthaltenen Teflonspacer, welches auch als interne Referenz verwendet wurde. Durch Vergleich des Spektrums von reinem DPPC ($T = 65^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$) können die vom C12/12 stammenden, isolierten Signale identifiziert werden. Die Insets zeigen Ausschnitte der Spektren für den Kopfgruppenbereich und den Bereich der Alkylketten.

von ca. 70°C alle ko-existierenden Phasen in eine flüssig-kristalline Phase übergegangen sind und eine homogene Mischung der beiden Substanzen vorliegt.

Das molekulare Bild der Phasen in den Mischungen aus DPPC und C12/12, welches mittels Fluoreszenz- und DSC-Messungen erhalten wurde, konnte also mit Hilfe temperaturabhängiger, quantitativer Protonenspektren gestützt werden. Die genaue Erscheinung der Phasen scheint vom Mischungsverhältnis der Substanzen abhängig zu sein. Anhand der hier erzielten Daten können zwei der drei zusätzlichen Phasenübergänge zugeordnet werden. Der zweite, zusätzliche Phasenübergang (II) geht vermutlich mit der Mobilisierung der bis dahin in Phasen separierten, eingeschränkten Lipidmoleküle einher, während der dritte, zusätzliche Übergang (III) mit dem Auflösen der supramolekularen Überstruktur, in Verbindung mit dem Ausbilden einer homogenen Mischphase, assoziiert wird.

5.2.2.2. Temperaturabhängige ^{13}C -Spektren

Für die 4:1-Mischung aus DPPC und C12/12 wurden weiterhin temperaturabhängige Kohlenstoffspektren aufgenommen. Das Spektrum bei der höchsten Messtemperatur, d.h. oberhalb aller DSC-Signale, ist in Abb. 5.8 gezeigt, wobei die Signale der einzelnen Kohlenstoffatome in beiden Molekülspezies den jeweiligen molekularen Gruppen zugeordnet sind. Für das untersuchte molare Verhältnis von 4:1 ist ausreichend Masse an C12/12 in der Probe vorhanden, um davon ebenfalls Signale zu erhalten. Dies ist bei der 10:1-Mischung nicht der Fall, weshalb diese hier nicht näher betrachtet wird. Durch interne Referenzierung auf das Teflon-Signal kann beim Vergleich der Spektren des reinen DPPC und der 4:1-Mischung eine leichte Linksverschiebung (ca. $0.1 - 0.15\text{ ppm}$) der Lipidsignale sowohl in der Kopfgruppenregion als auch im Bereich der Alkylketten festgestellt werden. Diese Änderung ist zwar sehr gering, deutet aber dennoch auf eine veränderte Konformation, zu einer etwas erhöhten Ordnung in allen Bereichen des Lipids durch den Einbau der

C12/12-Moleküle hin. Daten aus Röntgendiffraktometrie und Phosphor-NMR zeigen, dass die in der Mischung vorliegende Gelphase der Lipidmoleküle gegenüber der im reinen Lipid verändert ist [231].

Die temperaturabhängigen Kohlenstoffspektren für die 4:1-Mischung wurden bei jeder Temperatur sowohl mit direkter Anregung (DP) der Kohlenstoffatome, als auch mittels Polarisationstransfer (CP) von den Protonen auf die Kohlenstoffatome, aufgenommen. Dadurch ist es möglich, unterschiedliche Beweglichkeiten in der Probe zu detektieren [108, 109, 236]. Über die Kreuzpolarisation (CP) werden die Bereiche der Probe polarisiert, die eine große dipolare Kopplung besitzen. Dies sind vornehmlich starre bzw. sehr anisotrop mobile Teile der Probe. Mit direkter Anregung hingegen werden die Bereiche der Probe polarisiert, welche eine erhöhte molekulare Beweglichkeit besitzen. Es ist daher aus dem Vergleich der mit den beiden Methoden erhaltenen Spektren möglich, auf unterschiedliche Beweglichkeiten innerhalb der Probe zu schließen. In Abb. 5.9 sind für beide Anregungsarten temperaturabhängige Spektren dargestellt, wobei der Vergleich sowohl für den Kopfgruppenbereich als auch für den Bereich der Alkylketten gezeigt ist. In diesen Abbildungen ist ersichtlich, dass die Spektren in Abhängigkeit von Messtemperatur und Anregungsart ein unterschiedliches Erscheinungsbild besitzen. Zunächst kann festgestellt werden, dass die Spektren für beide Anregungsmethoden ähnliche Charak-

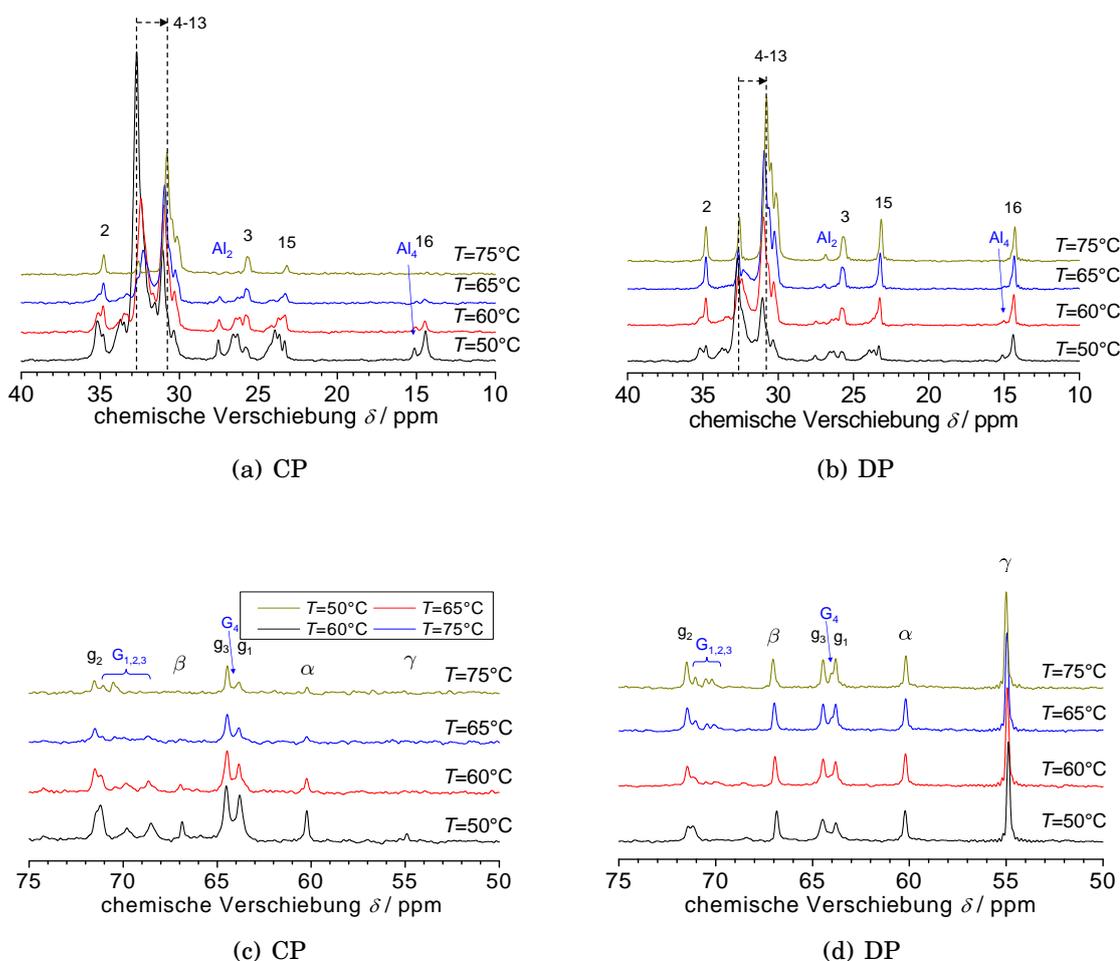


Abbildung 5.9.: ^{13}C -Spektren der 4:1-Mischung (DPPC+C12/12) mit CP-Anregung für (a) den Alkylkettenbereich und (c) die Kopfgruppenregion, sowie die Spektren mit direkter Anregung (DP) ebenfalls für (b) die Alkylketten und (d) die Kopfgruppen bei verschiedenen Messtemperaturen ($\nu_R = 5 \text{ kHz}$). Die gestrichelten Linien zeigen die Änderung der chemischen Verschiebungen der Alkylketten bei $T = 50^\circ\text{C}$ und $T = 75^\circ\text{C}$, welche auf unterschiedliche Konformationen hindeuten.

teristika aufweisen; sie unterscheiden sich jedoch in der Intensität und mitunter auch in der chemischen Verschiebung. Für die Alkylketten des Lipids in den Abb. 5.9(a) und 5.9(b) ist zu erkennen, dass die Spektren für $T = 50^\circ\text{C}$ deutlich mehr Signale aufweisen, als für $T = 75^\circ\text{C}$. Am deutlichsten sind diese Signale in den CP-Spektren in Abb. 5.9(a) zu erkennen, was auf eine größere Kopplung für die Kohlenstoffatome dieser Signale schließen lässt. Die abnehmende Signalintensität bei steigender Temperatur deutet auf eine Zunahme der Mobilität in der Probe hin. Dies ist auch in den DP-Spektren sichtbar. Dort nimmt die Intensität der Signale mit steigender Temperatur zu und damit die Mobilität in der Probe. Ähnlich verhält es sich auch in dem Bereich der Kopfgruppen- bzw. Glycerolsignale (s. Abb. 5.9(c) und 5.9(d)). Auch dort wird in den CP-Spektren eine abnehmende und in den DP-Spektren eine zunehmende Signalintensität verzeichnet, was eine wachsende Mobilität der Moleküle widerspiegelt. Eine eindeutige Separation in Lipid- und C12/12-Signale ist wegen der Komplexität der Spektren nur für die höchste Temperatur möglich. Anhand der ansteigenden Intensität der C12/12-Glycerolsignale ($G_{1,2,3}$) in Abb. 5.9(d) ist auch hier die zunehmende Mobilisierung der Moleküle deutlich erkennbar. Sie zeigen weiterhin eine große Änderung der chemischen Verschiebung von tiefer zu hoher Temperatur (s. Abb. 5.9(c)), was auf eine veränderte Konformation der Moleküle bei den betrachteten Temperaturen schließen lässt.

Vor allem auch in den Kettensignalen ist die Änderung der chemischen Verschiebung deutlich zu erkennen (s. gestrichelte Linie in Abb. 5.9(a) und 5.9(b)). Dies deutet darauf hin, dass sich eine relative große Anzahl der Lipidketten bei $T = 50^\circ\text{C}$ noch in einer all-trans Konformation befindet. Daraus kann geschlossen werden, dass bei dieser Temperatur Lipidmoleküle in verschiedenen Konformationen zu finden sind, die denen der Gel- bzw. L_α -Phase entsprechen. Mit zunehmender Temperatur verschieben sich die Signale zu den in der L_α -Phase gefundenen chemischen Verschiebungen. Oberhalb von $T = 65^\circ\text{C}$ zeigen die Spektren, dass sich alle Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase befinden, da keine weitere Verschiebung der Signale mehr stattfindet. Mit Hilfe dieser Spektren lässt sich erneut die Phasenseparation innerhalb der Probe bei Temperaturen oberhalb der Lipidphasenumwandlung erkennen. Erst oberhalb des letzten DSC-Umwandlungssignals (III, s. Abb. 5.5(b)) befinden sich alle Lipidmoleküle in der L_α -Phase und es existiert sehr wahrscheinlich eine homogene Mischphase aus DPPC und C12/12.

Natürlich beinhalten die erwähnten Bereiche auch Signale der C12/12-Moleküle; besonders das Signal der Kohlenstoffe C_4 - C_{11} der Alkylketten, unter dem auch die Kettensignale des C12/12 liegen. In der 4:1-Mischung macht dieser Anteil etwa 20% des Signals aus. Der Anteil an Alkylketten, welcher sich bei $T = 50^\circ\text{C}$ noch in der Gelphase befindet, ist jedoch wesentlich größer und muss daher vornehmlich Lipidalkylketten beinhalten. Es kann somit auch auf Basis der temperaturabhängigen Kohlenstoffspektren angenommen werden, dass die Mischung aus DPPC und C12/12 für Temperaturen unterhalb von 70°C phasensepariert vorliegt und sich erst oberhalb dieser Temperatur eine homogene Mischung beider Substanzen einstellt.

Da im Kohlenstoffspektrum in Abb. 5.8 auch die Signale der Kohlenstoffatome der C12/12-Phenylringe gut zu erkennen sind, ist es ebenfalls interessant, sich deren Verhalten in Abhängigkeit von der Temperatur und der Anregungsart genauer anzuschauen. Der Bereich des Spektrums, welcher die aromatischen Kohlenstoffe des C12/12 enthält, ist in Abb. 5.10 für vier verschiedene Temperaturen oberhalb der Hauptphasenumwandlung des Lipids gezeigt. Auch hier sind wiederum bei jeder Temperatur die Spektren mit CP- und Direktanregung gegenübergestellt. Dabei ist zu erkennen, dass für $T = 50^\circ\text{C}$ das CP-Spektrum größere Signale aufweist. Das heißt, dass die C12/12-Aromaten bei dieser Temperatur eine geringere Mobilität und daher eine größerer Kopplung in der Probe auf-

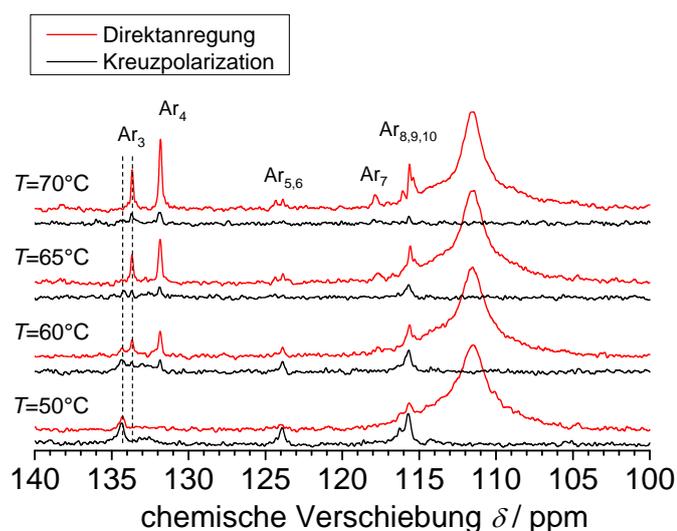


Abbildung 5.10.: Ausschnitte aus den temperaturabhängigen Kohlenstoffspektren der Mischung DPPC-C12/12 (4:1) für zwei verschiedene Anregungsarten. Dargestellt ist der Bereich der Phenytring-Resonanzen. Bei der Resonanz Ar_3 zeigt sich eine Änderung der chemischen Verschiebung mit zunehmender Temperatur um ca. 0.7 ppm (s. gestrichelte Linie).

weisen. Für steigende Temperaturen nehmen die Signalintensitäten in den CP-Spektren ab und in den DP-Spektren zu. Das zeigt die zunehmende Mobilisierung der C12/12-Ringe mit ansteigender Temperatur. Für die höchste Temperatur beinhaltet das CP-Spektrum nur noch sehr geringe Intensitäten für die Kohlenstoffe $Ar_{3,4}$ bzw. in der Region $Ar_{8,9,10}$, während die DP-Spektren vergleichsweise große und schmale Linien aufweisen. Dies zeigt, dass die Kohlenstoffatome der C12/12-Ringe bei dieser Temperatur sehr beweglich sind und daher eine entsprechend geringe Dipolkopplung besitzen. Dieses Ergebnis entspricht dem der Protonenmessungen (s. voriger Abschnitt).

Eine wesentliche Änderung im Spektrum mit zunehmender Temperatur kann am Signal Ar_3 der C12/12-Ringe ausgemacht werden. Bei einer Temperatur von 50 °C befindet sich dieses Signal bei einer chemischen Verschiebung von ca. 134.4 ppm. Nimmt die Temperatur zu, sind bei 60 °C zwei Signale erkennbar, wobei das Signal bei 134.4 ppm an Intensität verliert und ein Signal bei ca. 133.7 ppm sichtbar wird. Dieses Signal nimmt mit steigender Temperatur an Intensität zu, während das erste verschwindet. Beim Vergleich der CP- und DP-Spektren ist ersichtlich, dass diese Änderung im Spektrum ebenfalls mit einer Zunahme der Mobilität einhergeht. Es wird daraus geschlussfolgert, dass die beiden Signale die gleichen Kohlenstoffatome widerspiegeln, jedoch mit unterschiedlicher Packung. Dabei ändert sich die chemische Verschiebung eines Kernes in Abhängigkeit von seiner Position relativ zu einem aromatischen Ring [234, 237]. Diese Packungsänderung verschafft den Molekülen ebenfalls eine zunehmende Bewegungsfreiheit, wie an den ansteigenden Intensitäten im Spektrum zu erkennen ist (s. Abb. 5.10). Wie oben erläutert, ist anzunehmen, dass an den verschiedenen DSC-Umwandlungen Lipide unterschiedlicher Domänen ihren Phasenübergang besitzen und mobil werden. Basierend darauf und wegen der ^{13}C -Spektren legt dies die Vermutung nahe, dass die Lipide und die C12/12-Moleküle nicht unabhängig voneinander mobil werden und es nicht nur reine Lipid- oder C12/12-Domänen gibt. Das Mobilwerden der Moleküle steht in Verbindung mit zunehmender Bewegungsfreiheit, was im Fall der C12/12-Ringe zu einer Änderung der Packung und damit der Konformation führt. Da diese Packungsänderung im Spek-

trum der 4:1-Mischung bei einer Temperatur von ca. 60°C gefunden wird, kann dies mit dem ersten zusätzlichen Signal im DSC-Thermogramm (I) in Übereinstimmung gebracht werden. Auf Grundlage der NMR-Spektren wird dieses DSC-Signal einer Packungs- und Mobilitätsänderung der C12/12-Moleküle zugeordnet.

In den letzten beiden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von NMR-Spektren und den daraus ermittelten Integralen bzw. Änderungen der chemischen Verschiebung die Signale der DSC-Kurven einem molekularen Prozess zugeordnet werden können. Diese sind zunächst der Phasenübergang der DPPC-Moleküle, welche wahrscheinlich in lipidreichen Domänen vorliegen. Mit zunehmender Temperatur schließt sich eine Mobilitäts- und Packungsänderung der C12/12-Moleküle an (DSC-Signal I). Das Signal II im DSC-Thermogramm wird dem Phasenübergang der Lipidmoleküle zugeordnet, die in Domänen mit C12/12 in der Gelphase stabilisiert wurden und bei dieser Temperatur ihren Phasenübergang besitzen. Mit dem letzten Übergang (III) wird eine homogene Mischphase ohne makroskopische Phasenseparation erhalten, d.h. die Überstruktur in der Probe geht verloren. Dass die zusätzlichen DSC-Signale bei den beiden untersuchten Mischungen um ca. 5 K verschoben sind, kann an einer unterschiedlichen Struktur und/oder Größe der makroskopischen Domänen in den beiden Proben liegen.

Mit Hilfe der in Kapitel 3 besprochenen Experimente soll nun die Dynamik sowohl der Lipide als auch des Polyphils in der Mischung genauer charakterisiert werden.

5.2.2.3. Dynamikmessungen an den Lipid-Polyphil-Mischungen

¹³C-¹H Ordnungsparameter mittels DIPSHIFT-Experimenten Zur Untersuchung der Dynamik der Moleküle in der Mischung aus DPPC und C12/12 wurde mittels recoupled DIPSHIFT-Pulssequenz (s. Kap. 3.3) die heteronukleare, dipolare Restkopplung der einzelnen Kohlenstoffatome im Lipid sowie im C12/12 bestimmt. Das zu Grunde liegende Kohlenstoffspektrum mit der Zuordnung der jeweiligen Signale ist in Abb. 5.8 dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse für die Lipidmoleküle betrachtet. Um in der flüssig-kristallinen Phase der Lipidmoleküle zu messen, wurde die Probe auf 75°C geheizt, was oberhalb aller Phasenumwandlungen der DSC-Kurven liegt. Für alle vorhandenen Signale wurden die Dephasierungskurven der recoupled DIPSHIFT-Messungen mit der entsprechenden Fitfunktion angepasst (s. Abb. 5.11). Anhand dieser Kurven kann erneut die systematische Abweichung der Fitfunktion von den Messdaten für das Glycerol-*g*₃-Kohlenstoff, sowie den Anfangsbereich der Alkylketten (C₂, C₃) gefunden werden. Dies wurde bereits am reinen Lipid in Kap. 4.2.1 diskutiert. Es soll hier noch einmal erwähnt werden, dass als Grund für die Abweichung eine Verteilung von Restkopplungen angenommen wird, welche durch die Fitfunktion nicht beschrieben werden kann.

Das Signal der Lipidalkylketten in der Mischung aus DPPC und C12/12 beinhaltet auch Signale der Alkylketten der C12/12-Moleküle. Da eine Trennung dieser Signale nicht möglich ist, wurde für diese Kohlenstoffatome in der Mischung keine Restkopplung bestimmt. Es besteht die Möglichkeit, dass auch die Signale der Kohlenstoffe C₃ und C₁₅ der Lipidalkylkette sowie das Glycerol-*g*₁ Signal aus den Alkylketten der C12/12-Moleküle enthalten. Diese Intensitäten sind jedoch sehr gering im Vergleich zum Lipidsignal und die ermittelte Restkopplung ist davon scheinbar ungestört. Das kann zum Einen daran liegen, dass der Fremdbeitrag so gering ist, dass er kaum Einfluss auf das Ergebnis hat. Zum Anderen ist es wahrscheinlich, dass die Restkopplung für die entsprechenden Positionen in den Alkylketten der C12/12-Moleküle mit denen der entsprechenden Abschnitte der Lipidalkylketten vergleichbar ist und somit das Ergebnis nicht verändert wird.

Der Blick auf die Ordnungsparameter in der Mischung im Vergleich zum reinen DPPC in Abb. 5.12 zeigt keine signifikanten Änderungen in Anwesenheit der C12/12-Moleküle.

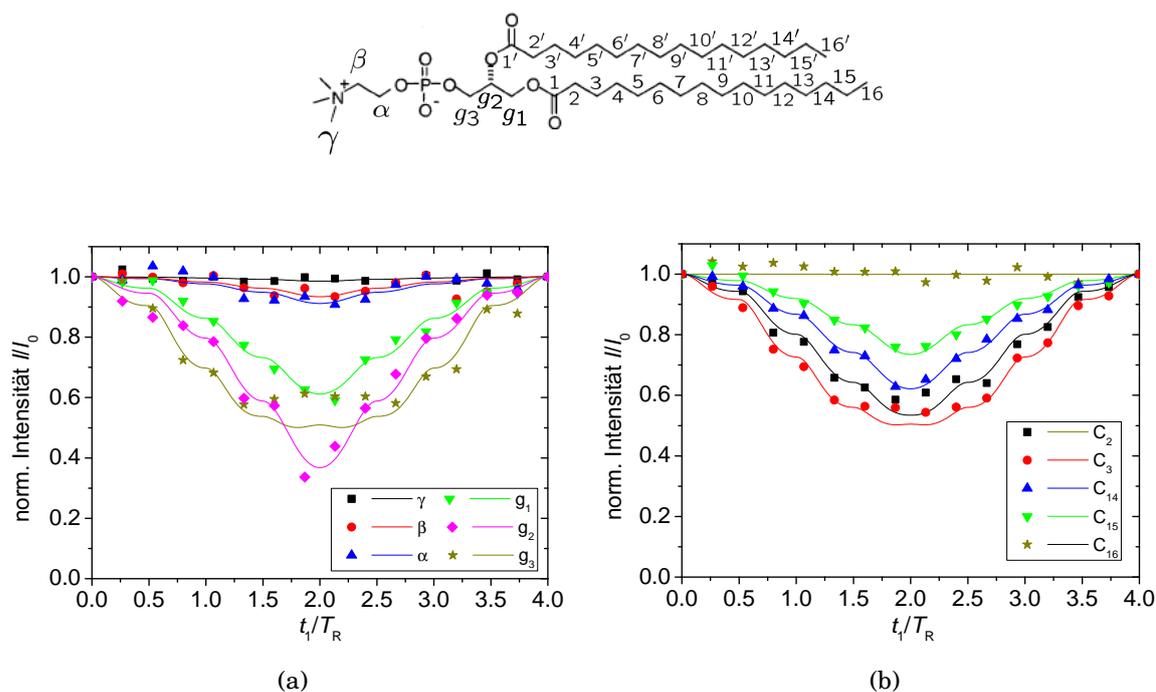


Abbildung 5.11.: Dephasierungskurven der Lipid-Kohlenstoffatome in der 4:1-Mischung aus DPPC und C12/12, (a) für die Kopfgruppe und die Glyceroleinheit, (b) für die Alkylketten ($T = 75^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$, $N = 4$). oben: Lipidmolekül mit Nomenklatur.

Die Glyceroleinheit besitzt weiterhin die größten Ordnungsparameter und damit die geringste Mobilität im Lipid. Auch der Mobilitätsgradient ausgehend von der Glyceroleinheit hin zu beiden Enden der Lipidmoleküle bleibt in der Mischung erhalten. Anhand dieser Messungen kann keine Veränderung der Geometrie der Dynamik der Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase festgestellt werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Lipidmoleküle durch den Einbau der C12/12-Moleküle ihren Bewegungsraum nicht einschränken müssen, weshalb die Anisotropie der Bewegung wahrscheinlich gleich bleibt. Die lokalen Lipidbewegungen bleiben erhalten bzw. werden durch die C12/12-Moleküle in einem Maße beeinflusst, welches mit Hilfe des recoupled DIPSHIFT-Experimentes nicht gemessen werden kann. Dass sich die Wechselwirkung von C12/12 mit den Lipidmolekülen anders äußert als es für Cholesterol der Fall ist (s. Kap. 4.2.3), kann auf die Molekülstruktur des C12/12 zurückgeführt werden. Da Cholesterol nur eine sehr kleine hydrophile Gruppe besitzt, lagert es sich vorzugsweise in den Anfangsbereich der hydrophoben Ketten einer Doppelschicht ein, genauer, in den Übergangsbereich zwischen hydrophilen Kopfgruppen und hydrophoben Alkylketten. Es ist außerdem sehr klein im Vergleich zu den Lipidmolekülen, wohingegen das C12/12-Molekül eine ausreichende Größe besitzt, um eine Lipiddoppelschicht zu durchspannen. Aufgrund seiner hydrophilen Glycerolgruppen und seinem linearen Aufbau, wird das C12/12-Molekül mutmaßlich in transmembraner Orientierung in die Lipiddoppelschicht eingebaut [238]. Es gibt daher keinen Kondensationseffekt wie beim Cholesterol einbau (s. Kap. 4.2.3). Da die Kopfgruppe der Phosphocholine das größte Volumen im Vergleich zum Rest des Moleküls einnimmt [227, 239], besitzen die Alkylketten auch im reinen Lipid schon eine bestimmte Bewegungsfreiheit. Werden die C12/12-Moleküle zwischen die Lipidmoleküle eingebaut, ändert sich der Platzbedarf der Lipidmoleküle nicht. Ihr Bewegungsfreiraum bleibt erhalten, was zu unveränderter Anisotropie und daher unveränderten dipolaren Restkopplungen führt. Mit Hilfe von Neutronenstreuexperimenten konnte gezeigt wer-

C-Atom	S_{CH}
γ	0.01 ± 0.01
β	0.04 ± 0.01
α	0.05 ± 0.01
g_3	0.20 ± 0.02
g_2	0.19 ± 0.01
g_1	(0.12 ± 0.01)
C_2	0.15 ± 0.01
C_3	(0.19 ± 0.02)
C_4-C_{13}	-
C_{14}	0.12 ± 0.01
C_{15}	(0.09 ± 0.01)
C_{16}	0.01 ± 0.01

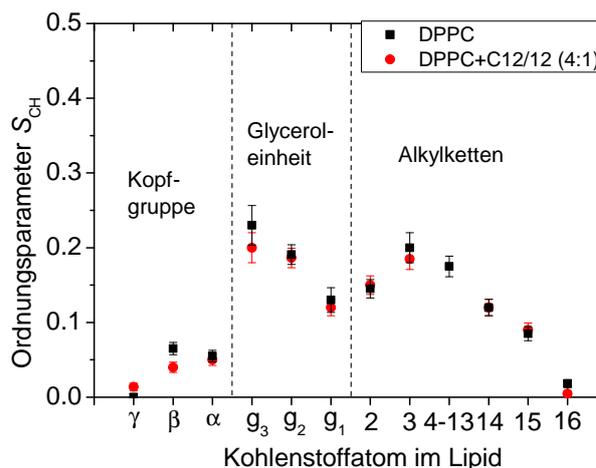


Abbildung 5.12.: Ordnungsparameter S_{CH} der Lipidmoleküle in der DPPC-C12/12-Mischung (4:1), sowie deren Darstellung im Vergleich zum reinen DPPC ($T = 75^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$). Die in Klammern angegebenen Werte könnten durch Resonanzen der C12/12-Moleküle beeinflusst sein.

den, dass die schnellen, lokalen Lipidbewegungen nur dann von Additiven beeinflusst werden, wenn sie eine Änderung in der Packungsdichte der Lipidmoleküle verursachen, wie dies z.B. beim Einbau von Cholesterin der Fall ist [240]. Auch NMR-Untersuchungen an Doppelschichten mit gebundenem Protein [69] und Simulationen zum Einfluss anderer Additive [241] zeigten, dass sich die Ordnungsparameter der Lipidketten trotz Einbau der Gastmoleküle nicht signifikant ändern müssen. In anderen Untersuchungen wurden dagegen reduzierte Ordnungsparameter gemessen, was auf eine vergrößerte Unordnung in den Lipidmolekülen hinweist [79, 242]. Für die Wechselwirkung der C12/12-Moleküle in der Membran ist vorstellbar, dass sich die C12/12-Moleküle zwischen die Lipidmoleküle legen und somit die Packungsdichte der Lipide nicht vergrößert wird. Deshalb ändert sich die lokale Dynamik der Lipidmoleküle in der Mischung im Vergleich zum Reinlipid nicht. Eine andere Erklärung ist, dass die schnellen Lipidbewegungen unabhängig von der Organisation der Lipide in der Membran sind. So wurde sowohl für verschiedene Morphologien von Membranen [165, 243] als auch für die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen [178, 244–246] oder anderen Fremdmolekülen [247] gezeigt werden, dass die schnelle Lipiddynamik nicht von der molekularen Ordnung bzw. Unordnung im System abhängt, d.h., dass Ordnung und Dynamik nicht immer korreliert sind. Die gemessenen Ordnungsparameter sind stets Mittelwerte, welche sich auch dann nicht ändern, wenn sich die individuellen Restkopplungen gegenläufig verändern. Werden einige Restkopplungen im System durch den Einbau von und die Wechselwirkung mit Fremdmolekülen größer, kann es sein, dass andere kleiner werden [244]. Im Mittel jedoch bleibt die Restkopplung und somit der Ordnungsparameter im System unverändert. Das gleiche Bild würde sich ergeben, wenn es einen schnellen Austausch zwischen wechselwirkenden und nicht-wechselwirkenden Lipiden gebe. Auch dann würde im Mittel eine unveränderte Lipiddynamik gemessen werden [245].

Für die 10:1-Mischung existiert keine Messung der heteronuklearen, dipolaren Restkopplung im Lipid. Es kann aber angenommen werden, dass eine niedrigere Konzentration an C12/12 in der Lipiddoppelschicht den gleichen Effekt hat wie in der 4:1-Mischung, so dass auch hier die lokale Lipiddynamik in der flüssig-kristallinen unverändert ist.

Da die Signale der C12/12-Moleküle in der 4:1-Mischung mit DPPC ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis besitzen, war es möglich mittels DIPSHIFT- und recou-

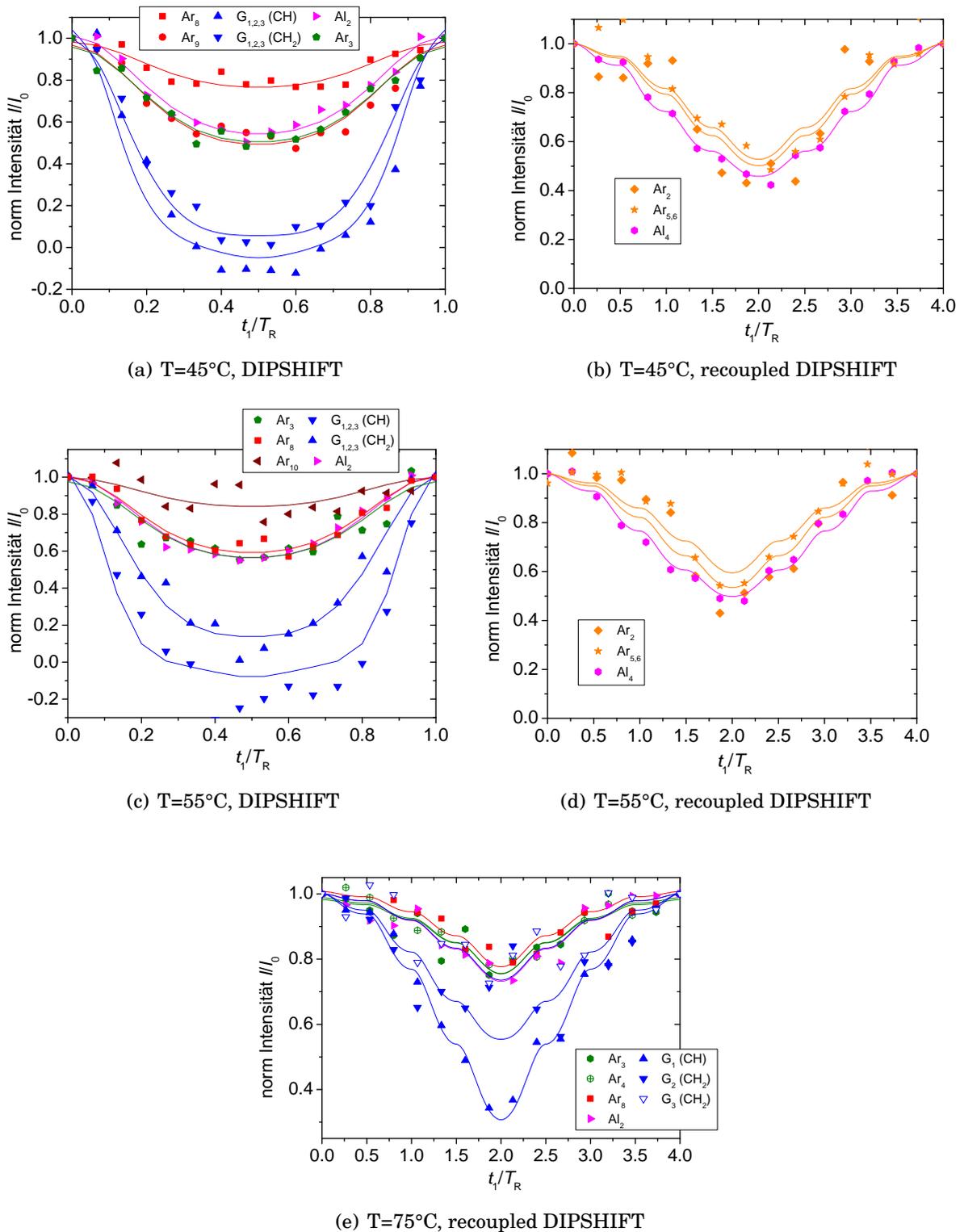


Abbildung 5.13.: Dephasierungskurven für die Kohlenstoffatome im C12/12-Molekül für die verschiedenen Messtemperaturen und Experimente wie angegeben ($\nu_R = 5 \text{ kHz}$, $N = 4$, $t_{CP} = 1.5 \text{ ms}$).

pled DIPSHIFT-Pulssequenz ebenfalls die Ordnungsparameter der Kohlenstoffatome der C12/12-Moleküle in der Mischung zu ermitteln. Diese Ordnungsparameter wurden bei drei verschiedenen Temperaturen bestimmt (s. Abb. 5.14). Für die Temperaturen $T = 45^\circ\text{C}$ und $T = 55^\circ\text{C}$ wurden die Restkopplungen jeweils mit beiden Pulssequenzen (DIPSHIFT und recoupled DIPSHIFT) gemessen. Dabei wurden die Kohlenstoffatome für die höchste Temperatur direkt und für die beiden tieferen Temperaturen mittels Kreuzpolarisation angeregt. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei der höchsten Temperatur die gesamte Probe betrachtet wird, da die Protonenintegrale in Abb. 5.7 eine vollständige Mobilisierung der C12/12-Moleküle belegen (s. vorn). Für die beiden tieferen Temperaturen zeigen die Protonenintegrale fast keine Intensität, so dass auch hier angenommen werden kann, dass alle C12/12-Moleküle unbeweglich und somit in den Dynamikmessungen vollständig repräsentiert sind. Auch an dieser Probe zeigt sich, dass in beiden Experimenten die verschiedenen Gruppen unterschiedlich gut untersucht werden können. Es wurde deshalb jene Kopplung als Ergebnis gewählt, bei welcher die Dephasierungskurve am Besten durch die Fitfunktion beschrieben werden konnte. Verallgemeinert kann gesagt werden, dass die geringeren Kopplungen mit Werten kleiner als $\approx 5\text{kHz}$ besser von der Wiedereinkopplungssequenz erfasst werden konnten. Demgegenüber waren die größeren Kopplungen besser mit dem DIPSHIFT-Experiment messbar. Demzufolge sind die Dephasierungskurven für die C12/12-Kohlenstoffe in der Mischung anhand der Datenqualität und bester Übereinstimmung zwischen Messung und Anpassung ausgewählt worden und in Abb. 5.13 dargestellt. Darin sind die bei den verschiedenen Messtemperaturen erhaltenen Dephasierungskurven aus den DIPSHIFT- bzw. recoupled DIPSHIFT-Experimenten, sowie die jeweils angepasste Fitfunktion aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass bei einigen Kurven die Datenpunkte sehr stark streuen. Dies ist dem eher schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis für diese Signale geschuldet, da in der Probe ca. dreimal weniger C12/12 vorhanden ist als DPPC. Es ist zu erwähnen, dass für die Glycerolgruppen des C12/12 in den Spektren der Mischung zwei Signale bei den tieferen Messtemperaturen gefunden werden, während bei der höchsten Temperatur drei Signale vorhanden sind. Dies wird auf Grundlage der Fitkurven so interpretiert, dass bei zwei Signalen eines zu den CH-Gruppen und eines zu den CH₂-Gruppen gehört, da die Kurvenanpassungen sonst unlogische Werte (größer als die statische Kopplung) für die Restkopplungen ergaben. Für die höchste Temperatur wird davon ausgegangen, dass sich das Signal der verschiedenen CH₂-Gruppen aufspaltet und deshalb drei Signale unterschieden werden können. Aufgrund dieser Unsicherheit sind diese ermittelten Restkopplungen mit einem vergleichsweise großem Fehler behaftet. Die aus den erhaltenen dipolaren Restkopplungen berechneten Ordnungsparameter sind in Tabelle 5.2 angegeben. Dabei ist ebenfalls vermerkt, mit welchem der beiden Experimente die Restkopplung bestimmt wurde. Eine zusammenfassende Darstellung der berechneten Ordnungsparameter für die Kohlenstoffatome des C12/12-Moleküls ist in Abb. 5.14 gegeben. Die Ordnungsparameter wurden in der Mischung für zwei Temperaturen ermittelt, bei denen das System phasensepariert ist ($T = 45^\circ\text{C}$, $T = 55^\circ\text{C}$) und oberhalb aller Phasenübergänge bei $T = 75^\circ\text{C}$, wo Mischbarkeit angenommen wird. Weiterhin sind zum Vergleich in Abb. 5.14 auch die Ordnungsparameter der reinen C12/12-Probe bei $T = 90^\circ\text{C}$ aufgetragen. Die für das reine C12/12 ermittelten Ordnungsparameter weisen daraufhin, dass die Aromatenringe 180°-Zweiplatz-Sprünge um die Moleküllängsachse ausführen und die Seitenketten auch im kristallinen Zustand eine hohe Mobilität aufweisen (s. Kap. 5.1). Da sich die Daten bei $T = 45^\circ\text{C}$ und $T = 55^\circ\text{C}$ nicht signifikant voneinander und vom reinen C12/12 unterscheiden, kann angenommen werden, dass die C12/12-Moleküle bei diesen beiden Temperaturen in etwa die gleiche Dynamik wie reines C12/12 besitzen. Dies ist

Tabelle 5.2.: Ordnungsparameter S_{CH} für die Kohlenstoffatome im C12/12-Molekül gemessen mittels DIPSHIFT-Experiment (D) bzw. recoupled DIPSHIFT-Experiment (rD) für die verschiedenen Messtemperaturen ($\nu_{\text{R}} = 5 \text{ kHz}$).

C-Atom	S_{CH}		
	$T = 45^\circ\text{C}$	$T = 55^\circ\text{C}$	$T = 75^\circ\text{C}$
Ar ₂	1.00±0.17 (rD)	0.90±0.13 (rD)	-
Ar _{3,(4)}	0.59±0.10 (D)	0.55±0.03 (D)	0.10±0.01 (rD)
Ar _{5,6}	0.93±0.13 (rD)	0.80±0.10(rD)	-
Ar ₈	0.38±0.03 (D)	0.54±0.03 (D)	0.10±0.01 (rD)
Ar ₉	0.61±0.04 (D)	0.54±0.03 (D)	-
G(CH)	1.03± 0.14 (D)	0.92±0.13 (D)	0.16±0.02 (rD)
G(CH ₂)	1.01±0.10 (D)	1.18±0.16 (D)	0.14±0.02 (rD)
G(CH ₂)	-	-	0.09±0.01 (rD)
Al ₂	0.46±0.3 (D)	0.45±0.03 (D)	0.09±0.01 (rD)
Al ₄	0.14±0.01 (rD)	0.14±0.01 (rD)	-

plausibel, da mit Hilfe der Kohlenstoffspektren bereits gezeigt wurde, dass eine Änderung der Mobilität und Packung im C12/12 erst ab einer Temperatur von ca. $T = 60^\circ\text{C}$ stattfindet (s. oben).

