

HOCHSCHULE MÜNCHEN

FAKULTÄT FÜR ANGEWANDTE NATURWISSENSCHAFTEN UND  
MECHATRONIK

---

# Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit kovalenter Bindungen

---

*Autor:*  
Julian BLASER

*Betreuer:*  
Dr. Hauke CLAUSEN-SCHAUMANN

15. April 2019



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Zielsetzung	1
1.2. Kopplungschemie	1
1.2.1. Oberflächenfunktionalisierung via Kohlenstoffanker	2
1.2.2. Kopplung der Spacermoleküle an funktionalisierte Oberflächen	3
1.3. Hydrolyse der Amidbindung	3
1.3.1. Sauer katalysierte Amidhydrolyse	4
1.3.2. Basisch katalysierte Amidhydrolyse	5
1.3.3. Energieprofil der Amidhydrolyse ohne Krafteinfluss	6
1.3.4. Bindungskinetik unter Krafteinfluss	6
1.4. Rasterkraftmikroskop	8
1.5. Einzelmolekülspektroskopie am Rasterkraftmikroskop	9
1.5.1. Molekularer Aufbau des Versuchssystems	9
1.5.2. Kraftkurven	10
1.5.3. Auflösungsgrenzen der Kraftexperimente	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Material	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Substrate	17
2.1.3. Geräte und Software	17
2.2. Methoden	17
2.2.1. Oberflächenfunktionalisierung der Substrate	17
2.2.2. Vorbereitung der Versuche	18
2.2.3. Durchführung der Versuche	19
2.2.4. Kategorisierung der Kraftkurven	21
2.2.5. Auswertung der Versuchsergebnisse	28
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>36</b>
<b>5. Fazit</b>	<b>43</b>
<b>6. Ausblick</b>	<b>41</b>
<b>Literatur</b>	<b>42</b>
<b>A. Überlagerung der normierten Kraft-Abstand-Kurven von Clampereignissen</b>	<b>45</b>
<b>B. Mechanische Eigenschaften der Kraft-Abstand-Kurven von Clampereignissen</b>	<b>46</b>

## 4. Diskussion

Die Auswertungen der experimentellen Daten durch einen Biexponentiellen Zerfall lieferte robuste Parameterschätzungen (für  $k_1$ ,  $k_2$  und  $A$ ), wenn ausreichend Datenpunkte für den schnellen und langsamen Prozess vorhanden waren und  $A \approx 0,5$ . Robust bedeutet, dass die Fehler der Fitparameter mindestens eine Größenordnung kleiner sind als der Wert des Fitparameters selbst. In den Force-Clamp-Experimenten bei den pH-Werten 8, 7,4 und 4,5 erfüllte ausschließlich das Force-Clamp-Experiment bei pH 7,4 diese Kriterien. Bei pH 8 fielen nur 5 Datenpunkte in den schnellen Prozess, sodass  $\Delta k_1^8 \approx k_1^8$ . Bei pH 4,5 war nicht mit Sicherheit zu sagen ob ein schneller Prozess vorhanden war, da nur 2 Datenpunkte in diesen Prozess fielen. Interessant ist jedoch generell das Auftreten eines schnellen und eines langsamen Prozesses. Es stellen sich daher die Fragen:

- Welcher Prozess stellt die Hydrolyse der Amidbindung dar?
- Was bedeutet der andere Prozess?

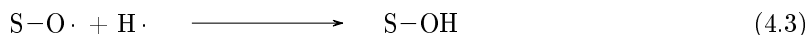
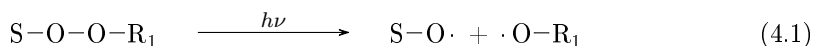
Um zu zeigen, dass die Amidbindung in der Kette zwischen Substrat, CMA-Spacer und Abtastspitze das schwächste Glied war, wurden in einer anderen Arbeit folgende Kontrollen durchgeführt [1]:

- Austausch der Aminogruppen auf Substrat und Abtastspitze durch Carboxylgruppen (Bildung von Esterbindungen zwischen Carboxymethylamylose (CMA) und Substrat/ Abtastspitze)
- Austausch von CMA durch Biscarboxy-PEG bzw. Adipinsäure (keine glykosidischen Bindungen innerhalb des CMA-Spacers)

