

Starke Haftkraft

Klebstoffe nach dem Vorbild von Insektensekreten

Heike Gerhardt und Prof. Dr. Michael Lämmerhofer
Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen, Deutschland

Geowissenschaftler, Biologen und Chemiker der Universität Tübingen arbeiten in Zusammenarbeit mit dem IFAM (Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung in Bremen) an der Aufklärung der Haftung von Insekten an Oberflächen. Ziel dieses Projektes ist es, einen Kleber auf Basis von Insektensekreten zu synthetisieren. Dabei ist besonders beeindruckend, wie stark die Haftkraft bei manchen Insekten in Bezug auf das Körpergewicht ist und wie sich die Insekten trotzdem ohne Probleme wieder von der Oberfläche ablösen können. Zudem hinterlassen die Insekten keine Spuren des Sekrets an den Oberflächen.





Glatte versus behaarte Haftsyste^me

Bei Insekten gibt es zwei Arten von Haftsyste^men, das behaarte sowie das glatte System. Gut erforscht und durchaus bekannt ist das behaarte System des Gekko, Gekkonidae. Durch immer feiner werdende Haare, die eine charakteristische Oberflächenstruktur aufweisen, besitzt der Gekko die Fähigkeit, an vertikalen Oberflächen laufen zu können [1].

Glatte Haftsyste^me sind weitaus weniger erforscht. Diese basieren auf der Ausscheidung eines zweiphasigen Sekrets, das Klebeeigenschaften aufweisen soll; d.h., es gibt sowohl polare als auch apolare Anteile [2]. Im gegenständlichen Kooperationsprojekt werden diese Sekrete abgesammelt und hinsichtlich ihrer molekularen Zusammensetzung analysiert (Abb. 1). Ein Teilprojekt beschäftigt sich dabei mit der gaschromatographischen Analytik von Kohlenwasserstoffen in Adhäsionssekreten.

Warum analysieren wir die Kohlenwasserstoffe?

Langkettige Alkane spielen bei Insekten eine bedeutende Rolle. Sie dienen als Sexualpheromone und Kairomone (zur Erkennung von Geschlecht und Gattung) und schützen die Cuticula vor dem Austrocknen. Da sie Einfluss auf die Viskosität von Sekreten haben, liegt die Annahme nahe, dass sie auch bei der Haftung eine gewisse Rolle spielen könnten. Grundsätzlich nimmt die Viskosität mit zunehmender Kettenlänge bei Alkanen zu, wodurch tarsale Sekrete zähflüssiger werden, somit die Benetzbarkeit von Oberflächen und Hafteigenschaften positiv beeinflussen können.

Madagaskar-Fauchschabe

Eines der untersuchten Insekten ist die Madagaskar-Fauchschabe (*Gromphadorrhina portentosa*). Sie eignet sich besonders gut als Forschungsobjekt, da sie für ein Insekt verhältnismäßig groß (ca. 6–8 cm) und sehr robust ist (Abb. 2). Um Substanzen eindeutig dem Sekret zuzuordnen, das an den Füßen (Tarsi) und nicht der Cuticula (Oberfläche des Insekts) abgesondert wurde, werden jeweils Referenzproben von den Unterschenkeln (Tibia) der Tiere genommen, wo keine Haftorgane vorhanden sind.