Beim genaueren Betrachten der einzelnen molekularen Abschnitte im C12/12 ist für die beiden tiefen Temperaturen kein großer Unterschied der Ordnungsparameter zwischen reinem C12/12 und dem C12/12 in der Mischung mit dem Lipid vorhanden. Dies zeigen auch die quartären Kohlenstoffe ohne direkt gebundene Protonen. Sowohl im reinen C12/12 als auch in der Mischung bei den beiden tieferen Temperaturen weisen diese einen Ordnungsparameter von $S_{\text{CH}} \approx 1$ auf. Dass die Daten für die quartären Kohlenstoffe der Ringe eine starke Streuung aufweisen ist damit zu begründen, dass diese keine direkt gebundenen Protonen besitzen. Sie spüren jedoch die entfernteren Protonen, die am selben Ring gebunden sind und zeigen daher eine messbare heteronukleare, dipolare Restkopplung. Des Weiteren ist in der Fehlerbetrachtung das vergleichsweise schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis der quartären Kohlenstoffe einzubeziehen, ebenso wie sich verändernde Atomabstände, welche durch Molekülschwingungen hervorgerufen werden. Der Ordnungsparameter für die Kohlenstoffe der Ringe mit direkt gebundenem Proton beträgt $S_{\text{CH}} \approx 0.5$. Für die C12/12-Moleküle in der Mischung zeigt dies, dass zusätzlich zu dem 180° -Zweiplatz-Sprung der Aromatenringe um die Längsachse des Moleküls eine weitere anisotrope Bewegung der Moleküle angenommen werden muss. Diese Bewegung kann in der Mischung im Vergleich zum reinen C12/12 stattfinden, da die Moleküle im Lipid weniger dicht gepackt sind als im Kristall und daher Freiraum für Taumelbewegungen o.ä. besitzen. Auch hier kann durch ein geeignetes Modell die Amplitude der Bewegung ermittelt werden. Für eine Taumelbewegung kann eine Diffusion in oder auf einem Kreiskegel zu Grunde gelegt werden (s. Kap. 2.3.2.2). Damit ergibt sich aus den Ordnungsparametern ein Winkel von $\alpha = 20 - 35^\circ$ zur Bewegungsachse. Für die Kohlenstoffe der Glycerolgruppen und der OCH₂-Gruppe beträgt der Ordnungsparameter in der Mischung bei den beiden tiefen Temperaturen und im reinen C12/12 ungefähr eins, so dass diese Gruppen auch in der Mischung eher unbeweglich sind. Auch die Alkylketten des C12/12 zeigen in der Mischung bei den beiden tiefen Temperaturen eine vergleichbare Mobilität wie in der reinen Probe. Wegen der vielen Signalüberlagerungen in diesem Bereich, konnte nur eines der Alkylkettensignale ausgewertet werden.

Für $T = 75^\circ\text{C}$ befinden sich alle Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase, was dazu führt, dass auch die C12/12-Moleküle an Beweglichkeit gewinnen und sich dies

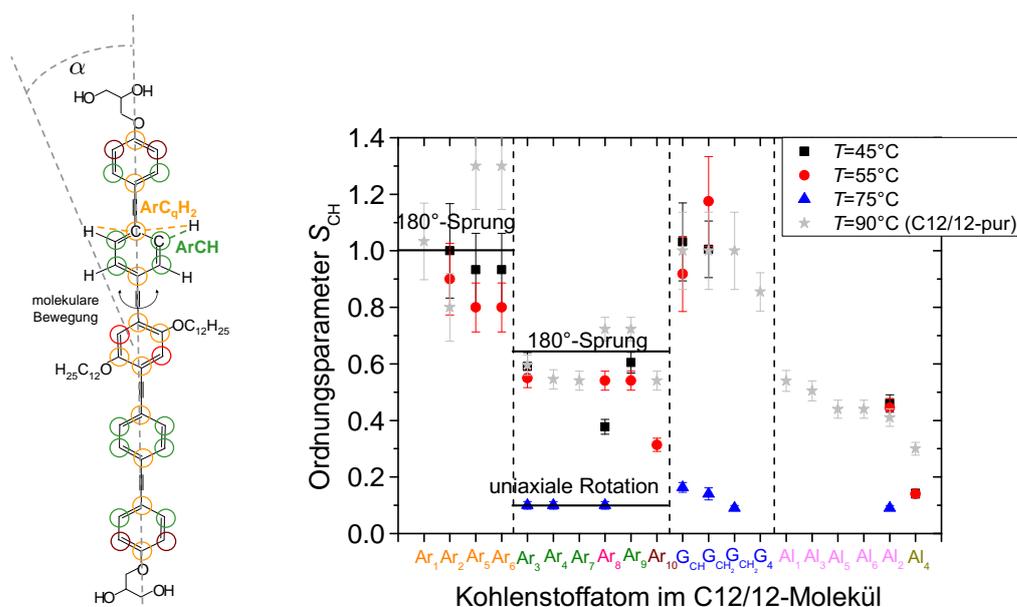


Abbildung 5.14.: links: C12/12-Molekül mit Zuordnung der jeweiligen Aromaten-Kohlenstoffe und der molekularen Bewegungsachse.

rechts: Ordnungsparameter für C12/12-Kohlenstoffatome in der 4:1-Mischung für drei verschiedene Temperaturen, sowie die Ordnungsparameter in reinem C12/12. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Werten für die Ordnungsparameter bei Annahme des angegebenen Bewegungsmodells.

in einer starken Reduzierung des Ordnungsparameters äußert (s. Abb. 5.14). Für alle auswertbaren Kohlenstoff-Signale des C12/12 ergeben sich Ordnungsparameter von $S_{CH} \approx 0.1 - 0.2$, welche belegen, dass die C12/12-Moleküle in der Mischung oberhalb aller Phasenumwandlungen vermutlich eine uniaxiale Rotation um ihre Längsachse ausführen. Es wurde für die niedrigeren Temperaturen angenommen, dass die Moleküle zusätzlich zum Zweiplatz-Sprung noch eine Taumel- oder Wackelbewegung ausführen, die den Ordnungsparameter reduziert. Die Änderung des Ordnungsparameters aufgrund dieser Bewegung liegt jedoch bei dieser Temperatur innerhalb des Fehlerintervalls, so dass angenommen werden kann, dass diese Taumelbewegung auch oberhalb der letzten Phasenumwandlung noch vorhanden ist und die Amplitude dieser Bewegung sich nicht signifikant ändert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die lokale Lipiddynamik in der flüssig-kristallinen Phase von der Anwesenheit der C12/12-Moleküle unbeeinflusst ist. Dies deutet darauf hin, dass die Packungsdichte der Lipidmoleküle in der Membran durch den Einbau des C12/12 nicht messbar verändert wird. Es existiert oberhalb der Lipidphasenumwandlung eine komplexe Phasenseparation, welche erst ab einer Temperatur von ca. 70 °C durch Auflösen der makroskopischen Überstruktur verloren geht. Im Temperaturbereich der Phasenseparation zeigen die C12/12-Moleküle eine zum reinen Kristall vergleichbare Dynamik. D.h., die Aromatenringe führen 180°-Zweiplatz-Sprünge um die Moleküllängsachse und vermutlich eine weitere, kleinwinklige Wackelbewegung aus. Erst oberhalb aller Phasenumwandlungen besitzen die C12/12-Moleküle genügend Bewegungsfreiraum, um schnelle uniaxiale Rotationen um ihre Längsachse auszuführen.

^1H - ^1H Ordnungsparameter aus DQ-Seitenbandenspektren Im Protonenspektrum (s. Abb. 5.6(a)) sind die Signale der Aromatenringe des C12/12 gut messbar. Um für diese Protonen die zugehörigen homonuklearen, dipolaren Restkopplungen zu ermitteln, können

Doppelquanten-Seitenbandenmuster aufgenommen werden (s. Kap. 3.4.3). Aus den Restkopplungen werden anschließend Ordnungsparameter berechnet, die etwas über die Anisotropie der Bewegung der Moleküle aussagen. Dabei ist zu bemerken, dass unterhalb einer Temperatur von 65°C die Protonensignale der C12/12-Aromaten aufgrund der fehlenden Mobilität zu breit bzw. zu klein sind. Die Intensität war so gering, dass die Seitenbandenmuster erst ab $T = 65^\circ\text{C}$ aufgenommen werden konnten. Für die beiden Konzentrationen aus DPPC und C12/12 waren die DQ-Seitenbandenspektren für zwei der drei Aromatensignale auswertbar. Exemplarisch sind die gemessenen Seitenbandenmuster für die 4:1-Mischung in Abb. 5.15 und für die 10:1-Mischung in Abb. 5.16 für zwei Messtemperaturen dargestellt. Für die Auswertung dieser Spektren ist es notwendig, die einzelnen Seitenbanden zu integrieren und die Intensitäten in Abhängigkeit der Seitenbandenordnung analytisch zu beschreiben. Dass diese Intensität von der zu Grunde liegenden dipolaren Restkopplung abhängt, wurde in Kap. 3.4.3 erläutert. Da die Intensitätsverteilung symmetrisch sein sollte, wurden für die beiden Intensitäten der jeweiligen Seitenbandenordnung der Mittelwert gebildet. Die Abweichung zum Messwert wurden dabei als Fehlerabschätzung deklariert. Unter Einbeziehung dieser Fehler wurden die Seitenbandenspektren anschließend mit Hilfe von Gl. (3.15) ausgewertet. Dabei wurde für die dipolare Restkopplung eine Gauß-Verteilung angenommen [150], so dass das Ergebnis der Datenanpassung immer eine mittlere, homonukleare Restkopplung $D_{\text{res}}/2\pi$ und eine Verteilungsbreite $\sigma/2\pi$ um den Mittelwert liefert. Die Annahme einer Verteilung, verursacht durch sich ändernde Abstände und/oder unterschiedlichen Bewegungsmittlungen, ist besonders in amorphen und ungeordneten Systemen berechtigt [248]. Weiterhin ist zu bemerken, dass gerade bei Systemen mit großer Verteilungsbreite die erste Seitenbandenordnung in den Spektren überrepräsentiert ist [136, 248]. Das bedeutet, dass die dipolare Kopplung in diesen Systemen unterschätzt werden würde. Daher wurde die erste Seitenbandenordnung nicht mit in die Datenanpassung einbezogen.

In den einzelnen Seitenbandenspektren sind in beiden Mischungen zusätzlich zu den Seitenbanden ungerader Ordnung auch Seitenbanden gerader Ordnung sichtbar. Besonders deutlich sind diese bei den äußeren Ringprotonen für die 4:1-Mischung bei $T = 75^\circ\text{C}$ zu sehen (s. Abb. 5.15(d)). Diese Signale sind ein Indiz dafür, dass auch Kopplungen zu anderen Protonen einen Einfluss haben (s. Kap. 3.4.3). Dennoch ist die Intensität dieser Signale klein und sie können von den Seitenbanden ungerader Ordnung unterschieden werden, so dass sie das Ergebnis praktisch nicht beeinflussen. Auch die sich an den (linken) Flanken der Seitenbanden leicht abzeichnenden, kleinen Signale stellen zusätzliche Kopplungen dar. Bei der Auswertung der Daten wurden diese Signale nicht mit integriert, um deren Einfluss zu minimieren. Da diese aber vornehmlich an den Seitenbanden erster Ordnung vorhanden sind, und diese nicht in die Datenanpassungen einbezogen wurden, wirkt sich die zusätzliche Kopplung nicht auf das Ergebnis aus. Die bestimmten mittleren Restkopplungen, sowie die zugehörigen Verteilungsbreiten sind in Tabelle 5.3 zusammengestellt. Die errechneten Ordnungsparameter für verschiedene Messtemperaturen sind in Abb. 5.17 für die untersuchten Mischungen aus DPPC und C12/12 dargestellt. Zur Berechnung des Ordnungsparameters wurde als Referenzkopplung der Wert $D_{\text{res}} \approx (8300 \pm 400)\text{Hz}$ verwendet. Dieser Wert entspricht einem Abstand der koppelnden Protonen von $\approx 2.44\text{\AA}$, wobei dieser einen Mittelwert aus einem aus der Geometrie abgeschätzten Wert von 2.4\AA und dem Wert 2.47\AA entspricht [234]. Die Ordnungsparameter für die zwei betrachteten Protonengruppen betragen für die 4:1-Mischung $S_{\text{HH}} \approx 0.8$. Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen der Verteilungsbreite für den Ordnungsparameter, welche sich aus der Verteilungsbreite der Restkopplungen ergibt. Die ermittelte Verteilung ist für alle Temperaturen relativ groß, so dass davon

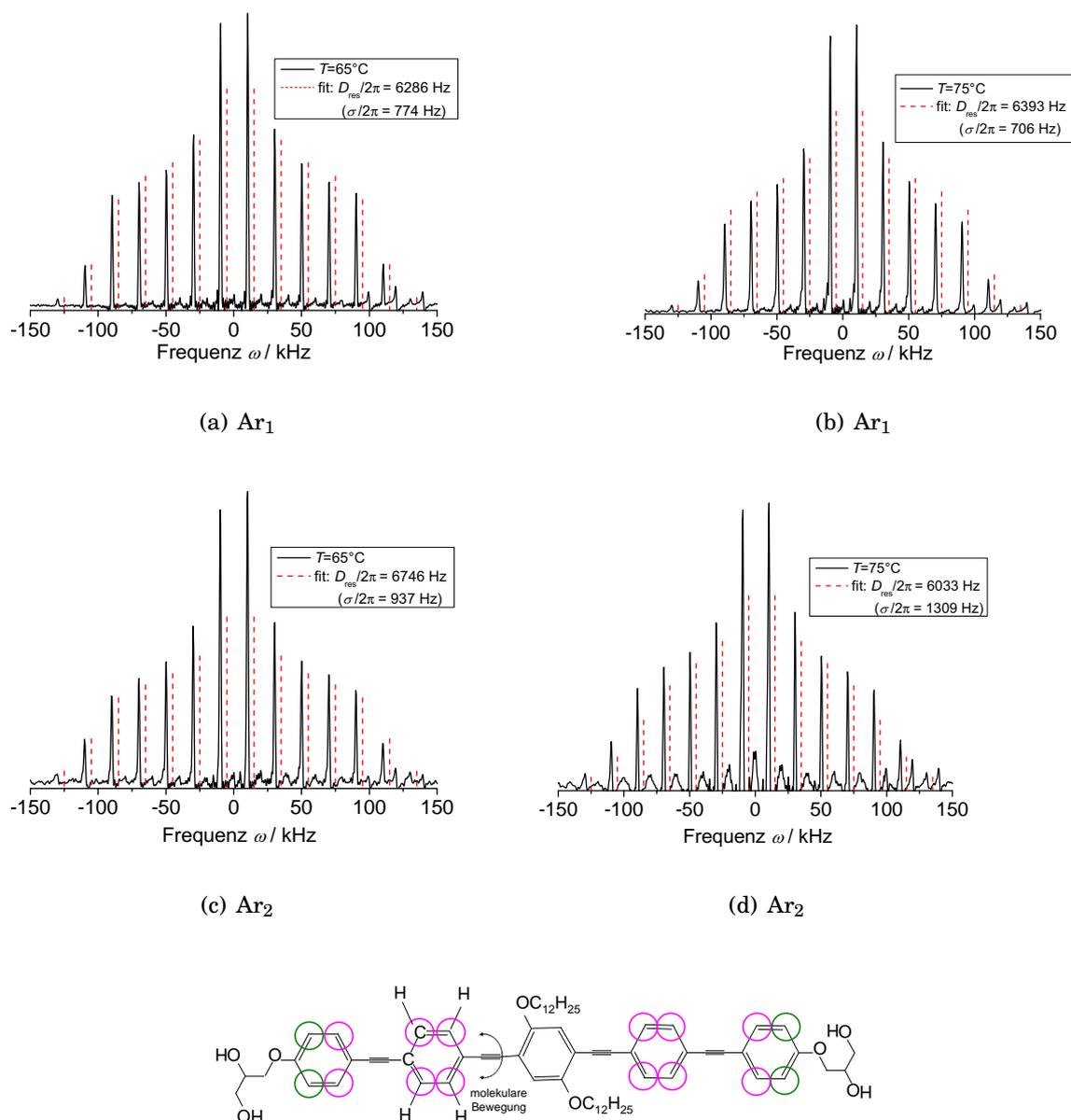


Abbildung 5.15.: ^1H -DQ-Seitenbandenmuster für (a), (c) die inneren Protonen der Phenylringe (Ar_2 , in der Molekülstruktur pink markiert) sowie (b), (d) die äußeren Protonen der äußeren Ringe (Ar_2 , in der Molekülstruktur grün markiert) in der 4:1-Mischung (DPPC+C12/12) bei $T = 65^\circ\text{C}$ bzw. $T = 75^\circ\text{C}$ ($\nu_R = 10\text{ kHz}$). Die aus der Datenanpassung ermittelten Restkopplungen $D_{\text{res}}/2\pi$, sowie die Verteilungsbreiten $\sigma/2\pi$ sind ebenfalls mit angegeben.
unten: Molekülstruktur des C12/12 mit den Markierungen für die Protonen der Phenylringe.

ausgegangen werden kann, dass das Probensystem trotz Mischbarkeit oberhalb von 65°C nicht vollständig homogen ist, sondern Bereiche mit geringerer und solche mit größerer Anisotropie vorliegen. Weiter ist zu bemerken, dass der Ordnungsparameter für die Protonen der mittleren Ringe nahezu konstant über den gemessenen Temperaturbereich ist. Die Werte für den Ordnungsparameter der zweiten Protonengruppe (Ar_2 , grüne Markierung in der Molekülstruktur in Abb. 5.17) streuen etwas mehr und zeigen einen leichten Abfall mit steigender Temperatur. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die 10:1-Mischung. Insgesamt liegen die Ordnungsparameter in dieser Mischung niedriger, zwischen 0.6 und 0.7, als im Vergleich zur 4:1-Mischung und die Verteilungsbreite ist etwas größer. Die

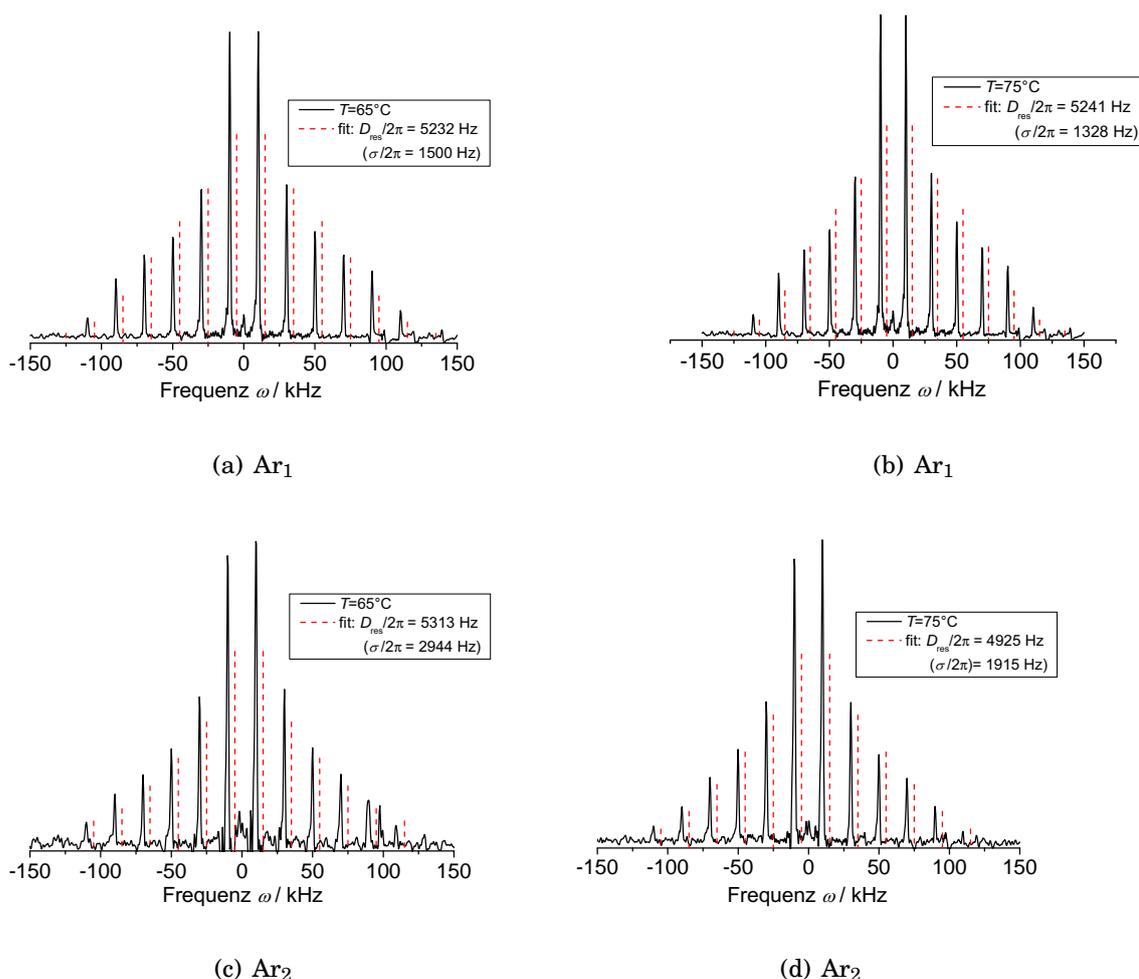


Abbildung 5.16.: ^1H -DQ-Seitenbandenmuster für (a), (c) die inneren Protonen der Phenylringe (Ar_1 , in der Molekülstruktur pink markiert) sowie (b), (d) die äußeren Protonen der äußeren Ringe (Ar_2 , in der Molekülstruktur grün markiert) in der 10:1-Mischung (DPPC+C12/12) bei $T = 65^\circ\text{C}$ bzw. $T = 75^\circ\text{C}$ ($\nu_{\text{R}} = 10\text{kHz}$). Die aus der Datenanpassung ermittelten Restkopplungen $D_{\text{res}}/2\pi$, sowie die Verteilungsbreiten $\sigma/2\pi$ sind ebenfalls angegeben. (Daten gemessen von Ruth Bärenwald.)

Auswertung dieser Daten hängt stark vom gewählten Integrationsbereich des jeweiligen Signals im Spektrum ab, wobei davon hauptsächlich die Verteilungsbreite der Kopplungen betroffen ist. Ein Ordnungsparameter $S_{\text{HH}} < 1$ kann mit Hilfe einer anisotropen Bewegung der C12/12-Moleküle in der Membran erklärt werden. Diese Bewegungen können mit verschiedenen Modellen beschrieben werden (s. Kap. 2.3.2.2). Da die Orientierung des dipolaren Kopplungstensors parallel zur Bewegungsachse ist (ArHH, s. Abb. 5.17), kann diese stellvertretend für die Molekülorientierung in Bezug auf die Membrannormale herangezogen werden. Dabei ist zu beachten, dass die aus den Ordnungsparametern der Kohlenstoffatome geschlussfolgerte Bewegung (180° -Sprung oder uniaxiale Rotation um die Moleküllängsachse) den Tensor der homonuklearen Kopplung in diesem Fall unverändert lässt, d.h. der Ordnungsparameter wäre eins. Der gemessene, reduzierte Ordnungsparameter der Protonen belegt daher eine weitere anisotrope Bewegung. Je nach Bewegungsmodell kann hier ein mittlerer Winkel von $\alpha = 20 - 30^\circ$ gegen die Membrannormale als Orientierung für die C12/12-Moleküle angegeben werden. Innerhalb dieses Winkelbereichs führen die Moleküle in der Membran ihre anisotrope Bewegung zusätzlich zur uniaxialen Rotation aus. Der Winkel ist dabei in der 10:1-Mischung offenbar etwas

Tabelle 5.3.: Aus den DQ-Seitenbandenspektren erhaltene temperaturabhängige, homonukleare, dipolare Restkopplungsstärken $D_{\text{res}}/2\pi$ für die ausgewerteten Protonensignale (Ar_1 und Ar_2) in (a) der 4:1-Mischung und (b) der 10:1-Mischung aus DPPC und C12/12 ($\nu_R = 10\text{kHz}$). Die Verteilungsbreite $\sigma/2\pi$ bei Annahme einer Gauß-Verteilung ist ebenfalls angegeben.

(a)				
4:1	Ar_1		Ar_2	
	$D_{\text{res}}/2\pi$ / Hz	$\sigma/2\pi$ / Hz	$D_{\text{res}}/2\pi$ / Hz	$\sigma/2\pi$ / Hz
65 °C	6286	774	6746	937
70 °C	6601	632	6800	814
75 °C	6393	706	6033	1309
80 °C	6222	785	6411	1341

(b)				
10:1	Ar_1		Ar_2	
	$D_{\text{res}}/2\pi$ / Hz	$\sigma/2\pi$ / Hz	$D_{\text{res}}/2\pi$ / Hz	$\sigma/2\pi$ / Hz
65 °C	5232	1500	5313	2944
70 °C	5869	1141	4514	2206
75 °C	5241	1328	4925	1915

größer als in der 4:1-Mischung, was auf einen unterschiedlich großen Bewegungsfreiraum schließen lässt. Anhand der Ordnungsparameter kann die Amplitude der Bewegung der C12/12-Moleküle in der 10:1-Mischung zu $\alpha = 35 - 45^\circ$ bestimmt werden (s. Kap. 2.3.2.2). Befindet sich weniger C12/12 in der Membran, sind die Moleküle durch ihre Umgebung weniger eingeschränkt. Dies deutet aber auch darauf hin, dass die C12/12-Moleküle nicht den Platzbedarf der Lipidmoleküle beeinflussen, sondern nur ihren eigenen. Darüber hinaus existiert zwar oberhalb aller Phasenumwandlungen eine homogene Mischphase, es können jedoch immer noch Bereiche mit mehr C12/12 und Bereiche mit mehr Lipid vorliegen, welche sich vermutlich in beiden Mischungen unterscheiden.

5.3 | C12/12 in der Modellmembran DOPC

5.3.1 | Vorbetrachtungen

Das amphiphile Molekül C12/12 wurde ebenfalls in einer Mischung mit DOPC untersucht, welches im Vergleich zu DPPC längere Alkylketten mit je einer Doppelbindung zwischen dem neunten und zehnten Kohlenstoffatom besitzt (s. Tab. 4.1). Das molare Verhältnis der beiden Substanzen betrug für diese Probe 10:1 (Lipid:C12/12). Aufgrund der Doppelbindungen in den Ketten liegt die Temperatur der Hauptphasenumwandlung des DOPC bei $T_m \approx -20^\circ\text{C}$. Für die Mischung aus DOPC und C12/12 konnten in DSC-Messungen keine Phasenübergänge detektiert werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Hauptphasenumwandlung bei so niedriger Temperatur stattfindet, dass sie mit Hilfe von DSC nicht gemessen werden kann. Dies ist erst für Temperaturen oberhalb von ca. 0°C möglich, da dann das Wasser in der Probe nicht mehr gefriert. Es wurden dennoch für positive Temperaturen im DSC keine Phasenumwandlungen für die DOPC-C12/12-Mischung gefunden [249]. Daher wird davon ausgegangen, dass dieses System bereits homogen, ohne (makroskopische) Phasenseparation, vorliegt. Diese Annahme konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie an großen unilamellaren Vesikeln (GUV) unterstützt werden (s. Abb. 5.18). Da das C12/12 eine Eigenfluoreszenz besitzt, ist eine Markierung nicht notwendig. Das DOPC hingegen ist mit einem rotem Farbstoff markiert. In den

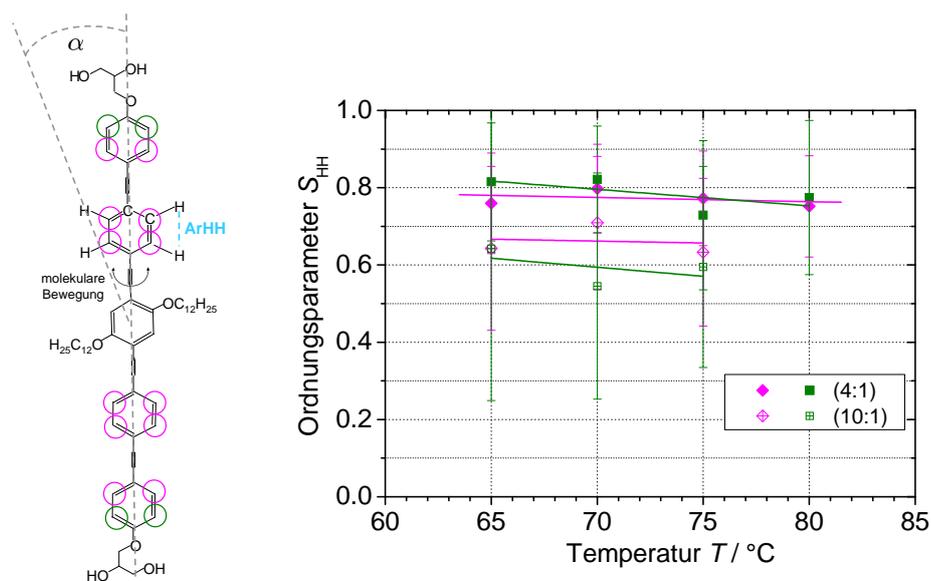


Abbildung 5.17.: Ordnungsparameter S_{HH} für die in der Strukturformel markierten Protonengruppen der Aromatenringe in den beiden untersuchten Mischungen aus DPPC und C12/12. links: C12/12-Molekül mit den entsprechend markierten Protonen, sowie die Veranschaulichung des Reorientierungswinkels.

Abb. 5.18(a) und (b) sind die jeweiligen Fluoreszenzbilder der beiden Substanzen, sowie in (c) die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass beide Farbstoffe gleichmäßig über die Vesikel verteilt sind, was einer homogenen Mischung von C12/12 und DOPC entspricht. Eine makroskopische Phasenseparation kann in diesem System ausgeschlossen werden, weshalb dessen Dynamik im Vergleich zum phasenseparierten System aus DPPC und C12/12 mittels NMR ebenfalls untersucht wurde.

5.3.2 | NMR-Spektren und Dynamikmessungen

Zur Charakterisierung des Systems wurden in dieser Arbeit verschiedene NMR-Untersuchungen durchgeführt. In Abb. 5.19 sind das Protonen- und das Kohlenstoffspektrum für die 10:1-Mischung aus DOPC und C12/12 dargestellt. Die Zuordnung der Lipidsignale zu den entsprechenden Protonen bzw. Kohlenstoffen wurde anhand der in der Literatur angegebenen chemischen Verschiebungen durchgeführt [251]. In den Spektren sind die Signale der C12/12-Moleküle wegen der geringen molaren Konzentration der Substanz zunächst nicht erkennbar. Durch Vergrößerung des Protonenspektrums im Bereich zwischen 8 ppm und ca. 6.5 ppm werden die Signale der Aromatenringe des C12/12 sichtbar (s. Abb. 5.19(a)).

Das Spektrum der Mischung aus DOPC und C12/12 unterscheidet sich in dieser molaren Konzentration nicht vom Spektrum des reinen DOPC (s. Abb. 5.19). Es sind alle Lipidsignale vorhanden und die chemischen Verschiebungen entsprechen denen im Reinlipid. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Konformationen der Lipidmoleküle durch die Anwesenheit der C12/12-Moleküle nicht merklich ändert.

Um den Einfluss der C12/12-Moleküle auf die Lipiddynamik zu untersuchen, wurden mittels der recoupled DIPSHIFT-Pulssequenz die heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen für die jeweiligen Kohlenstoffatome der Lipidmoleküle gemessen. Die Dephasierungskurven der Lipidmoleküle in der Mischung, sowie die zugehörigen Kurven der Datenanpassung sind in Abb. 5.20 dargestellt. Dabei ist in diesen Kurven zu erkennen, dass die Kurvenanpassungen die Messdaten unterschiedlich gut beschreiben. Es sind

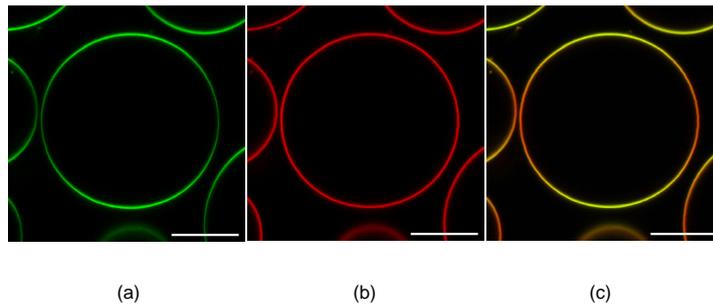


Abbildung 5.18.: Fluoreszenzbilder der Mischung aus C12/12 und DOPC (1:10), wobei (a) die Fluoreszenz des C12/12 ist, (b) die des farbstoffmarkierten DOPC und (c) die Überlagerung aus beiden Bildern darstellt (Daten von S. Werner [250]).

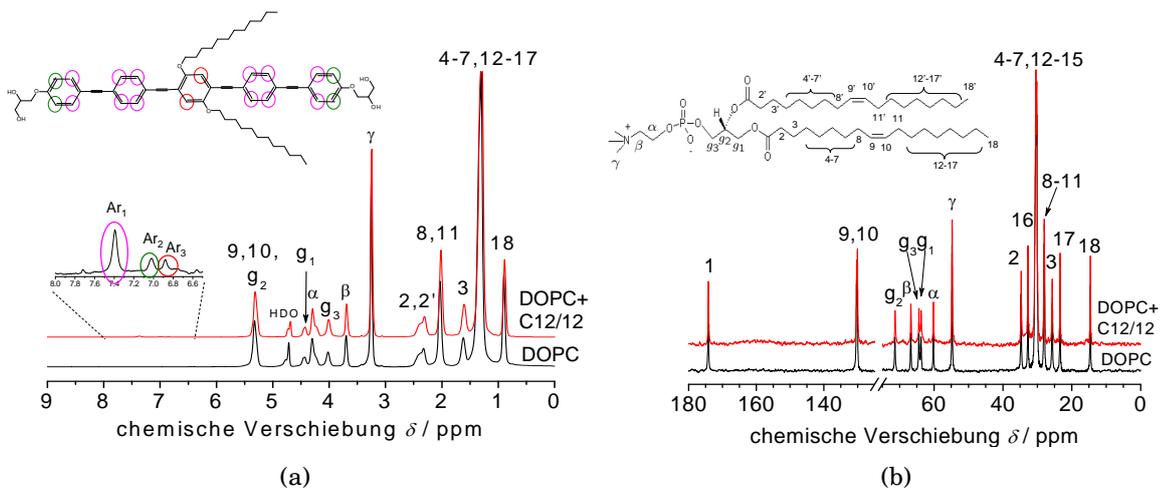


Abbildung 5.19.: (a) ^1H - und (b) ^{13}C -Spektrum für das reine DOPC und die DOPC-C12/12-Mischung (10:1) mit Zuordnung der Signale zu den einzelnen Protonen bzw. Kohlenstoffen im Molekül. Zusätzlich sind die Molekülstrukturen der beiden Substanzen sowie die Bezeichnung der einzelnen Kerne dargestellt ($\nu_R = 5 \text{ kHz}$).

geringe Abweichungen für die oberen Kettensegmente und das Glycerol- g_3 -Kohlenstoff vorhanden; vermutlich auch hier durch eine Verteilung von dipolaren Restkopplungen bedingt (s. Kap. 4).

Die ermittelten Ordnungsparameter für die DOPC-C12/12-Mischung sind in der Tabelle in Abb. 5.21 aufgeführt und im Vergleich zur reinen Lipidprobe für eine Messtemperatur von $T = 34^\circ\text{C}$ dargestellt. Für die verschiedenen molekularen Bereiche im Lipid werden unterschiedliche Ordnungsparameter bestimmt (s. Kap. 4.2.1). Es ist zu erkennen, dass die heteronukleare, dipolare Kopplung im gesamten Lipid in der Mischung im Vergleich zum reinen Lipid nicht signifikant verändert wird. Das deutet auch hier darauf hin, dass die Lipidmoleküle ihre Dynamik durch die Anwesenheit der C12/12-Moleküle nicht ändern. Eine mögliche Erklärung ist wiederum, dass die Packungsdichte der Lipidmoleküle durch die C12/12-Moleküle nicht vergrößert wird, wie es zum Beispiel bei Zugabe von Cholesterin geschieht (s. Kap. 4.2.3). Simulationen und Messungen mittels Neutronenstreuung zeigten, dass die schnellen Bewegungen der Lipidmoleküle dann beeinflusst werden, wenn durch die Gastmoleküle die Lipidpackung erhöht wird [240]. Dies ist jedoch unwahrscheinlich für Moleküle wie C12/12, die sich in der gesamten Doppelschicht einlagern können und nicht nur im hydrophoben Kern der Membran. Da C12/12 durch seine molekulare Struktur und die amphiphilen Eigenschaften wahrscheinlich in senkrechter Orientierung in die

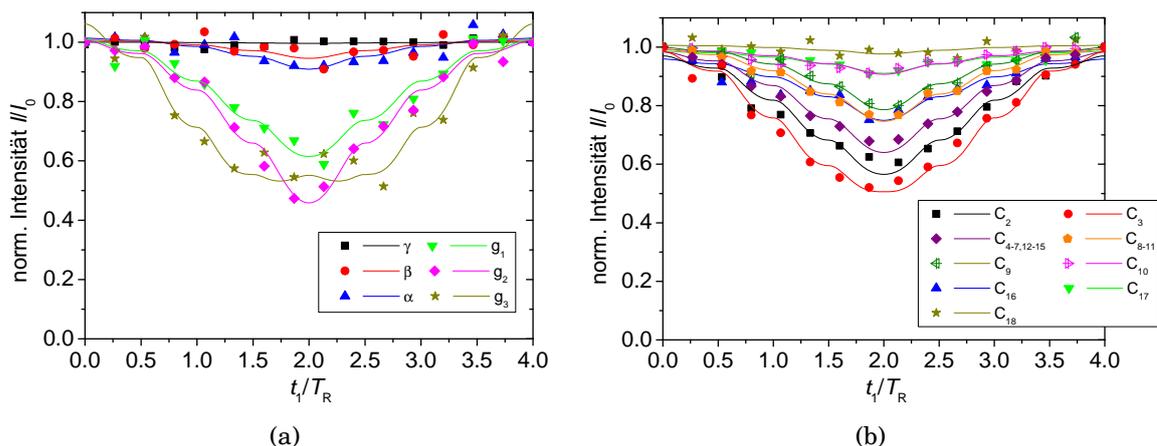


Abbildung 5.20.: Dephasierungskurven für die Kohlenstoffatome (a) der Kopfgruppe und Glyceroleinheit und (b) für die Alkylketten des DOPC aus recoupled DIPSHIFT-Messungen ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N=4$)

Membran eingebaut wird, sich dabei der Platzbedarf der Lipidmoleküle aber vermutlich nicht ändert, müssen diese ihre Bewegungsamplituden nicht einschränken. Die schnelle Dynamik der Moleküle wird durch C12/12 daher nicht verändert. Weitere mögliche Erklärungen für unveränderte Restkopplungen bzw. Ordnungsparameter wurden anhand von Dynamikuntersuchungen der DPPC-C12/12-Mischung näher beschrieben (s. Kap. 5.2.2).

Wie im Protonenspektrum für die Mischung aus C12/12 und DOPC gezeigt, sind die Signale der Aromatenringe des C12/12 ebenfalls auswertbar (s. Abb. 5.19(a)). Es wurden daher $^1\text{H-DQ}$ -Seitenbandenspektren (s. Kap. 3.4) in der Mischung von DOPC und C12/12 im Temperaturbereich von $T = 5^\circ\text{C}$ bis $T = 65^\circ\text{C}$ gemessen. Beispielhaft sind in Abb. 5.22 die Seitenbandenmuster für zwei Temperaturen dargestellt, sowie die aus dem Fit erhaltenen mittleren, homonuklearen Restkopplungen und deren Verteilungsbreiten

C-Atom	S_{CH}
γ	0.01 ± 0.01
β	0.04 ± 0.01
α	0.05 ± 0.01
g_3	0.21 ± 0.03
g_2	0.17 ± 0.01
g_1	(0.12 ± 0.01)
C_2	0.13 ± 0.01
C_3	(0.17 ± 0.01)
$C_4\text{-}C_7, C_{12}\text{-}C_{15}$	0.11 ± 0.01
C_8, C_{11}	0.09 ± 0.01
C_9	0.10 ± 0.01
C_{10}	0.06 ± 0.01
C_{16}	0.08 ± 0.01
C_{17}	(0.05 ± 0.01)
C_{18}	0.02 ± 0.01

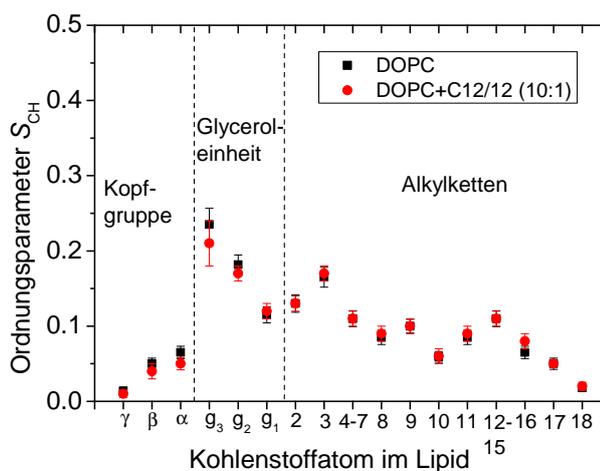


Abbildung 5.21.: Ordnungsparameter S_{CH} der Lipidmoleküle in der DOPC-C12/12-Mischung (10:1), sowie deren Darstellung im Vergleich zum reinen DOPC ($T = 75^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$). Die in Klammern angegebenen Werte können durch Resonanzen der C12/12-Moleküle beeinflusst sein.

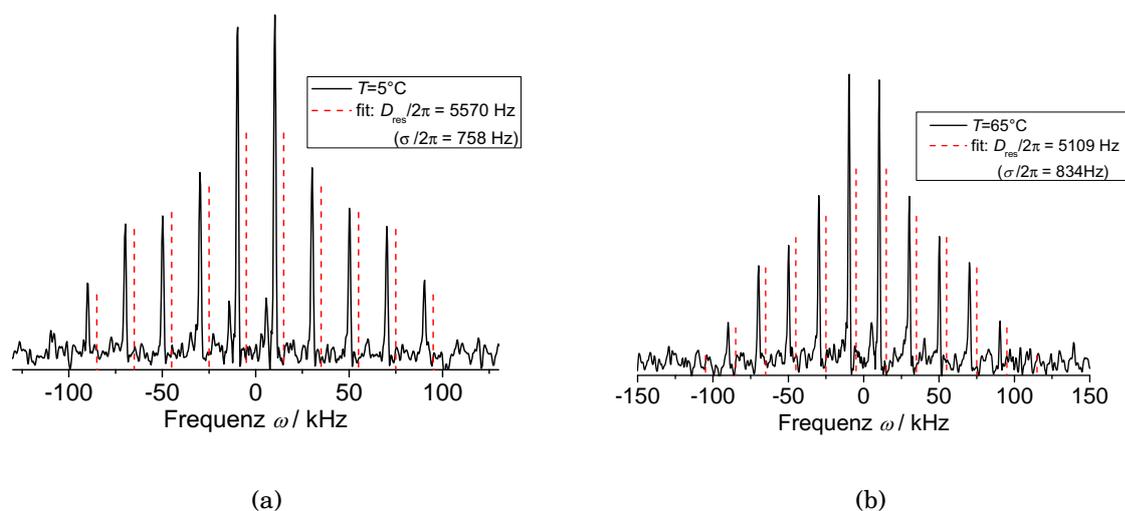


Abbildung 5.22.: ^1H -DQ-Seitenbandenmuster für die Protonen der Phenylringe (Ar_1) in der 10:1-Mischung mit DOPC bei (a) $T = 5^\circ\text{C}$ und (b) $T = 65^\circ\text{C}$ ($\nu_{\text{R}} = 10\text{kHz}$). Die aus der Datenanpassung ermittelten Restkopplungen $D_{\text{res}}/2\pi$, sowie die Verteilungsbreiten $\sigma/2\pi$ sind ebenfalls angegeben.

angegeben. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die Mischung aus DOPC und C12/12 nur das größte der drei Aromatensignale ausgewertet werden konnte. Das zweite Signal, welches in der DPPC-Mischung ebenfalls ausgewertet wurde, zeigte in dieser Probe Spektren mit nur ein bis zwei Seitenbandenordnungen, was auf eine vergleichsweise geringe Kopplung für diese Protonen schließen lässt. Auch in den hier gezeigten Seitenbandenspektren sind links neben den Seitenbanden Signale zu erkennen, welche durch die Kopplung zu anderen Protonen in der Probe, in diesem Fall zu den Aliphaten, hervorgerufen werden.