Wurde in einem Force-Clamp-Experiment an einer Esterbindung gemessen, lag  $\tau$  bei ca. 4 Sekunden. Wurde der CMA-Spacer durch Biscarboxy-PEG oder Adipinsäure ersetzt und an der Amidbindung gemessen lag  $\tau$  bei ca. 0,17 Sekunden. All diese Experimente wurden bei pH = 7,4 durchgeführt. Ein Vergleich von [1] und den hier durchgeführten Force-Clamp-Experimenten lässt vermuten, dass es sich bei dem schnellen Prozess um die Hydrolyse der Amidbindung handelte. Demnach konnte es sich bei dem langsamen Prozess nicht um die Beeinflussung der Amidbindung durch den Einbau von  $O_2$  während der Funktionalisierung des Substrats/ Abtastspitze handeln (s. Abschnitt 1.2.1). Wird davon ausgegangen, dass sich Peroxidbrücken gebildet hätten, wäre die Wahrscheinlichkeit hoch, dass diese während der Oberflächenfunktionalisierung unter UV-Lichteinwirkung ( $\lambda = 254$  nm) homolytisch gespalten worden wären<sup>1</sup>. Prinzipiell wären dann folgende Reaktionen möglich:

---

<sup>1</sup>Die Dissoziationsenergie der O-O-Bindung liegt bei  $142 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Verglichen mit einer C-C-Bindung mit  $339 \text{ kJ mol}^{-1}$  oder C-O-Bindung mit  $331 \text{ kJ mol}^{-1}$  um mehr als die Hälfte schwächer [2, S. 15]



Wobei  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  jeweils für unterschiedliche Allylamin-Moleküle und  $S$  für das Substrat (wahlweise auch für die Abtastspitze) stehen. Hier wurde das baumartige Wachstum von Allylamin auf dem Substrat bzw. der Abtastspitze nicht berücksichtigt. Unter der Annahme, dass sich die Peroxidbrücken (Reaktion 4.1) gespalten hätten, wäre die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Peroxide im Laufe der Funktionalisierung zu Ethern reagierten (Reaktion 4.2) sehr hoch (vgl. [2, S. 15]). Die Reaktionen 4.3 bis 4.5 würden die Ausbeute der Funktionalisierung herabsetzen und die Ausbildung einer Amidbindung verhindern. Die Etherbrücken, gebildet nach Reaktion 4.2, waren unter Krafteinfluss jedoch stabiler als die Amidbindung (vgl. [1]) und wären damit nicht in den durchgeführten Force-Clamp-Experimenten sichtbar gewesen. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich der Sauerstoff zwischen Substrat und der Amidbindung befindet und somit an Ether und an Amid gleichzeitig gemessen wurde. Auch die Bildung von Estern, statt der Amide, durch die Einführung von Hydroxylgruppen auf dem Substrat bzw. der Abtastspitze wie in Reaktion 4.3 gezeigt ist, wäre möglich, jedoch entspricht keine der hier ermittelten mittleren Lebensdauern der langsamen Prozesse der des Esters ( $\tau_{\text{Ester}} = 4 \text{ s}$ ) aus [1].

Weitere Ursachen, die den langsamen Prozess hervorrufen:

- Das Auftreten einer zweiten Bindungsart
- Beeinflussung der Amidhydrolyse
- Mehrfach, parallel gebildete Amidbindungen zwischen den Carboxylgruppen eines einzigen CMA-Spacer an Substrat und Abtastspitze

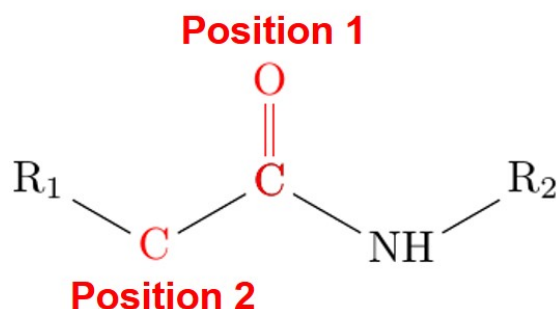
Der langsame Prozess könnte über eine zweite Bindungsart erklärt werden, wenn angenommen wird, dass die Oberflächen von Substrat und Abtastspitzen mit anderen funktionellen Gruppen ausgestattet worden wären<sup>2</sup>, oder ein Tausch der funktionellen Gruppen stattgefunden hätte. Für beides wären jedoch spezielle Substanzen nötig, die nicht zufällig durch unsauberes Arbeiten eingebracht werden konnten. Das Auftreten einer zweiten Bindungsart kann daher ausgeschlossen werden.