Probennahme

Die größte Herausforderung bei der Analytik von Insektenhaftsekreten ist die Probennahme. Die geringen Mengen an Sekret erfordern eine Probennahmetechnik, die eine Verdünnung vermeidet und einen Anreicherungsschritt implementiert. Außerdem ist es wichtig, dass die Probennahmetechnik wenig anfällig für die Einschleppung von Kontaminationen ist. Es sind mehrere Methoden für die Abnahme von Proben an Insekten bekannt [3]. Das Abtöten des Insekts mit flüssigem Stickstoff und anschließende Extraktion der kutikularen Verbindungen mit organischen Lösungsmitteln (Heptan, Chloroform, etc.) ist eine Standardtechnik. Bei einer anderen Technik werden die Insekten als Ganzes in Kapillaren eingeschlossen und diese direkt in den GC-Injektor eingebracht, wo die Analyte von der kutikularen Oberfläche thermisch desorbiert und analysiert werden. Diese Probennahmetechniken sind allerdings ungeeignet für die vorliegende Fragestellung, da kein örtlich kontrolliertes Sampling an den tarsalen Regionen, wo das Haftsekret abgesondert wird, erfolgt, sondern die molekularen Profile von Tarsalsekret und allgemeinen kutikulären Fingerprints vermischt werden. Daher wurden andere Probennahmetechniken entwickelt, die eine gezielte kontrollierte Probennahme der tarsalen Haftsekrete ermöglichen (Abb. 3). Diese Methoden wurden anhand der Madagaskar-Fauchschabe verglichen.

Die oben erwähnte Extraktionsmethode mit organischen Lösungsmitteln wurde spezifisch modifiziert, um eine gezielte Abnahme der Tarsalsekrete zu ermöglichen. Dazu werden die Tiere mit Klebeband und Drähten auf einer Glasplatte fixiert. Anschließend wird Heptan in eine Hamilton-Spritze aufgezogen und ein Tropfen auf die abzusammelnde Stelle gegeben und erneut in die Spritze aufgezogen. Dieser Schritt wird mehrmals wiederholt und das Extrakt schließlich in einem Probengefäß gesammelt. Diese Art des Samplings ist sehr zeitaufwendig. So haben sechs Personen an zwölf Insekten über 24 h Sekret gesammelt, um am Ende 200 µL Extrakt in Heptan zu erhalten. Angesichts der langwierigen Sammelaktion ist diese Methode ebenfalls anfällig für Kontaminationen aus der Umgebung sowie von anderen Körperstellen des Insekts.

Eine im Vergleich vorteilhafte Alternative dazu ist die Kontakt-Festphasenmikroextraktion mit kommerziell erhältlichen SPME-Fasern (solid phase micro extraction). In unserem Fall wurde eine Polydimethylsiloxan (PDMS)-SPME-Faser verwendet, die sich besonders für die

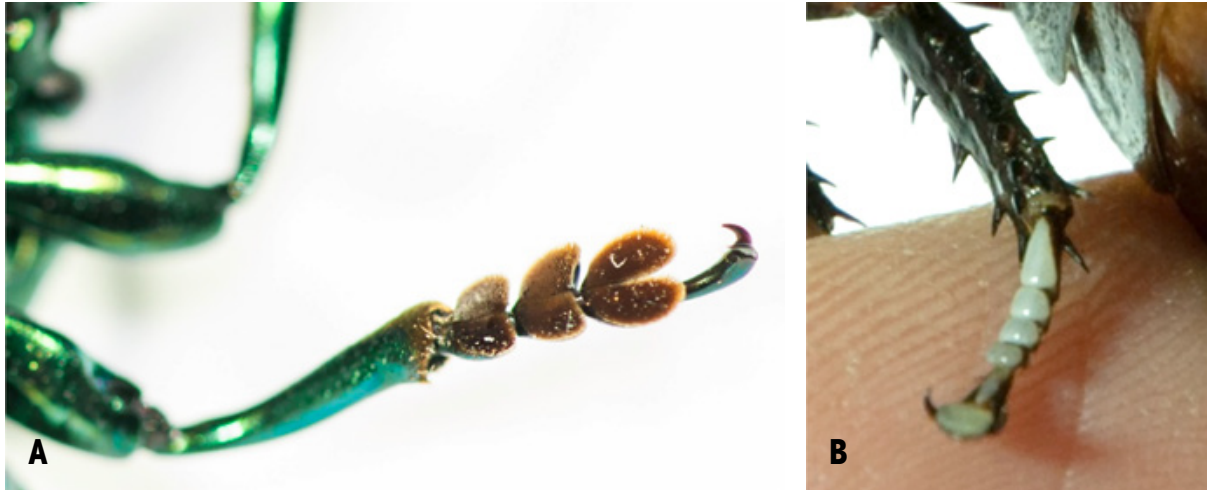


Abb. 1 Unterschiede zwischen **(A)** behaarten Haftsystemen und **(B)** glatten Haftsystemen. Bei den glatten Haftsystemen wird das Sekret abgegeben, das zur Haftung beiträgt.