Eine vollständige Übersicht der ermittelten homonuklearen, dipolaren Restkopplungen für C12/12 in DOPC bei verschiedenen Messtemperaturen ist in Tabelle 5.4 gegeben. Anhand dieser Werte kann der Ordnungsparameter für die Protonen der Aromatenringe für die einzelnen Temperaturen bestimmt werden (s. Abb. 5.23). Auch hier wurde für die Datenanpassung eine Gauß-Verteilung von Kopplungskonstanten zu Grunde gelegt [150]. Die Fehlerbalken in Abb. 5.23 ergeben sich hierbei aus der Verteilungsbreite der Restkopplungen. Als Referenzkopplung zur Berechnung des Ordnungsparameters (s. Kap. 2.3.2.2) wurde hier ebenfalls der Wert $D_{\text{Ref}} = (8300 \pm 400)\text{Hz}$ verwendet, welcher einem Abstand der benachbarten Ringprotonen von ca. 2.44Å entspricht (s. Kap. 5.2.2).

Die ermittelten Ordnungsparameter zeigen für alle Temperaturen einen reduzierten Wert. Da sich die DOPC-Moleküle bereits in ihrer flüssig-kristallinen Phase befinden, kann auch hier, wie in der Mischung mit DPPC, angenommen werden, dass die C12/12-Moleküle in ihrer Bewegung nicht wesentlich eingeschränkt werden und daher eine uniaxiale Rotation um die Moleküllängsachse ausführen können (s. Kap. 5.2.2.3). Diese Bewegung hat jedoch keinen Einfluss auf den Ordnungsparameter, da der Tensor der homonuklearen Dipolkopplung zwischen den beiden Protonen am Ring parallel zur Rotationsachse ist (ArHH , s. Abb. 5.23). Somit steht diese Orientierung stellvertretend für die Orientierung des Gesamtmoleküls in Bezug auf die Membrannormale, da von einem senkrechten Einbau ausgegangen wird. Jede molekulare Bewegung, die den Ordnungsparameter reduziert, kann daher als Bewegung des C12/12-Moleküls an sich betrachtet werden. Da der Ordnungsparameter kleiner als eins ist, muss eine molekulare Bewegung zusätzlich zur uniaxialen Rotation der Moleküle vorhanden sein. Durch Annahme bestimmter Bewegungsmodelle kann die Amplitude (bzw. der Winkel) der Bewegung ermittelt werden (s. Kap. 2.3.2.2). Der Verlauf des Ordnungsparameters zeigt eine leicht abnehmende Ten-

Tabelle 5.4.: Temperaturabhängige, homonukleare, dipolare Restkopplungsstärken $D_{res}/2\pi$ für das ausgewertete Protonensignal (Ar_1) in der 10:1-Mischung aus DOPC und C12/12 erhalten aus den DQ-Seitenbandenspektren ($\nu_R = 10\text{ kHz}$). Die Verteilungsbreite $\sigma/2\pi$ ist ebenfalls angegeben.

10:1	Ar_1	
	$D_{res}/2\pi$ / Hz	$\sigma/2\pi$ / Hz
5 °C	5570	758
15 °C	5925	982
25 °C	5351	1136
30 °C	5595	567
35 °C	5133	1386
45 °C	4998	326
55 °C	4922	1860
65 °C	5109	834

denz von $S_{HH} \approx 0.7$ auf $S_{HH} \approx 0.6$ mit steigender Temperatur. Es ergeben sich für diesen Wertebereich des Ordnungsparameters je nach Bewegungsmodell Winkel von $\alpha = 35 - 45^\circ$ zur Bewegungsachse. Dabei sind als passende Modelle die Diffusion innerhalb oder auf einem Kreiskegel zur Beschreibung dieser mutmaßlichen Taumelbewegung passend (s. Kap. 2.3.2.2). Die leichte Abnahme des Ordnungsparameters mit steigender Temperatur wird dabei nicht auf eine weitere zusätzliche Bewegung zurückgeführt, sondern nur auf eine vergrößerte Amplitude. Damit ist der Ordnungsparameter der C12/12-Moleküle in der 10:1-DOPC-Mischung vergleichbar mit dem in der Mischung mit DPPC im gleichen molaren Verhältnis (s. Kap. 5.2.2). Es scheint für die Gastmoleküle bei gleicher molarer Konzentration stets die gleiche Dynamik in der Membran vorzuliegen, solange sich diese in der flüssig-kristallinen Phase befindet. Für eine größere Konzentration an C12/12 scheint die Dynamik räumlich mehr begrenzt zu sein, wie im Fall der 4:1-Mischung mit DPPC.

5.4 | Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Wechselwirkung des polyphilen Moleküls C12/12 mit verschiedenen Modellmembranen untersucht, wobei sich die Proben in ihrem Phasenverhalten unterscheiden. Für die DOPC-C12/12-Mischung mit einem molaren Verhältnis von 10:1 (DOPC:C12/12) wurde ein homogenes System gefunden, in dem die lokale Lipiddynamik in der L_α -Phase von den Gastmolekülen nicht beeinflusst wird. In dieser Mischung kann die Dynamik der C12/12-Moleküle bei allen Messtemperaturen als eine Überlagerung einer uniaxialen Rotation und einer kleinwinkligen Taumelbewegung um die Moleküllängsachse charakterisiert werden. Eine ähnliche Dynamik der C12/12-Moleküle wurde in der Mischung mit DPPC bei gleicher molarer Konzentration in der L_α -Phase gefunden. Diese Mischung ist unterhalb von ca. 70°C phasensepariert, wobei alle Moleküle in den verschiedenen Phasen unterschiedlich mobil sind. Die C12/12-Moleküle führen für tiefe Temperaturen 180° -Zweiplatz-Sprünge um die Moleküllängsachse aus; oberhalb aller Phasenübergänge geht diese Bewegung in eine uniaxiale Rotation der Moleküle über. Überlagert werden beide Bewegungen von einer zusätzlichen, kleinwinkligen Dynamik mit einem Winkel von ca. 30° zur Moleküllängsachse. Es wird davon ausgegangen, dass sich die C12/12-Moleküle parallel zur Membrannormalen einbauen, so dass sich ihre Dynamik vermutlich den lokalen Fluktuationen der Lipidmolekülen anpasst. Die Dynamik der Lipidmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase wird auch in der DPPC-Membran

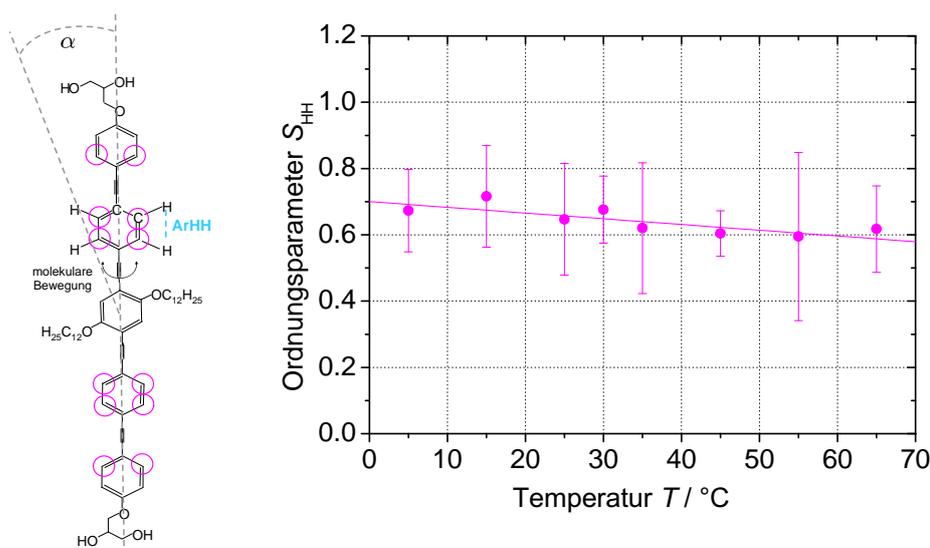


Abbildung 5.23.: Ordnungsparameter S_{HH} der Protonen an den Aromatenringen des C12/12 (in der Struktur markiert) für verschiedene Temperaturen in der 10:1-Mischung mit DOPC. links: C12/12-Molekül mit den entsprechend markierten Protonen, sowie die Veranschaulichung des Reorientierungswinkels.

durch die Anwesenheit des C12/12 nicht verändert. Unterhalb von ca. 70°C liegt die Membran in einer modifizierten Gelphase, aber dennoch mit unbeweglichen Lipidmolekülen, vor. Mit Hilfe von NMR-Messungen konnte den einzelnen Phasenübergängen in den DSC-Thermogrammen der DPPC-C12/12-Mischung jeweils ein bestimmter molekularer Prozess zugeordnet werden.

6 | Einfluss amphiphiler und polyphiler Blockcopolymerer auf Modellmembranen

Nachdem im vorigen Kapitel die Wechselwirkung niedermolekularer Polyphiler mit Modellmembranen untersucht wurde, soll nun die zweite Gruppe polyphiler Moleküle näher betrachtet werden. Bei diesen Molekülen handelt es sich um Blockcopolymerer, die aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Eigenschaften als membranmodifizierend angenommen werden [42, 252].

6.1 | Amphiphile und polyphile Blockcopolymerer

Blockcopolymerer sind Polymere, die aus verschiedenen Blöcken von Polymereinheiten aufgebaut sind. Dabei besitzen die einzelnen Blöcke unterschiedliche Philie, so dass die Blockcopolymerer insgesamt amphiphile oder polyphile Eigenschaften aufweisen. Den zentralen Block bildet bei den in dieser Arbeit untersuchten Blockcopolymeren das hydrophobe Poly(propylenoxid) (PPO). Dies ist auch der für andere amphiphile Polymere, die so genannten Poloxamere, verwendete hydrophobe Block [45]. An diesem Block ist bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben auf beiden Seiten je ein hydrophiler Poly(glycerolmethacrylat) (PGMA)-Block gebunden. Daraus ergibt sich ein amphiphiles Triblockcopolymer PGMA-PPO-PGMA (kurz: GP). Für die ursprünglichen Poloxamere wurden als hydrophile Blöcke Poly(ethylenoxid) (PEO) verwendet. Es wird jedoch vermutet, dass das PGMA aufgrund seiner größeren Hygroskopie und der verzweigteren Struktur einen größeren Einfluss auf Lipidmembranen hat als PEO [35, 253].

Werden anschließend an beiden Enden perfluorierte Alkylketten angefügt, welche sowohl hydrophob als auch hydrophil sind, ergibt dies ein polyphiles Pentablockcopolymer der Struktur F-PGMA-PPO-PGMA-F (kurz: FGP) [30]. Die fluorierten Teile tendieren wegen ihrer fluorophilen Eigenschaften zur Selbstaggregation und liegen daher bei Aggregation meist separiert von Blöcken anderer Philie vor [48]. Das Aggregationsverhalten der reinen Polymere in Wasser ist vom Verhältnis der einzelnen Blocklängen zueinander, dem so genannten Hydrophil/Hydrophob-Gleichgewicht, aber auch von der Länge des hydrophilen Blocks abhängig [254]. Im Allgemeinen bilden die Polymere in wässriger Lösung oberhalb einer bestimmten Temperatur und Konzentration Mizellen aus. Die molekulare Struktur der beiden Polymere ist in Abb. 6.1 dargestellt, wobei die Polymerisationsgrade der einzelnen Blöcke und deren ungefähre Länge in gestreckter Konformation ebenfalls angegeben sind. In den hier untersuchten Polymeren wurde die Länge des hydrophoben PPO-Blockes so gewählt, dass dieser eine Lipiddoppelschicht, deren Dicke im Bereich zwischen 3 – 5 nm liegt, überspannen kann. Die hydrophilen PGMA-Blöcke sind in der Lage mit den Kopfgruppen der Lipide zu wechselwirken. Interessant ist es, in diesem Zusammenhang zu untersuchen, welchen Einfluss die fluorierten Ketten auf die Wechselwirkung mit dem Lipid haben. Zunächst sollen jedoch die NMR-Messungen der reinen Polymerproben vorgestellt werden, um diese anschließend mit den Mischungen aus Polymer und Lipid vergleichen zu können. Dazu wurden für die reinen Polymerproben

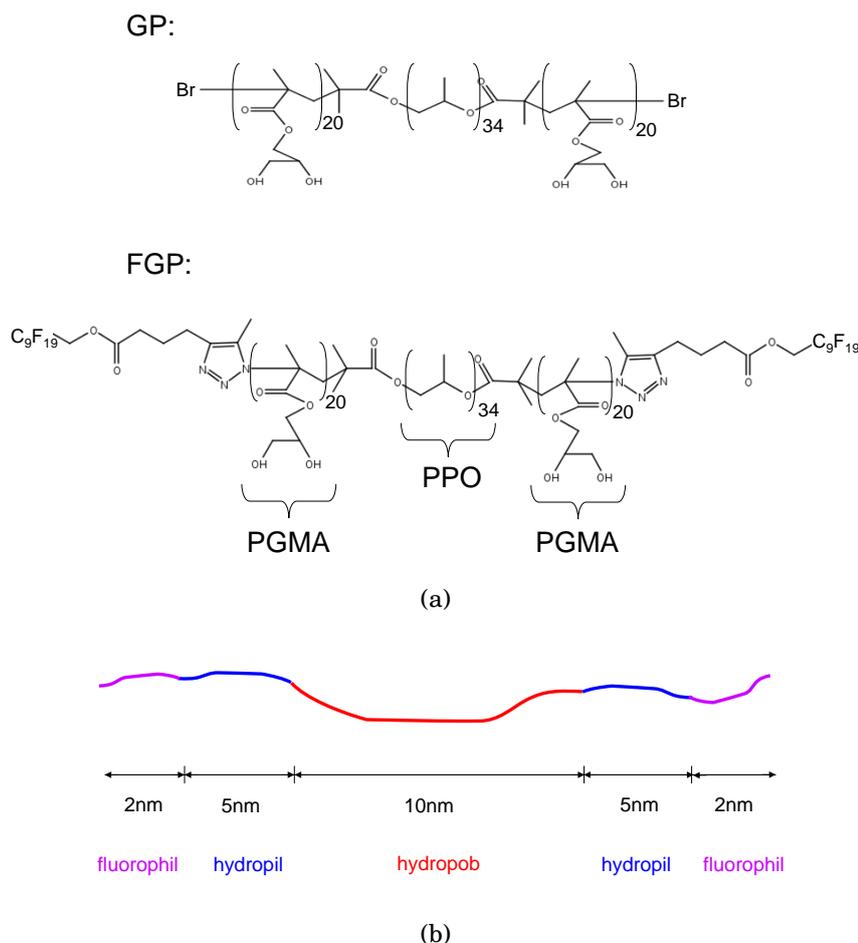


Abbildung 6.1.: (a) Struktur der Blockcopolymerer GP und FGP. (b) Vereinfachte Darstellung mit der Länge der einzelnen Abschnitte in all-trans-Konformation, sowie deren Philie (hydrophob, hydrophil, fluorophil).

(in 50 Gew.% D₂O) NMR-Spektren aufgenommen. In Abb. 6.2 sind die Protonenspektren und die Strukturformeln der beiden untersuchten Polymere dargestellt, in denen auch die Zuordnung der einzelnen Signale zu den Protonen der Polymere angegeben ist. Die Zuordnung erfolgte auf Grundlage von Lösungs-NMR-Spektren [255]. Beim direkten Vergleich der beiden Protonenspektren für GP und FGP zeigen sich nahezu identische Signale, welche sich lediglich etwas in ihrer Intensität unterscheiden. Dies ist nicht unerwartet, da die Struktur beider Polymere im Wesentlichen gleich ist. Die Fluorkohlenstoffketten des FGP sind im Protonenspektrum nicht detektierbar und haben daher keinen Einfluss auf das Spektrum. Die schmalen Linien in den Protonenspektren zeigen eine isotrope Mobilität der Polymermoleküle an, welche vermutlich aus schnellen Rotationsbewegungen der Mizellen im Wasser resultiert. Des Weiteren sind in Abb. 6.3 die Kohlenstoffspektren der beiden Polymere dargestellt. Für die Zuordnung der Kohlenstoffsignale, welche ebenfalls auf einem Lösungsspektrum basiert [255], sind in dieser Abbildung nochmals die Strukturformeln der beiden Polymere dargestellt. Die Spektren wurden mit direkter Anregung der Kohlenstoffkerne aufgenommen und zeigen für beide Polymere keinen signifikanten Unterschied. Die CP-Spektren enthielten kaum Signal, weshalb auch hier von einer nahezu isotropen Mobilität der Polymermoleküle in beiden Proben ausgegangen werden kann. Im Weiteren soll nun die Wechselwirkung der amphiphilen und polyphilen Blockcopolymerer mit der Modellmembran DMPC untersucht werden.

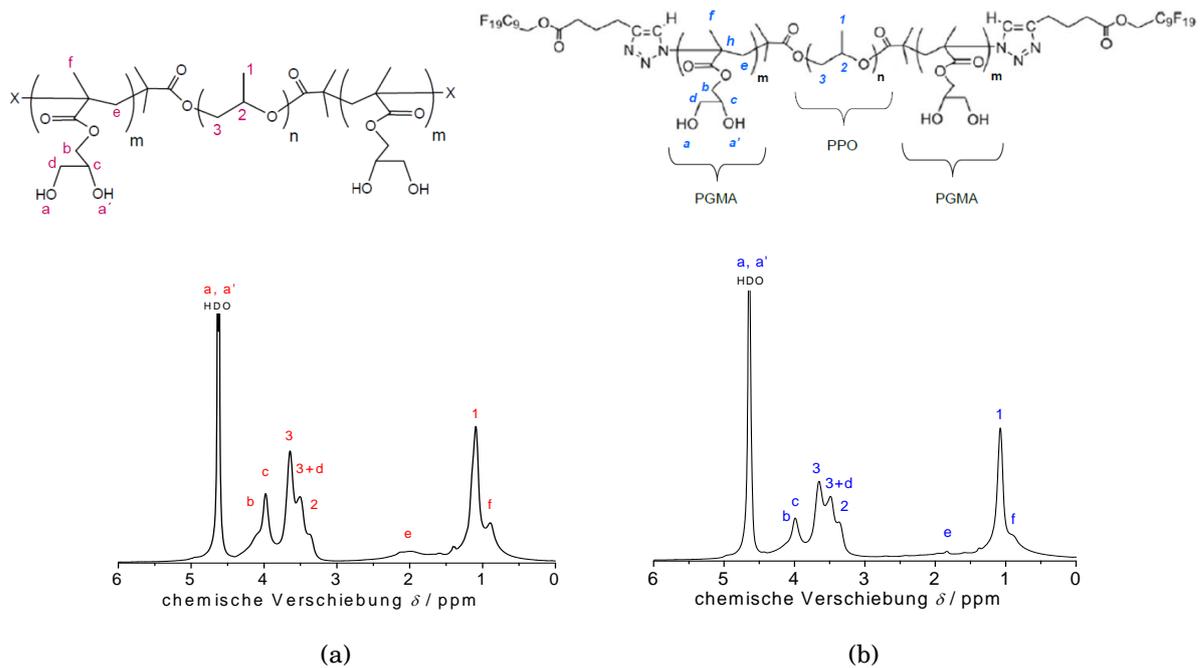


Abbildung 6.2.: Strukturformeln und Protonenspektren für (a) GP und (b) FGP in 50 Gew.% D_2O . In den Strukturformeln sind die Bezeichnungen der jeweiligen Protonen für PPO (Zahlen) und PGMA (Buchstaben) angegeben und den Signalen in den Protonenspektren zugeordnet ($T = 34^\circ C$, $\nu_R = 5 \text{ kHz}$).

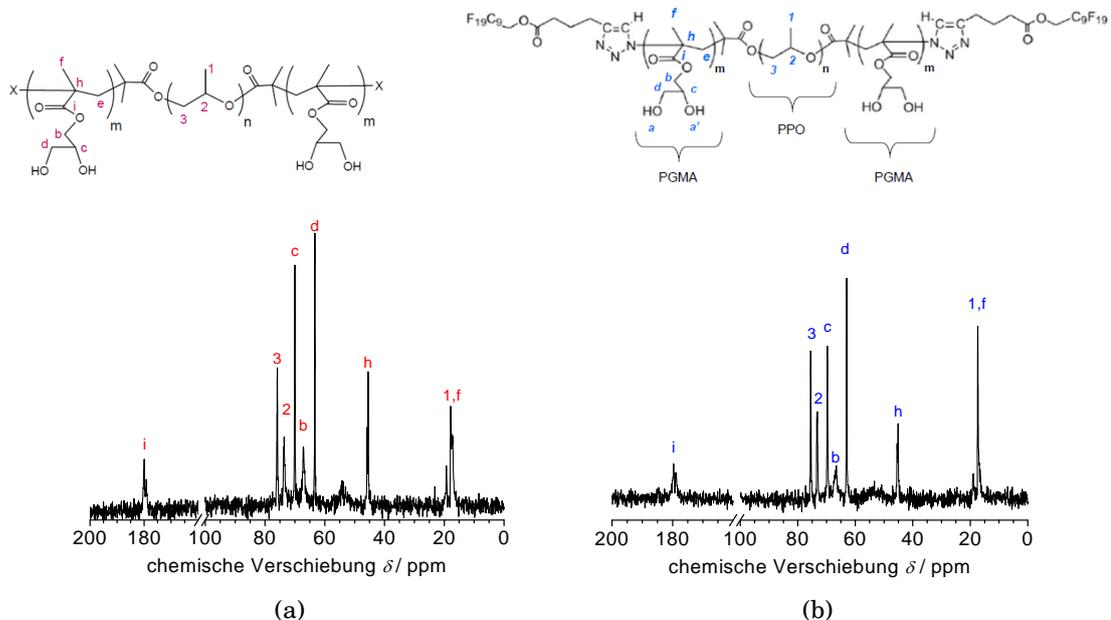


Abbildung 6.3.: Strukturformeln und direkt angeregte Kohlenstoffspektren für (a) GP und (b) FGP in 50 Gew.% D_2O . In den Strukturformeln sind die Bezeichnungen der jeweiligen Kohlenstoffatome für PPO (Zahlen) und PGMA (Buchstaben) angegeben und den Signalen in den Protonenspektren zugeordnet ($T = 34^\circ C$, $\nu_R = 5 \text{ kHz}$).

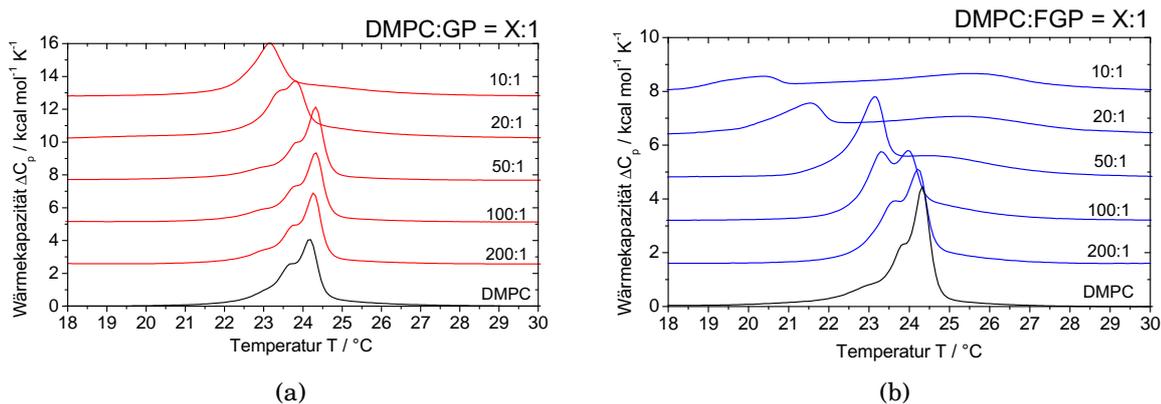


Abbildung 6.4.: DSC-Thermogramme für (a) GP und (b) FGP in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit DMPC sowie das DSC-Thermogramm für das reine DMPC (aus [52]).

6.2 | Wechselwirkung der Blockcopolymerer mit der Modellmembran DMPC

6.2.1 | Vorbetrachtungen

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob und in welcher Weise die beschriebenen Polymere mit den Lipidmolekülen in einer Modellmembran wechselwirken. Zunächst wurden für die Proben mit verschiedenen Konzentrationen aus Lipid und Polymer DSC-Thermogramme aufgenommen (s. Abb. 6.4) [52]. Das DSC-Thermogramm für reine DMPC-Vesikel ist ebenfalls gezeigt, welches hier ein etwas breiteres und aufgespaltenes Signal besitzt und die Phasenübergangstemperatur bei $T_m \approx 24^\circ\text{C}$ zeigt. Die Aufspaltung und Verbreiterung kann durch Inhomogenitäten in der Probe (leicht unterschiedliche Vesikelgrößen) verursacht sein, so dass die Kooperativität der Lipidmoleküle abnimmt und es zu leicht unterschiedlichen Phasenumwandlungstemperaturen kommt [179]. Weiter ist zu erkennen, dass der Einfluss beider Polymere auf das Lipid sehr unterschiedlich ist. So ist in den DSC-Kurven für GP bei niedrigen Polymerkonzentrationen keine Änderung im Vergleich zum Reinlipid zu erkennen (s. Abb. 6.4(a)). Ab einer Konzentration von 20:1 (DMPC:GP) zeigt sich eine deutliche Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur zu niedrigeren Temperaturen um ca. 0.5 K, was als Einbau der Gastmoleküle in die Membran interpretiert wird [256]. Eine positive Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur hingegen wird bei Wechselwirkung der Lipidkopfgruppe mit den Gastmolekülen, d.h. an der Membranoberfläche, erhalten. Insgesamt sollte aber beachtet werden, dass selten nur ein Wechselwirkungsmechanismus für die Änderung dieser Temperatur verantwortlich ist und diese daher meist aus dem Zusammentreffen verschiedener Mechanismen resultiert [257]. Mit zunehmender GP-Konzentration verschwindet die Aufspaltung des Signals und die Phasenumwandlungstemperatur verschiebt sich weiter zu tieferen Temperaturen, so dass eine zunehmende Wechselwirkung im hydrophoben Teil der Membran angenommen werden kann.

Die DSC-Kurven für FGP in DMPC zeigen hingegen ein anderes Verhalten (s. Abb. 6.4(b)). Schon bei geringen Polymerkonzentrationen lassen sich deutliche Änderungen sowohl in der Form des Signals als auch in der Position des Maximums erkennen. Ab einer Konzentration von 50:1 (DMPC:FGP) existieren zwei breite, voneinander getrennte Umwandlungssignale, deren Abstand mit steigender Polymerkonzentration zunimmt. Dies deutet auf eine starke Phasenseparation hin [257, 258]. Auch die starke Verbreiterung der Signale zeigt eine sehr ausgeprägte Heterogenität der Probe und somit eine zuneh-

mende Wechselwirkungsstärke an [71]. Zu bemerken ist, dass sich die eine Komponente mit zunehmender Polymerkonzentration mehr zu tieferen Umwandlungstemperaturen und die andere mehr zu höheren Umwandlungstemperaturen verschiebt. Diese starke Änderung des Phasenverhaltens des Lipids scheint vornehmlich durch die fluorierten Endgruppen des polyphilen FGP verursacht zu sein, da diese Veränderungen für die Phasenumwandlung des Lipids mit GP nicht zu finden sind. Die Ergebnisse der DSC-Kurven deuten daraufhin, dass die Bindung bzw. der Einbau des FGP einen größeren Einfluss auf die Lipidmembran hat als das unfluorierte GP [71].

Diese unterschiedliche Art bzw. Stärke der Wechselwirkung konnte auch mittels Fluoreszenzmikroskopie-Messungen an großen unilamellaren Vesikeln (GUV) aus Modelllipid und GP bzw. FGP nachgewiesen werden [52]. In diesen Experimenten wurde gefunden, dass das unfluorierte GP nicht in der Lage ist die Lipiddoppelschicht zu durchdringen, wohingegen das fluoridierte FGP schon nach kurzer Zeit im Inneren der GUVs detektiert werden konnte. Dies weist darauf hin, dass in der Membran durch FGP Defekte entstehen und die Barrierefunktion verloren geht, wobei die Doppelschicht jedoch insgesamt intakt bleibt. Es zeigte sich auch eine besonders große Ansammlung von FGP an der Vesikeloberfläche, was auf eine verstärkte Wechselwirkung dieses Polymers mit der Membran hinweist.

Aus den Betrachtungen der Ergebnisse anderer Messmethoden kann für die Wechselwirkung der beiden Polymere zusammengefasst gesagt werden, dass sowohl GP als auch FGP mit der Membran in Interaktion treten. Die Art und das Ausmaß der Wechselwirkung scheinen dabei von der Anwesenheit fluorierter Anteile stark beeinflusst zu sein, da der Effekt des FGP auf die Modellmembran sowohl in den DSC-Thermogrammen als auch in den Fluoreszenzmessungen größer ist als der des GP.

Messungen an Lipidmonoschichten, welchen GP zugegeben wurde, zeigten einen Einbau der Polymermoleküle in zwei Schritten [253]. Im ersten Schritt wird der PPO-Block oberflächlich in die Monoschicht eingelagert, während die PGMA-Blöcke in der wässrigen Phase verbleiben. Im zweiten Schritt beginnt das PGMA mit der Kopfgruppenregion der Lipide zu wechselwirken, so dass der PPO-Block tiefer in die Alkylkettenregion vordringen kann. Einen ähnlichen, eventuell mehrstufigen Mechanismus könnte es auch beim Einbau der Polymere in Lipiddoppelschichten geben. Es wurde in der gleichen Arbeit festgestellt, dass die Wechselwirkung zwischen den PPO-Blöcken und den Alkylketten der Lipide nicht sehr stark ist, die Alkylketten der Lipide aber dennoch in eine vertikālere Orientierung gezwungen werden [253].

Auf Grundlage der oben beschriebenen Ergebnisse, wurde die Wechselwirkung der beiden Blockcopolymerer in der Modellmembran DMPC mit den in dieser Arbeit erläuterten NMR-Methoden untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben und die Wechselwirkungen weiter charakterisiert.

6.2.2 | NMR-Messungen an den Polymer-Lipid-Mischungen

6.2.2.1. ^1H - und ^{13}C -Spektren der untersuchten Proben

Um die Wechselwirkung der Blockcopolymerer mit einer Lipidmembran zu untersuchen, wurden Mischungen aus DMPC und GP sowie FGP in den molaren Konzentrationen 20:1, 60:1 und 150:1 (DMPC:Polymer) hergestellt (s. Anhang B) und NMR-Spektren dieser Proben aufgenommen. Diese drei Konzentrationen wurden auf Basis der DSC-Thermogramme in Abb. 6.4 ausgewählt, um eine hohe, eine mittlere und eine niedrige Polymerkonzentration im Lipid vergleichen zu können. Die entsprechenden Massenver-

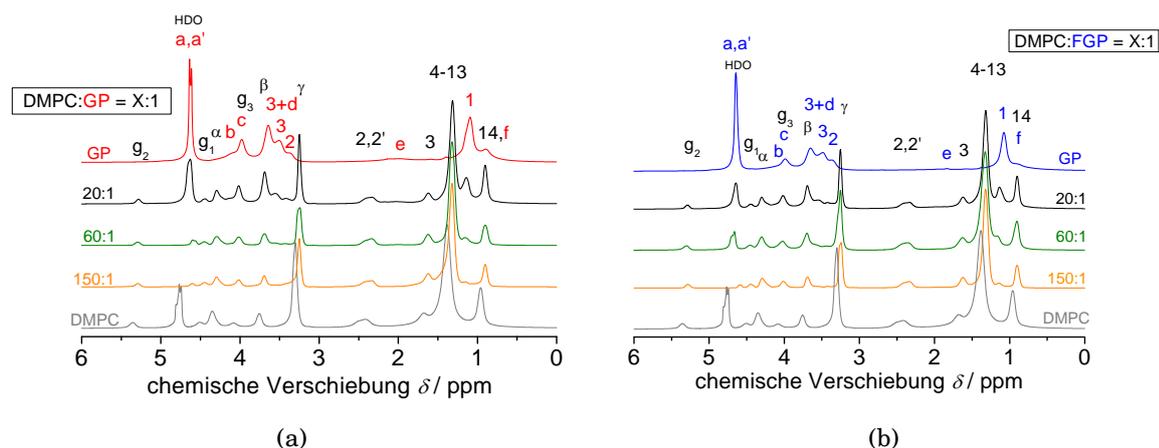


Abbildung 6.5.: Protonenspektren für die Mischungen aus (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP für die verschiedenen molaren Verhältnisse und die Spektren der reinen Polymere und des reinen DMPC, sowie die Zuordnung der jeweiligen Signale zu den Protonen in den Molekülen (s. Abb. 6.1) ($T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$).

hältnisse (DMPC:Polymer) betragen ungefähr 1.5:1, 5:1 und 10:1 für die oben angegebenen molaren Konzentrationen.

In Abb. 6.5 sind die Protonenspektren der beiden Polymere in DMPC für die verschiedenen, untersuchten molaren Verhältnisse dargestellt. Es können in den Mischungen sowohl die Signale der Polymere als auch die der Lipide zugeordnet werden; es gibt jedoch eine Vielzahl von Überlagerungen einzelner Resonanzen. Beim Vergleich der Spektren verschiedener Konzentrationen können geringe Änderungen der chemischen Verschiebung der Lipidresonanzen in den Mischungen im Vergleich zum reinen Lipid festgestellt werden. Diese kann durch eine etwas abweichende Referenzierung der einzelnen Spektren bedingt sein. Wie schon in Kap. 5.2.2 beschrieben, erfolgte eine externe Referenzierung der Protonenresonanzen, welche immer auch von den jeweiligen experimentellen Gegebenheiten abhängt. Diese Einflüsse sind zwar gering, aber die Verschiebung der Signale liegt im Bereich der sich aus dem Experiment ergebenden Unsicherheit und kann daher in diesem Fall nicht als signifikant betrachtet werden.

Die Überlappung der Signale von Lipid und Polymer macht weitere, komplexere Untersuchungen anhand der Protonenspektren schwierig. Das einzige auswertbare Protonensignal der Polymere ist das Signal der PPO-Methylgruppe bei ca. 1.1 ppm. Alle anderen Signale besitzen entweder eine zu geringe Intensität (z.B. Signal e bei ca. 2 ppm) oder sind mit Lipidsignalen überlagert (s. Kopfgruppenregion zwischen 4.5 und 3 ppm). Für Untersuchungen der homonuklearen, dipolaren Restkopplung der Polymermoleküle wird das Signal der PPO-Methylgruppe später noch einmal genauer betrachtet (s. Abschnitt 6.2.2.2).

Des Weiteren wurden für die verschiedenen Lipid-Polymer-Gemische Kohlenstoffspektren aufgenommen, welche für die beiden reinen Polymere sowie die verschiedenen Konzentrationen aus Polymer und Lipid in Abb. 6.6 im Vergleich zum reinen DMPC dargestellt sind. Auch in diesen Spektren ist es möglich, die einzelnen Signale zuzuordnen. Im Bereich der chemischen Verschiebungen der Lipidkopfgruppe, zwischen ca. 75 ppm und 60 ppm, existiert ebenfalls eine teilweise Überlagerung der Signale von Lipid und Polymer. Anhand der ^{13}C -Spektren in Abhängigkeit der Polymerkonzentration in den Proben können für beide Polymere Änderungen der chemischen Verschiebung der Lipidsignale festgestellt werden. Durch die interne Referenzierung auf das Signal der Teflonspacer im Rotor ist es

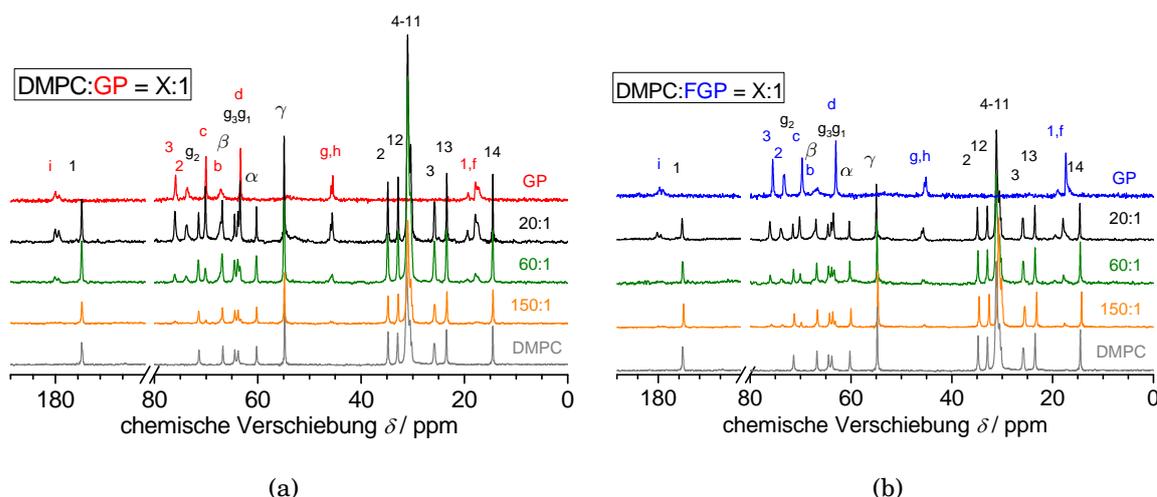


Abbildung 6.6.: Kohlenstoffspektren für die Mischungen aus (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP für die verschiedenen molaren Verhältnisse und die Spektren der reinen Polymere und des reinen DMPC, sowie die Zuordnung der jeweiligen Signale zu den Kohlenstoffatomen in den Molekülen ($T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$).

möglich, die chemischen Verschiebungen der Lipidsignale in An- und Abwesenheit der Polymere miteinander zu vergleichen und so Aussagen über eventuelle Konformationsänderungen zu machen. Es können aus diesem Vergleich Schlussfolgerungen darüber getroffen werden, welche molekularen Abschnitte des Lipids mit den Polymermolekülen wechselwirken. Beispielsweise zeigten Änderungen der chemischen Verschiebung der DMPC-Resonanzen durch Wechselwirkung mit dem amphiphilen Molekül Pyridin, dass sich das Pyridin vorzugsweise zwischen der Cholin- und der Glycerolgruppe der Lipide einlagert [259]. Auch für die Wechselwirkung eines Proteins mit DMPC konnten Änderungen der chemischen Verschiebung der Lipidresonanzen festgestellt werden [251]. Exemplarisch sind die Spektren der 20:1-Mischungen für GP und FGP in DMPC im Vergleich zum reinen Lipid in Abb. 6.7 dargestellt. Eine Übersicht der Änderungen der einzelnen chemischen Verschiebungen ist in Tabelle 6.1 gegeben. Betrachten wir zunächst den Einfluss des unfluorierten Polymeren, GP, auf das Lipid in verschiedenen Konzentrationen, so ist für den Bereich der Kopfgruppe zu erkennen, dass sich im Vergleich zum reinen Lipid für die geringste Polymerkonzentration eine Änderung der chemischen Verschiebungen nur für die Signale g_2 , β und γ ergibt (s. Tab. 6.1(a)). Diese Signale weisen eine leichte Verschiebung zu größeren ppm-Werten auf, was auf eine geringe Konformationsänderung hindeutet. Die anderen Kopfgruppensignale zeigen in dieser Mischung keine Änderung ihrer Position. Für den Bereich der Alkylketten des DMPC zeigt sich dagegen eine leicht negative Verschiebung der Signale ab dem dritten Kohlenstoffatom (s. Tab. 6.1(a)), was auf eine etwas erhöhte Unordnung in diesem Bereich schließen lässt. Die beiden oberen Kettensegmente weisen keine Verschiebung ihrer Resonanzen auf. Für diese Konzentration kann daher eine geringe Änderung der Konformation durch den Einbau des GP in die Doppelschicht gefunden werden. Vermutlich lagern sich die Polymerketten zwischen die Lipidmoleküle und verursachen dadurch Unordnung in der Doppelschicht, wohingegen die Kopfgruppen durch die Wechselwirkung mit den PGMA-Blöcken in ihrer Konformation etwas geordneter erscheinen. Untersuchungen zum Einfluss des Polymeren PEG auf eine Lipidmembran ergaben ebenfalls eine durch das Polymer erhöhte, induzierte Ordnung [260]. Dies ist damit zu begründen, dass das PEG aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften mit dem vorhandenen Wasser um Wasserstoffbrückenbindungen zu den Lipidkopfgruppen

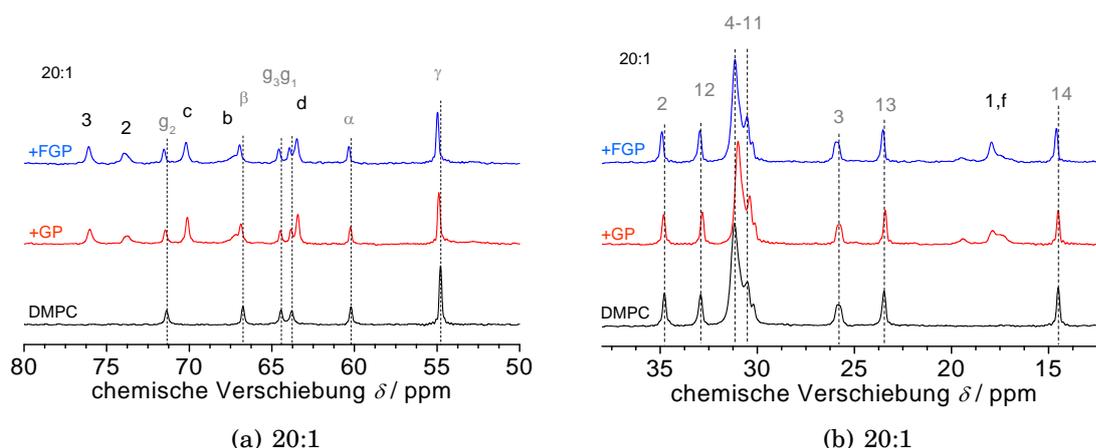


Abbildung 6.7.: Kohlenstoffspektren für die 20:1-Mischungen aus DMPC und GP bzw. FGP für (a) den Bereich der Kopfgruppe bzw. die Glyceroleinheit des DMPC und (b) den Bereich der Lipidalkylketten ($T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$). Die Änderungen der chemischen Verschiebung sind in Tabelle 6.1 für alle Konzentrationen angegeben.

konkurriert. Als Folge des verdrängten Wassers nimmt die Kopfgruppe ein geringeres Volumen ein, was zu einer vergrößerten lateralen Packung der Lipidmoleküle führt. Ein ähnliches Bild ist auch für die Wechselwirkung des hydrophilen PGMA-Blockes mit der Lipidkopfgruppe vorstellbar. Die erhöhte Ordnung kann auch hier von einer zunehmenden Verdrängung des Wassers von den Lipidkopfgruppen durch die PGMA-Blöcke verursacht sein. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass das PGMA im Vergleich zum PEG mehr Platz einnimmt und eine erhöhte Ordnung vermutlich nur durch Einbau einzelner Polymerelemente verursacht wird. Ein Einbau der Polymerelemente in die Membran ist deshalb wahrscheinlich, da die hydrophilen PGMA-Blöcke nicht lang genug sind, um dies zu verhindern und das Polymer aufgrund der Hydrophilie stattdessen an der Oberfläche der Doppelschicht anzulagern [45].