Es bleibt bisher ungeklärt, welche Reaktionen generell an sekundären Carbonsäureamiden ablaufen können. Die Frage ist wie sich etwaige Verunreinigungen oder Reaktionsnebenprodukte auf die Amidbindung auswirken. Die typische Angriffspunkte der Carbonsäureamide sind die Carbonylgruppe (Abbildung 4.1, Position 1) und das C-Atom in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe (Abbildung 4.1, Position 2). An diesen Stellen wären eine Reihe von Reaktionen möglich [2, S. 305–308]. An der Carbonylgruppe könnten in erster Linie Additionsreaktionen (sowohl nukleophil<sup>3</sup> durch den Angriff am Carbonylkohlenstoff oder elektrophil durch den Angriff an der

<sup>2</sup>Abgesehen von Hydroxylgruppen. Die daraus resultierenden Ester konnten anhand ihrer mittleren Lebensdauer für den langsamen Prozess ausgeschlossen werden (s.o.).

<sup>3</sup>Die nukleophile Addition von  $\text{H}_2\text{O}$  an das Carbonylkohlenstoff ist die initiale Reaktion für die Hydrolyse. Diese Reaktion kann durch Säuren oder Basen beschleunigt werden [2, S. 288]

Doppelbindung der Carbonylgruppe) durchgeführt werden. Daneben könnte die Carbonylgruppe reduziert, bzw. oxidiert werden. Das Kohlenstoffatom in  $\alpha$ -Stellung könnte deprotoniert werden und so das Carbonsäureamid in seine Enolatform überführt werden. An der entstandenen Doppelbindung zum  $\alpha$ -C-Atom können wiederum elektrophile Additionsreaktionen durchgeführt werden. Da Carbonsäureamide zu den schwach reaktiven Carbonsäurederivaten<sup>4</sup> zählt, sind für die oben genannten Reaktionen jedoch starke Reagenzien notwendig. Reaktionen am Stickstoffatom finden nicht statt. Zum einen war die Basizität durch eine Keto-Enol-Tautomerie der C-N-Bindung und zum anderen die N-H-Acidität durch +I-Effekte der Substituenten am Stickstoffatom herabgesetzt.



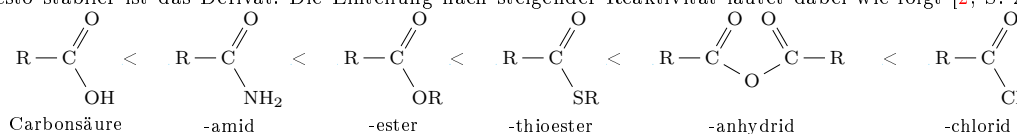
**Abbildung 4.1.:** Amidbindung eines Carbonsäureamids. Position 1: Carbonylgruppe. Position 2: C-Atom in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe.  $R_1$  steht für den Allylaminrest an Substrat/ Abtastspitze,  $R_2$  für die Fortsetzung des CMA-Spacers.

Eventuelle Verunreinigungen oder Reaktionsnebenprodukte der einzelnen Funktionalisierungen können sich entweder auf die Kinetik, oder den Mechanismus der Amidhydrolyse auswirken. Die Kinetik ändert sich, wenn die Aktivierungsenergien der Übergangszustand (ÜZ) geändert werden, oder der Übergang von Tetraedisches Zwischenprodukt (TZP) zu Zwitterion (ZI) erleichtert bzw. behindert wird.

Für eine Änderung des Reaktionsmechanismus muss die Struktur der Amidbindung durch chemische Reaktionen geändert werden.

Die Beeinflussung der Hydrolyse durch Reaktionsnebenprodukte kann jedoch ausgeschlossen werden, da sie durch die jeweiligen Waschschrte entfernt worden sind. Quellen für sonstige Verunreinigungen sind vor allem organische Rückstände (hauptsächlich Fette) oder Mineralablagerungen ( $\text{CaCO}_3$  und  $\text{MgCO}_3$ ) auf den Oberflächen der verwendeten Petrischalen und Pinzetten. Da organische Ablagerungen in Form von Fetten unlöslich sind, würden sie als Oberflächenfilm auf die Substrate übertragen und die Bildung von Amidbindungen an diesen Stellen verhindern. Mineralablagerungen sind in wässrigen Medien schwer löslich und kommen in äußerst geringen Mengen vor (maximal 1 mg). Verglichen mit dem Volumen der Phosphate Buffered Saline (PBS)-Lösungen in den verwendeten Petrischalen (ca. 5 ml) wäre die Konzentration von  $\text{CaCO}_3$  bzw.

