

**Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen auf Gold
zur Rekonstitution von Membranproteinen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich
Chemie und Pharmazie
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Herbert Wieder

geboren in Worms am Rhein

Mainz 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2000

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Knoll und Herrn Dr. A. Offenhäuser in der Zeit von Juni 1997 bis Januar 2000 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz und am NIST in Gaithersburg, USA angefertigt.

Wer, wie, was, wieso, weshalb, warum?

Wer nicht fragt bleibt dumm!

[Motto der Sesamstraße]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Biomembranen | 1 |
| 1.2 Biomimetik im Bereich der Lipidmembranen..... | 2 |
| 1.3 Lipide..... | 3 |
| 1.3.1 Lipide zum Aufbau festkörperunterstützter Biomembranen auf Gold..... | 5 |
| 1.3.1.1 Thiolipide | 5 |
| 1.3.1.2 Füll-Lipide..... | 6 |
| 1.4 Carrier, Kanäle und Transporter..... | 8 |
| 1.4.1 Annexin V | 9 |
| 1.4.2 Porine..... | 10 |
| 1.4.3 H ⁺ -ATP-Synthase | 10 |
| 1.4.4 Bande 3-Protein in Erythrocytenmembranen | 11 |
| 1.5 Optik und Oberflächenplasmonenresonanz..... | 12 |
| 1.6 Elektrochemie..... | 17 |
| 1.6.1 Die elektrische Doppelschicht..... | 17 |
| 1.6.2 Zyklische Voltammetrie (CV)..... | 20 |
| 1.6.2.1 Zyklische Voltammetrie an filmbedeckten Elektroden | 24 |
| 1.6.2.2 Reduktive Desorption von Thiolen | 24 |
| 1.6.3 Impedanzspektroskopie (IS)..... | 26 |
| 1.6.3.1 Prinzip | 26 |
| 1.6.3.2 Ersatzschaltkreise | 27 |
| 1.6.3.3 Auftragungen..... | 32 |
| 1.7 Kontaktwinkel und freie Oberflächenenergie..... | 35 |
| 1.7.1 Methoden zur Bestimmung der Oberflächen- und Grenzflächenspannungen von Festkörpern..... | 37 |
| 1.7.1.1 Zisman..... | 37 |
| 1.7.1.2 Good und Girifalco..... | 37 |
| 1.7.1.3 Fowkes | 38 |
| 1.7.1.4 Owens und Wendt | 38 |
| 1.8 Druck-Flächen-Diagramme | 39 |
| 1.9 Differential Scanning Calorimetry (DSC)..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 2 Problemstellung | 41 |
| 3 Diskussion der Ergebnisse | 42 |
| 3.1 Entwicklung der Meßzelle..... | 42 |
| 3.2 Hybrid-Bilayer-Membranen (HBM)..... | 43 |
| 3.2.1 Aufbau | 43 |
| 3.2.2 Ersatzschaltkreis | 44 |
| 3.2.3 SA-DPPTE + DMPC-SUV (Route A-C) | 44 |
| 3.2.4 LB-Übertrag von DMPC auf SA-DPPTE (Route A-D) | 47 |
| 3.2.5 LB-DPPTE + DMPC-SUV (Route B-C)..... | 47 |
| 3.2.6 LB-Transfer von cogespreiteten DPPTE/DMPC-Filmen..... | 50 |
| 3.3 Gemischte Bilayer-Membranen (MBM) | 53 |
| 3.3.1 Aufbau | 53 |
| 3.3.2 Ersatzschaltkreis | 55 |
| 3.3.3 Abhängigkeiten..... | 56 |
| 3.3.3.1 Molenbruch | 57 |
| 3.3.3.2 Temperatur | 58 |
| 3.3.3.3 pH-Wert..... | 59 |
| 3.3.3.4 Konzentration | 60 |
| 3.3.3.5 Fusionsdauer..... | 61 |
| 3.3.3.6 Ionenstärke | 62 |
| 3.3.4 Oberflächenbelegung mittels reduktiver Desorption..... | 63 |
| 3.3.4.1 Durchführung | 63 |
| 3.3.4.2 Reduktive Desorption selbstorganisierter DPPTE-Monolayer | 63 |
| 3.3.4.3 Zeitaufgelöste reduktive Desorption bei der Fusion gemischter Vesikel auf Gold..... | 67 |
| 3.4 Spacer-Lipid Membranen | 71 |
| 3.4.1 Ersatzschaltkreis | 72 |
| 3.4.2 Isothermen und LB-Überträge..... | 76 |
| 3.4.3 Experimente auf Mini- und Mikroelektroden | 78 |
| 3.5 Vesikelfusion auf binäre Hydroxythiol-/Alkanthiol-Monolayer mit definierter Oberflächenenergie..... | 81 |
| 3.5.1 Bestimmung des polaren und dispersen Anteils an der freien Oberflächenenergie durch Kontaktwinkelmessungen | 84 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.5.2 | Phasenseparation, Domänenbildung?..... | 90 |
| 3.5.3 | Korrelation des Schichtdickenzuwachses und der Fusionskinetik mit den Oberflächeneigenschaften | 92 |
| 3.5.4 | Impedanz-Spektroskopie | 97 |
| 3.5.5 | Kraftmikroskopie (AFM) | 100 |
| 3.5.6 | Ergebnis..... | 103 |
| 3.6 | Proteine in festkörperunterstützten Lipidmembranen | 104 |
| 3.6.1 | Porine..... | 104 |
| 3.6.2 | CF ₀ F ₁ -ATPsynthase..... | 106 |
| 3.6.3 | Annexin V | 114 |
| 3.6.3.1 | Optische Messungen an DPPTE/(DMPS/DMPC)-Hybridmembranen | 115 |
| 3.6.3.2 | Impedanzspektroskopie an sub-DPPTE/(DMPS/DMPC)-Membranen | 117 |
| 3.6.3.3 | Kraftmikroskopie (AFM) | 120 |
| 3.6.4 | Bande 3-Protein in roten Blutzellen | 121 |
| 4 | Experimenteller Teil | 126 |
| 4.1 | Materialien..... | 126 |
| 4.2 | Methoden..... | 127 |
| 4.2.1 | Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)..... | 127 |
| 4.2.2 | Elektrochemie (IS/CV)..... | 128 |
| 4.2.3 | Filmwaage | 128 |
| 4.2.4 | Kontaktwinkelmessungen (CA) | 128 |
| 4.2.5 | Dynamische Lichtstreuung (DLS)..... | 129 |
| 4.2.6 | Kraftmikroskopie (AFM) | 129 |
| 4.2.7 | Differenz-Thermoanalyse (DSC) | 129 |
| 4.2.8 | Dünnschichtchromatographie (DC)..... | 129 |
| 4.3 | Probenpräparation..... | 130 |
| 4.3.1 | Herstellung dünner Au-Filme auf Glas, Mica und Si..... | 130 |
| 4.3.2 | Vesikelpräparation [Szo 80, Lic 87]..... | 131 |
| 4.3.3 | Proteoliposomen..... | 132 |
| 4.3.4 | Hämolytierte Erythrocyten („Red Blood Cell Ghosts“..... | 133 |
| 5 | Zusammenfassung | 134 |
| 6 | Literatur | 137 |
| 7 | Anhang | 149 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 7.1 | Technische Zeichnungen zur Meßzelle | 149 |
| 7.2 | Korrektur des Oberflächenmolenbruchs nach Cassie..... | 154 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 156 |
| | Danksagung | |
| | Lebenslauf | |