Wird die GP-Konzentration erhöht, so wird in der 60:1-Mischung ein zunehmender Einfluss des GP auf die Kopfgruppenkonformation festgestellt. Es zeigen sich bei allen Kopfgruppen- bzw. Glycerolsignalen Verschiebungen zu größeren ppm-Werten (s. Tab. 6.1(a)) und somit eine etwas erhöhte Ordnung in diesem molekularen Bereich der Lipide. Für die Alkylketten des Lipids hingegen findet sich bei dieser Polymerkonzentration ein gegenläufiger Trend (s. Tab. 6.1(a)). Es ist ersichtlich, dass nur noch die Signale der Kettensegmente C_4 - C_{11} und C_{12} eine Änderung der chemischen Verschiebung im Vergleich zum Reinlipid aufweisen. Die übrigen Signale besitzen wieder die gleiche chemische Verschiebung wie im reinen DMPC bzw. geringfügig vergrößerte Werte. Das bedeutet aber, dass sich die Ordnung im Vergleich zur Mischung mit weniger GP wieder leicht erhöht hat. Ein etwas größerer Effekt kann am Kohlenstoff C_2 beobachtet werden, welches sich im Vergleich am meisten nach links verschiebt. Für die 60:1-Mischung kann daher im Bereich der Kopfgruppe von einer veränderten, etwas gestreckteren Konformation ausgegangen werden, während sich der Einfluss auf die Ketten in einer leicht erhöhten Unordnung im Bereich der mittleren Segmente im Vergleich zum Reinlipid äußert.

Für die Probe mit der höchsten GP-Konzentration (20:1) ist in der Kopfgruppen- und Glycerolregion des Spektrums nur eine geringe, weitere Verschiebung der Signale zu kleineren ppm-Werten detektierbar (s. Tab. 6.1(a)). Auch das Alkylkettensignal der mittleren Segmente zeigt kaum eine Änderung seiner Position (s. Abb. 6.7(b)). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine weitere, signifikante, konzentrationsabhängige

Tabelle 6.1.: Änderungen der chemischen Verschiebung, $\Delta\delta$, der Lipidresonanzen in Anwesenheit von (a) GP und (b) FGP für die verschiedenen Konzentrationen.

(a) DMPC+GP				(b) DMPC+FGP			
C-Atom	$\Delta\delta$ / ppm			C-Atom	$\Delta\delta$ / ppm		
	150:1	60:1	20:1		150:1	60:1	20:1
γ	+0.06	+0.12	+0.10	γ	-0.13	+0.04	+0.18
β	+0.07	+0.15	+0.14	β	-0.10	+0.06	+0.21
α	-	+0.05	+0.03	α	-0.20	+0.03	+0.13
g ₃	-	+0.05	+0.05	g ₃	-0.20	-	+0.14
g ₂	+0.05	+0.12	+0.08	g ₂	-0.13	+0.03	+0.16
g ₁	-	+0.07	+0.05	g ₁	-0.19	-	+0.13
COO	-	-	-	COO	-0.19	-	+0.10
C ₂	-	+0.05	+0.04	C ₂	-0.20	+0.03	+0.13
C ₃	-0.07	-	-	C ₃	-0.27	-	+0.12
C ₄₋₁₁	-0.21	-0.20	-0.19	C ₄₋₁₁	-0.47	-	-0.02
C ₁₂	-0.11	-0.07	-0.09	C ₁₂	-0.34	-	+0.04
C ₁₃	-0.09	-0.04	-0.06	C ₁₃	-0.31	-	+0.05
C ₁₄	-0.04	+0.02	-	C ₁₄	-0.25	+0.02	+0.10

Konformationsänderung durch den Einbau einer größeren Anzahl an GP-Molekülen stattfindet. Interessanterweise verhält sich die Phasenumwandlungstemperatur von DMPC in Anwesenheit des GP genau entgegengesetzt. Die größte Änderung findet sich dort bei hohen Polymerkonzentrationen (s. Abb. 6.4(a)). Da die Änderungen in den NMR-Spektren gering sind, wird angenommen, dass diese gemessenen Signalverschiebungen ebenfalls das Ergebnis unterschiedlicher Einflüsse widerspiegeln, d.h., es Bereiche mit starker und mit schwacher Wechselwirkung gibt. Es ist aber auch möglich, dass verschiedene Probenpräparationsweisen unterschiedliche Wechselwirkungen induzieren. Dabei wird ein Anlagerung der Polymermoleküle an die Oberfläche der Doppelschicht begünstigt, wenn das Polymer zu vorpräparierten Vesikeln hinzugegeben wird. Der membranüberspannende Einbau ist jedoch für eine gemeinsame Präparation wahrscheinlicher [32, 261].

Für das unfluorierte Polymer, GP, zeigte sich somit insgesamt eine zunehmende Ordnung im Bereich der Kopfgruppe und dem Übergangsbereich zu den hydrophoben Alkylketten, sowie im Kettensegment C₂. Dies spricht für eine Wechselwirkung im Bereich der polaren Region der Doppelschicht. Eine Änderung der Orientierung bei einem Teil der Kopfgruppe ist auch bei PEO in orientierten Lipidmembranen bekannt [262]. Das geschieht dadurch, dass die PEO-Ketten nur bis zu einer bestimmten Tiefe in die Membran eindringen und damit die Orientierung der Kopfgruppen verändern. Dies ist in den vorliegenden Proben ebenfalls möglich. Der Unterschied für die hier verwendeten Polymere besteht darin, dass die hydrophile Gruppe vom PGMA gebildet wird, welche im Vergleich zu PEO etwas verzweigter ist und damit mehr Volumen einnimmt [35]. Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften kann angenommen werden, dass die PGMA-Blöcke im hydrophilen Teil der Doppelschicht eingelagert werden und Wasserstoffbrückenbindungen zu den Lipidmolekülen in der Kopfgruppenregion bzw. im Bereich der Glyceroleinheit ausbilden. Dies führt zu einer leichten Konformationsänderung in diesem Bereich der Doppelschicht und kann dadurch auch die Konformation der obersten Alkylkettensegmente beeinflussen. Diese Wechselwirkung nimmt für eine höhere Polymerkonzentration zunächst zu, bleibt aber für weiter steigende Konzentrationen gleich. Gleichzeitig entsteht im Bereich der Alkylketten mehr Unordnung durch den Einbau der Polymermoleküle.

Etwas anders verhält es sich, wenn das Lipid mit dem fluorierten Polymer, FGP, gemischt wird. Schon bei geringer FGP-Konzentration ist in der Kopfgruppe und der Glyceroleinheit eine Rechtsverschiebung aller Signale zu erkennen (s. Tab. 6.1(b)). Eine Verschiebung der Signale zu kleineren ppm-Werten deutet auf eine zunehmende Unordnung im Bereich der Kopfgruppe hin. Der gleiche Trend ist auch in den Alkylketten der Lipidmoleküle sichtbar (s. Tab. 6.1(b)). Beim Vergleich der Spektren der beiden Polymere in derselben Konzentration im Lipid kann ein größerer Einfluss des FGP festgestellt werden. Auch für FGP kann ein Einbau in die Membran angenommen werden, welcher für geringe Konzentrationen zunächst Unordnung, wahrscheinlich in Form von Defekten, in der Membran verursacht.

Für die 60:1-Mischung aus FGP und DMPC ist ersichtlich, dass die Signale sich im Vergleich zur 150:1-Mischung für die steigende Polymerkonzentration in die entgegengesetzte Richtung verschoben haben (s. Tab. 6.1(b)). Es scheint bei dieser FGP-Konzentration nur einen sehr geringen Einfluss auf die Kopfgruppensignale zu geben. Die gleiche Schlussfolgerung könnte auch für die Alkylketten getroffen werden, wenn nur diese Spektren zur Verfügung stehen würden. Im Zusammenhang mit der niedrigeren FGP-Konzentration kann dieses Verhalten der Signale jedoch anders gedeutet werden. Die Lipidmoleküle in der 60:1-Mischung weisen zwar offenbar fast keine Konformationsänderung im Vergleich zum reinen DMPC auf, befinden sich aber in einer veränderten Konformation im Vergleich zur 150:1-Mischung. Die Linksverschiebung der Signale in der 60:1-Mischung deutet darauf hin, dass die Lipidmoleküle durch eine größere Anzahl an FGP-Molekülen eine vergleichbare Ordnung/Unordnung wie im reinen DMPC aufweisen. Es zeigt sich jedoch eine größere Ordnung als für eine geringere Anzahl an Polymermolekülen. Mit zunehmender Polymerkonzentration könnte die Größe der Defekte in der Doppelschicht verringert sein und so zu etwas mehr Ordnung im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen führen.

Der Trend zunehmender Ordnung wird mit steigender FGP-Konzentration fortgesetzt (s. Tab. 6.1(b)). Alle Lipidsignale sind sowohl im Vergleich zum Reinlipid als auch im Vergleich zu der geringeren FGP-Konzentration weiter nach links verschoben und zeigen eine weiter erhöhte Ordnung der Lipidmoleküle an. Eine Ausnahme bildet das Signal der mittleren Kettensegmente $C_4 - C_{11}$, welches seine Position in der 20:1-Mischung nicht weiter verändert. Dies kann daran liegen, dass einige Bindungen ihre Konformation mehr zu trans ändern und andere mehr zu gauche, was im Mittel zu einer unveränderten Konformation in diesem Bereich der Alkylketten führt. Die Änderungen sind am deutlichsten im Bereich der Kopfgruppe, der Glyceroleinheit sowie der oberen Kettensegmente auszumachen. Auch die Methylgruppe der Alkylketten zeigt eine stärkere Konformationsänderung als in den geringeren Polymerkonzentrationen. Dies deutet auf eine zunehmende Wechselwirkung im Bereich der polaren Region der Lipidmoleküle hin. Die mittleren und unteren Kettensegmente sind hingegen nur gering von der zunehmenden Polymerkonzentration betroffen. Dass sich die Ordnung mit steigender FGP-Konzentration weiter erhöht, kann durch eine zunehmende Einlagerung der Fluorketten im Übergangsbereich zwischen hydrophilen und hydrophoben Teilen der Membran verursacht sein [263].

Auch für die Polymersignale zeigen sich leichte Änderungen der chemischen Verschiebung zu größeren Werten im Vergleich zwischen reinen Polymerproben und den Mischungen. Dies deutet ebenfalls auf eine veränderte Konformation der Polymermoleküle durch die Wechselwirkung mit der Membran hin.

Mit Hilfe der hier dargestellten Kohlenstoffspektren für die verschiedenen Mischungen aus DMPC und GP bzw. FGP konnte der Einfluss der beiden Polymere auf die molekulare Konformation gezeigt werden. Es zeigt sich, dass durch den Einbau des GP (bis zu einem molaren Verhältnis von ca. 60:1) die Ordnung im Bereich der Kopfgruppe und Glycero-

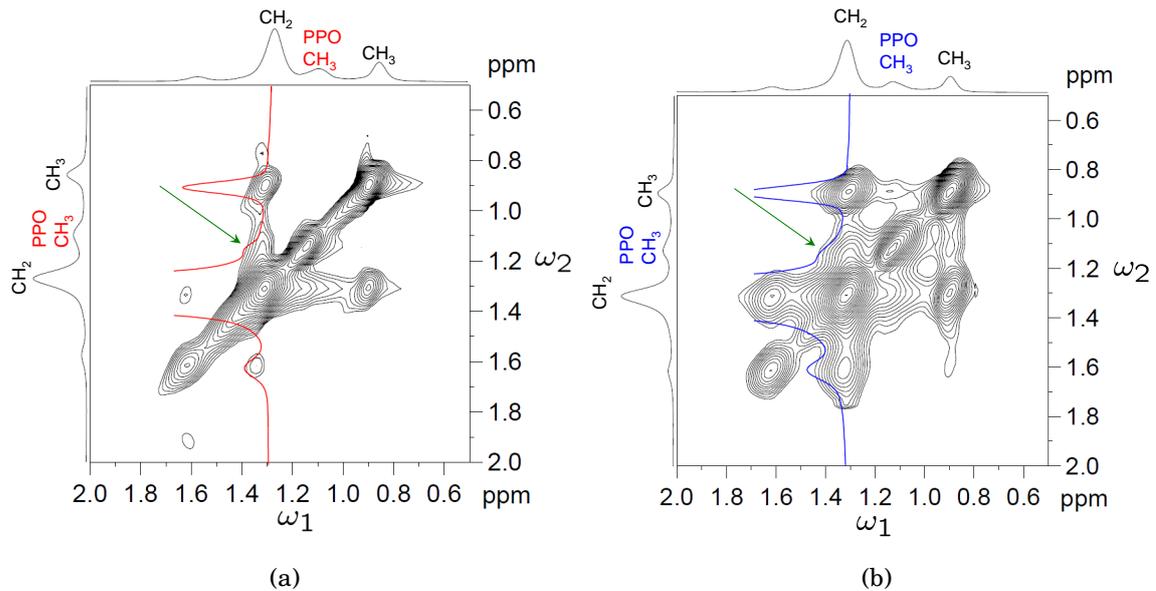


Abbildung 6.8.: Ausschnitt aus den 2D-NOESY-Korrelationsspektren für (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP mit einer Konzentration von 20:1. Zur Verdeutlichung ist der Schnitt entlang der ω_1 -Dimension durch das Signal der CH_2 -Kette des Lipids bei ca. 1.3 ppm gezeigt. Jeweils rechts am Autokorrelationssignal befindet sich eine Schulter (s. Pfeil), die der Korrelation zum PPO-Methylsignal entspricht (Basislevel für die Konturen ist 5% des CH_2 -Autopeaks, $T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 4\text{ kHz}$, $t_{\text{mix}} = 200\text{ ms}$).

leinheit zunimmt und im Bereich der Alkylketten abnimmt. Eine weitere Erhöhung der Anzahl der GP-Moleküle in der Doppelschicht führt zu keiner weiteren Änderung der Konformation in den Lipidmolekülen. Beim Einbau des fluorierten FGP zeigt sich zunächst eine durch das Polymer induzierte Unordnung in der Doppelschicht und nachfolgend eine zunehmende Tendenz zur erhöhten Ordnung in allen Bereichen der Lipidmoleküle mit ansteigender Polymerkonzentration. Insgesamt ist der Effekt, welcher durch das FGP in der Membran hervorgerufen wird etwas größer als der des GP, was zweifellos durch die fluorierten Ketten des FGP bedingt ist.

2D-NOESY-Spektren der Polymer-Lipid-Mischungen Die Kohlenstoffspektren der untersuchten Polymer-Lipid-Mischungen weisen auf einen Einbau der Polymermoleküle in die Lipiddoppelschicht hin (s. oben). Da die Änderungen in den Spektren jedoch gering sind, soll der mögliche Einbau mit Hilfe des 2D-NOESY Experiments (s. Anhang C.5) genauer untersucht werden. Ausschnitte aus den gemessenen 2D-NOESY-Spektren für die 20:1-Mischungen aus DMPC+GP und DMPC+FGP sind in Abb. 6.8 exemplarisch dargestellt. Für die anderen Konzentrationen ist das Signal der PPO-Methylgruppe sehr viel kleiner, so dass auch vorhandene Kreuzsignale eine geringere Intensität aufweisen, und daher für eine genaue Analyse weniger geeignet sind (zugehörige Graphen s. Anhang C.5). Es handelt sich bei den Abbildungen um Ausschnitte aus dem gesamten Spektrum, um den interessierenden spektralen Bereich deutlicher darzustellen. Wie schon erläutert, gibt es wegen des geringen spektralen Bereiches der Protonen sehr viele Überlagerungen von Lipid- und Polymerresonanzen (s. Abb. 6.5). Daher existieren auch im NOESY-Korrelationsspektrum der Polymer-Lipid-Mischungen verschiedene Kreuzsignale, die aber auf Grund der Überlagerungen nicht eindeutig interpretiert werden können. Das einzige isolierte Signal der Polymerproben ist das der PPO-Methylgruppe bei ca. 1.1 ppm. In beiden Korrelationsspektren kann ein Kreuzsignal zwischen der Alkylkette des Lipids

(bei ca. 1.3 ppm) und der PPO-Methylgruppe des jeweiligen Polymers gefunden werden. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 6.8 ein Schnitt entlang der indirekten Dimension, ω_1 , enthalten. Diese Kurve zeigt ein Signal mit sehr großer Intensität, welches der Autokorrelation der Lipid-CH₂-Gruppe entspricht. Auf Grund der großen Intensität dieses Autopeaks ist es schwierig, die geringe Intensität des Kreuzsignals auszumachen. Die Schulter an diesem Autokorrelationssignal der CH₂-Kette des Lipids lässt die Korrelation zwischen beiden Molekülspezies erkennen (s. Pfeile in Abb. 6.8). Dieses Kreuzsignal zeigt, dass zwischen der CH₂-Gruppe des Lipids und der Methylgruppe des PPO-Blockes am Polymer während der Mischzeit Polarisation ausgetauscht wurde. Dies weist auf räumliche Nähe und somit einen Einbau der Polymermoleküle in die Lipidmembran hin [264, 265]. Dass dieses Kreuzsignal eine so geringe Intensität besitzt, kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich vermutlich nur um schwache und/oder nicht ständige Kontakte zwischen diesen beiden Molekülen handelt. Dies ist vor allem auch durch die dynamischen Eigenschaften der Lipidmoleküle in der Doppelschicht bedingt. Diese besitzen keine feste Position, sondern durch die ständigen Molekülbewegungen in der Membran nur eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit in transversaler Richtung [61, 62]. Dadurch ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um eine schwache Wechselwirkung, vermutlich durch vorübergehende Kontakte zwischen Polymer und Lipid, handelt.

Anhand dieser Messung ist nicht eindeutig zu klären, ob das Kreuzsignal durch den Mechanismus des NOE oder durch Spindiffusion verursacht wird. Beide Mechanismen beruhen auf der dipolaren Wechselwirkung, sind jedoch für die verwendete Mischzeit nur schwer unterscheidbar. In NOESY-Korrelationsspektren für reine Lipidproben konnten für vergleichbare Mischzeiten Kreuzsignale für die am weitesten entfernten molekularen Gruppen (Methylgruppen der Kopfgruppe und der Alkylketten) gefunden werden, für welche Spindiffusion als Ursache ausgeschlossen wurde. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass eine räumliche Nähe ($r < 5 \text{ \AA}$) zwischen den untersuchten Gruppen besteht [103, 266]. Weiterhin ist die Effizienz der Spindiffusion durch die hohe molekulare Mobilität reduziert [267]. Aus der Existenz des Kreuzsignals zwischen der Lipidalkylkette und der PPO-Methylgruppe in den gezeigten Spektren kann daher geschlossen werden, dass sich die Polymermoleküle nicht nur an der Membranoberfläche anlagern, sondern tatsächlich in die Membran eingebaut werden und dort mit den Lipidmolekülen, wenn auch schwach bzw. vorübergehend, wechselwirken.

6.2.2.2. Untersuchung der molekularen Dynamik der Polymer-Lipid-Mischungen

Recoupled DIPSHIFT-Messungen an Polymer-Lipid-Mischungen Da die Kohlenstoffspektren trotz der Überlappungen der Signale im Kopfgruppenbereich eine hohe Auflösung zeigen (s. Abb. 6.6), ist es möglich die Dynamik der Lipidmoleküle zu untersuchen. Dazu wurden Messungen mittels recoupled DIPSHIFT-Sequenz durchgeführt (s. Kap. 3.3) und daraus die heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen für die einzelnen Kohlenstoffatome im Lipid ermittelt. Die gemessenen Dephasierungskurven der Lipidmoleküle in der 20:1-Mischung aus DMPC und GP ist in Abb. 6.9 exemplarisch dargestellt. Die Kurven für die jeweiligen anderen Konzentrationen, sowie der Mischung mit FGP sind der Vollständigkeit wegen in Anhang C.2 eingefügt. Alle Kurven zeigen qualitativ den gleichen Verlauf. Für die meisten Dephasierungskurven ist auch hier eine gute Übereinstimmung der Messdaten mit der Fitfunktion zu erkennen. Am größten sind die Abweichungen, wie in allen anderen Proben bisher (s. Kap. 4.2.1 und 5.2.2.3), für den Anfangsbereich der Alkylketten der Lipidmoleküle sowie das Glycerol-*g*₃-Kohlenstoff. Analog zu den vorherigen Ergebnissen dieser Art, kann die Abweichung mit Hilfe einer Verteilung von dipolaren Restkopplungen für die einzelnen Kohlenstoffatome begründet werden [195–197]. Beim

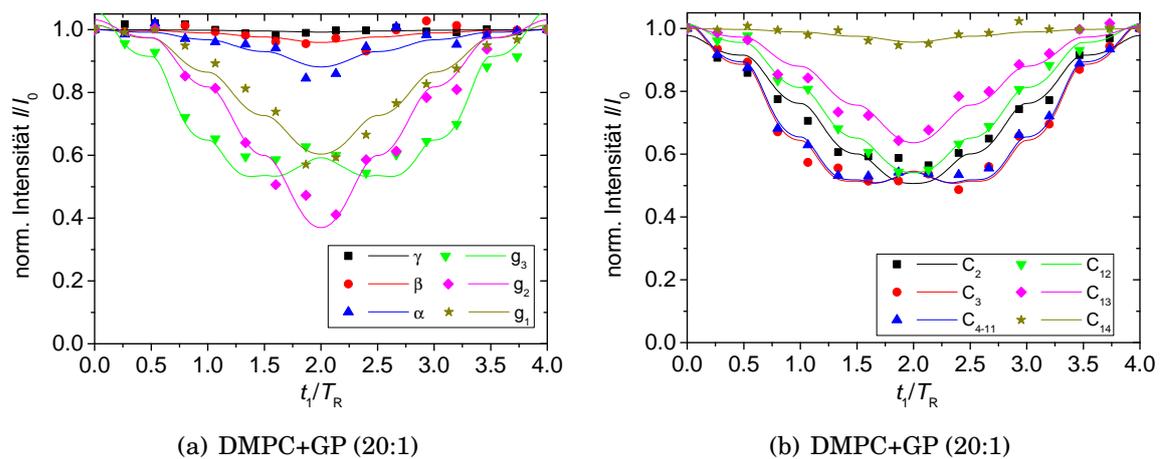


Abbildung 6.9.: Dephasierungskurven für (a) Kopfgruppe und Glyceroleinheit und (b) die Alkylketten der Lipidmoleküle in der 20:1-Mischung mit GP gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$).

Vergleich der Kurven des Lipids in Wechselwirkung mit den beiden Polymeren, kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass sich die mittlere dipolare Restkopplung der Lipidmoleküle durch die Wechselwirkung mit den beiden Polymeren, GP und FGP, nicht wesentlich unterscheidet. Dies ist ebenfalls anhand der aus den heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen berechneten Ordnungsparameter ersichtlich (s. Tab. 6.2). Zur besseren Übersicht sind die Ordnungsparameter der Lipidmoleküle für die verschiedenen Konzentrationen des unfluorierten und des fluorierten Polymers im Lipid im Vergleich zum reinen DMPC in Abb. 6.10 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass die Ordnungsparameter für die Mischungen aus DMPC und dem jeweiligen Polymer innerhalb der Fehlergrenzen mit denen für das reine DMPC übereinstimmen. Auch das Profil der ermittelten Ordnungsparameter entspricht dem des reinen Lipids. Es treten durch den Einbau der Polymermoleküle keine signifikanten Änderungen in der lokalen Lipiddynamik auf. Auch scheint es keine Abhängigkeit der ermittelten Ordnungsparameter von der Anzahl der Polymermoleküle in der Doppelschicht zu geben. Dies ist in Anbetracht der vorhandenen Polymermoleküle bemerkenswert. Aber auch andere Gastmoleküle, wie beispielsweise das oben erwähnte Pyridin, zeigten bei großer Anzahl in der Membran keinen Einfluss auf die schnelle Dynamik der Lipidmoleküle; auch die lamellare Phase der Membran blieb erhalten [259]. Ebenso unbeeindruckt zeigen sich die Ordnungsparameter der Lipidmoleküle davon, ob das Polymer eine zusätzliche, fluorophile Einheit trägt oder nicht. Trotz des Einbaus der Polymere in die Lipiddoppelschicht bleibt die Anisotropie der schnellen Lipiddynamik in den Mischungen mit den Polymeren erhalten.

Für die Mischungen mit dem höchsten Polymergehalt (20:1) waren die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse einzelner Polymersignale ausreichend, um auch diese Dephasierungskurven auszuwerten. Dabei wurde festgestellt, dass die Polymermoleküle eine (z.T. vollständig) ausgemittelte heteronukleare, dipolare Restkopplung besitzen und diese auch mit der wiedereingekoppelten recoupled DIPSHIFT-Sequenz nicht mehr erfassbar sind (s. Abb. 6.11). Die Mischung mit dem fluorierten Polymer lieferte die gleichen Resultate (s. Anhang D). Dies zeigt, dass die Polymerketten auch in der Lipidmembran eine nahezu isotrope Bewegung ausführen können, was eine relativ große Bewegungsfreiheit der Moleküle voraussetzt. Der Wert, welcher für das Signal „d“ des PGMA-Blockes ermittelt wurde, ist vermutlich ein wenig überschätzt, da dieses Signal etwas mit dem Glycerol- g_1 -Signal

Tabelle 6.2.: Ordnungsparameter S_{CH} für die Kohlenstoffatome im Lipidmolekül in der Mischung mit (a) GP und (b) FGP gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$) für die verschiedenen molaren Verhältnisse.

(a) DMPC+GP				(b) DMPC+FGP			
C-Atom	S_{CH}			C-Atom	S_{CH}		
	150:1	60:1	20:1		150:1	60:1	20:1
γ	0.01±0.01	0.01±0.01	0±0	γ	0±0	0.02±0.01	0.01±0.01
β	0.06±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	β	0.05±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01
α	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	α	0.07±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01
g_3	0.23±0.03	0.25±0.03	0.25±0.03	g_3	0.27±0.02	0.28±0.03	0.27±0.03
g_2	0.20±0.01	0.20±0.01	0.19±0.02	g_2	0.20±0.01	0.21±0.02	0.18±0.01
g_1	0.13±0.01	0.14±0.01	0.13±0.01	g_1	0.15±0.01	0.12±0.02	0.13±0.01
C_2	0.15±0.02	0.17±0.01	0.17±0.02	C_2	0.15±0.01	0.20±0.03	0.16±0.02
C_3	0.22±0.20	0.23±0.02	0.24±0.02	C_3	0.22±0.02	0.25±0.02	0.21±0.02
C_{4-11}	0.22±0.02	0.22±0.02	0.23±0.02	C_{4-11}	0.22±0.02	0.23±0.02	0.22±0.02
C_{12}	0.14±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	C_{12}	0.15±0.01	0.17±0.02	0.15±0.01
C_{13}	0.11±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	C_{13}	0.11±0.01	0.13±0.01	0.11±0.01
C_{14}	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	C_{14}	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01

überlappt und somit der Wert der ermittelten Restkopplung davon beeinflusst sein kann. Eine dichte Packung und eine daraus resultierende Immobilisierung sowohl der Lipid- als auch der Polymermoleküle kann auf Basis der hier erzielten Ergebnisse ausgeschlossen werden.

^1H -Doppelquanten-Messungen an den Polymer-Lipid-Mischungen Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, ist die Messung von Doppelquanten(DQ)-Aufbaukurven bei Systemen mit geringer Anisotropie gegenüber anderen Methoden vorzuziehen. Da mittels recoupled DIPSHIFT-Sequenz eine nahezu isotrope Bewegung der Polymermoleküle festgestellt wurde, bietet es sich an, über die homonukleare, dipolare Kopplung die vorhandene Bewegungsanisotropie der Polymermoleküle zu untersuchen. Die einzige Schwierigkeit stellt die Überlappung der Polymerresonanzen mit den Lipidsignalen dar (s. Abb. 6.5). Anhand der Protonenspektren wurde die Resonanz der PPO-Methylgruppe als einziges relativ isoliertes Signal mit ausreichend gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gefunden. Daher wurden die DQ-Aufbaukurven für diese Gruppe in den reinen Polymerproben und den verschiedenen Mischungen mit dem Lipid aufgenommen und ausgewertet (s. Anhang D).

Die DQ-Aufbaukurven, sowie die Referenzintensitäten für die untersuchten Mischungen aus DMPC und GP bzw. FGP sind in Abb. 6.12 dargestellt, ebenso wie die Aufbaukurven der reinen Polymere. Diese zeigen für die beiden reinen Polymerproben keine DQ-Intensität, was bedeutet, dass in den reinen Polymerproben für die PPO-Methylgruppe keine homonukleare, dipolare Restkopplung existiert. Es ist aus Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung bekannt, dass die Polymere der angegebenen Struktur in wässriger Lösung zu Mizellen mit einem hydrodynamischen Durchmesser kleiner als 30 nm aggregieren [268]. Die homonuklearen, dipolaren Kopplungen der PPO-Methylgruppe sind in den reinen Polymerproben wahrscheinlich durch isotrope Bewegungen der kleinen Aggregate (schnelle Rotationsdiffusion) vollständig ausgemittelt. Im Vergleich dazu ist für die Mischungen aus DMPC mit dem jeweiligen Polymer für alle Konzentrationen ein deutlicher DQ-Aufbau zu erkennen, auch, wenn die DQ-Intensitäten nur im Bereich von 10% und weniger liegen (s. Abb. 6.12). Das bedeutet, dass die PPO-Methylgruppe in den Mischungen mit dem Lipid eine messbare homonukleare, dipolare Restkopplung aufweist. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die PPO-Methylgruppe in einer

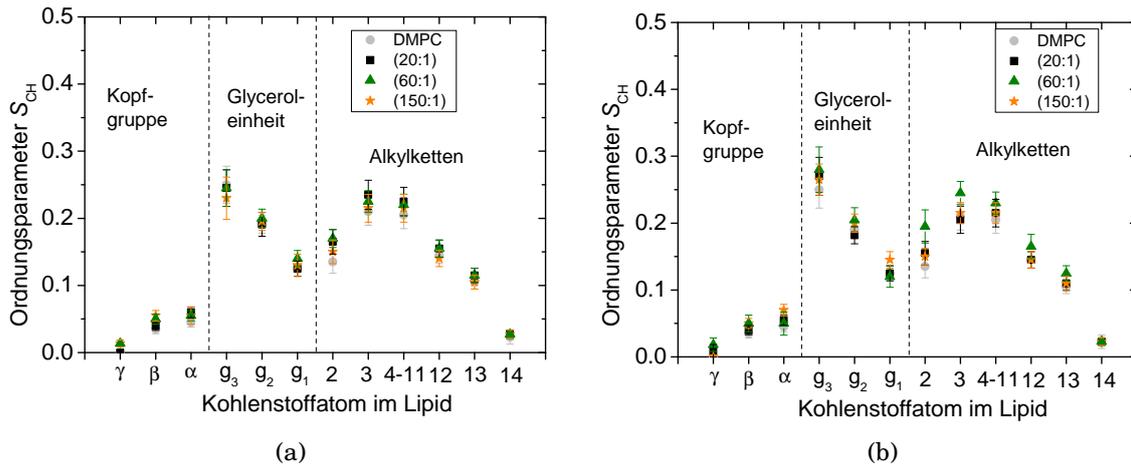


Abbildung 6.10.: Ordnungparameter S_{CH} der jeweiligen Kohlenstoffatome im Lipid in den Mischungen mit (a) GP und (b) FGP im Vergleich zum reinen DMPC ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$).

anisotropen Umgebung befindet und daher in ihrer Bewegung im Vergleich zur reinen Polymerprobe eingeschränkt ist. Da die Messung der heteronuklearen Dipolkopplung im recoupled DIPSHIFT-Experiment keine messbare Restkopplung ergeben hat, ist auch für die homonukleare Restkopplung ein eher geringer Wert zu erwarten.

Wegen der teilweisen Überlappung des PPO-Signals mit dem Signal der Alkylketten des Lipids, sind die ersten Punkte der DQ-Aufbaukurven stark vom Lipidsignal beeinflusst, denn ein Ausläufer dieses Signals liefert einen Beitrag zum Polymersignal (s. Abb. 6.5). Aus diesem Grund wurden die DQ-Aufbaukurven erst ab einer Evolutionszeit von $\tau_{DQ} = 2\text{ms}$ dargestellt und ausgewertet. Dies ist möglich, da das Lipidsignal bei dieser Evolutionszeit bereits um mehr als 90% abgefallen ist und beide Signale somit gut voneinander trennbar sind, wie in Abb. 6.13 anhand der DQ- und Referenzspektren für verschiedene Evolutionszeiten gezeigt. Es ist erkennbar, dass das Lipidsignal der Alkylkette (bei ca. 1.3 ppm) nach $\tau_{DQ} = 2\text{ms}$ so stark abgefallen ist, dass es das PPO-Methylsignal kaum noch beeinflusst. Das bedeutet, dass die Intensitäten für größere Evolutionszeiten maßgeblich durch das Polymer verursacht sind. Das Signal der Lipidalkylketten nimmt innerhalb der ersten 2ms so stark ab, dass das DQ-Signal der PPO-Methylgruppe zunehmend isoliert ist und somit ausgewertet werden kann (s. Abb. 6.13 (a) und (c)). Durch die vergleichsweise starke Restkopplung der Lipidalkylketten ist das Maximum des DQ-Aufbaus für diese Gruppe bereits nach vier Rotationsperioden, d.h. nach ca. 0.5ms überschritten und nimmt dann als Folge von Relaxationseffekten wieder ab. Die DQ-Aufbaukurve des PPO-Methylsignals besitzt ihr Maximum erst bei $\tau_{DQ} \approx 4\text{ms}$ (s. Abb. 6.12), d.h. bei 32 Rotationsperioden, was ebenfalls auf eine verhältnismäßig schwache homonukleare, dipolare Restkopplung hindeutet.

Wie erwähnt, wird die Referenzintensität für Evolutionszeiten $\tau_{DQ} \gtrsim 2\text{ms}$ hauptsächlich durch das Polymer hervorgerufen. Diese fällt auch für große Evolutionszeiten nicht auf Null ab, was durch isotrope Anteile in der Probe verursacht wird, welche vermutlich hauptsächlich vom Polymer stammen. Durch die isotropen Bewegungen der Polymermoleküle werden die dipolaren Kopplungen ausgemittelt, so dass vorhandene Relaxationen auf einer sehr langen Zeitskala stattfinden und so das Signal über einen langen Zeitbereich erhalten bleibt. Da der isotrope Anteil für die Bestimmung der Restkopplung nicht mit einbezogen werden darf, wurden die Referenzintensitäten um diesen Beitrag korrigiert und die korrigierten Intensitäten zur Normierung der DQ-Aufbaukurven verwendet (s. Kap. 3.4). Die Anpassung der isotropen Anteile ist Abb. 6.12 gezeigt. Die Normierung

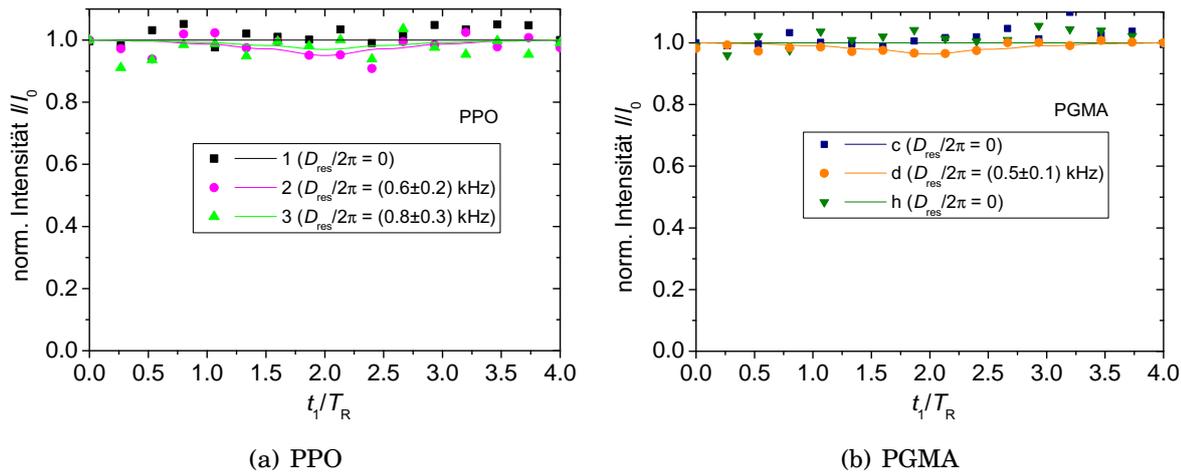


Abbildung 6.11.: Dephasierungskurven der einzelnen Copolymerblöcke: (a) PPO und (b) PGMA für GP in der 20:1-Mischung mit DMPC ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{kHz}$). Die ermittelten heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen sind ebenfalls angegeben und weisen auf eine nahezu isotrope Mobilität der Polymermoleküle in den Mischungen hin.

ergibt die DQ-Aufbaukurven für die untersuchten Proben, wie sie in Abb. 6.14 dargestellt sind. Für die Auswertung der DQ-Aufbaukurven aus den jeweiligen Spektren ergibt sich wegen der Überlappung des PPO-Methylsignals mit dem Signal der Lipidalkylkette ein systematischer Fehler. Einzelheiten zur Vorgehensweise der Datenauswertung sind in Anhang D zu finden.

Die normierten DQ-Aufbaukurven isolierter Methylgruppen besitzen ihren Plateauwert wegen der Gleichverteilung der Intensitäten auf alle Kohärenzordnungen idealerweise bei $1/3$ [269]. Liegt das gemessene Plateau höher, kann vom Einfluss zusätzlicher dipolarer Kopplungen zu entfernteren Protonen ausgegangen werden, welche zur DQ-Intensität beitragen. Auch in Messungen der homonuklearen, dipolaren Restkopplung der Methylgruppe des Polymer PDMS konnte dieser Einfluss gefunden werden. Die Messung ergab, dass der Fehler im Ordnungsparameter durch den Einfluss umgebender Spins maximal 25% beträgt [269]. Auch die in dieser Arbeit gemessenen, normierten DQ-Aufbaukurven zeigen einen abweichenden Plateauwert, was auf den Einfluss zusätzlicher Kopplungen in den Polymerproben schließen lässt.

Aus den normierten DQ-Aufbaukurven kann mittels geeigneter Datenanpassung [141] die homonukleare, dipolare Restkopplung für die PPO-Methylgruppe in den Proben ermittelt werden. Auch hier wurde eine Gauß-Verteilung von dipolaren Kopplungskonstanten angenommen [141]. Weiter ist zu bemerken, dass im Anfangsteil der Kurven die Punkte für $\tau_{\text{DQ}} < 2\text{ms}$ nicht mit in die Anpassung einbezogen wurden, da diese sehr stark vom Lipidsignal beeinflusst sind. Dennoch ergibt die Auswertung der Daten ein stabiles Endergebnis. Dafür wurden für jede der verschiedenen Proben die DQ-Aufbaukurven mehrfach gemessen und unter verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet (s. Anhang D). Aus all diesen Messungen wurde für jede Probe ein statistischer Mittelwert für die Restkopplung und die Verteilungsbreite der verschiedenen Auswertungen gebildet, wobei die Streuung der Werte als jeweiliges Fehlerintervall angenommen wurde (s. Tab. 6.3). Es ist deutlich, dass die ermittelten homonuklearen, dipolaren Restkopplungen sehr gering sind, vergleichbar mit denen von Elastomeren, d.h. von Polymerketten zwischen zwei Vernetzungspunkten [135]. Diese geringen Restkopplungen erklären auch, warum es mittels der recoupled DIPSHIFT-Sequenz nicht möglich war, die entsprechenden heteronuklearen Dipolkopplungen zu bestimmen, da diese ebenfalls sehr klein sind und somit schon

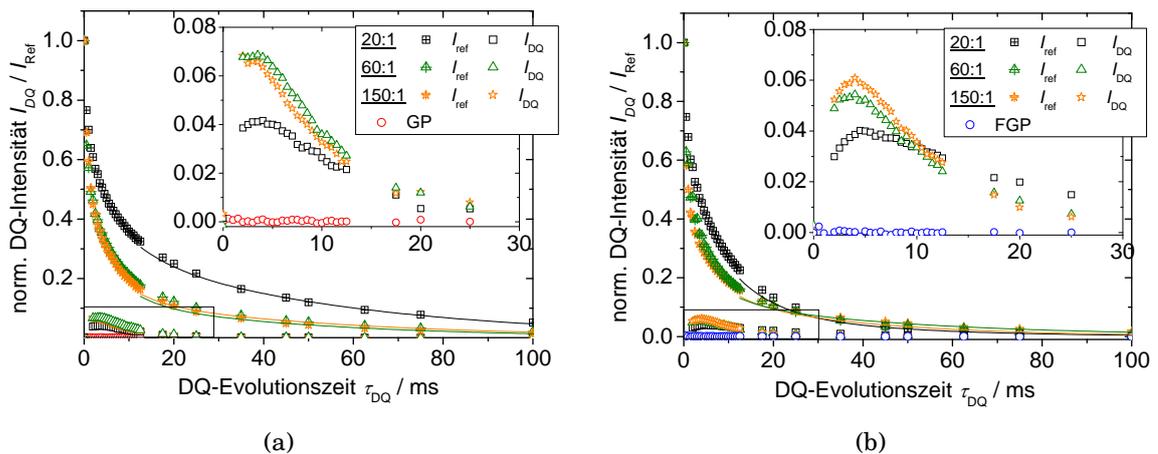


Abbildung 6.12.: Exemplarische 1H -DQ-Aufbaukurven und Referenzintensitäten für die Mischungen aus DMPC und (a) GP, sowie (b) FGP in den verschiedenen Konzentrationen. Die DQ-Aufbaukurven für die reinen Polymere sind ebenfalls aufgetragen ($T = 40^\circ C$, $\nu_R = 8\text{ kHz}$). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung des isotropen Anteils in der Referenzintensität der jeweiligen Probe. Die Anfangsbereiche der Graphen sind vergrößert dargestellt.