<sup>4</sup>Die Reaktivität der Carbonsäurederivate beruht auf der Basizität des Substituenten. Je geringer die Basizität, desto stabiler ist das Derivat. Die Einteilung nach steigender Reaktivität lautet dabei wie folgt [2, S. 287]:



MgCO<sub>3</sub> mit  $c \approx 2 \text{ mmol l}^{-1}$  sehr nahe bei null. Mögliche Änderungen des pH-Wertes, sowie ionische Einflüsse von Ca<sup>2+</sup>- bzw. Mg<sup>2+</sup>-Ionen sind damit Vernachlässigbar.

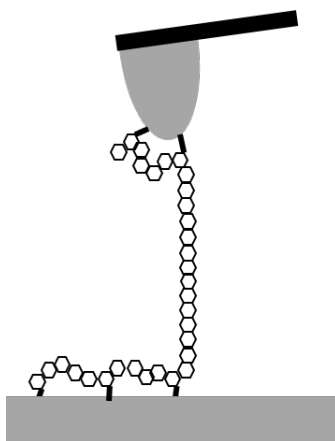
Eventuelle ionische Effekte auf die Kinetik der Amidhydrolyse würden sich auf alle Experimente (hier durchgeführte Force-Clamp-Experimente, sowie die Kontrollen in [1]) gleichermaßen auswirken und die Hydrolysereaktion entweder beschleunigen, oder verlangsamen, jedoch nicht beides zur gleichen Zeit.

Um die Struktur der Amidbindung zu ändern, sind zwei Reaktionen von Bedeutung [2, S. 301 ff.]:

- Reduktion der Carbonylgruppe (Position 1, Abbildung 4.1)
- Deprotonierung des  $\alpha$ -C-Atoms (Position 2, Abbildung 4.1)

Für die Reduktion der Carbonylgruppe sind jedoch starke Reduktionsmittel wie LiAlH<sub>4</sub> notwendig [2, S. 306, 3, S. 208]. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass solche Verbindungen als Verunreinigung von außen eingetragen wurden. Die Deprotonierung des  $\alpha$ -C-Atoms bedarf starker Basen und verläuft sehr langsam [2, S. 308, 4, S. 122]. Die pH-Werte der Force-Clamp-Experimente lagen jedoch zwischen 4,5 und 8, waren für diese Reaktion daher zu niedrig. Daneben verläuft diese Reaktion viel langsamer als die Amidhydrolyse unter Krafteinfluss. Vor diesem Hintergrund können Verunreinigungen, sowie Reaktionsnebenprodukte als Grund für den langsamen Prozess ausgeschlossen werden.

Eine plausible Erklärung für den langsameren Prozess sind Mehrfachanbindungen des CMA-Spacer an Substrat und Abtastspitze, wie in Abbildung 4.2 dargestellt ist [5].



**Abbildung 4.2.:** Mehrfach angebundener CMA-Spacer an Substrat und Abtastspitze.

Um im Falle eines einzelnen CMA-Moleküls, dass über mehrere Amidbindung an Substrat und Abtastspitze gekoppelt wurde, Einzelabrisse in den Kraftkurven identifizieren zu können, (s. Abschnitt 1.5.3) müssen die Abstände der Anbindungen groß genug sein (s.u.). Sind die Abstände zu klein überlagern sich die Einzelereignisse und abhängig von der Anzahl der vorhandenen Amidbindungen errechnet sich so eine Geschwindigkeitskonstante, die erheblich größer ist, als sie für eine einzelne Bindung zu erwarten wäre. Wie in Abschnitt 1.5.3 gezeigt wurde, liegt die Auflösungsgrenze in z-Richtung bei  $\Delta l_{min} = 1 \text{ nm}$ . Die Monomerlänge von Amylose beträgt  $l_{mono} = 0,36 \text{ nm}$ . Rechnerisch müssten die Amidbindungen daher mindestens 3 Monomereinheiten auseinander liegen um noch als Einzelabrisse erkannt zu werden. In der Regel wurde dieser

Wert durch das thermische Rauschen erhöht. Die Amplitude des thermischen Rauschens betrug im Mittel ca.  $40 \text{ pN}$  was für typische Federkonstanten von  $0,08 \text{ N m}^{-1}$  einen Wert von ca.  $1 \text{ nm}$  entspricht. Damit Mehrfachabrisse klar als diese erkannt werden können, sollten sie daher die doppelte Länge, also ca.  $2 \text{ nm}$  (6 Monomereinheiten) lang sein. Das während eines Clamp-Experiments unerkannte Mehrfachabrisse auftraten, ist hinsichtlich der langen Reaktionszeit an der Oberfläche durchaus möglich (die Wartezeit im 2. Segment betrug  $3 \text{ s}$ ). Das Zufällig mehrere CMA-Spacer gleichzeitig gestreckt und somit mehrere Amidbindungen parallel gemessen wurden, kann ausgeschlossen werden. Zum einen zeigten die Kraft-Abstands-Kurven das typische Plateau von **CMA** bei  $300$  bis  $400 \text{ pN}$ , zum anderen zeigt die Überlagerung mehrerer normierter Kraft-Abstands-Kurven dieser Clampereignisse keinen Unterschied in den mechanischen Eigenschaften (s. Anhang A). Die quantitative Bestimmung der mechanischen Eigenschaften nach dem Modell der frei verbundenen Kette unterstützt diese Aussage (s. Anhang B).