Abkürzungen:

| | |
|---|---|
| ϵ (ϵ' , ϵ'') | Dielektrizitätskonstante (Realteil, Imaginärteil) |
| ϵ_0 | elektrische Feldkonstante $8.854 \cdot 10^{-12}$ [$\text{C}^2\text{J}^{-1}\text{m}^{-1}$] |
| γ | Grenzflächenspannung |
| Γ | Grenzflächenüberschußkonzentration |
| λ | Wellenlänge |
| μ | chemisches Potential |
| ν | Frequenz |
| ω | Kreisfrequenz |
| π | Lateraldruck |
| θ | Bedeckungsgrad |
| A | Oberfläche (<i>area</i>) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AFM | Atomare Kraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i>) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Au(111) | Gold in kristalliner Orientierung (111) |
| BLM | Schwarzfilm-Membran (<i>Black Lipid Membrane</i>) |
| c | Konzentration Lichtgeschwindigkeit |
| C | Kapazität (<i>Capacitance</i>) |
| CV | Zyklovoltametrie, Zyklovoltammogramm (<i>Cyclic Voltammetry</i>) |
| d | Schichtdicke |
| D | Diffusionskoeffizient |
| DMPC | Dimyristoylphosphatidylcholin |
| DPPE | Dipalmitoylphosphatidylthioethanol |
| DSC | Differenz Scanning Kalorimetrie (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>) |
| e | Elementarladung |
| E (E_{ox} , E_{red}) | elektrochemisches Potential (Oxidationspotential, Reduktionspotential) |
| F | Faradaykonstante $9.64846 \cdot 10^4$ [Cmol^{-1}] |
| FT-IR | Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie |
| HBM | Hybrid-Bilayermembran |
| i | Stromdichte |