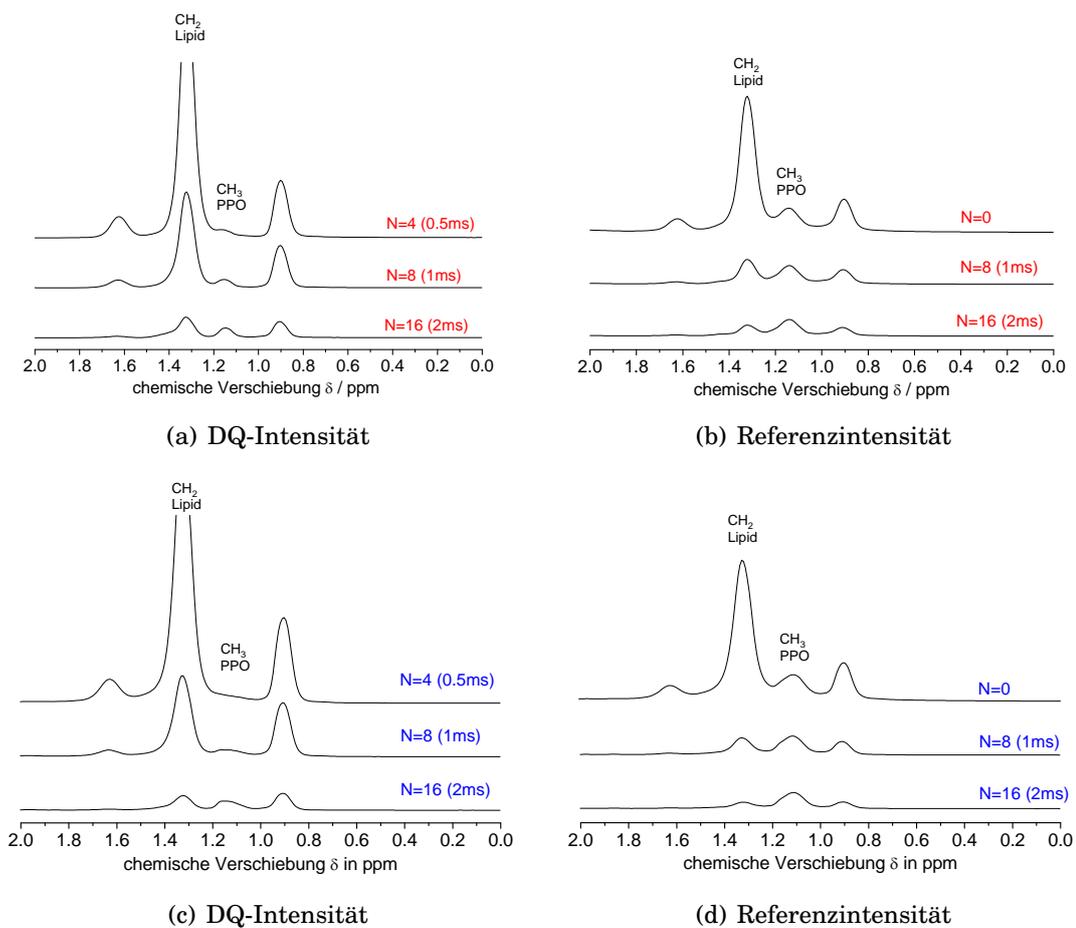


Abbildung 6.13.: (a) 1H -DQ-Spektren und (b) DQ-Referenzspektren für DMPC+GP, sowie (c) 1H -DQ-Spektren und (d) DQ-Referenzspektren für DMPC+FGP bei verschiedenen Evolutionszeiten $\tau_{DQ} = NT_R$, jeweils für die Konzentration 20:1 ($T = 40^\circ C$, $\nu_R = 8\text{ kHz}$).

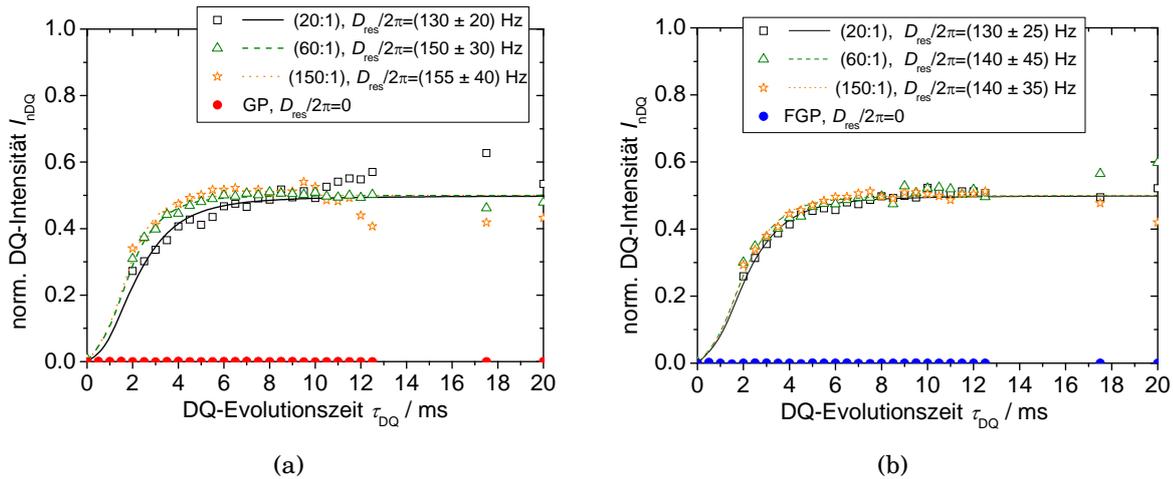


Abbildung 6.14.: Normierte DQ-Aufbaukurven der PPO-Methylgruppe für die Mischungen aus (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP, sowie die zugehörigen Datenanpassungen mit den daraus ermittelten homonuklearen, dipolaren Restkopplungen ($T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 8\text{kHz}$). Die DQ-Aufbaukurven für die reinen Polymerproben sind zum Vergleich mit dargestellt (Daten einer Messung). Die angegebenen Restkopplungen sind die aus allen Messungen errechneten Mittelwerte.

außerhalb des Empfindlichkeitsbereichs der Methode liegen. Die für die Polymerproben bestimmten, homonuklearen Restkopplungen stimmen für die verschiedenen Konzentrationen an Polymer im Lipid innerhalb ihrer Fehlerintervalle überein (s. Tab. 6.3). Die Wechselwirkung zwischen Polymer-PPO-Block und Lipidmolekülen im hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht scheint daher nicht von der Menge an vorhandenem Polymer abzuhängen. Dies führt zu der Annahme, dass die Wechselwirkung dieser Gruppe am hydrophoben Block der Polymere in den verschiedenen Probensystemen gleich ist. Weiterhin kann für den Vergleich zwischen GP und FGP in der Membran geschlossen werden, dass auch die Fluorierung für die Wechselwirkung der PPO-Methylgruppe mit der Membran keine Rolle spielt, so dass daraus eher eine Wechselwirkung der fluorierten Blöcke im Bereich der Kopfgruppe bzw. der Glyceroleinheit vermutet wird.

Wie beschrieben, wurde aus den Referenzintensitäten der isotrope Anteil in der Probe bestimmt und von der gesamten Intensität abgezogen, um eine korrekte Normierung zu benutzen (s. Kap. 3.4). Wird der isotrope Anteil von der Gesamtintensität abgezogen, ergibt sich die absolute Summenintensität, SMQ_{iso} , welche nur noch anisotrope, d.h. dipolar gekoppelte Probenanteile beinhaltet (s. Abb. 6.15). Dabei ist zu beachten, dass sowohl das Lipid als auch das Polymer zu dieser Summenintensität beitragen. Die Datenanpassung der absoluten Summenintensitäten mittels bi-exponentieller Funktion liefert zwei verschiedene Beiträge und Relaxationszeiten, wobei die kürzere Relaxationszeit dem Lipidanteil zugeordnet wird und die längere dem Polymeranteil (s. Abb. 6.15). Natürlich liegen die beiden ermittelten Komponenten in ihren Relaxationszeiten eng beieinander und eine exakte Trennung der Komponenten ist schwierig, jedoch stimmen die ermittelten Werte gut mit den Beobachtungen der Signalabnahmen in den Spektren (s. Abb. 6.13) überein, so dass die Annahme zweier Komponenten mit unterschiedlichen Relaxationszeiten damit begründet werden kann. Es ist zu erkennen, dass in den verschiedenen Konzentrationen von Lipid und Polymeren die Anteile der Polymermoleküle unterschiedlich groß sind. So zeigt sich für die dargestellte Messung in Abb. 6.15 für die beiden 20:1-Mischungen ein Polymeranteil von 12% für GP bzw. 14% für FGP, in den 60:1-Mischungen betragen die Anteile für GP 24%, für FGP 18% und in den 150:1-Mischungen

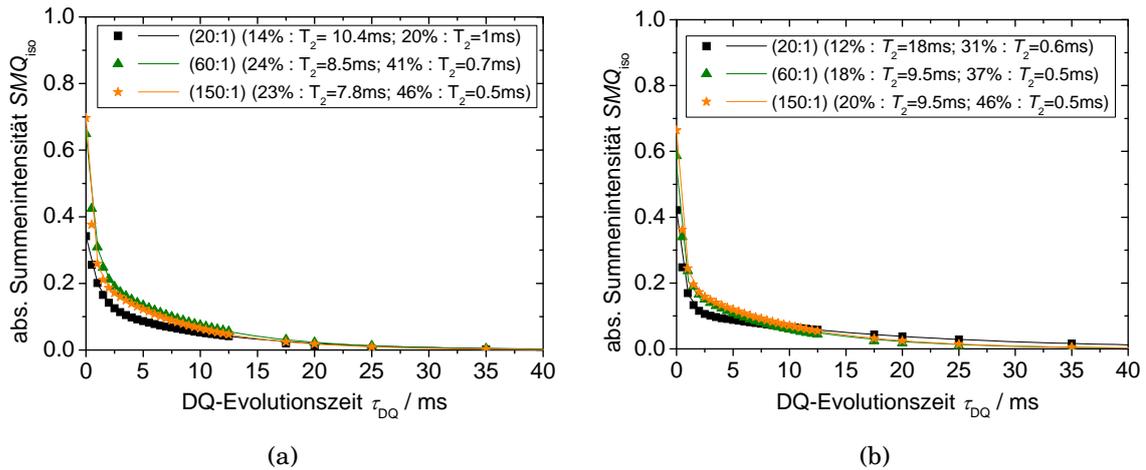


Abbildung 6.15.: Exemplarische Darstellung der absoluten Summenintensitäten als Funktion der DQ-Evolutionszeit für (a) DMPC+GP, (b) DMPC+FGP in den untersuchten Konzentrationen mit den zugehörigen Datenanpassungen an die Kurven und den daraus erhaltenen Ergebnissen für die beinhalteten Anteile aus Polymer und Lipid.

Tabelle 6.3.: Dipolare Restkopplungen $D_{res}/2\pi$, Verteilungsbreiten $\sigma/2\pi$ und Anteile an anisotrop beweglichem Polymer (PPO) f_{ansio} für die Polymere GP bzw. FGP in den verschiedenen Mischungen mit DMPC.

(a) GP				(b) FGP			
mol. Verh.	$D_{res}/2\pi$ /Hz	$\sigma/2\pi$ /Hz	f_{ansio} /%	mol. Verh.	$D_{res}/2\pi$ /Hz	$\sigma/2\pi$ /Hz	f_{ansio} /%
20:1	130±20	45±20	18±5	20:1	130±25	45±20	16±5
60:1	150±30	40±15	43±5	60:1	140±45	45±35	30±5
150:1	155±40	45±30	39±5	150:1	140±35	35±25	37±5

sind es 23% für GP bzw. 20% für FGP. Aus dem Fit der gesamten Summenintensität wurde der Anteil des Polymers (PPO) bestimmt, welcher anisotrop mobil ist. Außerdem stammt der isotrop mobile Beitrag im Summensignal ebenfalls von PPO-Molekülen. Wird der Anteil an anisotropem PPO auf die Summe der einzelnen PPO-Anteile (isotrop + anisotrop) bezogen, kann der Anteil des anisotropen PPO insgesamt berechnet werden:

$$\text{Anteil anisotropes PPO} = \frac{\text{Anteil PPO in } SMQ_{iso}}{\text{Gesamtanteil PPO}} \quad (6.1)$$

Am Beispiel der 20:1-Mischung aus DMPC und GP wird dieser Anteil wie folgt berechnet. Der anisotrope Anteil in der Probe beträgt in dieser Mischung ca. 34% (s. Abb. 6.15), woraus folgt, dass ca. 66% der Moleküle (hauptsächlich PPO) isotrop mobil sind. Aus der Datenanpassung der absoluten Summenintensität, SMQ_{iso} , ergibt sich ein Beitrag des PPO im anisotropen Teil der Mischung von ca. 14% (s. Abb. 6.15). Insgesamt liegt der Anteil des PPO somit bei 80%. Mit Hilfe von Gleichung (6.1) wird der Anteil an anisotrop mobilem PPO damit zu ca. 18% bestimmt. Die sich für die verschiedenen Proben ergebenden Beiträge an anisotrop mobilen PPO-Blöcken in GP bzw. FGP sind in Tabelle 6.3 angegeben. Dabei ist zu erkennen, dass in den Proben mit der höchsten Polymerkonzentration weniger PPO anisotrop mobil ist, als für geringere Polymerkonzentrationen. Für die Proben mit GP und FGP in der jeweils gleichen Konzentration ergeben sich

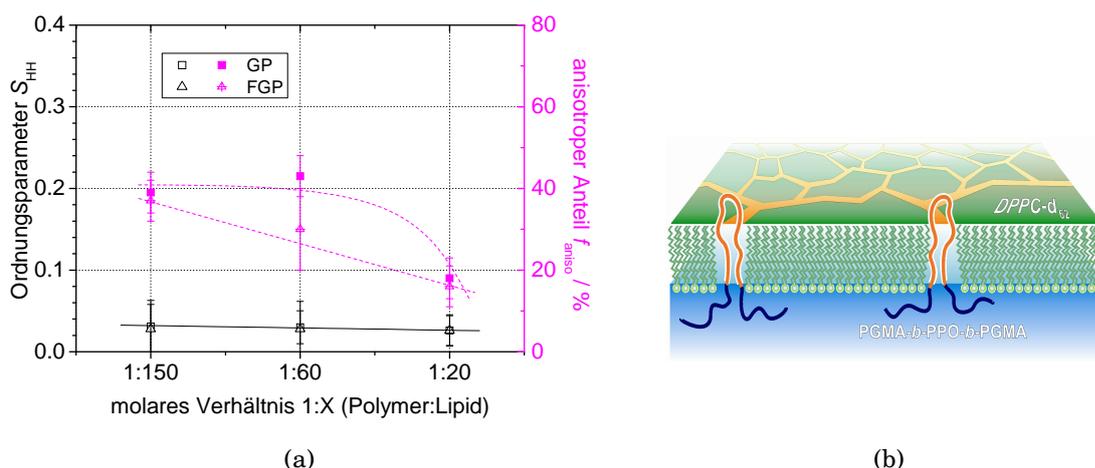


Abbildung 6.16.: (a) Ordnungsparameter und Anteil an anisotrop beweglichem Polymer für GP bzw. FGP in DMPC in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis in den unterschiedlichen Proben. Die eingezeichneten Linien sollen den Trend verdeutlichen. (b) Modell zur molekularen Organisation der Polymermoleküle in Lipidmonoschichten (aus [270]).

ungefähr die gleichen Anteile an anisotrop mobilen PPO-Gruppen. Die 60:1-Mischung aus DMCP und GP weist im Vergleich zur Mischung mit FGP einen etwas größeren Anteil an anisotrop mobilem PPO auf. Für das unfluorierte Polymer ergibt sich somit der größte Anteil an anisotrop mobilem PPO für die mittlere Polymerkonzentration, während sich im fluorierten Polymer der Anteil mit abnehmender Polymerkonzentration erhöht.

Aus den ermittelten homonuklearen, dipolaren Restkopplungen können die Ordnungsparameter für die PPO-Methylgruppe in den verschiedenen Polymerproben berechnet werden (s. Kap. 2.3.2.2), welche in Abb. 6.16(a) zusammen mit dem Anteil an anisotrop mobilem PPO dargestellt sind. Als Referenzkopplung für die Methylgruppe wurde der Wert $D_{Ref} = 4.5 \text{ kHz}$ gewählt. Ausgehend von einer statischen, homonuklearen Dipolkopplung von ca. 18 kHz [85] wird dieser Wert einerseits durch die schnelle Rotation der Protonen der CH_3 -Gruppe (s. Kap. 3.2) um den Ordnungsparameter 0.5 reduziert [147]. Andererseits rotiert die gesamte Methylgruppe in einem Winkel von 90° um das Polymerrückgrat, was wiederum zu einer Reduzierung der Dipolkopplung um einen Ordnungsparameter von 0.5 führt [269]. Diese beiden Bewegungsgeometrien wurden somit für in der Auswertung für die Methylgruppen bereits berücksichtigt.

Die sehr kleinen Ordnungsparameter verdeutlichen eine nahezu isotrope Bewegung der PPO-Moleküle. Der Vergleich aller Ordnungsparameter für die Probensysteme und die verschiedenen Konzentrationen an Polymer im Lipid zeigt, dass der Ordnungsparameter der PPO-Methylgruppe für alle untersuchten Proben im Rahmen der Fehlertoleranzen gleich ist (s. Abb. 6.16(a)). Dies weist darauf hin, dass die Wechselwirkung der PPO-Methylgruppe im hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht für die untersuchten Polymere unabhängig von der Anzahl an vorhandenen Polymermolekülen ist. Wie der Anteil an anisotrop mobilen PPO-Gruppen in den verschiedenen Proben zeigt, findet die Wechselwirkung vermutlich nur mit einem Teil der Polymere statt, welche in den Mischungen mit dem Lipid in eingeschränkter Umgebung vorliegen. Die Zahlen in Tabelle 6.3 verdeutlichen, dass nicht notwendigerweise mehr Polymermoleküle in der Lipiddoppelschicht wechselwirken, wenn mehr zur Verfügung stehen. Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ergeben sich unterschiedliche Erklärungsansätze für den Anstieg des isotrop mobilen PPO mit zunehmender Polymerkonzentration. Einerseits ist es möglich, dass Polymermoleküle nur bis zu einer gewissen Konzentration eingebaut werden und die

übrigen Polymermoleküle außerhalb der Lipiddoppelschicht separierte Domänen bilden, die zum größten Teil aus Polymer bestehen. Die eingebauten Polymermoleküle wechselwirken mit der Membran, während die Polymerdomänen (vermutlich Mizellen) isotrope Bewegungen in der wässrigen Suspension ausführen. In Mischungen von Lipiden und so genannten Lipopolymeren zeigt das DSC-Thermogramm eine Phasenseparation bei hohen Lipopolymerkonzentrationen [257]. Diese wird damit erklärt, dass die lamellare Struktur der Membran aufbricht und anschließend lamellare und mizelläre Phasen koexistieren. Dies ist auch bei den hier verwendeten Probensystemen denkbar, wobei jedoch die Fluoreszenzmessungen an GUVs eine intakte Membranstruktur trotz erhöhter Permeabilität zeigten [52]. Dies kann zum Beispiel darin begründet sein, dass die Poren/Defekte so klein sind, dass sie nicht detektiert werden können, wie es im Fall eines amphiphilen Polymers (Poloxamer F127) gefunden wurde [271]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es sich um transiente Poren handelt. So bildet das Poloxamer P85 in der Membran solch transiente Poren aus, welche innerhalb weniger Minuten „heilen“ [37]. Es ist natürlich möglich, dass die unterschiedlichen Präparationsweisen unterschiedliche Wechselwirkungen in den verschiedenen Proben bedingen. Es wurde gezeigt, dass sich die Polymermoleküle eher in die Membran (in durchspannender Konformation) einbauen, wenn Lipid und Polymer zusammen präpariert werden [261]. Das nachträgliche Hinzugeben der Polymermoleküle zu vorpräparierten Lipidvesikeln begünstigt hingegen eine Anlagerung an bzw. das Ein- und Austreten der Polymermoleküle auf derselben Seite der Membranoberfläche, was einen Vergleich verschiedener Untersuchungen mit unterschiedlicher Probenpräparation schwierig macht.

Eine zweite Möglichkeit ist die Domänenbildung wie sie in [270] vorgeschlagen wurde. Aus Experimenten an Lipidmonoschichten mit GP wurde ein Modell für die molekulare Organisation von Lipid- und Polymermolekülen angenommen, in welchem die Lipidmoleküle in Clustern vorliegen, die von einem Netzwerk an Polymermolekülen umgeben sind (s. Abb. 6.16(b)) [270]. Beim Übertragen dieses Modells auf Lipiddoppelschichten kann ein ähnliches Bild angenommen werden, wobei sich die Ausdehnung der Polymerdomänen des Netzwerkes mit zunehmender Polymerkonzentration vergrößern [272]. In diesem Fall wechselwirken die Lipid- und Polymermoleküle an den Domänengrenzen miteinander, die Polymermoleküle im Inneren des Netzwerkes sind jedoch isotrop mobil, analog zum reinen Polymer. Wenn die Lipiddomänen ausreichend groß sind, besteht für die Lipidmoleküle kein Grund die Geometrie ihrer Dynamik in der L_α -Phase zu ändern. Für geringere Konzentrationen an Polymer ist vorstellbar, dass die Domänen kleiner sind und somit mehr Grenzfläche vorhanden ist, an der mehr Polymermoleküle ihre Bewegungen durch die Wechselwirkung mit den Lipidmolekülen etwas einschränken müssen. Dadurch würde ein größerer Anteil des Polymers eine anisotrope Dynamik aufweisen, wie es in dieser Arbeit ermittelt wurde. Beispielsweise wurde für die Wechselwirkung eines Peptids mit DMPC gefunden, dass nur die Lipidmoleküle in der Nähe der Bindungsstelle ihre molekulare Packung ändern, während weiter entfernte Lipidmoleküle unbeeinflusst bleiben [273]. Es ist auch wahrscheinlich, dass es Polymermoleküle innerhalb der Lipiddomänen und umgekehrt gibt, was aber auf die Eigenschaften der jeweiligen Domäne vermutlich keinen merklichen Einfluss hat.

Für Polymerketten existiert ein Zusammenhang zwischen dem dynamischen Ordnungsparameter, welcher mit NMR gemessen wird und dem Ordnungsparameter des Polymerrückgrates:

$$S = \frac{3}{5N} \frac{R^2}{R_0^2} = \frac{D_{\text{res}}}{D_{\text{Ref}}}, \quad (6.2)$$

wobei R^2 und R_0^2 der End-zu-End-Abstand und der Gleichgewichtsabstand der Polymerkette sind, und N die Anzahl der so genannten Kuhn-Segmente darstellt [135, 274]. Wird dieses Modell auf die in die Membran eingebauten Polymermoleküle übertragen, kann anhand der vorliegenden Konformation eine untere Grenze für den dynamischen Ordnungsparameter angegeben werden (s. Anhang D). Dieser beträgt in membran-durchspannender Konformation der Polymere $S \approx 0.05$, was einer dipolaren Restkopplung von $D_{\text{res}} \approx 225$ Hz entspricht. Die gemessenen Restkopplungen sind etwas niedriger, was aber vermutlich den der Berechnung zu Grunde gelegten Näherungswerten für die einzelnen Parameter geschuldet ist. Wird hingegen eine U-Konformation der Polymerketten angenommen, ist der End-zu-End-Abstand der Polymerkette gleich Null, so dass keine messbare dipolare Restkopplung resultiert. Dies könnte den großen Anteil an isotrop mobil gemessenem Anteil an PPO-Molekülen in der Lipidmembran erklären. Es erscheint daher plausibel, dass die Polymere, für die eine Restkopplung gemessen wurde, im membran-durchspannender Konformation eingebaut sind, wohingegen Polymere ohne messbare Restkopplung eine U-Konformation in der Membran einnehmen.

6.3 | Zusammenfassung

Auf der Basis von DSC-Messungen wurde der Einbau von fluorierten und unfluorierten amphiphilen und polyphilen Blockcopolymeren für erhöhte Polymerkonzentrationen geschlossen. Die DSC-Thermogramme zeigten außerdem für die Mischung aus DMPC und fluoriertem Polymer eine beträchtliche Phasenseparation mit zunehmender Polymerkonzentration. In Fluoreszenzmessungen an GUVs wies das Lipid in Wechselwirkung mit dem polyphilen Blockcopolymer, FGP, eine erhöhte Permeabilität auf, wohingegen das amphiphile Blockcopolymer, GP, die Membrandurchlässigkeit nicht erhöhte [52]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse können das Bild zur Wechselwirkung dieser Polymere mit der Modellmembran DMPC in Hinblick auf die Dynamik der Moleküle erweitern. So konnte mit den NMR-Messungen die Wechselwirkung zwischen Polymer- und Lipidmolekülen nachgewiesen werden, welche jedoch offenbar sehr schwach und/oder vorübergehender Natur ist. Es wurde gezeigt, dass sich die Polymermoleküle in die Membran einbauen und die PPO-Methylgruppe der Polymere in der Lipiddoppelschicht eine anisotrope Dynamik aufweist, wohingegen sie im reinen Polymer isotrop mobil ist. Diese veränderte Dynamik betrifft vermutlich nur die Polymermoleküle, die in direkter Wechselwirkung mit den Lipidmolekülen stehen.

Für die Anisotropie der molekularen Bewegung der Lipidmoleküle konnte keine Änderung nachgewiesen werden, was nicht bedeutet, dass sie nicht vorhanden ist. Es kann sich durchaus die Zeitskala der Bewegung verändert haben, ohne die Geometrie zu beeinflussen [104]. Diese Änderungen können jedoch von solch geringem Ausmaß sein, dass sie in den hier benutzten Experimenten nur einen marginalen Einfluss haben. Die Lipidmoleküle sind daher durch den Einbau der Polymermoleküle vermutlich nicht wesentlich in ihrer Bewegung eingeschränkt. Auch wenn die Änderungen der chemischen Verschiebungen in den Kohlenstoffspektren nur gering sind, weisen sie dennoch darauf hin, dass die beiden verschiedenen Polymere in unterschiedlicher Weise mit den verschiedenen Bereichen der Lipidmoleküle wechselwirken.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurde für den Einbau der beiden verschiedenen Polymere in die Modellmembran DMPC ein einfaches Modell, wie in Abb. 6.17 dargestellt, abgeleitet. Dieses beinhaltet, dass beide Polymere in verschiedenen Konformationen in die Doppelschicht eingebaut werden, wobei sich die Polymerdomänen

mit zunehmender Polymerkonzentration vergrößern und die Wechselwirkung damit auf den Übergangsbereich der Domänen beschränkt ist (s. Abb. 6.17).

Das dargestellte Modell zur konzentrationsabhängigen Wechselwirkung zwischen Lipid- und Polymermolekülen ist nur eine Möglichkeit, die auf Basis der hier erzielten Ergebnisse in Betracht gezogen wurde. Es sind natürlich auch andere Arten der molekularen Organisation denkbar. Zur vollständigen Charakterisierung dieser Wechselwirkung sind jedoch weiterführende Experimente notwendig.

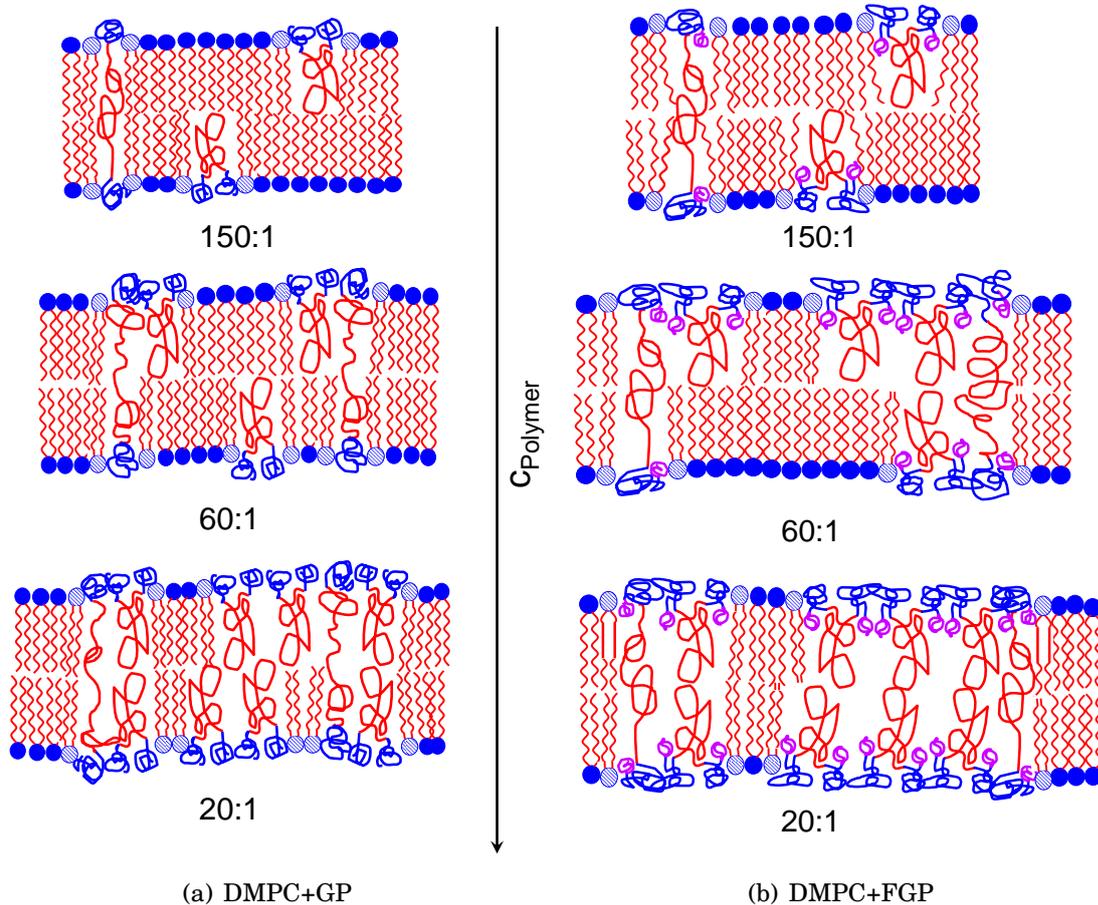


Abbildung 6.17.: Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkung von (a) GP und (b) FGP in DMPC für verschiedene Polymerkonzentrationen.

Für geringe Polymerkonzentrationen werden die einzelnen Polymermoleküle in unterschiedlichen Konformationen (membranüberspannend oder in einer U-Konformation) in die Membran eingebaut und verursachen leichte Änderungen der Lipidkonformationen (oben). Für ansteigende Polymerkonzentrationen werden die Polymerdomänen größer und die Wechselwirkung zum Lipid findet an den Domänengrenzen statt (Mitte). Wird die Anzahl der Polymermoleküle weiter erhöht, vergrößern sich die Polymerdomänen weiter (unten). Polymere in membrandruckspannender Konformation sind anisotrop mobil, wohingegen Polymermoleküle in U-Konformation eine isotrope Mobilität besitzen. Die Lipidmoleküle werden in ihrer Konformation ebenfalls, jedoch unterschiedlich stark von GP bzw. FGP, beeinflusst (schraffierte Lipidmoleküle).

7 | Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung neuer, amphiphiler und polyphiler Moleküle mit Modellmembranen mit Hilfe von Festkörper-NMR-Methoden zu charakterisieren. Dazu wurden in verschiedenen Experimenten vor allem dipolare Restkopplungen gemessen und die daraus resultierenden, dynamischen Ordnungsparameter sowohl für die Lipidmoleküle als auch für die Gastmoleküle in Modellmembranen ermittelt. Da die dipolaren Restkopplungen für Systeme mit geringer Bewegungsanisotropie und unter schneller Probenrotation in hohem Maße reduziert sind, wurden verschiedene Wiedereinkopplungssequenzen benutzt. Für die Messung von heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen wurde dazu das DIPSHIFT-Experiment im Rahmen dieser Arbeit zu einer Wiedereinkopplungssequenz, der recoupled DIPSHIFT-Sequenz, weiterentwickelt und erfolgreich auf Systeme mit geringer Anisotropie, wie beispielsweise Lipide, angewendet.

Niedermolekulare, polyphile Moleküle Als synthetisiertes, amphiphiles Molekül wurde die Substanz C12/12 in Wechselwirkung mit Modellmembranen untersucht. Dabei wiesen die Moleküle im reinen Kristall eine anisotrope Dynamik auf, bei der die Phenylringe des starren Rückgrates 180° -Sprünge ausführen.

In Wechselwirkung mit dem Modelllipid DPPC zeigte sich eine komplexe, makroskopische Phasenseparation der beiden Substanzen, welche sich durch verschiedene Phasenübergänge auszeichnet. Die Aufnahme quantitativer Protonenspektren und direkt angeregter Kohlenstoffspektren erlaubte eine Zuordnung der einzelnen Phasenübergänge zu je einem molekularen Prozess. Diese beinhalteten zunächst eine Packungsänderung der C12/12-Moleküle und damit einhergehend eine Mobilisierung der C12/12- und Lipidmoleküle. Daran anschließend wurden die in den verschiedenen Phasen separierten Lipide mobil und damit auch die C12/12-Moleküle. In diesen Phasen konnte ein signifikanter Anteil der Lipidmoleküle in einer oder mehreren immobilisierten Phasen nachgewiesen werden¹. Am letzten Phasenübergang löste sich schließlich die makroskopischen Überstruktur auf und sowohl Lipid- als auch C12/12-Moleküle bildeten eine homogene Mischphase, in der alle Moleküle eine sehr hohe Mobilität aufwiesen.

Die ermittelten Ordnungsparameter der C12/12-Moleküle im Lipid DPPC zeigten, dass die anisotrope Dynamik der C12/12-Moleküle in den separierten Phasen vergleichbar mit der im reinen Kristall ist. In der homogenen Mischphase hingegen führten die C12/12-Moleküle eine uniaxiale Rotation um ihre Moleküllängsachse aus. Zusätzlich dazu wurde mit Hilfe der homonuklearen, dipolaren Restkopplung und den daraus bestimmten Ordnungsparametern eine weitere, anisotrope Bewegung der C12/12-Moleküle gefunden. Diese ähnelt einer Taumelbewegung des gesamten Moleküls senkrecht zur Membranoberfläche. Die Ordnungsparameter der Lipidmoleküle in der homogenen Mischphase

¹Ob sich die Dynamik in dieser Phase von der in der ursprünglichen Gelphase unterscheidet, bedarf einer genaueren Untersuchung der Gelphase im Allgemeinen.

(oberhalb aller Phasenumwandlungen) zeigten keine Änderung durch die Anwesenheit der Gastmoleküle, was auf eine unveränderte Dynamik dieser Moleküle hinwies.

Für die Wechselwirkung der C12/12-Moleküle mit dem Modelllipid DOPC wurde bei allen untersuchten Temperaturen eine homogene Mischphase gefunden. Die ermittelten Ordnungsparameter der C12/12-Moleküle ließen in DOPC eine ähnliche, anisotrope Dynamik dieser Moleküle erkennen wie in der homogenen Mischung mit DPPC (oberhalb aller Umwandlungen). Durch die etwas flexibleren Lipidketten im DOPC besaßen die C12/12-Moleküle jedoch eine größere Bewegungsamplitude als im DPPC. Die mittels recoupled DIPSHIFT ermittelten Ordnungsparameter der Lipidmoleküle ergaben ebenfalls keine Änderung der schnellen Lipiddynamik durch den Einbau der Gastmoleküle.

Amphiphile und polyphile Blockcopolymere Für die Untersuchung der Wechselwirkung amphiphiler und polyphiler Blockcopolymere in Modellmembranen wurden zwei verschiedene Blockcopolymere verwendet. Beide Polymere besaßen die gleichen hydrophoben und hydrophilen Blöcke. Der Unterschied bestand darin, dass eines der Polymere zusätzlich über fluorophile Blöcke verfügte. In DSC-Thermogrammen konnte eine unterschiedliche Wechselwirkung der beiden Polymere, GP und FGP, mit dem Modelllipid DMPC nachgewiesen werden. Auch war eine konzentrationsabhängige Änderung der Wechselwirkungsstärke in diesen Thermogrammen erkennbar. Eine Änderung der chemischen Verschiebung in den Kohlenstoffspektren konnte diesen Trend der Konzentrationsabhängigkeit zum Teil ebenfalls zeigen.

Mit Hilfe zweidimensionaler NOESY-Korrelationsspektren konnte der Einbau der Polymermoleküle in den hydrophoben Teil der Membran nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei, dass die zu Grunde liegende Wechselwirkung (vermutlich aufgrund der hohen lateralen Mobilität der Moleküle) eher schwacher und/oder vorübergehender Natur ist. Auch Protonen-Doppelquanten-Aufbaukurven bestätigten den Einbau der Polymermoleküle in die Membran. Für die reinen Polymerproben war keine messbare Restkopplung vorhanden, was auf eine isotrope Dynamik der Moleküle hindeutete. In der Mischung mit dem Lipid konnte hingegen eine homonukleare, dipolare Restkopplung ermittelt werden, was wiederum den Einbau in die Doppelschicht belegte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass nicht alle Polymermoleküle, sondern nur ein Teil in der Membran eine anisotrope Dynamik besaßen. Dieser Anteil an anisotrop mobilem Polymer hing von der Konzentration an Polymer im Lipid ab. Der Anteil anisotrop mobiler Polymermoleküle für das unfluorierte Polymer zeigte eine Sättigung mit abnehmender Polymerkonzentration. Im Gegensatz dazu stieg dieser Anteil für das fluorierte Polymer mit abnehmender Polymerkonzentration an. Aus der Abschätzung der dipolaren Restkopplung aus der Polymerkonformation konnte ein Modell für den Einbau der Polymere in die Lipiddoppelschicht erarbeitet werden. Dieses nimmt die Mehrzahl der Polymermoleküle in einer U-Konformation an (isotrop mobil), während ein kleinerer Anteil in der Membran in gestreckter Konformation vorliegt (anisotrop mobil). Dies deutet daraufhin, dass bei höherer Polymerkonzentration zusätzliche Moleküle vornehmlich in U-Konformation eingebaut werden und somit größere Domänen aus Polymermolekülen entstehen.

Für die Wechselwirkung im hydrophoben Teil der Membran wurde keine Abhängigkeit von der Fluorierung der Ketten gefunden. Dies wies daraufhin, dass die fluorierten Ketten mehr Einfluss im Übergangsbereich oder im hydrophilen Teil der Membran nehmen.

Die Messung der heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen der Lipidmoleküle ergab weder eine Abhängigkeit von der Polymerkonzentration noch von der Fluorierung. Es zeigte sich bei allen Proben die gleiche Dynamik der Lipidmoleküle wie im reinen Lipid.

Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendeten und zum Teil neu entwickelten NMR-Experimente bilden eine Grundlage zur Untersuchung schwacher, dipolarer Restkopplung. Es zeigten sich jedoch auch die Grenzen der Methoden. So ist es z.B. mit dem DIPSHIFT- und dem recoupled DIPSHIFT-Experiment lediglich möglich, eine mittlere Restkopplung für eine CH₂-Gruppe zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch unter anderem auch, dass es vor allem in den Lipidproben notwendig ist, die dipolaren Restkopplungen der beiden CH-Bindungen einer CH₂-Gruppe einzeln messen zu können. Nachfolgend bietet es sich an, z.B. das PDLF-Experiment zu verwenden [190,200], bei dem die dipolare Kopplung von einem Proton zum gebundenen Kohlenstoffatom betrachtet wird. Dies macht eine separate Messung von Ordnungsparametern für die einzelnen CH-Bindungen möglich.

Des Weiteren ist es auch möglich, den Einbau starrer Moleküle in eine Membran mittels Spindiffusion von den Lipidmolekülen auf die Gastmoleküle zu untersuchen. Dazu kann die Sequenz, wie sie von Huster *et al.* vorgeschlagen wurde, verwendet werden [275]. Diese Sequenz erlaubt es, Informationen über die Lokalisation der Gastmoleküle in der Membran zu erhalten.

Eine Möglichkeit, die Überlagerung von Resonanzen in den Protonenspektren zu minimieren, wäre es, mit teilweise oder vollständig deuterierten Lipidproben zu arbeiten. Dies macht es denkbar, auch andere Resonanzen der Gastmoleküle zu untersuchen, um so auch Aussagen über die Dynamik z.B. im hydrophilen Teil der Membran zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung amphiphiler und polyphiler Moleküle mit Modellmembranen untersucht. Die Ergebnisse, wie oben dargestellt, zeigten unterschiedliche Wechselwirkungen der einzelnen Gastmoleküle. Es ist jedoch notwendig, weitere Molekülarchitekturen zu untersuchen, um gezielt Moleküle mit einer bestimmten Wechselwirkung in der Membran zu synthetisieren. Die Kenntnis des Zusammenhanges zwischen Molekülaufbau und Wechselwirkungsmechanismus ist wesentlich für die Anwendung dieser Moleküle, z.B. als synthetische Ionenkanäle bzw. Poren.

Die untersuchten amphiphilen und polyphilen Moleküle bieten daher Ansatzpunkte zur Modifizierung. So existieren bereits Verbindungen von niedermolekularen Polyphilen, welche eine größere, hydrophile Kopfgruppe besitzen, z.B. Poly(ethylenoxid)-Ketten, welche in Wechselwirkung mit der Membran untersucht werden könnten. Darüber hinaus ist es möglich, die hydrophoben Seitenketten sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Zusammensetzung zu verändern. Beispielsweise könnten Substanzen mit fluorierten Seitenketten in der Membran charakterisiert werden, welche vermutlich in anderer Weise wechselwirken als die hier untersuchten. Ebenfalls denkbar ist es, die Länge des starren Rückgrates zu variieren und den daraus resultierenden Einfluss auf die Wechselwirkung mit der Membran zu untersuchen. Es ergibt sich für all diese Modifizierungen eventuell ein anderes Aggregationsverhalten der Moleküle in der Membran.

Auch für die untersuchten Blockcopolymere bieten sich vielfältige Variationsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Änderung des Verhältnis von hydrophober zu hydrophiler Blocklänge. Da dieses Verhältnis die Wechselwirkung maßgeblich beeinflusst, würden für die verschiedenen Proben unterschiedliche Wechselwirkungen erwartet werden. Eine andere Möglichkeit stellt eine Änderung in der Reihenfolge der einzelnen Blöcke dar. So könnte z.B. der fluorophile Block den mittleren Teil des Polymers bilden, was ebenfalls zu einer veränderten Wechselwirkung in der Membran führen könnte.

Ein weiterer, wichtiger Punkt, dessen systematische Untersuchung im Zusammenhang mit dem Einbau von Fremdmolekülen von großem Interesse ist, ist das Lipid an sich. Auch

hier ist es möglich, dass eine veränderte hydrophobe Dicke der Membran eine unterschiedliche Wechselwirkung zeigt [276]. Andere Variationsmöglichkeiten bieten ungesättigte Lipide [272] oder Lipide mit einer anderen, evtl. sogar geladenen Kopfgruppe [42, 277]. Dies alles können Faktoren sein, die die Wechselwirkung zwischen Lipid- und Gastmolekülen beeinflussen. Daher ist eine systematische Untersuchung der Wechselwirkung verschiedener Moleküle in Abhängigkeit vom Lipid wichtig.

A | Anpassung der Dephasierungskurve einer CH₂-Gruppe

Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, wurde für die Anpassung der Dephasierungskurven der CH₂- bzw. CH₃-Gruppen eine andere analytische Funktion verwendet als für die CH-Gruppen.