Ein weiterer Effekt, der die Amidhydrolyse beeinflusste, war der thermische Drift. Dieser schwankte zwischen  $1 \text{ pN s}^{-1}$  und  $5 \text{ pN s}^{-1}$ . Die Zeit, bis die Amidbindung auf ca.  $800 \text{ pN}$  gestreckt wurde betrug ca.  $4 \text{ s}$ . Die eingestellte Kraft schwankte dadurch zwischen  $600$  und  $800 \text{ pN}$ . Beides zusammen, das Messen von Mehrfachanbindungen und eine stark schwankende Clamp-Kraft, führte bei einigen Force-Clamp-Experimenten zu einer Überschätzung der Amidbindung, wodurch die lange mittlere Lebensdauer ( $\tau \approx 20 \text{ s}$ ) des langsamen Prozesses erklärt werden kann.

Der schnelle Prozess mit  $k_1$  stellt die Hydrolyse zur Amidbindung dar. Im basischen Bereich ( $\text{pH} = 8$ ) ist  $k_1^8 = 5,3 \text{ s}^{-1}$  und somit größer im Vergleich zu  $k_1^{7,4} = 4,1 \text{ s}^{-1}$ . Die mittlere Lebensdauer sinkt von  $\tau_1^{7,4} = 0,24 \text{ s}$  auf  $\tau_1^8 = 0,19 \text{ s}$ . Dies steht im Einklang mit [6–8]. Hier wurde ab einem pH-Wert von ca. 8 ebenfalls eine Beschleunigung der Amidhydrolyse beobachtet.

Der gemessene Anstieg von  $k_2^8$  stand jedoch im Gegensatz der Arbeitshypothese. Eine mögliche Erklärung liefert die Protonierung des Stickstoffatoms des **TZP** während der Hydrolyse. Diese Reaktion scheint ein wichtiger Teilschritt des Bindungsbruchs zu sein, da er im basisch- bzw. sauer-katalysierten, sowie im neutralen Mechanismus der Amidhydrolyse auftritt [9–11]. Es zeigt sich, dass das Stickstoffatoms der Amidbindung nach der Bildung des **TZP** einen basischen Charakter aufweist und die Protonierung im alkalischen Milieu durch die Spaltung eines Wassermoleküls „erzwingen“ kann. Es ist daher möglich, dass die Protonierung des Stickstoffatoms die Qualität der Abgangsgruppe - die primäre Aminogruppe am Substrat bzw. Abtastspitze - erheblich verbessert. Möglicherweise wird diese Protonierung erst ab einem pH-Wert über 8 verhindert, sodass die Geschwindigkeitsverminderung der Hydrolyse erst bei deutlich höheren pH-Werten als  $\text{pH} = 8$  in Erscheinung tritt.

Analog verhielt es sich mit dem langsamen Prozess. So ist  $k_2^{7,4} = 0,06 \text{ s}^{-1}$  auf  $k_2^8 = 0,12 \text{ s}^{-1}$  erhöht. Die mittlere Lebensdauer sank dabei von  $\tau_2^{7,4} = 18,18 \text{ s}$  auf  $\tau_2^8 = 8,33 \text{ s}$ . Dieses Verhalten passte zu der Vermutung der Mehrfachanbindung eines einzelnen CMA-Spacer an Substrat und Abtastspitze wie sie in Abbildung 4.2 dargestellt werden. Die Beschleunigung der Hydrolyse trat bei allen gebildeten Amidbindungen in gleichem Maße auf, somit war eine Beeinflussung der Summe aller seriell brechender Amidbindungen, unter der Annahme einzelner mehrfach angebundener CMA-Spacer, ebenfalls plausibel.