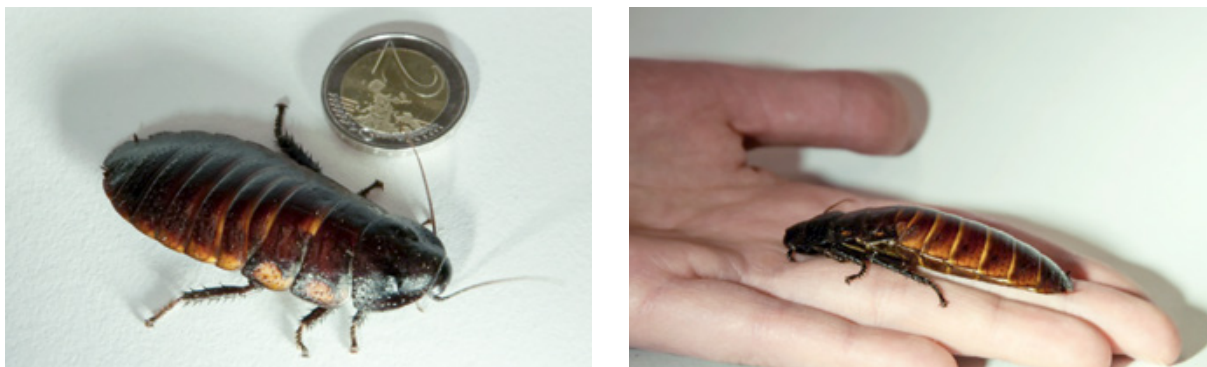


Abb. 2 Madagaskar-Fauchschabe im Vergleich zu einer 2-Euro-Münze und zu einer Hand

Extraktion von apolaren Substanzen gut eignet. Mit dieser kann man durch Kontaktverfahren, d.h. durch kurzes Rubbeln direkt an der gewünschten Stelle, das Haftsekret gezielt absammeln. In unserem Fall wurde ca. 7 min über die gewünschte Stelle gestrichen und die Faser anschließend direkt in den Injektor des Gaschromatographen eingeführt, um die extrahierten Substanzen zu desorbieren und die komplexen Proben mit GC aufzutrennen. Detektiert wurde mittels Quadrupol-Massenspektrometer (MS). Vorteil dieser In-vivo-Sampling-Methode ist, dass die Schabe dafür nicht fixiert werden muss, weil eine Betäubung mit CO₂ ausreicht, um die Insekten für ca. 7 min Kontakt-SPME-Sampling ruhigzustellen.

Kommerzielle SPME-Fasern sind teuer und die Beschichtung wird beim Kontakt-SPME-Verfahren sehr leicht zerstört. Außerdem brechen die Fasern sehr häufig, insbesondere dann, wenn die Insekten vorzeitig aus der Betäubung aufwachen und durch heftiges Strampeln die Faser mechanisch zerstören. Wir konnten zeigen, dass die beschichtete SPME-Faser durch eine einfache Glasfaser, die aus einer Vorsäule für die Gaschromatographie hergestellt wurde, ersetzt werden kann. Sie ist günstig, leicht herzustellen und robuster als die SPME-Faser.

Dabei ist die Probennahme an sich jener mit der SPME-Faser sehr ähnlich. Es wurde ebenfalls 7 min Sekret entnommen und anschließend sofort analysiert. Obwohl es sich bei der Glasfaser um eine polare Oberfläche handelt, unterscheiden sich die extrahierten Substanzprofile nicht von jenen, die mit der apolar-beschichteten PDMS-SPME-Faser aufgenommen wurden und auch nicht von jenen, die mit Heptan-Extraktion erhalten wurden.