| | |
|--|--|
| I (I_{ox} , I_{red}) | Strom (Oxidationsstrom, Reduktionsstrom) |
| I_c | nicht-faradayscher Ladestrom |
| IR | Infraroter Bereich des elektromagnetischen Spektrums |
| ITC | Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>) |
| IS | Impedanz-Spektroskopie |
| k | Boltzmannkonstante Wellenvektor |
| LS | Lichtstreuung |
| LSV | Lineare Voltametrie (<i>Linear Sweep Voltammetry</i>) |
| LB(K) | Langmuir-Blodgett(-Kuhn) |
| LMV | große, multilamellare Vesikel (<i>Large Multilamellar Vesicle</i>) |
| LUV | große, unilamellare Vesikel (<i>Large Unilamellar Vesicle</i>) |
| M | Molekulargewicht |
| m | Masse |
| MES | Morpholinoethansulfonsäure |
| MBM | gemischte Lipidbilayermembran (<i>Mixed Bilayer Membrane</i>) |
| n | Brechungsindex Stoffmenge |
| N_A | Avogadrokonstante |
| OD | Optische Dichte |
| p.A. | per analysis |
| PA | Phosphatidsäure (<i>Phosphatidic Acid</i>) |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PS | Phosphatidylserin |
| PSP | Oberflächenplasmon (<i>Plasmon Surface Polariton</i>) |
| pH | $-\lg[\text{H}^+]$ (<i>potentia hydrogenii</i>) |
| q, Q | Ladung |
| R | Reflektivität Widerstand (<i>Resistance</i>) Allg. Gaskonstante $8.31441 \text{ [Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}]$ |
| SA | Selbstorganisation (<i>Self-Assembly</i>) |
| SAM | selbstorganisierte Monoschicht (<i>Self-Assembled Monolayer</i>) |

| | |
|----------------|--|
| SECM | Elektrochemische Rasterkraftmikroskopie (<i>Scanning Electrochemical Microscopy</i>) |
| SPM | Oberflächenplasmonenmikroskopie (<i>Surface Plasmon Microscopy</i>) |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>) |
| SUV | kleine, unilamellare Vesikel (<i>Small Unilamellar Vesicle</i>) |
| t | Zeit (<i>time</i>) |
| T | Temperatur |
| T _M | Hauptphasenübergangstemperatur (gel → flüssig-kristallin) |
| UHV | Ultrahochvakuum |
| UV | Ultravioletter Bereich des elektromagnetischen Spektrums |
| V | Volumen |
| VIS | sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums (<i>visible</i>) |
| x | Molenbruch (<i>molar fraction</i>) |
| XPS | Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>) |
| Y | Admittanz |
| Z | Impedanz |

1 Einleitung

1.1 Biomembranen

Biomembranen haben die Aufgabe biochemische Prozesse zu **kompartimentieren**. Man findet sie in der Zelle als umhüllende Plasmamembran und bei Eukaryonten darüber hinaus als äußere Begrenzung subzellulärer Organellen. Den **Stofftransport** über diese Barriere hinweg bewerkstelligen in die Membran eingebettete Kanäle und Pumpen, welche auch bei der membrangebundenen **Verarbeitung von Information** (Reizleitung, Hormonrezeptoren) mitwirken [Voe 92].

Die **Hauptbestandteile** der meisten biologischen Membranen sind Lipide, Proteine und Zucker. Je nach Einsatzort und Funktion der Membran findet man diese in den unterschiedlichsten Verhältnissen und Ausprägungen.