Im sauren pH Bereich ( $\text{pH} = 4,5$ ) war die Datenlage anders. Erwartet wurde eine Beschleunigte Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse für den schnellen Prozess (ähnlich wie im basischen Bereich  $k_1^{4,5} > k_1^{7,4}$ ), dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Da die Anzahl der gemessenen Überlebenszeiten mit  $N_{0,2}^{4,5} = 2$  verglichen mit den anderen Zahlen ( $N_{0,2}^{7,4} = 7$  und  $N_{0,2}^8 = 5$ ), gering ausfiel, war der schnelle Prozess für  $\text{pH} 4,5$  nur im Ansatz zu erkennen. Der Wert für  $k_1^{4,5}$  mit  $2,7 \text{ s}^{-1}$  hatte daher keine sinnvolle Aussagekraft.

Der langsame Prozess bei  $\text{pH} 4,5$  verlief etwas schneller als der langsame Prozess bei  $\text{pH} 7,4$

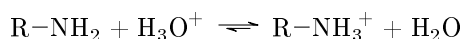
( $k_2^{4,5} = 0,08 \text{ s}^{-1} > k_2^{7,4} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ ). Die Bildung von Amidbindungen zwischen den aktivierten Carboxylgruppen des CMA-Spacers und den Aminogruppen auf Substrat und Abtastspitze haben die höchste Ausbeute in einem pH-Bereich zwischen 7 und 9 [12, 13, S. 69, 14]. Unter pH 7 nimmt die Reaktionsfähigkeit der N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester ab, da immer mehr freie Aminogruppen protoniert vorliegen und somit kein freies Elektronenpaar mehr besitzen. Oberhalb von pH 9 wird die Kopplungsreaktion durch die Instabilität des NHS-Esters begrenzt. Aufgrund dieser Aussage während bei einem pH-Wert von 4,5 nur wenig Clampereignisse aufgrund der geringen Kopplungseffizienz zu erwarten gewesen. In den Ergebnissen waren fast ausschließlich Clampereignisse im langsamen Prozess gemessen worden, was jedoch für eine hohe Kopplungseffizienz sprach<sup>5</sup> sprach. Der hohe Anteil an Kategorie B Kraftkurven, sowie Clampereignisse der Kategorie D, sprechen ebenfalls für eine hohe Kopplungseffizienz (vgl. Abschnitt 3).

Eine Erklärung hierfür liefert die Art und Weise, wie alle Force-Clamp-Experimente durchgeführt wurden. Während des 2. Segments (Ruhezeit) wurden die freien Aminogruppen von Substrat bzw. Abtastspitze mit den aktivierten Carboxylgruppen am CMA-Spacer in räumliche Nähe gebracht. Somit war die lokale Konzentration von Amino- und Carboxylgruppen sehr hoch<sup>6</sup>. Die Wahrscheinlichkeit das sich eine zufällig zurück gebildete  $\text{NH}_2$ -Gruppe in direkter Nähe zu einem NHS-Ester befindet damit ebenfalls hoch. Zusammen mit der Tatsache, dass die Bildung einer Amidbindung über einen NHS-Ester auch im sauren katalysiert wird (über Addition eines  $\text{H}^+$  an das Carbonylsauerstoff<sup>7</sup>) [15, S. 10828] lässt den obigen Schluss zu.

Der langsame Prozess bei pH 8 verlief sehr viel schneller als der langsame Prozess bei pH 4,5 ( $k_2^8 = 0,11 \text{ s}^{-1} \gg k_2^{4,5} = 0,08 \text{ s}^{-1}$ ). Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls über die erhöhte Effizienz bei der Bildung der Amidbindung, zusammen mit einzelnen, mehrfach angebundene CMA-Spacer erklären. Neben den oben genannten räumlichen Bedingungen spielen vor allem drei Punkte eine Rolle.

- Im basischen Milieu werden NHS-Ester durch die Reaktion mit  $\text{OH}^-$ -Ionen gespalten [2, S. 289]
- Im sauren Milieu stehen, wegen der Protonierung der Aminogruppen ( $\text{R-NH}_3^+$ ), nur wenig freie Elektronenpaare zur Bildung der Amidbindung zur Verfügung [2, S. 189]
- Zusätzlich ist der Carbonylsauerstoff der NHS-Ester im sauren Milieu protoniert, daher kann der Carbonylkohlenstoff besser durch nukleophile Teilchen angegriffen werden [2, S. 288]

Im basischen Milieu konkurriert die Spaltung der NHS-Ester durch  $\text{OH}^-$ -Ionen mit der Spaltung durch Aminogruppen. Diese Konkurrenzsituation vermindert die Ausbeute an Amidbindungen. Im sauren Milieu hingegen verhindert die Protonierung der Aminogruppen eine Bildung von Amidbindungen. Die Protonierung läuft als Gleichgewichtsreaktion ab [2, S. 189]:



Bei pH 4,5 liegt das Gleichgewicht zwar auf der rechten Seite, in geringem Maße bilden sich jedoch vereinzelt Aminogruppen mit freiem Elektronenpaar zurück. Hinzu kommt, dass der Angriff der verbleibenden, nicht protonierten Aminogruppen durch den Einsatz von Säuren katalysiert

<sup>5</sup>Unter der Voraussetzung der mehrfach angebondenen CMA-Spacer nach Abbildung 4.2.