Zur Berechnung des dipolaren FID wird der Produktoperatorformalismus verwendet. Dazu wird die Entwicklung des Spins S unter heteronuklearer, dipolarer Kopplung zu den Spins I^1 und I^2 betrachtet, was der Kopplung des Kohlenstoffatoms zu je einem der beiden Protonen einer CH₂-Gruppe entspricht. Für die Kopplung zu zwei verschiedenen Protonen kann die Entwicklung unter den beiden wirkenden, dipolaren Hamiltonoperatoren $\hat{H}_{1/2} = 2\Phi_{1/2}\hat{S}_z\hat{I}_z^{1/2}$ nacheinander betrachtet werden:

$$\begin{aligned} \hat{S}_x &\xrightarrow{2\Phi_1\hat{S}_z\hat{I}_z^1} \hat{S}_x \cos \Phi_1 + 2\hat{S}_y\hat{I}_z^1 \sin \Phi_1 \\ &\xrightarrow{2\Phi_2\hat{S}_z\hat{I}_z^2} \hat{S}_x \cos \Phi_1 \cos \Phi_2 + \hat{S}_y\hat{I}_z^1 \sin \Phi_1 \cos \Phi_2 + \\ &\quad \hat{S}_y\hat{I}_z^2 \cos \Phi_1 \sin \Phi_2 - 4\hat{S}_x\hat{I}_z^1\hat{I}_z^2 \sin \Phi_1 \sin \Phi_2. \end{aligned} \quad (\text{A.1})$$

Da nur transversale Magnetisierung direkt detektierbar ist, können alle Terme des Ergebnisses bis auf den ersten vernachlässigt werden. Damit ergibt sich der dipolare FID zu:

$$\text{FID} \propto \langle \cos \Phi_1 \cos \Phi_2 \rangle, \quad (\text{A.2})$$

bzw. wird durch Verwendung von Additionstheoremen der Ausdruck

$$\text{FID} \propto \left\langle \underbrace{\frac{1}{2} \cos(\Phi_1 - \Phi_2)}_{\uparrow \text{bzw.} \downarrow} + \underbrace{\frac{1}{2} \cos(\Phi_1 + \Phi_2)}_{\uparrow \text{bzw.} \downarrow} \right\rangle \quad (\text{A.3})$$

erhalten, wobei die eckigen Klammern das Pulver- und Zeitmittel verdeutlichen. An dieser Gleichung zeigen sich die verschiedenen Einstellmöglichkeiten der Protonenspins zueinander [278].

Es ist nun für die Beschreibung von Messdaten mit diesem Ausdruck notwendig, die beiden dipolaren Phasen Φ_1 und Φ_2 der beiden CH-Bindungen zu berechnen. Dies erfolgt wie in Gl. 2.42 auf Seite 17 angegeben über die dipolare Frequenz $\omega_D(t)$. Da diese Frequenz normalerweise nur im Hauptachsensystem des Kopplungstensors bekannt ist, ist eine Reihe von Transformationen für jede der beiden CH-Bindungen notwendig, um diesen Tensor im Laborkoordinatensystem zu erhalten. Diese sind die Transformation vom Hauptachsensystem über das Molekülsystem (ϑ) und das Rotorsystem (α , β , γ) ins Laborkoordinatensystem ($\omega_R t$, β_m):

$$\underline{D}^{\text{LF}} = \underline{\hat{R}}^{-1}(\beta_m) \underline{\hat{R}}^{-1}(\omega_R t) \underline{\hat{R}}^{-1}(\gamma) \underline{\hat{R}}^{-1}(\beta) \underline{\hat{R}}^{-1}(\alpha) \underline{\hat{R}}^{-1}(\vartheta) \underline{D}^{\text{PAS}} \underline{\hat{R}}(\vartheta) \underline{\hat{R}}(\alpha) \underline{\hat{R}}(\beta) \underline{\hat{R}}(\gamma) \underline{\hat{R}}(\omega_R t) \underline{\hat{R}}(\beta_m). \quad (\text{A.4})$$

A. Anpassung der Dephasierungskurve einer CH₂-Gruppe

Unter der Annahme einer idealen CH₂-Gruppe entspricht der Öffnungswinkel $\sphericalangle(\text{HCH})$ dem Tetraederwinkel von 109.5°. Sollen beide CH-Bindungen in ein gemeinsames Molekülsystem transformiert werden, bietet es sich an, die Winkelhalbierende des Tetraederwinkels als Referenzrichtung zu wählen. Mit dieser Annahme vereinfacht sich die erste Transformation, da der Rotationswinkel gerade dem magischen Winkel entspricht und es ergibt sich nach allen durchgeführten Rotationen, wie in Gl. A.4 aufgeführt, die zz-Komponente des dipolaren Tensors im Laborkoordinatensystem D_{zz}^{LF} zu:

$$D_{zz}^{\text{LF}} = \frac{2}{3}d_{11}\cos^2(\omega_{\text{R}t}) + \frac{4}{3}d_{12}\sin(\omega_{\text{R}t})\cos(\omega_{\text{R}t}) + \frac{2}{3}d_{22}\sin^2(\omega_{\text{R}t}) + \frac{2}{3}\sqrt{2}d_{13}\cos(\omega_{\text{R}t}) + \frac{2}{3}\sqrt{2}\sin(\omega_{\text{R}t}) + \frac{1}{3}d_{33}, \quad (\text{A.5})$$

mit den Vorfaktoren

$$d_{11} = \frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos^2\beta\cos^2\gamma \pm \sqrt{2}\cos\alpha\sin\beta\cos\beta\cos^2\gamma - 2\sin\alpha\cos\alpha\cos\beta\cos\gamma\sin\gamma \mp \sqrt{2}\sin\alpha\sin\beta\sin\gamma\cos\gamma + \frac{1}{2}(\sin^2\alpha - \cos^2\alpha)\sin^2\gamma, \quad (\text{A.6})$$

$$d_{12} = -\frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos^2\beta\sin\gamma\cos\gamma \mp \sqrt{2}\cos\alpha\sin\beta\cos\beta\sin\gamma\cos\gamma + \cos\alpha\sin\alpha\cos\beta(\sin^2\gamma - \cos^2\gamma) \pm \frac{1}{\sqrt{2}}\sin\alpha\sin\beta(\sin^2\gamma - \cos^2\gamma) \mp (\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\sin\gamma\cos\gamma, \quad (\text{A.7})$$

$$d_{13} = \frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos\beta\sin\beta\cos\gamma \pm \frac{1}{\sqrt{2}}\cos\alpha(\sin^2\beta - \cos^2\beta)\cos\gamma - \sin\alpha\cos\alpha\sin\beta\sin\gamma \pm \frac{1}{\sqrt{2}}\sin\alpha\cos\beta\sin\gamma, \quad (\text{A.8})$$

$$d_{22} = \frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos^2\beta\sin^2\gamma \pm \sqrt{2}\cos\alpha\sin\beta\cos\beta\sin^2\gamma + 2\sin\alpha\cos\alpha\cos\beta\sin\gamma\cos\gamma \pm \sqrt{2}\sin\alpha\sin\beta\sin\gamma\cos\gamma \mp \frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos^2\gamma, \quad (\text{A.9})$$

$$d_{23} = -\frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\cos\beta\sin\beta\sin\gamma \mp \frac{1}{\sqrt{2}}\cos\alpha(\sin^2\beta - \cos^2\beta)\sin\gamma - \sin\alpha\cos\alpha\sin\beta\cos\gamma \pm \frac{1}{\sqrt{2}}\sin\alpha\cos\beta\cos\gamma, \quad (\text{A.10})$$

$$d_{33} = \frac{1}{2}(\cos^2\alpha - \sin^2\alpha)\sin^2\beta \mp \sqrt{2}\cos\alpha\cos\beta\sin\beta, \quad (\text{A.11})$$

welche die Euler-Winkel (α , β und γ) enthalten. Die verschiedenen Vorzeichen vor einigen Termen stammen von der gegensätzlichen Rotation der beiden dipolaren Tensoren der je-

weiligen CH-Bindung vom Hauptachsensystem ins Molekülsystem. Die dipolare Frequenz für die jeweilige CH-Bindung kann damit über

$$\begin{aligned}
 D_{zz}^{\text{LF}} = \omega_{\text{D}} = & \left[\frac{1}{6} \cos(2\alpha)(\cos^2 \beta + 1) \pm \frac{\sqrt{2}}{3} \cos \alpha \sin \beta \cos \beta \right] \cos(2\omega_{\text{R}}t + 2\gamma) \quad (\text{A.12}) \\
 & + \left[\mp \frac{\sqrt{2}}{3} \sin \alpha \sin \beta - \frac{2}{3} \cos \alpha \sin \alpha \cos \beta \right] \sin(2\omega_{\text{R}}t + 2\gamma) \\
 & + \left[\frac{\sqrt{2}}{3} \cos(2\alpha) \cos \beta \sin \beta \mp \frac{2}{3} \cos \alpha \cos(2\beta) \right] \cos(\omega_{\text{R}}t + \gamma) \\
 & + \left[-\frac{2}{3} \sqrt{2} \cos \alpha \sin \alpha \sin \beta \pm \frac{2}{3} \cos \beta \sin \alpha \right] \sin(\omega_{\text{R}}t + \gamma)
 \end{aligned}$$

berechnet werden. Eine Integration über die Zeit liefert für jede der beiden CH-Bindungen eine dipolare Phase, welche in Gl. A.2 eingesetzt werden kann.

Einen Spezialfall dieser Gleichung ergibt sich, wenn für die CH₂-Gruppe eine schnelle, uniaxiale Dynamik angenommen wird. In diesem Fall werden die dipolaren Tensoren der Einzelbindungen so gemittelt, dass sie stets eine parallele Orientierung zueinander einnehmen [278] und somit bereits ein gemeinsames Koordinatensystem besitzen. Die erste Rotation um den Winkel ϑ entfällt bzw. für diese ist dieser Winkel Null. Daraus resultiert, dass die Phasen Φ_1 und Φ_2 gleich werden und sich Gl. A.3 zu

$$\text{FID} \propto \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \langle \cos(2\Phi) \rangle. \quad (\text{A.13})$$

vereinfacht. Das Pulvermittel $\langle \dots \rangle$ stellt hier eine Mittelung über alle möglichen Orientierungen der Symmetrieachse dar. Ebenso kann eine Gleichung zur Beschreibung einer CH₃-Gruppe hergeleitet werden. Die schnelle Rotation der Methylgruppe führt ebenfalls dazu, dass die gemittelten Kopplungstensoren eine parallele Orientierung einnehmen. Durch eine zusätzliche Entwicklung unter dipolarer Kopplung in Gl. A.2 wird ein Ausdruck der Form

$$\text{FID} \propto \langle \cos \Phi_1 \cos \Phi_2 \cos \Phi_3 \rangle \quad (\text{A.14})$$

erhalten. Unter Annahme einer uniaxialen Rotation, wie sie eine CH₃-Gruppe ausführen kann, wird für das dipolare Signal

$$\text{FID} \propto \langle \cos^3 \Phi \rangle \quad (\text{A.15})$$

erhalten, wobei das Pulvermittel über alle möglichen Orientierungen der Symmetrieachse gebildet wird.

Damit ist es möglich, die heteronukleare, dipolare Restkopplung aus den DIPSHIFT- und recoupled DIPSHIFT-Dephasierungskurven durch Anpassung der jeweiligen Funktion zu ermitteln.

Es ist zu bemerken, dass diese gemessene Restkopplung bereits einer Vormittlung durch die angenommene Dynamik unterliegt. Das bedeutet, dass die statische Dipolkopplung in diesen beiden Fällen bereits um den für die angenommene Modellbewegung vorliegenden Ordnungsparameter reduziert ist (wie z.B. für die Methylgruppe des Alanin in Kap. 3.2 beschrieben). Dies sollte bei der Auswertung der Experimente und der Wahl der Referenzkopplung zur Ermittlung eines Ordnungsparameters berücksichtigt werden.

B | Probenpräparation

B.1 | Reine Lipidproben

Für die Herstellung der reinen Lipidproben wurde Pulver des entsprechenden Lipids abgewogen und in einen 4mm-MAS Rotor gefüllt. Anschließend wurde die gleiche Menge an deuteriertem Wasser (D₂O) hinzugegeben und nach Verschließen des Behältnisses mit Hilfe eines Vortexmischers geschüttelt. Teflonspacer ober- und unterhalb der Probe stellten eine Positionierung dieser in der Mitte des Rotors sicher. Danach wurde der Rotor für ca. 1-2 Stunden bei einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des jeweiligen Lipids in einen Heizblock gestellt, um eine homogene Suspension multilamellarer Vesikel zu erhalten [166].

B.2 | Mischungen aus Lipid und anderen Molekülen

Für die Herstellung der einzelnen Mischungen aus Lipid und dem jeweiligen Gastmolekül wurde ähnlich verfahren. Zunächst wurden für das gewünschte molare Verhältnis von X:1 (Lipid:Gastmolekül) die benötigten Massen über

$$m_{\text{Gast}} = \frac{M_{n,\text{Gast}} \cdot m_{\text{Lipid}}}{X \cdot M_{n,\text{Lipid}}} \quad (\text{B.1})$$

berechnet. Dabei sind $M_{n,\text{Gast/Lipid}}$ die molaren Massen des jeweiligen Gastmoleküls und des Lipids und $m_{\text{Gast/Lipid}}$ die Massen der beiden Substanzen. Die für die Berechnung verwendeten Molekulargewichte der Gastmoleküle sind in Tabelle B.1 aufgeführt; die der Lipide finden sich in Tabelle 4.1 in Kapitel 4. Die eingewogenen Massen der jeweiligen Substanzen wurden mit dem Lipid gemischt und anschließend in einer Chloroform/Methanol-Mischung (Volumenverhältnis 2:1) gelöst. Nachdem sich die Mischung gelöst hat, d.h. sobald keine Aggregate mehr sichtbar waren, wurde das Lösungsmittel verdampft, in dem die Probe auf eine Heizplatte gestellt wurde. Nach vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels wurde das entstandene Pulver in einen 4mm-MAS Rotor gegeben. Danach wurde die entsprechende Menge an D₂O hinzugegeben. Anschließendes Schütteln, Erwärmen auf eine Temperatur oberhalb der Phasenumwandlung des Lipids und erneutes Schütteln ergaben wieder eine homogene Suspension multilamellarer Vesikel.

Tabelle B.1.: Molekulargewichte M_n für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen.

Substanz	$M_n / \text{g mol}^{-1}$
Cholesterol	386.7
C12/12	1027.4
GP	8622
FGP	9810

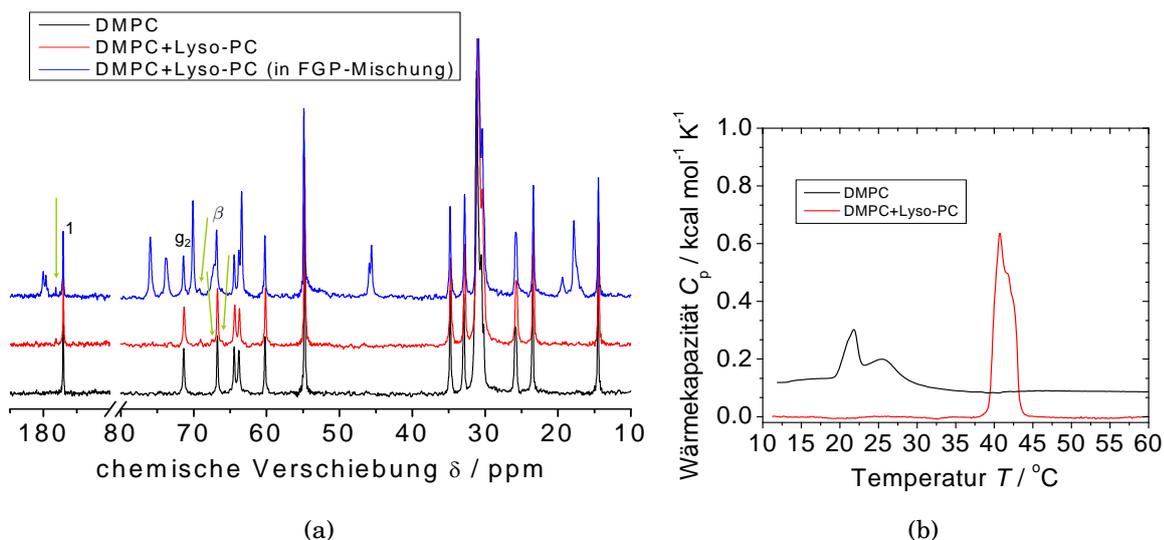


Abbildung B.1.: (a) ^{13}C -NMR-Spektrum von reinem DMPC, sowie DMPC-Mischungen, welche einen gewissen Anteil an Lyso-Phospholipiden enthielten. Die Pfeile deuten auf die neue Signale, welche infolge der Zersetzung erscheinen. (b) DSC-Thermogramm einer intakten DMPC-Probe, sowie einer DMPC-Probe mit Lyso-Phospholipiden. Durch die Zersetzung der Lipidmoleküle erhöht sich die Phasenumwandlungstemperatur deutlich.

B.3 | Zersetzung von Phospholipiden

Alle Proben, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, beinhalten mindestens 50 Gew. % D_2O . Das bedeutet, sie lagen stets in einem wässrigen Medium vor. Dies stellt zwar sicher, dass die Membranen in ihrer natürlich vorkommenden Umgebung untersucht werden können, verursacht jedoch auch Stabilitätsprobleme. Die in den Proben existierenden Phospholipide in den multilamellaren Vesikeln unterliegen mit zunehmender Zeit der Zersetzung [279]. Es gibt zwei möglich chemische Reaktionen, die zur Zersetzung der Phospholipide in Wasser führen: die Oxidation und die Hydrolyse [280]. Während die Oxidation hauptsächlich bei Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäureketten eine Rolle spielt, ist die Hydrolyse in allen Proben aktiv. Am anfälligsten für Hydrolyse sind dabei die Esterbindungen an den Positionen sn-1 und sn-2 des Glycerolrückgrates, d.h., an den Carboxygruppen, an denen die Fettsäureketten gebunden sind [281]. Da diese Gruppen ungefähr den Übergangsbereich zwischen hydrophil und hydrophob in der Lipiddoppelschicht bilden, stehen sie immer in Kontakt mit dem umgebenden Wasser in der Probe. Durch die Hydrolyse entstehen mehrere Zersetzungsprodukte in der Probe: freie Fettsäuren, Lyso-Phospholipide und in letzter Instanz Glycerophospho-Verbindungen. Dabei werden durch die Lyso-Phospholipide die Doppelschichten destabilisiert und es kommt zur Bildung von Mizellen [282]. Auch im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden Zersetzungserscheinungen sowohl in den reinen Lipidproben als auch in verschiedenen Mischungen sichtbar. Dies äußerte sich vor allem in den Kohlenstoffspektren. In Abb. B.1(a) sind Spektren einer intakten Probe und zweier Proben, welche Zersetzungsprodukte enthielten, gezeigt. In diesen ist zu erkennen, dass beim Vorhandensein von Lyso-Phospholipiden in den Proben neue, zunächst sehr kleine Signale erscheinen. Diese sind dann links neben dem Signal der Carboxy-Gruppen (s. Abb. B.1(a) Signal 1), rechts neben dem Signal des Glycerol-2-Kohlenstoffs (Signal g_2), sowie links und rechts neben dem Kopfgruppensignal β zu finden. Das Erscheinen der Signale an diesen Positionen deutet sehr stark auf veränderte Umgebungen der betroffenen

Kohlenstoffatome hin. Da bei der Entstehung von Lyso-Phospholipiden Fettsäureketten an den Esterbindungen abgelöst werden, ist es plausibel, dass die Änderungen im Spektrum an diesen Positionen erfolgen. Eindeutiger ist die Veränderung der Probe jedoch in DSC-Messungen feststellbar. Dort ist für einen zunehmenden Anteil an hydrolytischem Phospholipid eine erhöhte Phasenumwandlungstemperatur messbar [282]. Dies konnte auch für eine in dieser Arbeit untersuchte Probe festgestellt werden (s. Abb. B.1(b)). Es ist zu erkennen, dass sich die Phasenumwandlungstemperatur in der betreffenden Probe um ca. 20 K erhöht hat. Dies ist zusätzlich zu den NMR-Spektren ein eindeutiges Zeichen für die Zersetzung der Phospholipidmoleküle innerhalb der Probe. Eine Lagerung der hergestellten Lipidproben und Mischungen bei tiefen Temperaturen und einem neutralem pH-Wert minimiert die Hydrolyserate [283], kann jedoch nicht vermieden werden, solange die Probe Wasser enthält. Je länger eine Probe in wässriger Umgebung vorliegt, desto mehr hydrolytische Reaktionen finden statt. Eine Zersetzung der Lipidmoleküle kann nur durch das vollständige Entfernen von Wasser aus der Probe (z.B. durch Gefriertrocknung) verhindert werden [281].

C | Experimentelle Details

C.1 | Allgemeine Parameter

Alle Messungen wurden an einem Bruker Avance III Spektrometer mit einer Protonen-Larmorfrequenz von 400 MHz und einer Kohlenstoff-Larmorfrequenz von 100.5 MHz durchgeführt. Für alle Messungen wurde ein 4 mm-WVT-Doppelresonanzkopf benutzt. Die Messtemperatur wird bei diesem Probenkopf über einen beheizbaren Luftstrom geregelt und wurde entsprechend kalibriert [284, 285]. Die Rotationsfrequenz betrug im Allgemeinen $\nu_R = 5$ kHz. Typische Pulslängen waren $3 \mu\text{s}$ für Protonen und $3.2 \mu\text{s}$ für Kohlenstoff. Für die Messung von nicht-quantitativen Protonenspektren wurde im Allgemeinen eine Wartezeit von $d1 = 1$ s zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans gewählt, wobei meist 32 Scans für ein Spektrum aufgenommen wurden. Zur Messung der Kohlenstoffspektren war eine Wartezeit von $d1 = 5$ s notwendig, um eine durch rf-Einstrahlung (Entkopplung) bedingte Erwärmung der Probe zu verhindern [182]. Die Entkopplungsfrequenz betrug bei allen Kohlenstoffspektren 83 kHz, wobei die SPINAL64-Sequenz zum entkoppeln benutzt wurde [115]. Typischerweise waren für ausreichend gute Signal-zu-Rausch Verhältnisse mindestens 512, meist jedoch 1024 Scans notwendig. Die für die Spektren mit Kreuzpolarisation verwendeten Kontaktzeiten sind unterhalb der jeweiligen Spektren im Haupttext angegeben.

Für die quantitativen Protonenspektren betrug die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans 8 s. Alle Intensitäten wurden mit dem Curiefaktor, T/T_{Ref} , multipliziert, um sie miteinander vergleichen zu können.

C.2 | DIPSHIFT und recoupled DIPSHIFT

Die Pulslängen und Wartezeiten für die DIPSHIFT- und recoupled DIPSHIFT-Experimente entsprachen den oben angegebenen Werten. Die Anzahl an Scans betrug entweder 512, 1024 bzw. bei sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen gegebenenfalls 2048. Es wurden typischerweise 16 t_1 -Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Die Entkopplungsfrequenzen für die heteronukleare Entkopplung mittels SPINAL64-Sequenz betrug $\nu = 62.5$ kHz. Für die homonukleare Entkopplung mit der Lee-Goldberg-Sequenz [110] wurde eine effektive Entkopplungsfrequenz von $\nu_{\text{eff}} = 85$ kHz verwendet. Dies entspricht der Bedingung, dass die Entkopplungsfrequenz ein ganz- oder halbzahliges Vielfaches der Rotationsfrequenz ist, um Artefakte in den Dephasierungskurven zu minimieren [82]. Alle diese Werte wurden sowohl für das DIPSHIFT- als auch für das recoupled DIPSHIFT-Experiment benutzt. Als Wiedereinkopplungszeit für die recoupled DIPSHIFT-Sequenz wurden 4 Rotationsperioden gewählt. Für Messungen, in denen Kreuzpolarisation als Anregungsmethode benutzt wurde, betrug die Kontaktzeit $t_{\text{CP}} = 5$ ms.

In den Abbildungen C.1 und C.2 sind wegen der Vollständigkeit die Dephasierungskurven der Lipide DPPC und DOPC gezeigt.

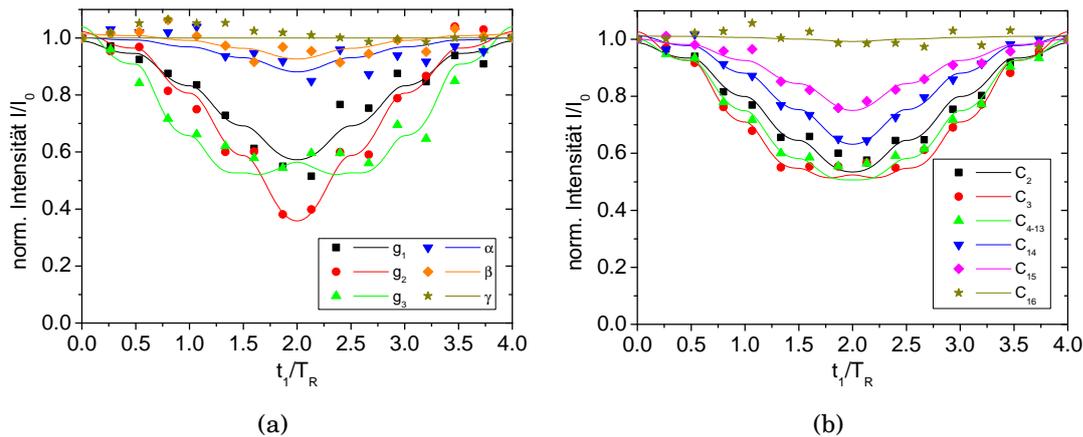


Abbildung C.1.: Dephasierungskurven für das Lipid DPPC gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T=47^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

Darüber hinaus sind in Abb. C.5 bis C.7 zur Vollständigkeit die Dephasierungskurven für die jeweiligen 60:1- und 150:1-Mischungen von DMPC mit GP bzw. die fehlenden Kurven für die Mischungen mit FGP gezeigt.

C.3 | ^1H -DQ-Aufbaukurven

Die Doppelquantenaufbaukurven für die Mischungen aus Polymer und Lipid wurden mit der BaBa-xy-16-Sequenz unter MAS aufgenommen [133]. Die Rotationsfrequenz betrug für diese Experimente $\nu_R = 8\text{ kHz}$. Es wurden 32 oder 64 Scans mit einer Wartezeit von 2s zwischen zwei Scans aufgenommen. Es wurden 41 τ_{DQ} -Inkrementen gemessen, welche zwischen 0 und 1000 Rotorperioden variiert wurden. Für sehr kurze Zeiten betrug das Inkrement $\Delta\tau_{\text{DQ}} = \tau_R$, für längere Zeiten $\Delta\tau_{\text{DQ}} = 4\tau_R$. Es zeigte sich jedoch die beste Kompensation von Offset-Effekten für $\Delta\tau_{\text{DQ}} = 4\tau_R$, so dass nur diese Evolutionszeiten ausgewertet wurden. Da die Aufbaukurven für das Signal der PPO-Methylgruppe gemessen wurden, wurde darauf geachtet, dass sich dieses Signal in Resonanz befand.

C.4 | DQ-Seitenbanden-Spektren

Für die Mischung aus C12/12 und dem jeweiligen Lipid wurden DQ-Seitenbanden-Spektren aufgenommen, wozu ebenfalls die BaBa-xy-16-Sequenz benutzt wurde [133]. Die Rotationsfrequenz betrug in diesen Experimenten $\nu_R = 10\text{ kHz}$. Es wurden typischerweise 32 Scans aufgenommen und die Wartezeit zwischen zwei Scans betrug $d1 = 2\text{ s}$. Die Wiedereinkopplungszeit (Anregung- und Rekonversion) betrug jeweils 4 Rotationsperioden. Es wurden insgesamt 512 t_1 -Inkrementen aufgenommen, wobei ein Inkrement $\Delta t_1 = 2.5\ \mu\text{s}$ betrug. Dabei wurde die Aromatenregion der C12/12-Moleküle in Resonanz gesetzt, um eine gute Kompensation von Offseteffekten zu erhalten.

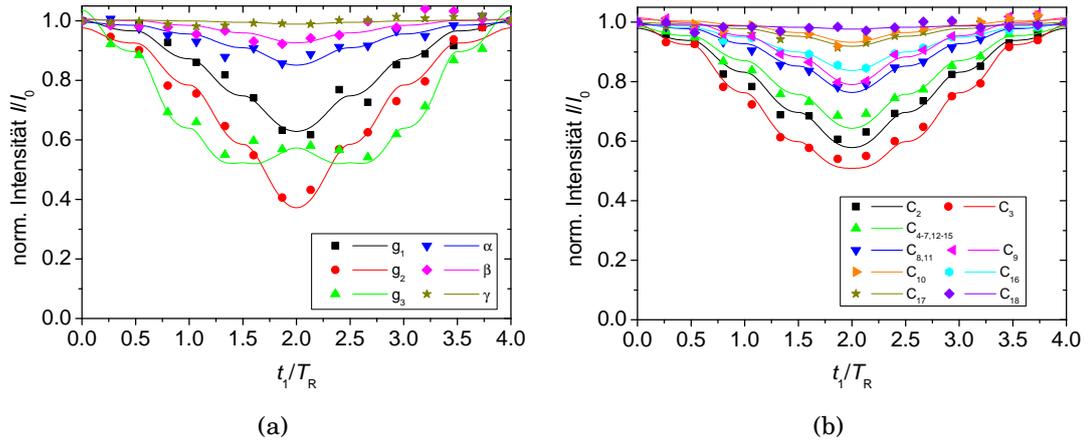


Abbildung C.2.: Dephasierungskurven für das Lipid DOPC gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment (Raumtemperatur, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

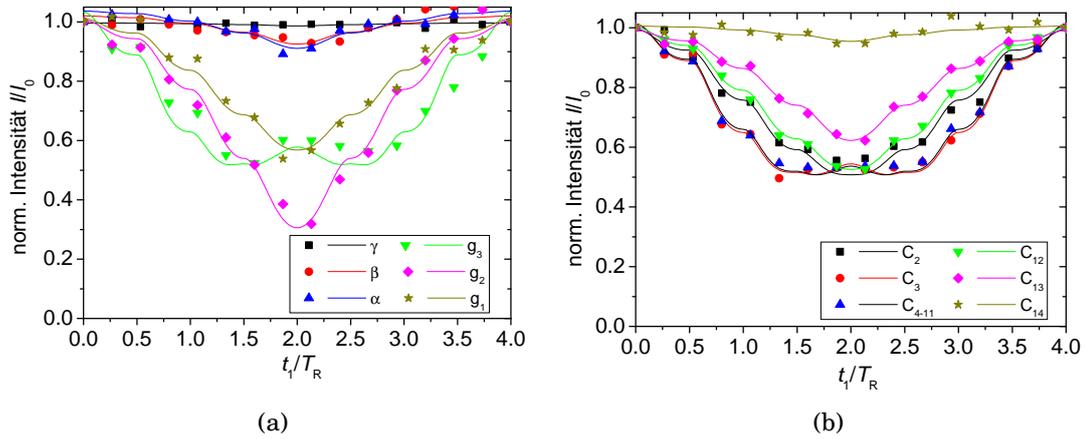


Abbildung C.3.: Dephasierungskurven für DMPC+GP (60:1) gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T=34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

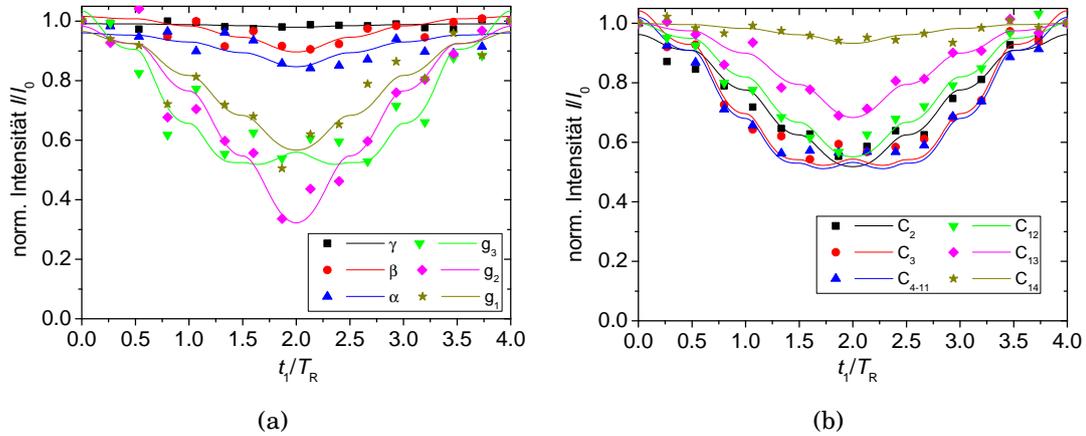
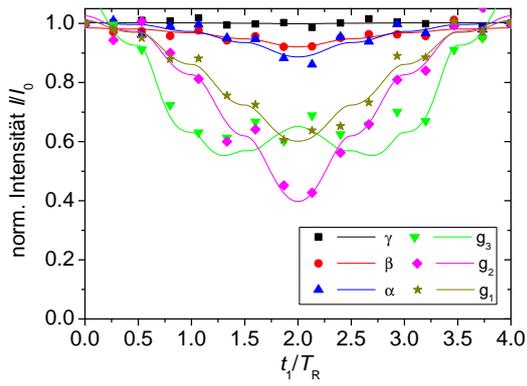
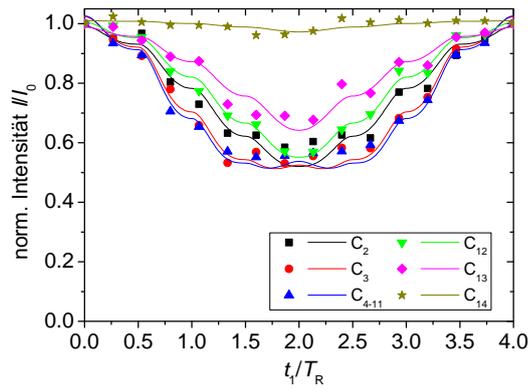


Abbildung C.4.: Dephasierungskurven für DMPC+GP (150:1) gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

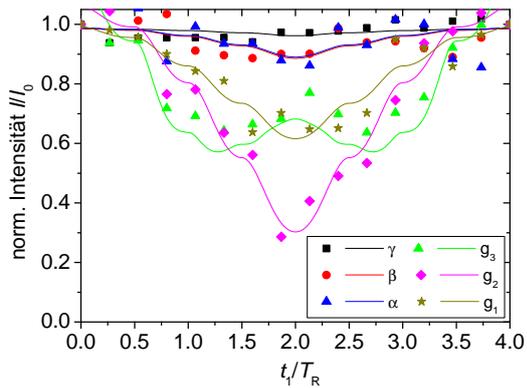


(a) DMPC+FGP (20:1)

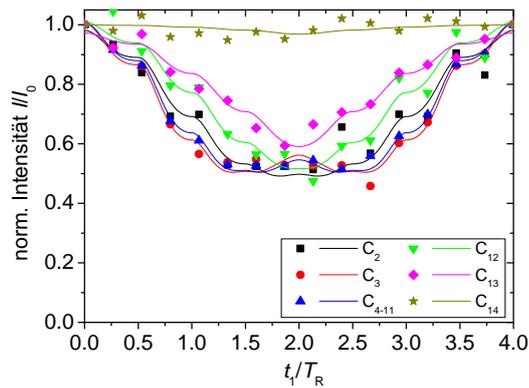


(b) DMPC+FGP (20:1)

Abbildung C.5.: Dephasierungskurven für (a) die Kopfgruppe und Glyceroleinheit und (b) die Alkylketten der Lipidmoleküle in der 20:1-Mischung mit FGP gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

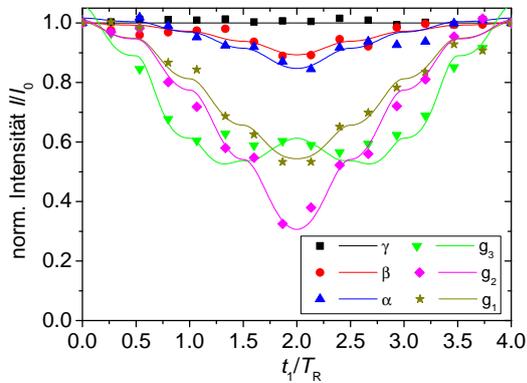


(a)

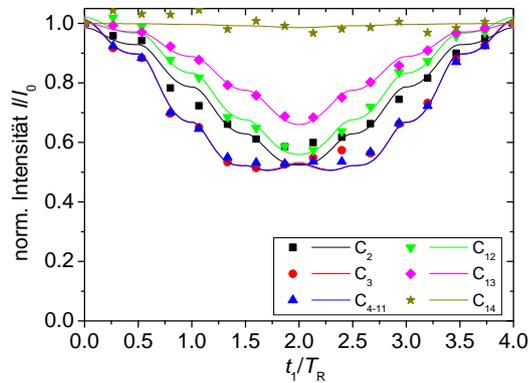


(b)

Abbildung C.6.: Dephasierungskurven für DMPC+FGP (60:1) gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T=34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).



(a)



(b)

Abbildung C.7.: Dephasierungskurven für DMPC+FGP (150:1) gemessen mittels recoupled DIPSHIFT-Experiment ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$).

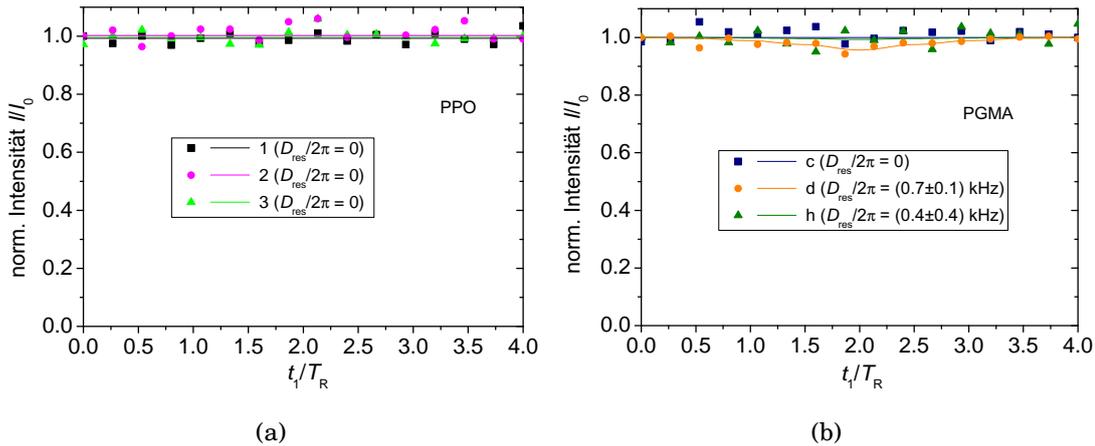


Abbildung C.8.: Dephasierungskurven der einzelnen Copolymerblöcke: (a) PPO und (b) PGMA für FGP in der 20:1-Mischung mit DMPC ($T = 34^\circ\text{C}$, $\nu_R = 5\text{ kHz}$, $N = 4$). Die ermittelten heteronuklearen, dipolaren Restkopplungen sind ebenfalls angegeben und weisen auf eine nahezu isotrope Mobilität der Polymermoleküle in den Mischungen hin.

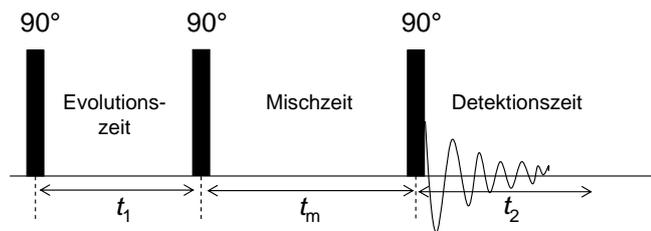


Abbildung C.9.: Sequenz des 2D-NOESY-Experiments nach Jeener et al. [286].

C.5 | 2D-NOESY-Spektren

An dieser Stelle soll das NOESY-Experiment zunächst kurz beschreiben werden, mit dessen Hilfe es möglich ist, räumliche Nähe zwischen zwei Kernen zu untersuchen [103, 264, 265]. Es wurde eine Dreipulssequenz mit entsprechendem Phasenzyklus benutzt, welcher es ermöglicht, phasen-sensitiv zu messen (s. Abb. C.9) [286]. Nach einem 90° -Puls existiert transversale Magnetisierung, welche sich unter dem Einfluss von Resonanzoffsets während einer Zeit t_1 entwickeln kann. Da alle Spins von ihrer Umgebung beeinflusst werden, spüren sie alle unterschiedliche lokale Magnetfelder. Dies führt dazu, dass die Spins unterschiedliche Larmorfrequenzen besitzen. Damit erhält jeder Spin in der Evolutionszeit seine eigene Frequenzmarkierung, die den Ausgangszustand des jeweiligen Spins charakterisiert. Durch Inkrementierung der Evolutionszeit t_1 entsteht eine Intensitätsmodulation, welche den Ausgangszustand der Spins kodiert.

Der zweite 90° -Puls speichert die Magnetisierung entlang der z-Richtung für die Dauer der Mischzeit t_m . Durch die dipolare Kopplung benachbarter Spins ist es während dieser Zeit möglich, dass ein Polarisationsübertrag stattfindet. Hat ein Polarisationsübertrag stattgefunden, ändert sich die Larmorfrequenz der beteiligten Spins. Nach der Mischzeit wird durch den letzten 90° -Puls wieder transversale Magnetisierung erzeugt und während der Detektionszeit t_2 gemessen. Die folgenden Fouriertransformationen bezüglich der Zeiten t_1 und t_2 liefern ein zweidimensionales Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$. Dabei beschreibt ω_1 den Ausgangszustand eines Spins und ω_2 den Zustand am Ende der Mischzeit. Hat während

der Mischzeit ein Polarisationstransfer stattgefunden, erscheint im Spektrum ein so genanntes Kreuzsignal, welches den Spins mit den zugehörigen chemischen Verschiebungen zugeordnet wird. Dies bedeutet, dass sich die beteiligten Spins in räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Nur allein von der Existenz der Kreuzsignale ist es jedoch nicht möglich, auf den zu Grunde liegenden Wechselwirkungsmechanismus (Spindiffusion oder NOE) zu schließen. Es existiert eine komplexe Abhängigkeit der Kreuzrelaxation vom Abstand der Spins und ihrer Dynamik, so dass das reine 2D-Spektrum nur qualitative Informationen liefert.

Für die Messungen der NOESY-Spektren wurde eine Rotationsfrequenz von $\nu_R = 4$ kHz verwendet. Pulslängen und Wartezeiten entsprechen denen wie in Abschnitt C.1 angegeben. Die Mischzeit betrug 200 ms und es wurden insgesamt 512 t_1 -Inkrementen aufgenommen, wobei jedes Inkrement 16 Scans beinhaltet.

In den Abbildung C.10 und C.11 sind zur Vollständigkeit die 2D-NOESY-Spektren der 60:1 und 150:1 Mischungen von Polymeren und Lipid gezeigt.