Identifizierte Kohlenwasserstoffe

Die Identifizierung der detektierten Verbindungen erfolgte einerseits über deren Kovats-Retentionsindices und Datenbankabgleich sowie via Massenspektren und charakteristische Fragmentierung bzw. NIST-Datenbanksuche. n-Alkane, methylverzweigte Alkane und ein dimethylverzweigtes Alkan im Bereich von C₂₇–C₃₃ wurden sowohl im Sekret als auch auf der Cuticula bestimmt. Abbildung 4 zeigt ein Chromatogramm nach 7 min Sammeln mit der Glasfaser an den Tarsi (Füße der Schaben), wobei den intensivsten Peaks die jeweiligen Substanznamen zugeordnet wurden. Die höchsten Intensitäten und damit auch den größten Anteil der

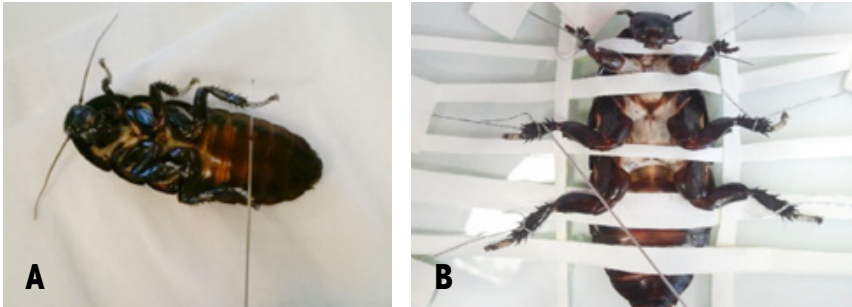


Abb. 3 Probenahme an der Madagaskar-Fauchschabe, wobei (A) die Abnahme mit Glasfaser-SPME ist und (B) die Lösungsmittelabnahme veranschaulicht.

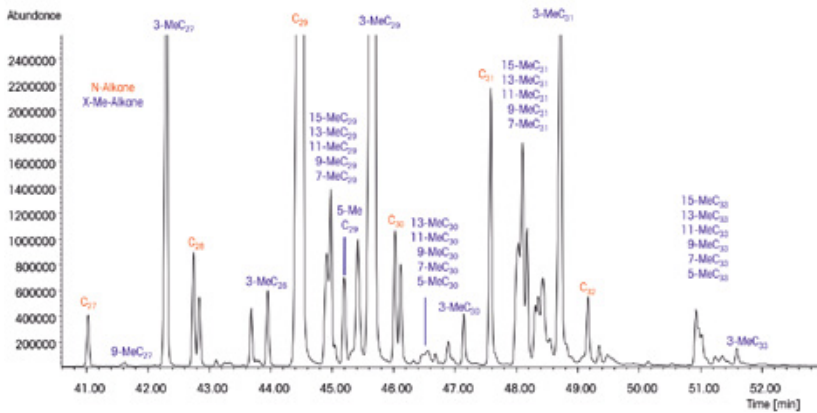


Abb. 4 Chromatogramm des Adhäsionssekrets durch Abnahme mit der Glasfaser-SPME-Methode und Zuordnung der Alkane

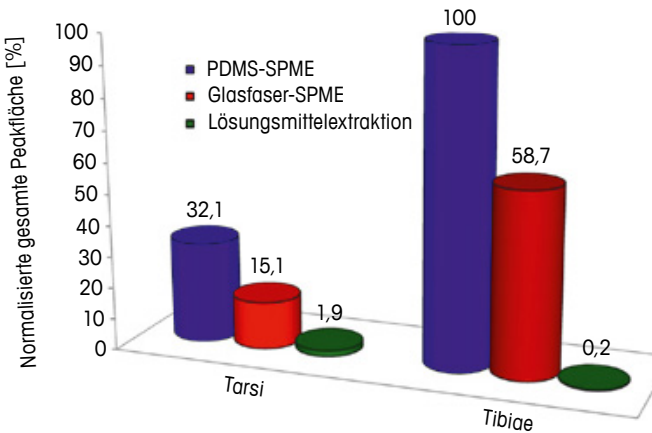


Abb. 5 Ausbeute der Alkane in Prozent für die Probenahmemethoden sowohl für Tarsen als auch für Tibiae

Alkane machen die Alkane C29 (Nonacosan) und 3-Me-C29 (3-Methyl-Nonacosan) aus. Man kann aber auch ganze Serien von methylverzweigten Kohlenwasserstoffisomeren unterschiedlichster Kettenlängen detektieren. Die Komplexität des molekularen Alkanprofils der tarsalen Sekrete wird in Abbildung 4 gut ersichtlich.