<sup>6</sup>In den Standard Kopplungsprotokollen werden i.a. Konzentration der zu koppelnden Verbindungen im mM Bereich verwendet. So z.B. in den Arbeiten von J.M. Nico *et al.* [13] oder Y. Nojima *et al.* [14].

<sup>7</sup>Die Bildung der Amidbindung über die Aminolyse der NHS-Ester läuft analog zur Rückreaktion der Amidhydrolyse [15, S. 10828].



werden kann. Die Katalyse basiert, wie bei der sauren Amidhydrolyse, auf der Protonierung des Carbonylsauerstoffs. Trotz der wenigen, im sauren nicht protonierten Aminogruppen, können sich daher im 2. Segment (Ruhezeit) tendenziell mehr Amidbindungen bilden, als im basischen Milieu. Ein CMA-Spacer würde dementsprechend über mehr Amidbindungen an Substrat bzw. Abtastspitze gekoppelt. Die Konsequenz daraus ist, dass während dem 5. Segment (Clamp) im sauren mehr Amidbindungen brechen müssen als im basischen und daher  $k_2^8 = 0,12 \text{ s}^{-1}$  eine Größenordnung über  $k_2^{4,5} = 0,08 \text{ s}^{-1}$  lag.

## 5. Fazit

Mehrfachanbindungen eines einzelnen CMA-Moleküls an Substrat und Abtastspitze (s. Abbildung 4.2) konnten den langsamen Prozess bei allen pH-Werten erklären. Durch räumliche Nähe der Abtastspitze zum Substrat (und damit Amino- und Carboxylgruppen) sowie die Wartezeit im 2. Segment führten zu einer vermehrten Bildung von Amidbindungen bei allen pH-Werten. Im Vergleich von pH 8 zu pH 7,4 zeigt sich eine stärkere Bildung von Amidbindungen, dass weniger Clampereignisse im schnellen Prozess zu finden waren. Die Konkurrenzreaktion der  $\text{OH}^-$ -Ionen mit den NHS-Estern bei pH 8 sorgte jedoch dafür, dass ausreichend Clampereignisse zur Ermittlung von  $k_1^8$  in den schnellen Prozess fielen.

Bei pH 4,5 stand der Ausbildung von Amidbindungen die protonierte Form der Aminogruppen entgegen. Die Protonierung der Aminogruppen läuft als Gleichgewichtsreaktion ab [2, S. 189]. Im sauren Milieu liegt das Gleichgewicht auf der rechten Seite. Die Carbonylgruppe der NHS-Ester liegt ebenfalls protoniert vor. Ein nukleophiler Angriff nicht protonierter Aminogruppen kann deshalb viel schneller erfolgen. Zusammen mit der hohen lokalen Konzentration aller Reaktionspartner und ausreichend Reaktionszeit im 2. Segment, konnten trotz des geringen Anteils an Aminogruppen mit freiem Elektronenpaar, im sehr effektiv Amidbindungen gebildet werden. Durch einzelne, mehrfach angebundene CMA-Spacer waren daher deutlich mehr Clampereignisse im langsamen Prozess vorhanden.

Die Ergebnisse stützten somit nicht die Arbeitshypothese, die Hydrolyse der Amidbindung verläuft mit steigendem pH-Wert langsamer. Zumindest bei den pH-Werten 7,4 und 8 verhielt sich die Hydrolysegeschwindigkeit der Amidbindung unter Einfluss einer äußeren Kraft wie in [6–8] beschrieben, jedoch um den Faktor  $10^9$  beschleunigt. Bei einem pH-Wert von 4,5 konnte über die einzelne Amidbindung keine Aussage getroffen werden. Hier wurden hauptsächlich mehrere, hintereinander brechende Amidbindungen gemessen. Diese hintereinander abreißen Bindungen konnten aufgrund des vorliegenden Messaufbaus nicht voneinander unterschieden werden. Wurden die langsamen Prozesse bei pH 7,4 und 4,5 miteinander verglichen ( $k_2^{7,4} = 0,06 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_2^{4,5} = 0,08 \text{ s}^{-1}$ ), konnte auch hier eine Beschleunigung der Hydrolysegeschwindigkeit der Amidbindung festgestellt werden.