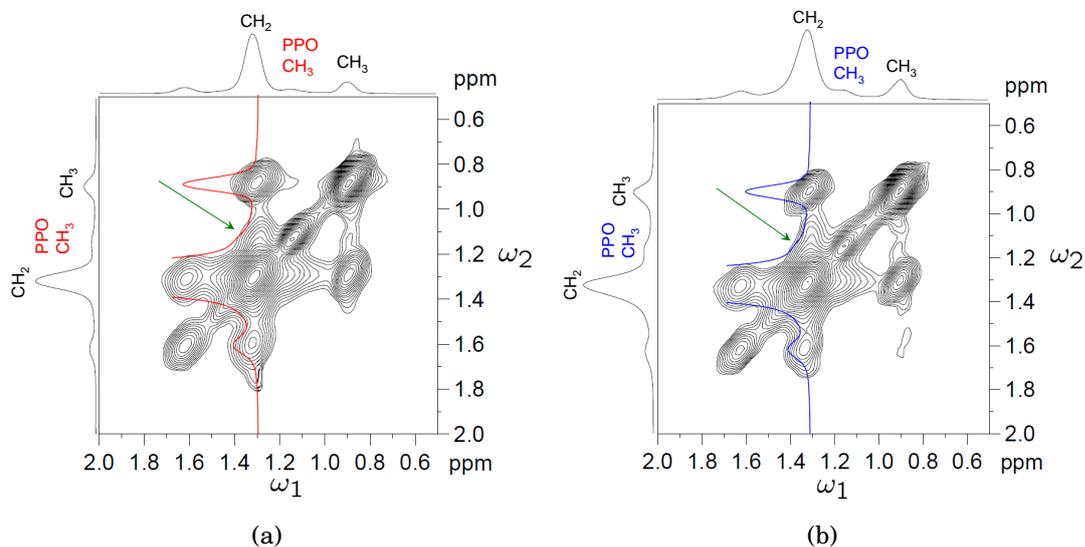


Abbildung C.10.: Ausschnitt aus den 2D-NOESY-Korrelationsspektren für (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP mit einer Konzentration von 60:1. Zur Verdeutlichung ist der Schnitt entlang der ω_1 -Dimension durch das Signal der CH_2 -Kette des Lipids bei ca. 1.3 ppm gezeigt. Jeweils rechts am Autokorrelationssignal befindet sich eine schwache Schulter (s. Pfeil), die der Korrelation zum PPO-Methylsignal entspricht (Basislevel für die Konturen ist 5% des CH_2 -Autopeaks, $T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 4$ kHz, $t_m = 200$ ms).

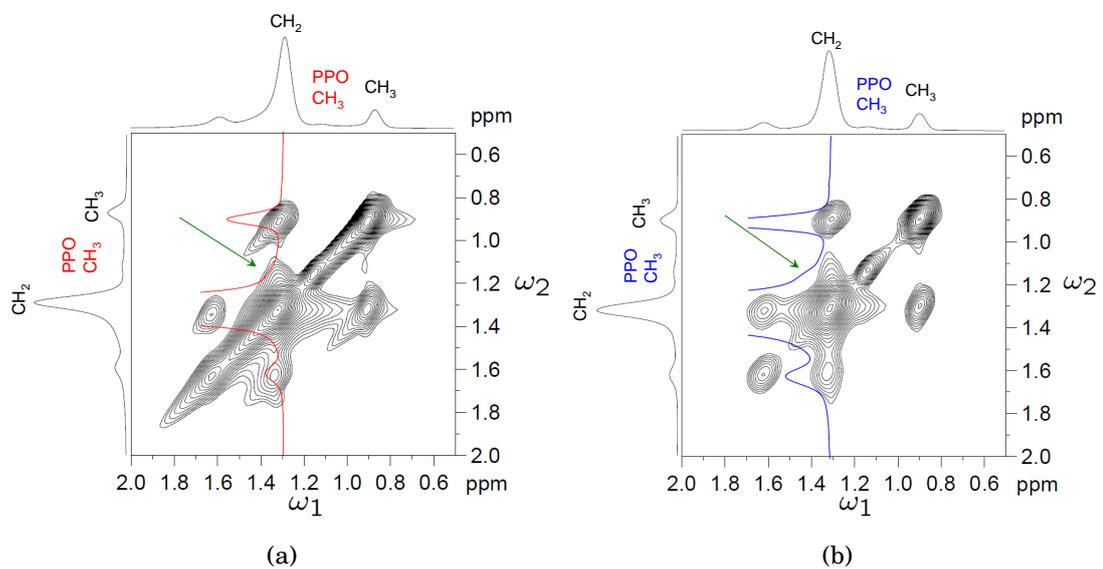


Abbildung C.11.: Ausschnitt aus den 2D-NOESY-Korrelationsspektren für (a) DMPC+GP und (b) DMPC+FGP mit einer Konzentration von 150:1. Zur Verdeutlichung ist der Schnitt entlang der ω_1 -Dimension durch das Signal der CH_2 -Kette des Lipids bei ca. 1.3 ppm gezeigt. Jeweils rechts am Autokorrelationssignal befindet sich eine sehr schwache Schulter (s. Pfeil), die der Korrelation zum PPO-Methylsignal entspricht (Basislevel für die Konturen ist 5% des CH_2 -Autopeaks, $T = 40^\circ\text{C}$, $\nu_R = 4\text{ kHz}$, $t_m = 200\text{ ms}$).

D | Datenauswertung der ^1H -DQ-Aufbaukurven der Lipid-Polymer-Mischungen

Wie in Kapitel 6.2 beschrieben, ist die Auswertung der DQ-Spektren für die Lipid-Polymer-Mischungen wegen der teilweisen Überlappung der Signale schwierig. In Abb. 6.13 ist zu erkennen, dass für kurze Evolutionszeiten das Signal der PPO-Methylgruppe sehr stark von dem der Lipidalkylketten überlagert ist. Daher wurden die Spektren erst ab Evolutionszeiten von $\tau_{\text{DQ}} = 2\text{ ms}$ ausgewertet. Sowohl die DQ- als auch die Referenzintensitäten wurden durch Integration über den PPO-Methyl-Peak erhalten. Wegen der Überlagerung mit dem Lipidsignal führt dies jedoch dazu, dass das Integral überschätzt wird. Der Versuch die beiden Signalanteile mittels Dekonvolution zu erhalten, führte nicht zum Erfolg. Dies ist vor allem der Vielzahl an Einzelsignalen geschuldet, welche im Signal der Lipidalkylketten enthalten sind [197]. Auch ist nicht klar, wie viele Signale verschiedener Konformationen das Signal der PPO-Methylgruppe enthält. Es ist jedoch anhand von Abb. 6.13 auf S. 107 für längere Evolutionszeiten ersichtlich, dass die Überlappung und damit der Einfluss des Lipids abnimmt.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu untersuchen, wurden für jede der Proben drei Messungen durchgeführt. Für jede Messung wurden die DQ- und Referenzdaten durch Integration unter dem PPO-Methyl-Signal erhalten. Um den isotropen Anteil in den Proben zu bestimmen, wurden die Referenzintensitäten angepasst. Da es keinen eindeutigen zweikomponentigen Kurvenverlauf gibt, wurde der isotrope Anteil für zwei Evolutionszeiten angepasst (ab 6 ms bzw. 8 ms, s. Abb. D.1). Für längere Evolutionszeiten wichen die bestimmten DQ-Aufbaukurven vom theoretischen Verlauf ab, d.h. der Plateauwert wurde nicht erreicht, wenn ein größerer isotroper Anteil abgezogen wurde. Für einen geringeren isotropen Anteil wurden die Plateauwerte zu groß bestimmt.

Für die beiden (nur gering unterschiedlichen) Anteile an isotrop mobilen Molekülen (s. Abb. D.1) wurden die normierten DQ-Aufbaukurven berechnet und durch Datenanpassung jeweils eine homonukleare, dipolare Restkopplung ermittelt (s. Abb. D.2). Für die Datenanpassung wurden in der entsprechenden DQ-Aufbaukurven jeweils einmal die ersten drei und einmal die ersten vier Punkte ausgelassen und anschließend die Restkopplung ermittelt. Weiterhin wurden die Daten sowohl mit einer fehlergewichteten, als auch mit einer ungewichteten Prozedur angepasst. Diese verschiedenen Ansätze zur Datenanalyse ergaben pro Probe acht Werte sowohl für die homonukleare, dipolare Restkopplung als auch für die Verteilungsbreite dieser Kopplung bei Annahme einer Gauß-Verteilung.

Um eine Abschätzung für den systematischen Fehler zu erhalten, wurde für je eine Messung jeder Konzentration eine Basislinienkorrektur unter dem PPO-Signal genutzt, um den Untergrund und damit auch den Anteil des Lipids zu subtrahieren. Der durch Basislinienkorrektur ermittelte systematische Fehler der Signalintensitäten für das PPO-Signal wurde anschließend zur Abschätzung des Einflusses auf die Restkopplung einerseits zu den ermittelten Intensitäten hinzu addiert und andererseits davon abgezogen. Aus den jeweils erhaltenen DQ-Aufbaukurven wurde erneut die Restkopplung bestimmt (s. Abb. D.3). Dies ergab pro Probe und Messung für jede der beiden aus Abzug des isotropen An-

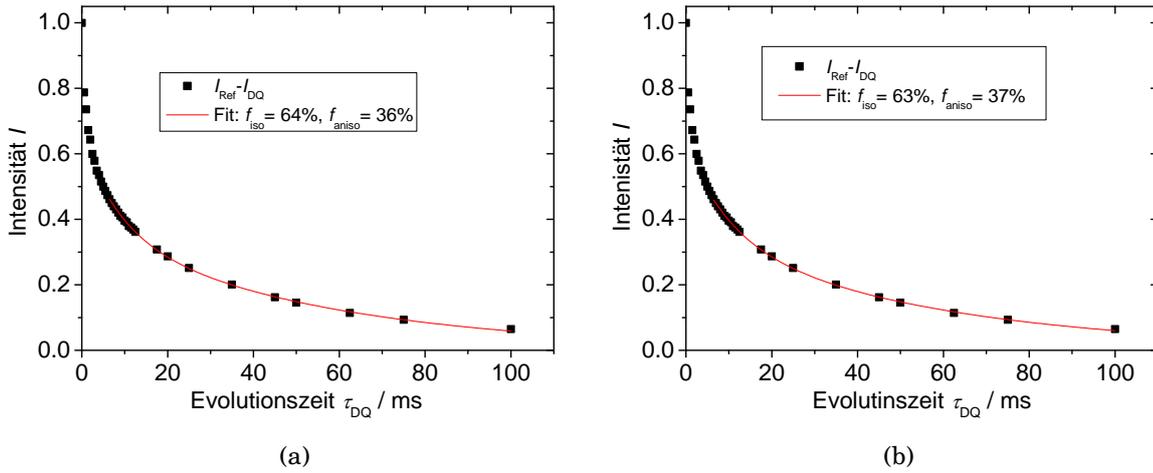


Abbildung D.1.: Anpassung des isotropen Anteils in der Probe (f_{iso}) ab einer Evolutionszeit von (a) $\tau_{\text{DQ}} = 6$ ms und (b) $\tau_{\text{DQ}} = 8$ ms für eine 20:1-Mischung aus DMPC+GP. Die angegebenen Anteile f_{iso} und f_{aniso} spiegeln die Anteile in der gesamten Probe (Lipid+Polymer) wider.

teils erhaltenen DQ-Aufbaukurven erneut vier Werte für die homonukleare Restkopplung und die Verteilungsbreite, welche die Minimal- bzw. Maximalwerte darstellten. Diese DQ-Aufbaukurven zeigten jedoch meist nicht das geforderte Plateau bei 0.5 bzw. war die Datenanpassung nicht immer stabil. In diesem Fall wurden die Restkopplungen nicht mit berücksichtigt. Somit wurden für jede Probe ca. 30 Werte für die homonukleare, dipolare Restkopplung und die zugehörige Verteilungsbreite erhalten. Aus den ermittelten Restkopplungen bzw. Verteilungsbreiten wurde für jede Probe ein statistischer, arithmetischer Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung bestimmt. Die Anteile an anisotrop mobilem PPO in der Lipidmembran wurden durch Bildung des Mittelwertes aus sechs verschiedenen Werten bestimmt. So ergeben sich die in Abb. 6.14 und Tab. 6.3 abgegebenen Werte für die homonuklearen, dipolaren Restkopplungen, die Verteilungsbreiten dieser Restkopplungen, sowie die Anteile an anisotrop mobilen PPO-Methylgruppen.

Abschätzung der homonuklearen, dipolaren Restkopplung aus der Polymerkonformation

In Kapitel 6.2 wurde bereits erwähnt, dass für Polymere ein Zusammenhang zwischen dem Ordnungsparameter, welcher sich aus der Polymerkonformation ergibt, und dem mittels NMR bestimmten Ordnungsparameter der Form

$$S = \frac{3}{5N} \frac{R^2}{R_0^2} = \frac{D_{\text{res}}}{D_{\text{Ref}}} \quad (\text{D.1})$$

existiert. Die Parameter R^2 und R_0^2 beschreiben den End-zu-End-Abstand bzw. den Gleichgewichts-End-zu-End-Abstand des Polymers. Die Anzahl der Kuhn-Segmente beträgt N . D_{res} und D_{Ref} sind die mittels NMR gemessene dipolare Restkopplung und die Referenzkopplung. Um die zu erwartende, dipolare Restkopplung abschätzen zu können, müssen die Parameter der Gleichung bekannt sein. Über den Gleichgewichts-End-zu-End-Abstand R_0^2 und die Kuhn-Länge b

$$b = \frac{R_0^2}{R_{\text{max}}}, \quad (\text{D.2})$$

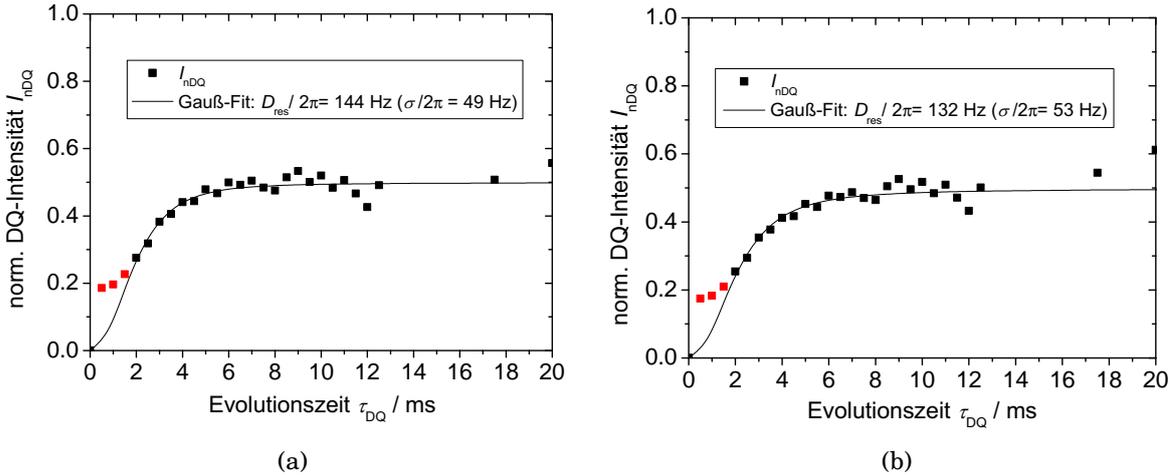


Abbildung D.2.: Normierte DQ-Aufbaukurven für eine 20:1-Mischung aus DMPC+GP nach Abzug des isotropen Anteils ab (a) $\tau_{\text{DQ}} = 6$ ms und (b) $\tau_{\text{DQ}} = 8$ ms mit den aus der Datenanpassung erhaltenen Restkopplungen $D_{\text{res}}/2\pi$ und Verteilungsbreiten $\sigma/2\pi$. Die ersten drei Punkte der jeweiligen Kurve wurden nicht in die Datenanpassung einbezogen.

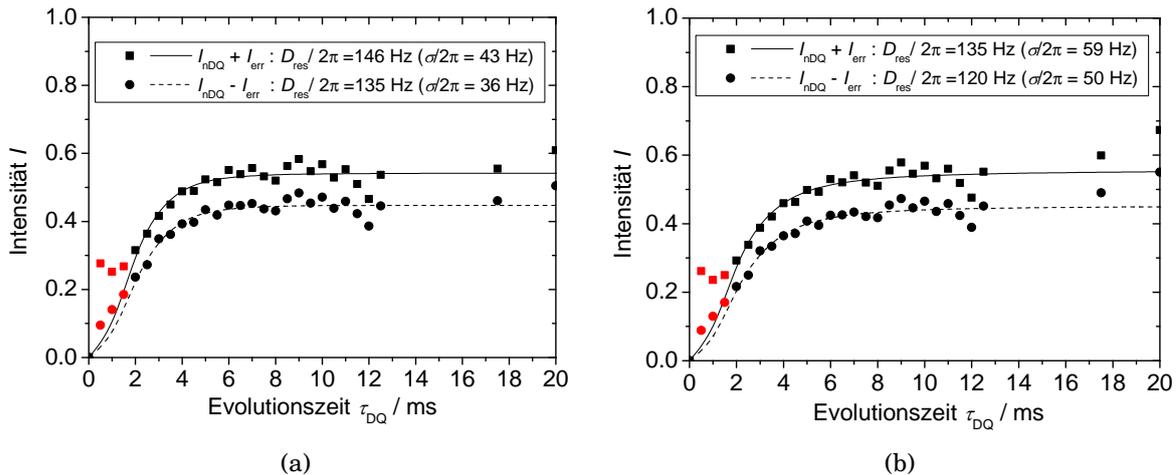


Abbildung D.3.: Abschätzung der Minimal- und Maximalwerte für die dipolare Restkopplung $D_{\text{res}}/2\pi$ und die Verteilungsbreite $\sigma/2\pi$ durch Addition und Subtraktion des sich aus der Messung/Auswertung ergebenden systematischen Fehlers für die beiden bestimmten, isotropen Anteile in einer 20:1-Mischung aus DMPC+GP. Die ersten drei Punkte wurden nicht in die Datenanpassung einbezogen.

mit R_{max} , dem End-zu-End-Abstand in gestreckter Konformation, und die Beziehung

$$R_0^2 = Nb^2, \quad (\text{D.3})$$

kann die Anzahl an Kuhn-Segmenten, N , bestimmt werden [274]. Der Gleichgewichts-End-zu-End-Abstand wird dabei aus dem Quotienten $R_0^2/M_w = 0.74 \text{ \AA}^2$ (Annahme für eine Schmelze bei ca. $T = 230^\circ\text{C}$ [274]) bei einem Molekulargewicht $M_w \approx 1974 \text{ Da}$ (für 34 Monomereinheiten PPO) ermittelt. Der Gleichgewichts-End-zu-End-Abstand ergibt sich damit zu $R_0 = 3.82 \text{ nm}$. Unter Annahme einer Länge von ca. $R_{\text{max}} = 10 \text{ nm}$ für die gestreckte Konformation des PPO-Blockes (s. Abb. 6.1) [52], wird die Kuhn-Länge $b = 1.46 \text{ nm}$ ermittelt. Wird das Polymer in die Membran eingebaut, kann für den End-zu-End-Abstand

des PPO-Blockes in durchspannender Konformation die hydrophobe Dicke der Lipidmembran von $R = 3\text{ nm}$ gewählt werden [60]. Der Ordnungsparameter ergibt sich damit zu $S \approx 0.05$. Mit der Referenzkopplung von 4.5 kHz wird schließlich eine dipolare Restkopplung von $D_{\text{res}} = 225\text{ Hz}$ bestimmt. Diese sollte ein Maß für untere Grenze der gemessenen Ordnungsparameter darstellen. Dass dieser Wert etwas höher liegt als die tatsächlich gemessenen Werte kann an den für die Abschätzung angenommenen Parametern liegen, welche wahrscheinlich etwas von den tatsächlichen Werten abweichen.

Literaturverzeichnis

- [1] Lodish, H., *Molecular Cell Biology*, 7. Aufl., Freeman and Macmillan Higher Education, 2013.
- [2] Schüring, J., *Wie viele Zellen hat der Mensch?*, <http://www.spektrum.de/frage/wie-viele-zellen-hat-der-mensch/620672> (2003, Stand Nov. 2014).
- [3] Edidin, M., *Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers*, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **4**, 414 (2003).
- [4] Singer, S. und G. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of Structure of Cell Membranes*, *Science* **175**, 720 (1972).
- [5] Bamberg, E., R. Benz, P. Läuger und G. Stark, *Ionentransport durch biologische Membranen*, *Chem. unserer Zeit* **8**, 33 (1974).
- [6] Bakker-Grunwald, T., *Die dynamische Biomembran: Regulation von Transportaktivitäten in tierischen Zellen*, *Chem. unserer Zeit* **19**, 69 (1985).
- [7] Al-Awqati, Q., J. Barasch und D. Landry, *Chloride Channels of Intracellular Organelles and Their Potential Role In Cystic-Fibrosis*, *J. Exp. Biol.* **172**, 245 (1992).
- [8] Mulley, J., I. Scheffer, S. Petrou und S. Berkovic, *Channelopathies as a genetic cause of epilepsy*, *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 171 (2003).
- [9] Ashkenazi, A. und V. Dixit, *Death Receptors: Signaling and Modulation*, *Science* **281**, 1305 (1998).
- [10] Thompson, C., *Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease*, *Science* **267**, 1456 (1995).
- [11] Fyles, T., *Synthetic ion channels in bilayer membranes*, *Chem. Soc. Rev.* **36**, 335 (2007).
- [12] Matile, S., A. Jentsch, J. Montenegro und A. Fin, *Recent synthetic transport systems*, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2453 (2011).
- [13] Sakai, N. und S. Matile, *Synthetic Ion Channels*, *Langmuir* **29**, 9031 (2013).
- [14] Busschaert, N. and Gale, P., *Small-Molecule Lipid-Bilayer Anion Transporters for Biological Applications*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 1374 (2013).
- [15] Reiss, P. und U. Koert, *Ion-Channels: Goals for Function-Oriented Synthesis*, *Acc. Chem. Res.* **46**, 2773 (2013).

- [16] Sakai, N., K. Brennan, L. Weiss und S. Matile, *Toward Biomimetic Ion Channels Formed by Rigid-Rod Molecules: Length-Dependent Ion-Transport Activity of Substituted Oligo(p-Phenylene)s*, J. Am. Chem. Soc. **119**, 8726 (1997).
- [17] Weiss, L., N. Sakai, B. Ghebremariam, C. Ni und S. Matile, *Rigid Rod-Shaped Polyols: Functional Nonpeptide Models for Transmembrane Proton Channels*, J. Am. Chem. Soc. **119**, 12142 (1997).
- [18] Wang, W., R. Li und G. Gokel, *Membrane-Length Amphiphiles Exhibiting Structural Simplicity and Ion Channel Activity*, Chem. Eur. J. **15**, 10543 (2009).
- [19] Wang, W., R. Li und G. Gokel, „Aplosspan“: *a bilayer-length, ion-selective ionophore that functions in phospholipid bilayers*, Chem. Commun. 911–913 (2009).
- [20] Sakai, N., J. Mareda und S. Matile, *Rigid-Rod Molecules in Biomembrane Models: From Hydrogen-Bonded Chains to Synthetic Multifunctional Pores*, Acc. Chem. Res. **38**, 79 (2005).
- [21] Tschierske, C., *Liquid crystal engineering - new complex mesophase structures and their relations to polymer morphologies, nanoscale patterning and crystal engineering*, Chem. Soc. Rev. **36**, 1930 (2007).
- [22] Muraoka, T., T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. Tabata, H. Noji und K. Kinbara, *Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores*, J. Am. Chem. Soc. **134**, 19788 (2012).
- [23] Hu, X., Z. Chen, G. Tang, J. Hou und Z. Li, *Single-Molecular Artificial Transmembrane Water Channels*, J. Am. Chem. Soc. **134**, 8384 (2012).
- [24] Fuhrhop, A. und T. Wang, *Bolaamphiphiles*, Chem. Rev. **104**, 2901 (2004).
- [25] Wang, T., L. Widanapathirana, Y. Zhao und M. Hong, *Aggregation and Dynamics of Oligocholate Transporters in Phospholipid Bilayers Revealed by Solid-State NMR Spectroscopy*, Langmuir **28**, 17071 (2012).
- [26] Cho, H. und Y. Zhao, *Translocation of Hydrophilic Molecules across Lipid Bilayers by Salt-Bridged Oligocholates*, Langmuir **27**, 4936 (2011).
- [27] Si, W., Z. Li und J. Hou, *Voltage-Driven Reversible Insertion into and Leaving from a Lipid Bilayer: Tuning Transmembrane Transport of Artificial Channels*, Angew. Chem. Int. Ed. **53**, 4578 (2014).
- [28] Mukhopadhyay, S. und U. Maitra, *Chemistry and biology of bile acids*, Curr. Sci. **87**, 1666 (2004).
- [29] Chiappetta, D. und A. Sosnik, *Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs*, Eur. J. Pharm. Biopharm. **66**, 303 (2007).
- [30] Amado, E. und J. Kressler, *Triphilic block copolymers with perfluorocarbon moieties in aqueous systems and their biochemical perspectives*, Soft Matter **7**, 7144 (2011).
- [31] Amado, E. und J. Kressler, *Interactions of amphiphilic block copolymers with lipid model membranes*, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **16**, 491 (2011).

- [32] Johnsson, M., M. Silvander, G. Karlsson und K. Edwards, *Effect of PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers on Structure and Stability of Phosphatidylcholine Liposomes*, *Langmuir* **15**, 6314 (1999).
- [33] Batrakova, E., S. Li, D. Miller und A. Kabanov, *Pluronic P85 Increases Permeability of a Broad Spectrum of Drugs in Polarized BBMEC and Caco-2 Cell Monolayers*, *Pharm. Res.* **16**, 1366 (1999).
- [34] Kabanov, A., E. Batrakova und V. Alakhov, *Pluronic[®] block copolymers for overcoming drug resistance in cancer*, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, PII S0169 (2002).
- [35] Demina, T., I. Grozdova, O. Krylova, A. Zhirnov, V. Istratov, H. Frey, H. Kautz und N. Melik-Nubarov, *Relationship between the Structure of Amphiphilic Copolymers and Their Ability To Disturb Lipid Bilayers*, *Biochemistry* **44**, 4042 (2005).
- [36] Pembouong, G., N. Morellet, T. Kral, M. Hof, D. Scherman, M.-F. Bureau und N. Mignet, *A comprehensive study in triblock copolymer membrane interaction*, *J. Controlled Release* **151**, 57 (2011).
- [37] Zhao, Y., F. Sakai, L. Su, Y. Liu, K. Wei, G. Chen und M. Jiang, *Progressive Macromolecular Self-Assembly: From Biomimetic Chemistry to Bio-Inspired Materials*, *Advanced Materials* **25**, 5215 (2013).
- [38] Ji, X., S. Dong, P. Wei, D. Xia und F. Huang, *A Novel Diblock Copolymer with a Supramolecular Polymer Block and a Traditional Polymer Block: Preparation, Controllable Self-Assembly in Water, and Application in Controlled Release*, *Adv. Mater.* **25**, 5725 (2013).
- [39] Wang, T., Y. Wu und A. Zeng, *Synthesis and Characterization of Amphiphilic Pluronic (F68)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine Copolymers and Their Micelles as a Drug Carrier*, *J. Appl. Polym. Sci.* **117**, 604 (2010).
- [40] Sharma, V., K. Stebe, J. Murphy und L. Tung, *Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation*, *Biophys. J.* **71**, 3229 (1996).
- [41] Maskarinec, S., J. Hannig, R. Lee und K. Lee, *Direct Observation of Poloxamer 188 Insertion into Lipid Monolayers*, *Biophys. J.* **82**, 1453 (2002).
- [42] Maskarinec, S. und K. Lee, *Comparative Study of Poloxamer Insertion into Lipid Monolayers*, *Langmuir* **19**, 1809 (2003).
- [43] Maskarinec, S., G. Wu und K. Lee, *Membrane Sealing by Polymers, Cell Injury: Mechanisms, Responses, and Repair* **1066**, 310 (2005).
- [44] Frey, S., D. Zhang, M. Carignano, I. Szleifer und K. Lee, *Effects of block copolymer's architecture on its association with lipid membranes: Experiments and simulations*, *J. Chem. Phys.* **127**, 114904 (2007).
- [45] Cheng, C.-Y., J.-Y. Wang, R. Kausik, K. Lee und S. Han, *Nature of Interactions between PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers and Lipid Membranes: (II) Role of Hydration Dynamics Revealed by Dynamic Nuclear Polarization*, *Biomacromolecules* **13**, 2624 (2012).

- [46] Firestone, M., A. Wolf und S. Seifert, *Small-Angle X-ray Scattering Study of the Interaction of Poly(ethylene oxide)-b-Poly(propylene oxide)-b-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers with Lipid Bilayers*, *Biomacromolecules* **4**, 1539 (2003).
- [47] Alakhova, D. und A. Kabanov, *Pluronics and MDR Reversal: An Update*, *Mol. Pharm.* **11**, 2566 (2014).
- [48] Krafft, M. und J. Riess, *Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution*, *Biochimie* **80**, 489 (1998).
- [49] Krafft, M., *Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research*, *Adv. Drug Del. Rev.* **47**, 209 (2001).
- [50] Erukova, V., O. Krylova, Y. Antonenko und N. Melik-Nubarov, *Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1468(1)**, 73 (2000).
- [51] Gerebtzoff, G., X. Li-Blatter, H. Fischer, A. Frenzel und A. Seelig, *Halogenation of Drugs Enhances Membrane Binding and Permeation*, *Chembiochem* **5**, 676 (2004).
- [52] Schwieger, C., A. Achilles, S. Scholz, J. Rüger, K. Bacia, K. Saalwächter, J. Kressler und A. Blume, *Binding of amphiphilic and triphilic block copolymers to lipid model membranes: the role of perfluorinated moieties*, *Soft Matter* **10**, 6147 (2014).
- [53] Riess, J., L. Sole-Violan und M. Postel, *A New Concept In the Stabilization of Injectable Fluorocarbon Emulsions - the Use of Mixed Fluorocarbon-Hydrocarbon Dowels*, *J. Dispersion Sci. Technol.* **13**, 349 (1992).
- [54] Trevino, L., F. Frézard, M. Postel und J. Riess, *Incorporation of a perfluoroalkyl-alkane ($R_F R_H$) into the phospholipid bilayer of DMPC liposomes results in greater encapsulation stability*, *J. Liposome Res.* **4**, 1017 (1994).
- [55] He, H., X. Cao und L. Lee, *Design of a novel hydrogel-based intelligent system for controlled drug release*, *J. Controlled Release* **95**, 391 (2004).
- [56] Thünemann, A., S. Kubowicz, H. von Berlepsch und H. Möhwald, *Two-Compartment Micellar Assemblies Obtained via Aqueous Self-Organization of Synthetic Polymer Building Blocks*, *Langmuir* **22**, 2506 (2006).
- [57] Raychaudhuri, P., Q. Li, A. Mason, E. Mikhailova, A. Heron und H. Bayley, *Fluorinated Amphiphiles Control the Insertion of α -Hemolysin Pores into Lipid Bilayers*, *Biochemistry* **50**, 1599 (2011).
- [58] König, S. und E. Sackmann, *Molecular and collective dynamics of lipid bilayers*, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1**, 78 (1996).
- [59] Douliez, J., A. Léonard und E. Dufourc, *Restatement of Order Parameters in Biomembranes: Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings*, *Biophys. J.* **68**, 1727 (1995).
- [60] Vermeer, L., B. de Groot, V. Reat, A. Milon und J. Czaplicki, *Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2H NMR experiments*, *Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett.* **36**, 919 (2007).

- [61] Nagle, J. und S. Tristram-Nagle, *Structure of lipid bilayers*, Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Biomembranes **1469**, 159 (2000).
- [62] Dowhan, W. und M. Bogdanov, *Functional roles of lipids in membranes*, in: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, herausgegeben von Vance, D. und J. Vance, 4. Aufl., Elsevier Science B.V., 2002.
- [63] Bermejo, J., A. Barbadillo, F. Tato und D. Chapman, *Magnetic resonance studies on interaction of antidepressants with lipid model membranes*, FEBS Lett. **52**, 69 (1975).
- [64] Kajiya, K., S. Kumazawa und T. Nakayama, *Steric Effects on Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers*, Biosci. Biotechnol. and Biochem. **65**, 2638 (2001).
- [65] Levitt, M., *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2. Aufl., John Wiley & Sons, 2009.
- [66] Auger, M., *Biological Membrane Structure by Solid-State NMR*, Curr. Issues Mol. Biol. **2(4)**, 119 (2000).
- [67] Ziegler, W. und A. Blume, *Acyl chain conformational ordering of individual components in liquid-crystalline bilayers of mixtures of phosphatidylcholines and phosphatidic acids. A comparative FTIR and ^2H NMR study*, Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **51**, 1763 (1995).
- [68] Aussenac, F., M. Laguerre, J. Schmitter und E. Dufourc, *Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated labels. ^2H NMR and Molecular Mechanics Study*, Langmuir **19**, 10468 (2003).
- [69] Dave, P., E. Tiburu, K. Damodaran und G. Lorigan, *Investigating Structural Changes in the Lipid Bilayer upon Insertion of the Transmembrane Domain of the Membrane-Bound Protein Phospholamban Utilizing ^{31}P and ^2H Solid-State NMR Spectroscopy*, Biophys. J. **86**, 1564 (2004).
- [70] Wi, S. und C. Kim, *Pore Structure, Thinning Effect, and Lateral Diffusive Dynamics of Oriented Lipid Membranes Interacting with Antimicrobial Peptide Protegrin-1: ^{31}P and ^2H solid-state NMR study*, J. Phys. Chem. B **112**, 11402 (2008).
- [71] Chieng, Y. und S. Chen, *Interaction and Complexation of Phospholipid Vesicles and Triblock Copolymers*, J. Phys. Chem. B **113**, 14934 (2009).
- [72] Muraoka, T., T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi und K. Kinbara, *Mimicking multipass transmembrane proteins: synthesis, assembly and folding of alternating amphiphilic multiblock molecules in liposomal membranes*, Chem. Commun. **47**, 194 (2011).
- [73] Tmir, S., A. Bondar, L. Cwiklik, M. Stefl, M. Hof, M. Vazdar, J. Lazar und P. Jungwirth, *Accurate Determination of the Orientational Distribution of a Fluorescent Molecule in a Phospholipid Membrane*, J. Phys. Chem. B **118**, 855 (2014).
- [74] Evans, K., J. Laszlo und C. D.L., *Carboxyl-terminated PAMAM dendrimer interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphocholine bilayers*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1838**, 445 (2014).

- [75] Somerharju, P., J. Virtanen, K. Eklund, P. Vainio und P. Kinnunen, *1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl Glycerophospholipids as Membrane Probes: Evidence for Regular Distribution in Liquid-Crystalline Phosphatidylcholine Bilayers*, *Biochemistry* **24**, 2773 (1985).
- [76] Aue, W., E. Bartholdi und R. Ernst, *Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance*, *J. Chem. Phys.* **64**, 2229 (1976).
- [77] Ernst, R., G. Bodenhausen und A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford Univ. Press, 1997.
- [78] deAzevedo, E., K. Saalwächter, O. Pascui, A. De Souza, T. Bonagamba und D. Reichert, *Intermediate motions as studied by solid-state separated local field NMR experiments*, *J. Chem. Phys.* **128**, 104505 (2008).
- [79] Kimura, T., K. Cheng, K. Rice und K. Gawrisch, *Location, Structure, and Dynamics of the Synthetic Cannabinoid Ligand CP-55,940 in Lipid Bilayers*, *Biophys. J.* **96**, 4916 (2009).
- [80] Graf, R., D. Demco, J. Gottwald, S. Hafner und H. Spiess, *Dipolar couplings and internuclear distances by double-quantum nuclear magnetic resonance spectroscopy of solids*, *J. Chem. Phys.* **106**, 885 (1997).
- [81] Barrè, P., S. Yamaguchi, H. Saitò und D. Huster, *Backbone dynamics of bacteriorhodopsin as studied by ¹³C solid-state NMR spectroscopy*, *Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett.* **32**, 578 (2003).
- [82] Cobo, M., A. Achilles, D. Reichert, E. deAzevedo und K. Saalwächter, *Recoupled separated-local-field experiments and applications to study intermediate-regime molecular motions*, *J. Magn. Reson.* **221**, 85 (2012).
- [83] Duer, M., *Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy*, Blackwell Publishing, 2004.
- [84] Haeberlen, U. und J. Waugh, *Coherent Averaging Effects in Magnetic Resonance*, *Phys. Rev.* **175**, 453 (1968).
- [85] Schmidt-Rohr, K. und H. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press Inc., 1996.
- [86] Lowe, I., *Free Induction Decays of Rotating Solids*, *Phys. Rev. Lett.* **2**, 285 (1959).
- [87] Andrew, E., A. Bradbury und R. Eades, *Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal rotated at High Speed*, *Nature* **182**, 1659 (1958).
- [88] Schnell, I. und H. Spiess, *High-Resolution ¹H NMR Spectroscopy in the Solid State: Very Fast Sample Rotation and Multiple-Quantum Coherences*, *J. Magn. Reson.* **151**, 153 (2001).
- [89] Abragam, A., *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford Univ. Press, 1989.
- [90] Reichert, D. und K. Saalwächter, *Dipolar Coupling: Molecular-Level Mobility*, in: *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance (NMR Crystallography)*, herausgegeben von Harris, R., R. Wasylichen und D. M.J., John Wiley & Sons, 2009.

- [91] Wittebort, R. und A. Szabo, *Theory of NMR relaxation in macromolecules: Restricted diffusion and jump models for multiple internal rotations in amino acid side chains*, J. Chem. Phys. **69**, 1722 (1978).
- [92] Wallach, D., *Effect of Internal Rotation On Angular Correlation Functions*, J. Chem. Phys. **47**, 5258 (1967).
- [93] Lipari, G. und A. Szabo, *Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation In Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity*, J. Am. Chem. Soc. **104**, 4546 (1982).
- [94] Sunada, S., N. Go und P. Koehl, *Calculation of nuclear magnetic resonance order parameters in proteins by normal mode analysis*, J. Chem. Phys. **104**, 4768 (1996).
- [95] Fedotov, V. und H. Schneider, *Structure and Dynamics of Bulk Polymers by NMR-Methods*, in: *NMR Basic Principles and Progress*, herausgegeben von Diehl, P., E. Fluck, H. Günther, R. Kosfeld und J. Seelig, Bd. 21, 1. Aufl., Springer: Berlin, 1989.
- [96] Hester, R., J. Ackerman, V. Cross und J. Waugh, *Resolved Dipolar Coupling Spectra of Dilute Nuclear Spins in Solids*, Phys. Rev. Lett. **34**, 993 (1975).
- [97] Hester, R. K., V. Cross, J. Ackerman und J. Waugh, *Structure determination by dipolar coupling measurements of dilute nuclear spins in a polycrystalline solid*, J. Chem. Phys. **63**, 3606 (1975).
- [98] Hester, R., J. Ackerman, B. Neff und J. Waugh, *Separated Local Field Spectra In NMR: Determination of Structure of Solids*, Phys. Rev. Lett. **36**, 1081 (1976).
- [99] Waugh, J., *Uncoupling of local field spectra in nuclear magnetic resonance: Determination of atomic positions in solids*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 1394 (1976).
- [100] Kolbert, A., H. de Groot, M. Levitt, M. Munowitz, J. Roberts, G. Harbison, J. Herzfeld und R. Griffin, *Two-dimensional dipolar-chemical shift NMR in rotating solids*, in: *Multinuclear Magnetic Resonance in Liquids and Solids - Chemical Applications*, herausgegeben von Granger, P. und R. Harris, Bd. 322, 339–354, Springer Netherlands, 1990.
- [101] Munowitz, M., R. Griffin, G. Bodenhausen und T. Huang, *Two-Dimensional Rotational Spin-Echo Nuclear Magnetic Resonance in Solids: Correlation of Chemical Shift and Dipolar Interactions*, J. Am. Chem. Soc. **103**, 2529 (1981).
- [102] Reichert, D., G. Hempel, H. Zimmermann, H. Schneider und Z. Luz, *Dynamic Carbon-13 MAS NMR: Application to Benzene Ring Flips in Polyaryl Ethers*, Solid State Nucl. Magn. Reson. **18**, 17 (2000).
- [103] Huster, D., K. Arnold und K. Gawrisch, *Investigation of Lipid Organization in Biological Membranes by Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*, J. Phys. Chem. B **103**, 243 (1999).
- [104] Hackel, C., T. Zinkevich, P. Belton, A. Achilles, D. Reichert und A. Krushelnitsky, *The trehalose coating effect on the internal protein dynamics*, Phys. Chem. Chem. Phys. **14**, 2727 (2012).

- [105] Pines, A., J. Waugh und M. Gibby, *Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy. A Method for High Resolution NMR of Dilute Spins in Solids*, J. Chem. Phys. **56**, 1776 (1972).
- [106] Pines, A., M. Gibby und J. Waugh, *Proton-Enhanced NMR of Dilute Spins in Solids*, J. Chem. Phys. **59**, 569 (1973).
- [107] Hartmann, S. und E. Hahn, *Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame*, Phys. Rev. **128**, 2042 (1962).
- [108] Nowacka, A., P. Mohr, J. Norrman, R. Martin und D. Topgaard, *Polarization Transfer Solid-State NMR for Studying Surfactant Phase Behavior*, Langmuir **26**, 16848 (2010).
- [109] Nowacka, A., N. Bongartz, O. Ollila, T. Nylander und D. Topgaard, *Signal intensities in ^1H - ^{13}C CP and INEPT MAS NMR of liquid crystals*, J. Magn. Reson. **230**, 165 (2013).
- [110] Lee, M. und W. Goldburg, *Nuclear-Magnetic-Resonance Line Narrowing by a Rotating rf Field*, Phys. Rev. **140**, 1261 (1965).
- [111] Bielecki, A., A. Kolbert und M. Levitt, *Frequency-switched pulse sequences: Homonuclear decoupling and dilute spin NMR in solids*, Chem. Phys. Lett. **155**, 341 (1989).
- [112] Vinogradov, E., P. Madhu und S. Vega, *High-resolution proton solid-state NMR spectroscopy by phase-modulated Lee-Goldburg experiment*, Chem. Phys. Lett. **314**, 443 (1999).
- [113] Stoll, M., A. Vega und R. Vaughan, *Heteronuclear dipolar modulated chemical shift spectra for geometrical information in polycrystalline solids*, J. Chem. Phys. **65**, 4093 (1976).
- [114] Bennett, A., C. Rienstra, M. Auger, K. Lakshmi und R. Griffin, *Heteronuclear decoupling in rotating solids*, J. Chem. Phys. **103**, 6951 (1995).
- [115] Fung, B., A. Khitrin und K. Ermolaev, *An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids*, J. Magn. Reson. **142**, 97 (2000).
- [116] Lehmann, M., T. Koetzle und W. Hamilton, *Precision Neutron Diffraction Structure Determination of Protein and Nucleic Acid Components. 1. The Crystal and Molecular Structure of Amino- Acid L-alanine*, J. Am. Chem. Soc. **94**, 2657 (1972).
- [117] Batchelder, L., C. Niu und D. Torchia, *Methyl Reorientation in Polycrystalline Amino Acids and Peptides - A ^2H NMR Spin-Lattice Relaxation Study*, J. Am. Chem. Soc. **105**, 2228 (1983).
- [118] Henry, E. und A. Szabo, *Influence of vibrational motion on solid state line shapes and NMR relaxation*, J. Chem. Phys. **82**, 4753 (1985).
- [119] Hong, M., J. Gross und R. Griffin, *Site-Resolved Determination of Peptide Torsion Angle ϕ from the Relative Orientations of Backbone N-H and C-H Bonds by Solid-State NMR*, J. Phys. Chem. B **101**, 5869 (1997).
- [120] Gullion, T. und J. Schaefer, *Rotational-Echo Double-Resonance NMR*, J. Magn. Reson. **81**, 196 (1989).