Nach dem **Fluid-Mosaic-Modell** von Singer und Nicolson [Sin 72] bilden die Lipide eine fluide Doppelschicht aus, welche von durch hydrophobe Wechselwirkungen gebundenen, **integralen Membranproteinen** durchspannt wird (s. Abb. 1). Die Proteine sind hierbei, falls sie nicht mit anderen Zellstrukturen assoziiert sind, durch Lateraldiffusion in der Lipidmatrix frei beweglich und bilden Carrier, Kanäle und aktive Transporter aus. **Periphere Proteine** lagern dagegen elektrostatisch und durch Wasserstoffbrücken an die Oberfläche der Membran und dort bevorzugt an die integralen Membranproteine an. An zahlreiche Proteine und Lipide der Zellaußenwand der Eucyte sind **Zucker** angebunden, die in ihrer Gesamtheit die Glykocalix ausbilden. Diese ist für die Zellerkennung und -adhäsionsfähigkeit sowie für die Bindung von Hormonen und Viren von großer Bedeutung.

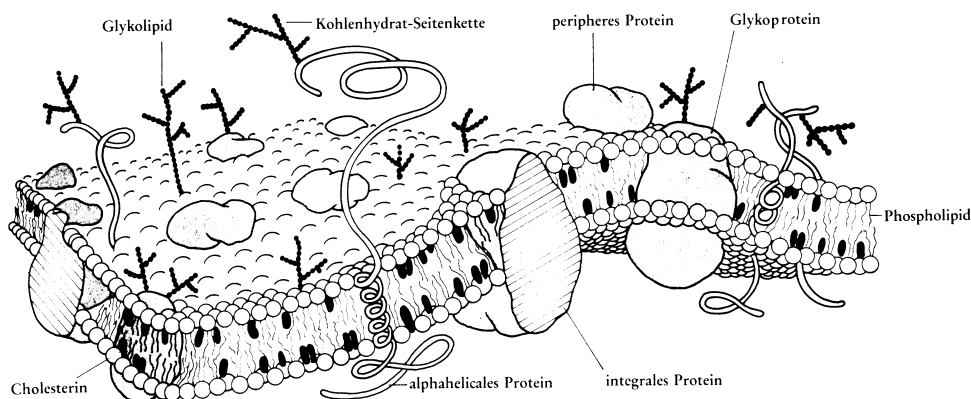


Abb. 1 Schematisches Modell einer Zellmembran (aus [Win 90]).

1.2 Biomimetik im Bereich der Lipidmembranen

Aufgrund der Komplexität von biologischen Membranen wurde zur Erforschung von Membraneigenschaften oft auf künstliche Membranen aus nur wenigen Komponenten zurückgegriffen. Die gängigsten Modellsysteme sind in Abb. 2 aufgeführt [Ahl 90, Rin 88].

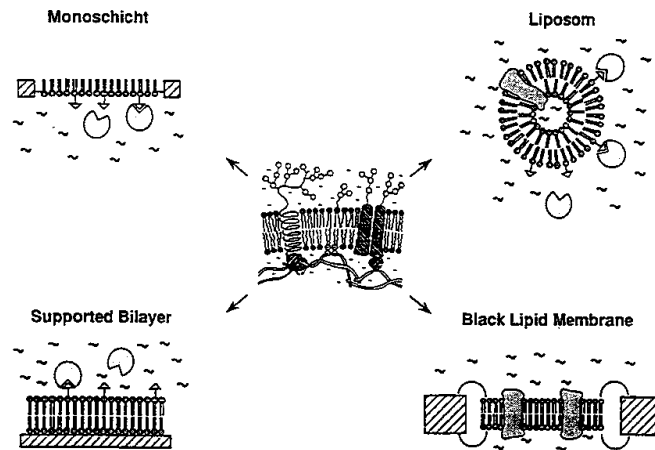


Abb. 2 Typische Modellmembranen (aus [Ahl 90]).

Dispersionen von sphärischen, wasserumschließenden Vesikeln bzw. **Liposomen** dienen vor allem zu kalorimetrischen (DSC, ITC), optischen (OD, LS, Fluoreszenz) und auch NMR-spektroskopischen Untersuchungen.