# Literatur

- [1] Hauke Clausen-Schaumann. *Persönliche Mitteilung: E-Mail*. Hrsg. von Julian Blaser. 2018 (siehe S. 36 f., 39).
- [2] Hans Peter Latscha, Uli Kazmaier und Helmut Klein. *Organische Chemie: Chemie Basiswissen II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 (siehe S. 36–39, 41, 43).
- [3] Stefan Leisering und Christoph A. Schalley. *Tutorium Reaktivität und Synthese*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017 (siehe S. 39).
- [4] Alfons Hädener und Heinz Kaufmann. *Grundlagen der organischen Chemie*. 11., überarbeitete und erweiterte Auflage. Basel: Birkhäuser Verlag, 2006 (siehe S. 39).
- [5] Michel Grandbois, Martin K. Beyer, Matthias Rief, Hauke Clausen-Schaumann und Hermann E. Gaub. „How Strong Is a Covalent Bond?“ In: *Science* 283 (1999) (siehe S. 39).
- [6] Robert M. Smith und David E. Hansen. „The pH-Rate Profile for the Hydrolysis of a Peptide Bond“. In: *Journal of the American Chemical Society* 120.35 (1998), S. 8910–8913 (siehe S. 40, 43).
- [7] H. Bundgaard und G. J. Rasmussen. „Prodrugs of Peptides. 11. Chemical and Enzymatic Hydrolysis Kinetics of N-Acyloxymethyl Derivatives of a Peptide-like Bond“. In: *Pharmaceutical Research* (1991) (siehe S. 40, 43).
- [8] Y. Song, R. L. Schowen, R. T. Borchardt und E. M. Topp. „Effect of ‘pH’ on the rate of asparagine deamidation in polymeric formulations: ‘pH’-rate profile“. In: (2000) (siehe S. 40, 43).
- [9] Dirk Zahn. „Theoretical Study of the Mechanisms of Acid-Catalyzed Amide Hydrolysis in Aqueous Solution“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 107.44 (2003), S. 12303–12306 (siehe S. 40).
- [10] Dirk Zahn. „Car–Parrinello molecular dynamics simulation of base-catalyzed amide hydrolysis in aqueous solution“. In: *Chemical Physics Letters* 383.1-2 (2004), S. 134–137 (siehe S. 40).
- [11] Dirk Zahn. „On the Role of Water in Amide Hydrolysis“. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2004.19 (2004), S. 4020–4023 (siehe S. 40).
- [12] Douglas Hayworth. „Thermofischer Instructions for NHS and EDC Reactions“. In: () (siehe S. 41).
- [13] J. Mol Nico und Marcel J. E. Fischer, Hrsg. *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*. Bd. 627. 2010 (siehe S. 41).

- 
- [14] Yasuhiro Nojima, Kazuma Iguchi, Yosuke Suzuki und Atsushi Sato. „The pH-Dependent Formation of PEGylated Bovine Lactoferrin by Branched Polyethylene Glycol (PEG)-N-Hydroxysuccinimide (NHS) Active Esters“. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32.3 (2009), S. 523–526 (siehe S. 41).
- [15] Christian A.G.N. Montalbetti und Virginie Falque. „Amide bond formation and peptide coupling“. In: *Tetrahedron* 61.46 (2005), S. 10827–10852 (siehe S. 41).

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AFM</b>	Atomic Force Microscope.....	<b>8</b>
<b>CMA</b>	Carboxymethylamylose.....	<b>36</b>
<b>DLC</b>	Diamond Like Carbon.....	<b>17</b>
<b>DP</b>	Doppelpeak.....	<b>27</b>
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid.....	<b>3</b>
<b>HCl</b>	Salzsäure	
<b>HDC</b>	High Densitiy Carbon.....	<b>17</b>
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid	
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid.....	<b>41</b>
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline.....	<b>38</b>
<b>SMFS</b>	Single Molecule Force Spectroscopy.....	<b>8</b>
<b>t<sub>max</sub></b>	Maximale Clamptzeit.....	<b>28</b>
<b>TZP</b>	Tetraedisches Zwischenprodukt.....	<b>38</b>
<b>ZI</b>	Zwitterion.....	<b>38</b>
<b>ÜZ</b>	Übergangszustand.....	<b>38</b>

## A. Überlagerung der normierten Kraft-Abstand-Kurven von Clampereignissen

## B. Mechanische Eigenschaften der Kraft-Abstand-Kurven von Clampereignissen