- [121] deAzevedo, E., W. Hu, T. Bonagamba und K. Schmidt-Rohr, *Principles of centerband-only detection of exchange in solid-state nuclear magnetic resonance, and extension to four-time centerband-only detection of exchange*, J. Chem. Phys. **112**, 8988 (2000).
- [122] Feike, M., D. Demco, R. Graf, J. Gottwald, S. Hafner und H. Spiess, *Broadband Multiple-Quantum NMR spectroscopy*, J. Magn. Reson. **122**, 214 (1996).
- [123] Hong, M., J. Gross, C. Rienstra, R. Griffin, K. Kumashiro und K. Schmidt-Rohr, *Coupling Amplification in 2D MAS NMR and Its Application to Torsion Angle Determination in Peptides*, J. Magn. Reson. **129**, 85 (1997).
- [124] Beckmann, P. und E. Schneider, *Methyl group rotation, ^1H spin-lattice relaxation in an organic solid, and the analysis of nonexponential relaxation*, J. Chem. Phys. **136**, 054508 (2012).
- [125] Yen, Y. und A. Pines, *Multiple-quantum NMR in solids*, J. Chem. Phys. **78**, 3579 (1983).
- [126] Baum, J., M. Munowitz, A. Garroway und A. Pines, *Multiple-quantum dynamics in solid state NMR*, J. Chem. Phys. **83**, 2015 (1985).
- [127] Baum, J. und A. Pines, *NMR Studies of Clustering in Solids*, J. Am. Chem. Soc. **108**, 7447 (1986).
- [128] Meier, B. H. und W. Earl, *Excitation of multiple quantum transitions under magic angle spinning conditions: Adamantane*, J. Chem. Phys. **85**, 4905 (1986).
- [129] Hafner, S. und H. Spiess, *Advanced Solid-State NMR Spectroscopy of Strongly Dipolar Coupled Spins Under Fast Magic Angle Spinning*, Conc. Magn. Res. **10**, 99 (1998).
- [130] Munowitz, M. und A. Pines, *Principles and Applications of Multiple-Quantum NMR*, in: *Advances in Chemical Physics*, herausgegeben von Prigogine, I. und S. Rice, Bd. 66, 1–152, John Wiley & Sons, 1987.
- [131] Sørensen, O., G. Eich, M. Levitt, G. Bodenhausen und R. Ernst, *Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **16**, 163 (1983).
- [132] Gottwald, J., D. Demco, R. Graf und H. Spiess, *High-resolution double-quantum NMR spectroscopy of homonuclear spin pairs and proton connectivities in solids*, Chem. Phys. Lett. **243**, 314 (1995).
- [133] Saalwächter, K., F. Lange, K. Matyjaszewski, C.-F. Huang und R. Graf, *BaBa-xy16: Robust and broadband homonuclear DQ recoupling for applications in rigid and soft solids up to the highest MAS frequencies*, J. Magn. Reson. **212**, 204 (2011).
- [134] Sommer, W., J. Gottwald, D. Demco und H. Spiess, *Dipolar Heteronuclear Multiple-Quantum NMR Spectroscopy In Rotating Solids*, J. Magn. Reson. A **113**, 131 (1995).
- [135] Saalwächter, K., B. Herrero und M. Lopez-Manchado, *Chain Order and Cross-Link Density of Elastomers As Investigated by Proton Multiple-Quantum NMR*, Macromolecules **38**, 9650 (2005).

- [136] Saalwächter, K., *Robust NMR Approaches for the Determination of Homonuclear Dipole-Dipole Coupling Constants in Studies of Solid Materials and Biomolecules*, Chem. Phys. Chem. **14**, 3000 (2013).
- [137] Ok, S., M. Steinhart, A. Serbescu, C. Franz, F. Chavez und K. Saalwächter, *Confinement Effects on Chain Dynamics and Local Chain Order in Entangled Polymer Melts*, Macromolecules **43**, 4429 (2010).
- [138] Saalwächter, K., *Proton multiple-quantum NMR for the study of chain dynamics and structural constraints in polymeric soft materials*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **51**, 1 (2007).
- [139] Saalwächter, K., P. Ziegler, O. Spyckerelle, B. Haidar, A. Vidal und J.-U. Sommer, *^1H multiple-quantum nuclear magnetic resonance investigations of molecular order distributions in poly(dimethylsiloxane) networks: Evidence for a linear mixing law in bimodal systems*, J. Chem. Phys. **119**, 3468 (2003).
- [140] Lange, F., *Rohdaten für eine Modellsubstanz (Gummi), welche für das Erläutern der Datenanalyse/Auswertung besser geeignet sind, als die für die in dieser Arbeit untersuchten Probensysteme*.
- [141] Chassè, W., J. Valentin, G. Genesky, C. Cohen und K. Saalwächter, *Precise dipolar coupling constant distribution analysis in proton multiple-quantum NMR of elastomers*, J Chem Phys **134**, 044907 (2011).
- [142] Brown, S., I. Schnell, J. Brand, K. Mullen und H. Spiess, *An Investigation of $\pi - \pi$ Packing in a Columnar Hexabenzocoronene by Fast Magic-Angle Spinning and Double-Quantum ^1H Solid-State NMR Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **121**, 6712 (1999).
- [143] Brown, S., I. Schnell, J. Brand, K. Mullen und H. Spiess, *A ^1H double-quantum magic-angle spinning solid-state NMR investigation of packing and dynamics in triphenylene and hexabenzocoronene derivatives*, J. Mol. Struct. **521**, 179 (2000).
- [144] Graf, R., *New proton conducting materials for technical applications: What can we learn from solid state NMR studies?*, Solid State Nucl. Magn. Reson. **40**, 127 (2011).
- [145] Geen, H., J. Titman, J. Gottwald und H. Spiess, *Solid-state proton multiple-quantum NMR spectroscopy with fast magic angle spinning*, Chem. Phys. Lett. **227**, 79 (1994).
- [146] Geen, H., J. Titman, J. Gottwald und H. Spiess, *Spinning Sidebands in the Fast-MAS Multiple-Quantum Spectra of Protons in Solids*, J. Magn. Reson. A **114**, 264 (1995).
- [147] Friedrich, U., I. Schnell, S. Brown, A. Lupulescu, D. Demco und H. Spiess, *Spinning-sideband patterns in multiple-quantum magic-angle spinning NMR spectroscopy*, Mol. Phys. **95**, 1209 (1998).
- [148] Brown, S. und H. Spiess, *Advanced Solid-State NMR Methods for the Elucidation of Structure and Dynamics of Molecular, Macromolecular, and Supramolecular Systems*, Chem. Rev. **101**, 4125 (2001).
- [149] Saalwächter, K., *Heteronuclear Recoupling Methods in Solid-State NMR*, Doktorarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz (2000).

- [150] Brown, S., *Probing proton-proton proximities in the solid state*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **50**, 199 (2007).
- [151] De Paul, S., K. Saalwächter, R. Graf und H. Spiess, *Sideband Patterns from Rotor-Encoded Longitudinal Magnetization in MAS Recoupling Experiments*, J. Magn. Reson. **146**, 140 (2000).
- [152] Abramowitz, M. und I. Stegun, *Handbook of Mathematical Functions*, 10. Aufl., Washington, D.C.: United States Department of Commerce, 1972.
- [153] Nicolson, G., *The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1838**, 1451 (2014).
- [154] Goni, F., *The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1838**, 1467 (2014).
- [155] Pietzsch, J., *Mind the Membrane*, Horizon Symposia: A Living Frontier. Nature publishing group 1–4 (2004).
- [156] Voet, D. und J. Voet, *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1992.
- [157] Caffrey, M. und J. Hogan, *LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis*, Chem. Phys. Lipids **61**, 1 (1992).
- [158] Hresko, R., I. Sugar, Y. Barenholz und T. Thompson, *Lateral Distribution of A Pyrene-Labeled Phosphatidylcholine in Phosphatidylcholine Bilayers: Fluorescence Phase and Modulation Study*, Biochemistry **25**, 3813 (1986).
- [159] Guo, W. und J. A. Hamilton, *A Multinuclear Solid-state NMR Study of Phospholipid-Cholesterol Interactions. Dipalmitoylphosphatidylcholine-Cholesterol Binary System*, Biochemistry **34**, 14174 (1995).
- [160] Phillips, M., H. Hauser und F. Paltauf, *The inter- and intra-molecular mixing of hydrocarbon chains in lecithin / water systems*, Chem. Phys. Lipids **8**, 127 (1972).
- [161] Drolle, E., N. Kučerka, M. Hoopes, Y. Choi, J. Katsaras, M. Karttunen und Z. Leonenko, *Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1828**, 2247 (2013).
- [162] Blokzijl, W. und J. Engberts, *Hydrophobe Effekte - Ansichten und Tatsachen*, Angew. Chem. **105**, 1610 (1993).
- [163] Tanford, C., *The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter*, Science **200**, 1012 (1978).
- [164] Israelachvili, J., D. Mitchell und B. Ninham, *Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2 **72**, 1525 (1976).
- [165] Stockton, G., C. Polnaszek, A. Tulloch, F. Hasan und I. Smith, *Molecular Motion and Order In Single-Bilayer Vesicles and Multilamellar Dispersions of Egg Lecithin and Lecithin-Cholesterol Mixtures. A Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Study of Specifically Labeled Lipids*, Biochemistry **15**, 954 (1976).

- [166] Blume, A., *Lipids*, in: *Biochemistry of Membranes*, herausgegeben von Walz, D., J. Teissié und G. Milazzo, Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 2004.
- [167] Chapman, D., R. Williams und B. Ladbroke, *Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins)*, Chem. Phys. Lipids **1**, 445 (1967).
- [168] Dörfler, H. und G. Brezesinski, *Phasenumwandlungserscheinungen in Lecithin /-Wasser-Systemen I. Einfluß des Wassers auf die Phasenumwandlungen homologer Lecithin / Wasser-Monohydrate*, Colloid Polym. Sci. **261**, 286 (1983).
- [169] Dörfler, H. und G. Brezesinski, *Phasenumwandlungserscheinungen in Lecithin /-Wasser-Systemen II. Das Zustandsdiagramm 1,2-Dipalmitoyllecithin / Wasser*, Colloid Polym. Sci. **261**, 329 (1983).
- [170] Janiak, M., D. Small und G. Shipley, *Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin*, J. Biol. Chem. **254**, 6068 (1979).
- [171] Lee, A., *Lipid phase transitions and phase diagrams. 1. Lipid phase transitions*, Biochim. Biophys. Acta **472**, 237 (1977).
- [172] Winter, R., *Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen*, Chemie in unserer Zeit **24**, 71 (1990).
- [173] Pearson, R. und I. Pascher, *The molecular structure of lecithin dihydrate*, Nature **281**, 499 (1979).
- [174] Seifert, U., *Configurations of fluid membranes and vesicles*, Adv. Physics **46**, 13 (1997).
- [175] Dufourc, E., C. Mayer, J. Stohrer, G. Althoff und G. Kothe, *Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements*, Biophys. J. **61**, 42 (1992).
- [176] Campbell, R., E. Meirowitch und J. Freed, *Slow-Motional NMR Line Shapes for Very Anisotropic Rotational Diffusion. Phosphorous-31 NMR of Phospholipids*, J. Phys. Chem. **83**, 525 (1979).
- [177] Sparrman, T. und P.-O. Westlund, *An NMR line shape and relaxation analysis of heavy water powder spectra of the L_{α} , $L_{\beta'}$ and $P_{\beta'}$ phases in the DPPC / water system*, Phys. Chem. Chem. Phys. **5**, 2114 (2003).
- [178] Cornell, B., J. Davenport und F. Separovic, *Low-frequency motion in membranes: the effect of cholesterol and proteins*, Biochim. Biophys. Acta **689**, 337 (1982).
- [179] McMullen, T. W., R. Lewis und R. McElhaney, *Differential Scanning Calorimetric Study of the Effect of Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior of a Homologous Series of Linear Saturated Phosphatidylcholines*, Biochemistry **32**, 516 (1993).
- [180] Seelig, A. und J. Seelig, *The Dynamic Structure of Fatty Acyl Chains in a Phospholipid Bilayer Measured by Deuterium Magnetic Resonance*, Biochemistry **13**, 4839 (1974).

- [181] Birdsall, N., J. Feeney, A. Lee, Y. Levine und J. Metcalfe, *Dipalmitoyl-lecithin: Assignment of the ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra, and Conformational Studies*, J. Chem. Soc.- Perkin Transactions **2**, 1441 (1972).
- [182] Dvinskikh, S., V. Castro und D. Sandstrom, *Heating caused by radiofrequency irradiation and sample rotation in ^{13}C magic angle spinning NMR studies of lipid membranes*, Magn. Reson. Chem. **42**, 875 (2004).
- [183] Forbes, J., J. Bowers, X. Shan, L. Moran, E. Oldfield und M. Moscarello, *Some New Developments In Solid-state Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of Lipids and Biological Membranes, including the Effects of Cholesterol In Model and Natural Systems*, J. Chem. Soc.- Faraday Transactions I **84**, 3821 (1988).
- [184] Forbes, J., C. Husted und E. Oldfield, *High-Field, High-Resolution Proton „Magic-Angle“ Sample-Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of Gel and Liquid Crystalline Lipid Bilayers and the Effects of Cholesterol*, J. Am. Chem. Soc. **110**, 1059 (1988).
- [185] Seelig, J., *^{31}P nuclear magnetic resonance and head group structure of phospholipids in membranes*, Biochim. Biophys. Acta **515**, 105 (1978).
- [186] Gally, H., W. Niederberger und J. Seelig, *Conformation and Motion of Choline Head Group In Bilayers of Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine*, Biochemistry **14**, 3647 (1975).
- [187] Hong, M., K. Schmidt-Rohr und D. Nanz, *Study of Phospholipid Structure by ^1H , ^{13}C , ^{31}P Dipolar Couplings from Two-Dimensional NMR*, Biophys. J. **69**, 1939 (1995).
- [188] Tonelli, A., *NMR spectroscopy and polymer microstructure: the conformational connection*, VCH Publisher, 1989.
- [189] Bruzik, K., G. Salamonczyk und B. Sobon, *^{13}C CP-MAS study of the gel phases of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine*, Biochim. Biophys. Acta **1023**, 143 (1990).
- [190] Hong, M., A. Pines und S. Caldarelli, *Measurement and Assignment of Long-Range C-H Dipolar Couplings in Liquid Crystals by Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, J. Phys. Chem. **100**, 14815 (1996).
- [191] Bruzik, K. und J. Harwood, *Conformational Study of Phospholipids in Crystalline State and Hydrated Bilayers by ^{13}C and ^{31}P CP-MAS NMR*, J. Am. Chem. Soc. **119**, 6629 (1997).
- [192] Tonelli, A., *Failure of the γ -Gauche Effect Method To Predict the Stereosequence-Dependent ^{13}C NMR Spectrum of the Disubstituted Vinyl Polymer Atactic Poly(methyl methacrylate)*, Macromolecules **24**, 3065 (1991).
- [193] Dvinskikh, S., V. Castro und D. Sandstrom, *Efficient solid-state NMR methods for measuring heteronuclear dipolar couplings in unoriented lipid membrane systems*, Phys. Chem. Chem. Phys. **7**, 607 (2005).
- [194] Ferreira, T., F. Coreta-Gomes, O. Ollila, M. Moreno, W. Vaz und D. Topgaard, *Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state ^1H - ^{13}C NMR and MD simulation studies*, Phys. Chem. Chem. Phys. **15**, 1976 (2013).

- [195] Middleton, D., E. Hughes und J. Madine, *Screening Molecular Associations with Lipid Membranes Using Natural Abundance ^{13}C Cross-Polarization Magic-Angle Spinning NMR and Principal Component Analysis*, J. Am. Chem. Soc. **126**, 9478 (2004).
- [196] Dvinskikh, S., H. Zimmermann, A. Maliniak und D. Sandstrom, *Heteronuclear dipolar recoupling in solid-state nuclear magnetic resonance by amplitude-, phase-, and frequency-modulated Lee-Goldburg cross-polarization*, J. Chem. Phys. **122**, 044512 (2005).
- [197] Bloom, M., E. Burnell, A. MacKay, C. Nichol, M. Valic und G. Weeks, *Fatty Acyl Chain Order In Lecithin Model Membranes Determined From Proton Magnetic Resonance*, Biochemistry **17**, 5750 (1978).
- [198] Metcalfe, J., N. Birdsall, J. Feeney, A. Lee, Y. Levine und P. Partington, ^{13}C NMR Spectra of Lecithin Vesicles and Erythrocyte Membranes, Nature **233**, 199 (1971).
- [199] Sheetz, M. und S. Chan, *Effect of Sonication on the Structure of Lecithin Bilayers*, Biochemistry **11**, 4573 (1972).
- [200] Caldarelli, S., M. Hong, L. Emsley und A. Pines, *Measurement of Carbon-Proton Dipolar Couplings in Liquid Crystals by Local Dipolar Field NMR Spectroscopy*, J. Phys. Chem. **100**, 18696 (1996).
- [201] Stubbs, C., T. Kouyama, K. Kinoshita und A. Ikegami, *Effect of Double Bonds on the Dynamic Properties of the Hydrocarbon Region of Lecithin Bilayers*, Biochemistry **20**, 4257 (1981).
- [202] Seelig, A. und J. Seelig, *Effect of a Single Cis Double Bond on the Structure of a Phospholipid Bilayer*, Biochemistry **16**, 45 (1977).
- [203] Warschawski, D. und P. Devaux, *Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a ^1H - ^{13}C solid-state NMR study at natural abundance*, Eur. Biophys. J. with Biophysics Letters **34**, 987 (2005).
- [204] Epand, R., *Cholesterol in Bilayers of Sphingomyelin or Dihydrosphingomyelin at Concentrations Found in Ocular Lens Membranes*, Biophys. J. **84**, 3102 (2003).
- [205] Bittman, R., S. Clejan, S. Lundkatz und M. Phillips, *Influence of cholesterol on bilayers of ester-linked and ether-linked phospholipids: Permeability and ^{13}C -nuclear magnetic resonance measurements*, Biochim. Biophys. Acta **772**, 117 (1984).
- [206] Subczynski, W., A. Wisniewska, J. Yin, J. Hyde und A. Kusumi, *Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol*, Biochemistry **33**, 7670 (1994).
- [207] Mathai, J., S. Tristram-Nagle, J. Nagle und M. Zeidel, *Structural Determinants of Water Permeability through the Lipid Membrane*, J. Gen. Physiol. **131**, 69 (2008).
- [208] Silvius, J., *Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems*, Biochim. Biophys. Acta-biomembranes **1610**, 174 (2003).
- [209] Martinez, G., E. Dykstra, S. Lope-Piedrafita und M. Brown, *Lanosterol and Cholesterol-Induced Variations in Bilayer Elasticity Probed by ^2H NMR Relaxation*, Langmuir **20**, 1043 (2004).

- [210] Léonard, A. und E. Dufourc, *Interactions of cholesterol with the membrane lipid matrix. A solid state NMR approach*, *Biochimie* **73**, 1295 (1991).
- [211] Huang, T., C. Lee, S. Dasgupta, A. Blume und R. Griffin, *A ^{13}C and ^2H Nuclear Magnetic Resonance Study of Phosphatidylcholine / Cholesterol Interactions: Characterization of Liquid-Gel Phases*, *Biochemistry* **32**, 13277 (1993).
- [212] Urbina, J., S. Pekerar, H. Le, J. Patterson, B. Montez und E. Oldfield, *Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ^2H , ^{13}C and ^{31}P -NMR spectroscopy*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1238**, 163 (1995).
- [213] Bartels, T., R. Lankalapalli, R. Bittman, K. Beyer und M. Brown, *Raftlike Mixtures of Sphingomyelin and Cholesterol Investigated by Solid-State ^2H NMR Spectroscopy*, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14521 (2008).
- [214] Douliez, J.-P., A. Léonard und E. Dufourc, *Conformational Order of DMPC sn-1 versus sn-2 Chains and Membrane Thickness: An Approach to Molecular Protrusion by Solid State ^2H -NMR and Neutron Diffraction*, *J. Phys. Chem.* **100**, 18450 (1996).
- [215] LeGuerneve, C. und M. Auger, *New Approach to Study Fast and Slow Motions in Lipid Bilayers: Application to Dimyristoylphosphatidylcholine-Cholesterol Interactions*, *Biophys. J.* **68**, 1952 (1995).
- [216] Brown, M. und J. Seelig, *Influence of Cholesterol on the Polar Region of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Bilayers*, *Biochemistry* **17**, 381 (1978).
- [217] Warschawski, D. und P. Devaux, *^1H - ^{13}C polarization transfer in membranes: A tool for probing lipid dynamics and the effect of cholesterol*, *J. Magn. Reson.* **177**, 166 (2005).
- [218] Brüning, B., M. Rheinstädter, A. Hiess, B. Weinhausen, T. Reusch, S. Aeffner und T. Salditt, *Influence of cholesterol on the collective dynamics of the phospholipid acyl chains in model membranes*, *Eur. Phys. J. E* **31**, 419 (2010).
- [219] Fritzsching, K., J. Kim und G. Holland, *Probing lipid-cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and ^{13}C solid-state NMR*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1828**, 1889 (2013).
- [220] Mihailescu, M., O. Soubias, D. Worcester, S. White und K. Gawrisch, *Structure and Dynamics of Cholesterol-Containing Polyunsaturated Lipid Membranes Studied by Neutron Diffraction and NMR*, *J. Membr. Biol.* **239**, 63 (2011).
- [221] Davis, J., J. Clair und J. Juhasz, *Phase Equilibria in DOPC/DPPC- d_{62} /Cholesterol Mixtures*, *Biophys. J.* **96**, 521 (2009).
- [222] Ohvo-Rekilä, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki und J. Slotte, *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes*, *Prog. Lipid Res.* **41**, 66 (2002).
- [223] Quinn, P., *A lipid matrix model of membrane raft structure*, *Prog. Lipid Res.* **49**, 390 (2010).
- [224] Knoll, W., G. Schmidt, K. Ibel und E. Sackmann, *Small-Angle Neutron Scattering Study of Lateral Phase Separation in Dimyristoylphosphatidylcholine-Cholesterol Mixed Membranes*, *Biochemistry* **24**, 5240 (1985).

- [225] Bach, D. und E. Wachtel, *Phospholipid / cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1610**, 187 (2003).
- [226] Huang, J., J. Buboltz und G. Feigenson, *Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1417**, 89 (1999).
- [227] Marsh, D., *Molecular volumes of phospholipids and glycolipids in membranes*, *Chem. Phys. Lipids* **163**, 667 (2010).
- [228] Collado, M., F. Goni, A. Alonso und D. Marsh, *Domain Formation in Sphingomyelin / Cholesterol Mixed Membranes Studied by Spin-Label Electron Spin Resonance Spectroscopy*, *Biochemistry* **44**, 4911 (2005).
- [229] Sankaram, M. und T. Thompson, *Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8686 (1991).
- [230] Hung, W.-C., M.-T. Lee, F.-Y. Chen und H. Huang, *The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers*, *Biophys. J.* **92**, 3960 (2007).
- [231] Werner, S., H. Ebert, B.-D. Lechner, F. Lange, A. Achilles, R. Bärenwald, S. Poppe, A. Blume, K. Saalwächter, C. Tschierske und K. Bacia, *Dendritic domains with hexagonal symmetry formed by X-shaped bolapolyphiles in lipid membranes*, *Chem. Eur. J.* (2015).
- [232] Kurz, R., M. Cobo, E. de Azevedo, M. Sommer, A. Wicklein, M. Thelakkat, G. Hempel und K. Saalwächter, *Avoiding Bias Effects in NMR Experiments for Heteronuclear Dipole-Dipole Coupling Determinations: Principles and Application to Organic Semiconductor Materials*, *Chem. Phys. Chem.* **14**, 3146 (2013).
- [233] Schmidt-Rohr, K., D. Nanz, L. Emsley und A. Pines, *NMR Measurement of Resolved Heteronuclear Dipole Couplings In Liquid Crystals and Lipids*, *J. Phys. Chem.* **98**, 6668 (1994).
- [234] Rapp, A., I. Schnell, D. Sebastiani, S. Brown, V. Percec und H. Spiess, *Supramolecular Assembly of Dendritic Polymers Elucidated by ^1H and ^{13}C Solid-State MAS NMR Spectroscopy*, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13284 (2003).
- [235] Ohno, H., Y. Maeda und E. Tsuchida, *^1H -NMR Study of the effect of synthetic polymers on the fluidity, transition temperature and fusion of dipalmitoyl phosphatidylcholine small vesicles*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **642**, 27 (1981).
- [236] Mavromoustakos, T. und E. Theodoropoulou, *A combined use of ^{13}C -cross polarization / magic angle spinning, ^{13}C -magic angle spinning and ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy with differential scanning calorimetry to study cannabinoid-membrane interactions*, *Chem. Phys. Lipids* **92**, 37 (1998).
- [237] Schleyer, P., M. C., D. A., J. H. und N. van Eikema Hommes, *Nuclues-Independent Chemical Shifts: A Simple and Efficient Aromaticity Probe*, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6317 (1996).
- [238] Wesołowska, O., J. Gašiorowska, J. Petrus, B. Czarnik-Matusiewicz und K. Michalak, *Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1838**, 173 (2014).

- [239] Tuchtenhagen, J., W. Ziegler und A. Blume, *Acyl chain conformational ordering in liquid-crystalline bilayers: comparative FT-IR and ^2H -NMR studies of phospholipids differing in headgroup structure and chain length*, Eur. Biophys. J. **23**, 323 (1994).
- [240] Busch, S. und T. Unruh, *The influence of additives on the nanoscopic dynamics of the phospholipid dimyristoylphosphatidylcholine*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1808**, 199 (2011).
- [241] Lee, B., R. Faller, A. Sum, I. Vattulainen, M. Patra und M. Karttunen, *Structural effects of small molecules on phospholipid bilayers investigated by molecular simulations*, Fluid Phase Equilib. **228–229**, 135 (2005).
- [242] Lee, H., H.-R. Kim, R. Larson und J. Park, *Effects of the Size, Shape, and Structural Transition of Thermosensitive Polypeptides on the Stability of Lipid Bilayers and Liposomes*, Macromolecules **45**, 7304 (2012).
- [243] Korstanje, L., E. Van Faassen und Y. Levine, *Reorientational dynamics in lipid vesicles and liposomes studied with ESR: effects of hydration, curvature and unsaturation*, Biochim. Biophys. Acta **982**, 196 (1989).
- [244] Deese, A., E. Dratz, F. Dahlquist und M. R. Paddy, *Interaction of Rhodopsin with Two Unsaturated Phosphatidylcholines: A Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Study*, Biochemistry **20**, 6420 (1981).
- [245] Paddy, M., F. Dahlquist, J. Davis und M. Bloom, *Dynamical and Temperature-Dependent Effects of Lipid-Protein Interactions. Application of Deuterium Nuclear Magnetic Resonance and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy to the Same Reconstitutions of Cytochrome c oxidase*, Biochemistry **20**, 3152 (1981).
- [246] Bienvenue, A., M. Bloom, J. Davis und P. Devaux, *Evidence for Protein-associated Lipids from Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Studies of Rhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Recombinants*, J. Biol. Chem. **257**, 3032 (1982).
- [247] Kintanar, A., A. Kunwar und E. Oldfield, *Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study of the Fluorescent Probe Diphenylhexatriene in Model Membrane Systems*, Biochemistry **25**, 6517 (1986).
- [248] Holland, G., B. Cherry und T. Alam, *Distribution effects on ^1H double-quantum MAS NMR spectra*, J. Magn. Reson. **167**, 161 (2004).
- [249] Lechner, B.-D., *unveröffentlichte Ergebnisse*.
- [250] Werner, S. und K. Bacia, *unveröffentlichte Ergebnisse DOPC+C12/12* .
- [251] Bouchard, M., C. Le Guerneve und M. Auger, *Comparison between the dynamics of lipid /gramicidin A systems in the lamellar and hexagonal phases: a solid-state ^{13}C NMR study*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1415**, 181 (1998).
- [252] Lee, B. und M. Firestone, *Electron Density Mapping of Triblock Copolymers Associated with Model Biomembranes: Insights into Conformational States and Effect on Bilayer Structure*, Biomacromolecules **9**, 1541 (2008).

- [253] Amado, E., A. Kerth, A. Blume und J. Kressler, *Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Coupled with Brewster Angle Microscopy for Studying Interactions of Amphiphilic Triblock Copolymers with Phospholipid Monolayers*, *Langmuir* **24**, 10041 (2008).
- [254] Kyeremateng, S., T. Henze, K. Busse und J. Kressler, *Effect of Hydrophilic Block-A Length Tuning on the Aggregation Behavior of α,ω -Perfluoroalkyl End-Capped ABA Triblock Copolymers in Water*, *Macromolecules* **43**, 2502 (2010).
- [255] Amado, E., *Triblock Copolymers of Poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate) and Poly(propylene oxide): Synthesis, Behavior in Aqueous Solution and at the Air-Water Interface, and Interactions with Model Lipid Membranes*, Doktorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2010).
- [256] Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E. Eylar und T. Isac, *Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes*, *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 317 (1975).
- [257] Baekmark, T., S. Pedersen, K. Jorgensen und O. Mouritsen, *The Effects of Ethylene Oxide Containing Lipopolymers and Tri-Block Copolymers on Lipid Bilayers of Dipalmitoylphosphatidylcholine*, *Biophys. J.* **73**, 1479 (1997).
- [258] Fujiwara, M., R. Grubbs und J. Baldeschwieler, *Characterization of pH-Dependent Poly(acrylic Acid) Complexation with Phospholipid Vesicles*, *J. Colloid Interface Sci.* **185**, 210 (1997).
- [259] Henderson, J., R. Iannucci und M. Petersheim, *An NMR Study of Pyridine Associated with DMPC Liposomes and Magnetically Ordered DMPC-Surfactant Mixed Micelles*, *Biophys. J.* **67**, 238 (1994).
- [260] Lehtonen, J. und P. Kinnunen, *Poly(ethylene Glycol)-Induced and Temperature-Dependent Phase Separation In Fluid Binary Phospholipid Membranes*, *Biophys. J.* **68**, 525 (1995).
- [261] Kostarelos, K., P. Luckham und T. Tadros, *Addition of (Tri-)Block Copolymers to Phospholipid Vesicles: A Study of the Molecular Morphology and Structure by Using Hydrophobic Dye Molecules as Bilayer Probes*, *J. Colloid Interface Sci.* **191**, 341 (1997).
- [262] Filippov, A., B. Munavirov, B. Gizatullin und O. Antzutkin, *Disordering of phospholipid headgroups induced by a small amount of polyethylene oxide*, *Magn. Reson. Chem.* **51**, 1 (2013).
- [263] Schmutz, M., B. Michels, P. Marie und M. Krafft, *Fluorinated Vesicles Made from Combinations of Phospholipids and Semifluorinated Alkanes. Direct Experimental Evidence of the Location of the Semifluorinated Alkane within the Bilayer*, *Langmuir* **19**, 4889 (2003).
- [264] Holte, L. und K. Gawrisch, *Determining Ethanol Distribution in Phospholipid Multilayers with MAS-NOESY Spectra*, *Biochemistry* **36**, 4669 (1997).
- [265] Yau, W., W. Wimley, K. Gawrisch und S. White, *The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces*, *Biochemistry* **37**, 14713 (1998).

- [266] Huster, D. und K. Gawrisch, *NOESY NMR Cosspeaks between Lipid Headgroups and Hydrocarbon Chains: Spin Diffusion or Molecular Disorder?*, J. Am. Chem. Soc. **121**, 1992 (1999).
- [267] Warschawski, D. und P. Devaux, *Polarization Transfer in Lipid Membranes*, J. Magn. Reson. **145**, 367 (2000).
- [268] Kyeremateng, S., K. Busse, J. Kohlbrecher und J. Kressler, *Synthesis and Self-Organization of Poly(propylene oxide)-Based Amphiphilic and Triphilic Block Copolymers*, Macromolecules **44**, 583 (2011).
- [269] Saalwächter, K., *Methyl groups as local probes for polymer dynamics as investigated by ^1H double-quantum magic-angle spinning NMR spectroscopy*, Chem. Phys. Lett. **362**, 331 (2002).
- [270] Amado, E., A. Kerth, A. Blume und J. Kressler, *Phospholipid crystalline clusters induced by adsorption of novel amphiphilic triblock copolymers to monolayers*, Soft Matter **5**, 669 (2009).
- [271] Johnsson, M., N. Bergstrand, K. Edwards und J. Stalgren, *Adsorption of a PEO-PPO-PEO Triblock Copolymer on Small Unilamellar Vesicles: Equilibrium and Kinetic Properties and Correlation with Membrane Permeability*, Langmuir **17**, 3902 (2001).
- [272] Kita-Tokarczyk, K., F. Itel, M. Grzelakowski, S. Egli, P. Rossbach und W. Meier, *Monolayer Interactions between Lipids and Amphiphilic Block Copolymers*, Langmuir **25**, 9847 (2009).
- [273] Lockhart, C. und D. Klimov, *Binding of A β peptide creates lipid density depression in DMPC bilayer*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1838**, 2678 (2014).
- [274] Fetters, L., D. Lohse und R. Colby, *Physical Properties of Polymers-Handbook*, Kap. 25, 447, 2. Aufl., Springer, 2007.
- [275] Huster, D., X. Yao und M. Hong, *Membrane Protein Topology Probed by ^1H Spin Diffusion from Lipids Using Solid-State NMR Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **124**, 874 (2002).
- [276] Marquardt, D., J. Williams, J. Kinnun, N. Kucerka, J. Atkinson, S. Wassall, J. Katsaras und T. Harroun, *Dimyristoyl Phosphatidylcholine: A Remarkable Exception to α -Tocopherol's Membrane Presence*, J. Am. Chem. Soc. **136**, 203 (2014).
- [277] Ergun, S., P. Demir, T. Uzbay und F. Severcan, *Agomelatine strongly interacts with zwitterionic DPPC and charged DPPG membranes*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1838**, 2798 (2014).
- [278] Terao, T., H. Miura und A. Saika, *Dipolar SASS NMR spectroscopy: Separation of heteronuclear dipolar powder patterns in rotating solids*, J. Chem. Phys. **85**, 3816 (1986).
- [279] Grit, M., J. Desmidt, A. Struijke und D. Crommelin, *Hydrolysis of pphosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions*, Int. J. Pharm. **50**, 1 (1989).
- [280] Grit, M. und D. Crommelin, *Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability*, Chem. Phys. Lipids **64**, 3 (1993).

- [281] Grit, M., W. Underberg und D. Crommelin, *Hydrolysis of Saturated Soybean Phosphatidylcholine in Aqueous Liposome Dispersions*, J. Pharm. Sci. **82**, 362 (1993).
- [282] Zuidam, N., H. Gouw, Y. Barenholz und D. Crommelin, *Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids*, Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes **1240**, 101 (1995).
- [283] Grit, M. und D. Crommelin, *The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions*, Chem. Phys. Lipids **62**, 113 (1992).
- [284] Bielecki, A. und D. Burum, *Temperature Dependence of ^{207}Pb MAS Spectra of Solid Lead Nitrate. An Accurate, Sensitive Thermometer For Variable-Temperature MAS*, J. Magn. Reson. A **116**, 215 (1995).
- [285] Takahashi, T., H. Kawashima, H. Sugisawa und T. Baba, *^{207}Pb chemical shift thermometer at high temperature for magic angle spinning experiments*, Solid State Nucl. Magn. Reson. **15**, 119 (1999).
- [286] Jeener, J., B. Meier, P. Bachmann und R. Ernst, *Investigation of exchange processes By two-dimensional NMR Spectroscopy*, J. Chem. Phys. **71**, 4546 (1979).

Publikationsliste

- [E1] Hackel, C., C. Franz, A. Achilles, K. Saalwächter und D. Reichert, *Signal loss in 1D magic-angle spinning exchange NMR (CODEX): radio-frequency limitations and intermediate motions*, Phys. Chem. Chem. Phys. **11**, 7022 (2009).
- [E2] Hackel, C., T. Zinkevich, P. Belton, A. Achilles, D. Reichert und A. Krushelnitsky, *The trehalose coating effect on the internal protein dynamics*, Phys. Chem. Chem. Phys. **14**, 2727 (2012).
- [E3] Scholtysek, P., A. Achilles, C.-V. Hoffmann, B.-D. Lechner, A. Meister, C. Tschierske, K. Saalwächter, K. Edwards und A. Blume, *A T-shaped Amphiphilic Molecule Forms Closed Vesicles in Water and Bicelles in Mixtures with a Membrane Lipid*, J. Phys. Chem. B **116**, 4871 (2012).
- [E4] Cobo, M., A. Achilles, D. Reichert, E. deAzevedo und K. Saalwächter, *Recoupled separated-local-field experiments and applications to study intermediate-regime molecular motions*, J. Magn. Reson. **221**, 85 (2012).
- [E5] Schäler, K., A. Achilles, R. Bärenwald, C. Hackel und K. Saalwächter, *Dynamics in Crystallites of Poly(ϵ -caprolactone) As Investigated by Solid-State NMR*, Macromolecules **46**, 7818 (2013).
- [E6] Schwieger, C., A. Achilles, S. Scholz, J. Rüger, K. Bacia, K. Saalwächter, J. Kressler und A. Blume, *Binding of amphiphilic and triphilic block copolymers to lipid model membranes: the role of perfluorinated moieties*, Soft Matter **10**, 6147 (2014).
- [E7] Werner, S., H. Ebert, B.-D. Lechner, F. Lange, A. Achilles, R. Bärenwald, S. Poppe, A. Blume, K. Saalwächter, C. Tschierske und K. Bacia, *Dendritic domains with hexagonal symmetry formed by X-shaped bolapolyphiles in lipid membranes*, eingereicht bei Chem. Eur. J. (2014).

Danksagung

„Ein guter Rat ist selten, Dankbarkeit dafür noch seltener.“ (Türkisches Sprichwort)

Daher möchte ich es nicht versäumen, mich bei allen zu bedanken, die in den letzten Jahren (direkt oder indirekt) zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Kay Saalwächter für die Betreuung dieser Arbeit, viele fachliche Gespräche und anregende Diskussionen. Darüber hinaus bin ich dankbar für die Möglichkeit, an nationalen, sowie internationalen Konferenzen teilnehmen zu können, um meine Ergebnisse zu präsentieren.

Bei der gesamten Fachgruppe NMR sowie Biophysik möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima der letzten Jahre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Detlef Reichert dafür, dass er sich mit viel Geduld fachlichen Fragen und Problemen aller Art angenommen hat.

Des Weiteren möchte ich Dr. Günter Hempel dafür danken, dass er bei den kompliziertesten Rechnungen immer den Überblick behalten hat und damit viel zum Verständnis des einen oder anderen Problems beigetragen hat.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Pierre Seiboth für die vielen Male, die wir zusammen einen Probenkopf auseinander und wieder zusammen gebaut haben, aber auch für die Unterstützung bei technischen Problemen sowohl an den Spektrometern als auch am Computer.

Ohne die Zusammenarbeit mit den verschiedenen Gruppen des Fachbereich Chemie im Rahmen der Forschergruppe FOR1145, vor allem der Gruppen von Prof. Tschierske, Prof. Blume und Prof. Kressler, wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

An erster Stelle danke ich Helgard Ebert für die (stetige) Synthese des vielen C12/12, welches im Laufe dieser Arbeit verbraucht wurde. Ebenso gilt mein Dank Dr. Zheng Li für die Synthese der amphiphilen und polyphilen Blockcopolymere in für NMR-Messungen ausreichend großer Menge. Bob-Dan Lechner und Dr. Christian Schwieger danke ich für die DSC-Messungen der jeweiligen Probensysteme sowie Stefan Werner für die Bereitstellung der Fluoreszenzdaten.

Mein großer Dank geht ebenfalls an Ruth Bärenwald und Frank Lange für das Überlassen einiger Messdaten sowie die Zusammenarbeit (als einziger Physiker) in der Forschergruppe FOR1145.

Für die Unterstützung bei den Versuchen, am hohen Feld zu messen, und die Tatsache, zu akzeptieren, dass explodierende Rotoren nun mal zum Geschäft gehören, möchte ich mich ganz herzlich bei Stefan Gröger bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eduardo deAzevedo und Dr. Marcio Cobo, die mich während meines Aufenthalts in ihrem Institut in Brasilien herzlich aufgenommen haben. Ohne diese Zusammenarbeit wäre die recoupled DIPSHIFT-Sequenz vermutlich nicht entstanden.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen langjährigen „Büro-Mitinsassinnen“ Christiane Hackel, Kerstin Schäler und Tatiana Zinkevich, bedanken. Ohne euch wären viele Fragen viel schwerer zu beantworten gewesen. Auch danke ich euch für viele aufmunternde Worte, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz großes Dankeschön geht weiterhin an Tilo Wiezcorek, der guten Seele der Forschergruppe FOR1145, für die Organisation der zahlreichen Forschergruppentreffen und der stets pünktlichen Rechnungsanweisung für die Kinderbetreuung. Natürlich möchte ich in diesem Zusammenhang für die mir zu Teil gewordene, finanzielle Unterstützung bei der Kinderbetreuung durch die Mittel der Forschergruppe danken.

Für das sorgfältige Lektorat dieser Arbeit und die (fast immer) konstruktive Kritik an dem Geschriebenen danke ich meinen beiden Lesern Steven Achilles und Christiane Hackel.

Für willkommene Abwechslung und Unterstützung in nicht-wissenschaftlicher Hinsicht und Hilfe in jeder Lebenslage danke ich besonders meinen Mädels Christiane, Anke, Kerstin, Katja und Steffi. Den „drei Jungs von der Mensa“ und ihren Familien bin ich ebenfalls sehr dankbar für viele unbeschwerte Sonntagabende.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Großeltern (auch neu dazu gewonnen) für die bedingungslose Unterstützung auf meinem Weg. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Mama bedanken, dafür, dass sie immer da war, wenn wir sie gebraucht haben, ob als Oma oder als Mama.

Das größte Dankeschön geht an meinen lieben Mann Steven, der immer an mich geglaubt hat, auch wenn es mir schwer fiel, und für die rückhaltlose Unterstützung vor allem in den letzten Monaten dieser Arbeit. Meiner Tochter Emma danke ich dafür, dass sie mir immer wieder zeigt, was im Leben wichtig ist.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anja Achilles
Clara-Zetkin-Str. 14
06114 Halle
Geb. am 10. 07. 1982 in Halle
verheiratet, ein Kind
deutsch

Schulbildung

1989–1990 Grundschule „Doktor-Salvador-Allende“, Hohnstedt
1990–1993 Grundschule „Paulusschule“, Halle (Saale)
1993–2002 Gymnasium am Reileck, Halle (Saale)

Studium

10/2002–02/2008 Studium der Medizinischen Physik an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
02/2008 Abschluss des Studiums an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg (Diplom); Thema der Abschlussarbeit: „Untersuchung zur
Struktur und Dynamik in Poly(ethylenoxid) mittels Festkörper-NMR“
02/2008–08/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Fachgruppe NMR am Institut
für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2008–09/2009 Elternzeit
seit 10/2009 Promotion in der Fachgruppe NMR am Institut für Physik der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, 25. November 2014

Anja Achilles

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in einer anderen Fassung im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht.

Halle (Saale), 25. November 2014

Anja Achilles