An **schwarzen Membranen** (black lipid membranes, BLMs) lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Membranen und inkorporierten Membranproteinen studieren. Der Vorteil exzellenter Kapazitäts- und Widerstandswerte dieser Membranen, als auch die Möglichkeit Einzelkanalereignisse zu studieren, werden aber durch die geringe mechanische Stabilität und störende Effekte vom Herstellungsprozeß verbliebenen Lösungsmittels aufgewogen [And 74].

Durch Untersuchungen an **Monoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche** lassen sich Aussagen über das Phasenverhalten einer Monolage bei lateraler Kompression als auch Bindungsstudien machen. In Kombination mit optischen Methoden (Brewster-Winkel; Fluoreszenz, IRRAS, Röntgen) ist auch dies ein wichtiges Modellsystem geworden, welches aber eben nur die „halbe Wahrheit“ widerspiegelt [Gai 66, Dem 74].

In jüngster Zeit werden immer mehr Untersuchungen an **festkörperunterstützten Membranen** (supported Bilayer Lipid Membranes, sBLM) durchgeführt [McC 86]. Die Zugänglichkeit mittels einer Vielzahl von oberflächenanalytischen als auch elektrischer Meßmethoden, ohne den Nachteil geringer mechanischer Stabilität, zeichnen dieses System aus. Desweiteren sind diese Membranen für den Aufbau von Biosensoren geeignet, da sie sich, im Gegensatz zu den zuvor genannten Systemen, in ein „Device“ einbauen lassen.

1.3 Lipide

Lipide (griech. lipos, Fett) sind ihrer Definition nach Stoffe biologischen Ursprungs, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, kaum aber in Wasser. Fette, Öle, bestimmte Vitamine, Hormone und die meisten Nicht-Protein-Membranbestandteile sind Lipide.

| Lipide | Funktion und Vorkommen |
|-----------------------------|--|
| Fettsäuren | kommen in veresterter Form in Membranen vor |
| Triacylglycerine | Energiespeicher im tierischen Organismus kommen nicht in Membranen vor |
| Glycerophospholipide | wichtigste Lipidbestandteile biologischer Membranen diverse Subklassen (s. Tab. 2) |
| Sphingolipide | ebenfalls Hauptbestandteile der Membran <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sphingomyeline (Sphingophospholipide) ▪ Cerebroside (Sphingoglycolipide) ▪ Ganglioside (Ceramid-Oligosaccharide) |
| Cholesterin | Steroid (Derivat des Cyclopentanperhydrophenanthrens) Hauptbestandteil der tierischen Plasmamembran |

Tab. 1 Die wichtigsten Lipidklassen.

Die weiteste Verbreitung in den in Kap. 1.2 beschriebenen Modellmembranen finden die **Glycerophospholipide**.

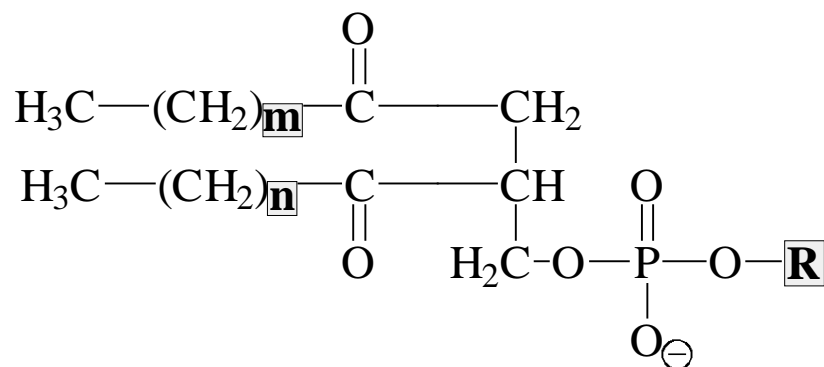


Abb. 3 Das Glycerophospholipidgrundgerüst.