Vergleich der unterschiedlichen Probenahmemethoden

Wie erwähnt ist in der Spurenanalytik die Probenahme ein ausschlaggebender Arbeitsschritt für gute, reproduzierbare Messergebnisse, aber auch für die erzielte Empfindlichkeit der Analysenmethode. Dabei kann durch adäquate Extraktion die Ausbeute erhöht werden und so die Sensitivität der Methode gesteigert werden, wodurch es erst möglich wird, dass auch gering abundante Substanzen nachgewiesen werden können. SPME-Extraktionsmethoden zeigen diesbezüglich deutliche Vorteile gegenüber der Lösungsmittelextraktion. Abbildung 5 zeigt die Gesamtmenge an Alkanen, normalisiert auf die Methode mit der größten Ausbeute, die bei der jeweiligen Abnahme gefunden wurde. Dabei ist zu beobachten, dass mittels PDMS-SPME-Faser an den Tibia am meisten gesammelt wurde, während mit der Glasfaser an derselben Stelle nur ca. 60% an Alkanen abgesammelt werden konnten. An den Tarsi, wo das Haftsekret vorhanden ist, wurden weniger Alkane gefunden. Dennoch ist die Intensität bei Verwendung der Glasfaser ausreichend, um alle Alkane zu identifizieren. Bei der Lösungsmittelextraktion ist die Menge an gesammeltem Sekret im Vergleich zu den anderen Methoden sehr gering, da das Sekret in dem Fall im Zuge der Extraktion mit Heptan verdünnt wird. Aufgrund dessen liefert die Lösungsmittelextraktionsmethode Chromatogramme mit geringen Peakintensitäten, was zum Verlust von Verbindungen mit geringer Abundanz führt, da diese unter der Nachweisgrenze sind. Im Vergleich dazu ist die Methode der SPME-Abnahme besser geeignet, wobei die beschichtete PDMS-SPME-Faser Vorteile hinsichtlich der Empfindlichkeit und die unbeschichtete Glasfaser Vorteile hinsichtlich der Präzision und praktischen Handhabbarkeit bzw. der Kosten besitzt [4].

Werden wir bald mittels Insektenkleberimitat wie Spiderman an Wänden laufen können?

Um den Einfluss auf die Haftung zu bestimmen, wurde das molekulare Profil des Tarsalsekrets im Vergleich zur

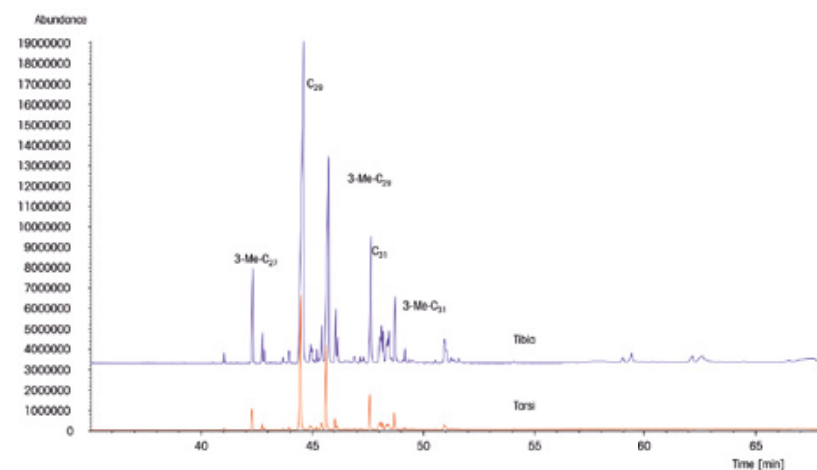


Abb. 6 Vergleich der Chromatogramme von Tarsi (Fuß) und Tibia (Unterschenkel, Referenz). Es ist zu sehen, dass deutlich mehr Kohlenwasserstoffe an den Tibia abgesammelt werden können.



Heike Gerhardt, Jg. 1983, studierte Chemie an den Universitäten Tübingen und Wien, wobei sie sich bereits während ihres Master-Studiums in Wien auf den Schwerpunkt Analytik spezialisierte. Seit April 2012 arbeitet sie an der Universität Tübingen bei Prof. Dr. Lämmerhofer an ihrer nahezu abgeschlossenen Doktorarbeit und beschäftigt sich hauptsächlich mit der Analyse von Haftsekreten unterschiedlichster Insekten. Dabei liegt der Schwerpunkt ihrer Arbeit auf der Bestimmung von Kohlenwasserstoffen.



Michael Lämmerhofer, Jg. 1966, studierte Pharmazie an der Universität Graz, wo er 1996 in Pharmazeutischer Chemie promovierte. Anschließend wechselte er an die Universität Wien. Dort war er, unterbrochen von einem einjährigen Postdoc-Aufenthalt 1999 bis 2000 an der Universität Berkeley, zuerst als Universitätsassistent, später als Universitätsdozent und außerordentlicher Univ.-Prof. am Institut für Analytische Chemie tätig. 2002 erfolgte die Habilitation, von 2002 bis 2009 war er zudem Leiter des Christian-Doppler-Labors für Molecular Recognition Materials in Wien. 2012 wurde er auf die Professur für Pharmazeutische (Bio-) Analytik an das Institut für Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen berufen. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Enantiomerenanalytik, Biopharmazeutika-Analytik, Biomarkeranalytik sowie die Entwicklung von funktionalisierten Trennmaterien. Michael Lämmerhofer ist Herausgeber der Zeitschrift „Journal of Separation Science“ und hält sechs Patente.

Kutikula der Madagaskar-Fauchschabe gegenübergestellt. Dabei hat sich gezeigt, dass sich diese beiden molekularen Fingerprints qualitativ sehr ähnlich sind, jedoch quantitativ signifikant unterscheiden (siehe Abb. 6).

Die gefundenen n-Alkane, methylverzweigten Alkane und die nicht vorhandenen ungesättigten Alkane und Aldehyde weisen darauf hin, dass das Sekret halbfest und fettähnlich sein könnte. Diese Eigenschaft würde die Haftung in Hinsicht auf Rutschfestigkeit, Austrocknenresistenz und Schutz vor Abrieb begünstigen.

Abschließend kann man sagen, dass diese Ergebnisse wohl darauf hindeuten, dass die Kohlenwasserstoffe nicht ausschließlich für die Haftperformanz verantwortlich sind, wohl aber einen signifikanten Beitrag zur Haftung

– insbesondere durch deren Einfluss auf die Konsistenz und Benetzbarkeit von hydrophoben Oberflächen – haben dürften. Andere Substanzen wie z.B. Zucker und Proteine rücken daher vermehrt in den Fokus unseres Interesses. An diesem Bereich wird ebenfalls geforscht, jedoch werden bis zur Entwicklung eines Klebstoffes, der als perfektes biomimetisches Adhäsiv auf Basis dieser Insektensekrete bezeichnet werden kann, noch einige Madagaskar-Fauchschaben glatte Wände hochklettern, ohne dass wir genau wissen, warum dies möglich ist.

- michael.laemmerhofer@uni-tuebingen.de
- heike.gerhardt@uni-tuebingen.de

Literatur
[1] Del Campo, A. & Arzt, E. (2014) CRC Press 3, 1543–1552
[2] Drechsler, P. & Federle, W. (2006) J. Comp. Physiol. A. 192, 1213–1222
[3] Golebiowski, M. et al. (2011) Anal. Bioanal. Chem. 399, 3177–3191
[4] Gerhardt, H. et al. (2015) J. Chromatogr. A (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.027>)