Die Phospholipide unterscheiden sich in den veresterten Fettsäuren und in den Eigenschaften (Ladung, Fähigkeit zu H-Brückenbindung) ihrer Kopfgruppen [Eib 84].

| n,m | Bezeichnung | kurz | R | Bezeichnung | kurz |
|-----|---------------|------|---|-------------------------|------|
| 10 | Dilauroyl- | DL | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ | Phosphatidylcholin | PC |
| 12 | Dimyristoyl- | DM | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3$ | Phosphatidylethanolamin | PE |
| 14 | Dipalmitoyl- | DP | $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ | Phosphatidylglycerin | PG |
| 16 | Distearoyl- | DS | $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{N}^+\text{H}_3)-\text{COO}^-$ | Phosphatidylserin | PS |
| 18 | Diarachidoyl- | DA | -H | Phosphatidsäure | PA |

Tab. 2 Die Glycerophospholipid-Nomenklatur.

Zweikettige Phospholipide bilden bevorzugt Doppelschichten aus, welche zu einem thermotropen Phasenübergang von einer Gelphase L_β (mit geordneten Fettsäureketten in all-trans-Konformation) in eine flüssig-kristalline Phase L_α (mit gtg-Kinken in ungeordneten Fettsäureketten) befähigt sind.

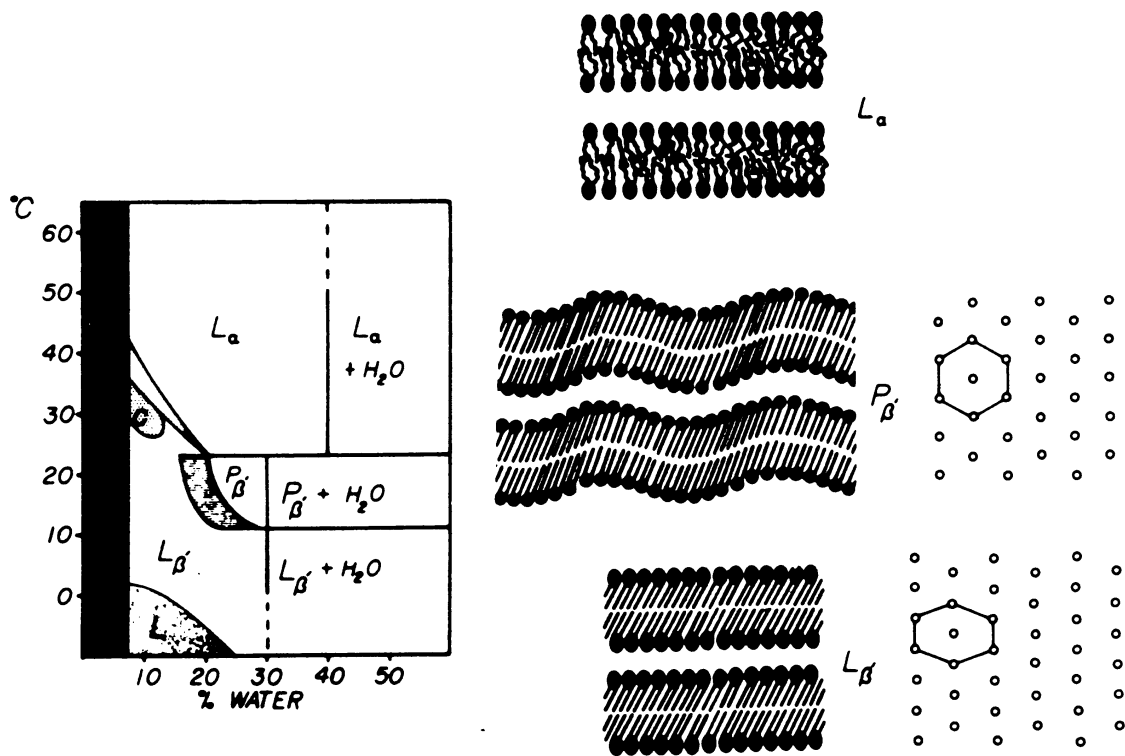


Abb. 4 Phasendiagramm für DMPC (aus [Cev 87]).

1.3.1 Lipide zum Aufbau festkörperunterstützter Biomembranen auf Gold

1.3.1.1 Thiolipide

Zum Aufbau festkörperunterstützter Lipidmembranen auf Gold finden Thiolipide Verwendung, welche die Membran durch Ausbildung von Au-S-Bindungen auf dem Substrat verankern. Im folgenden werden diese deswegen auch oft als „Ankerlipide“ bezeichnet.

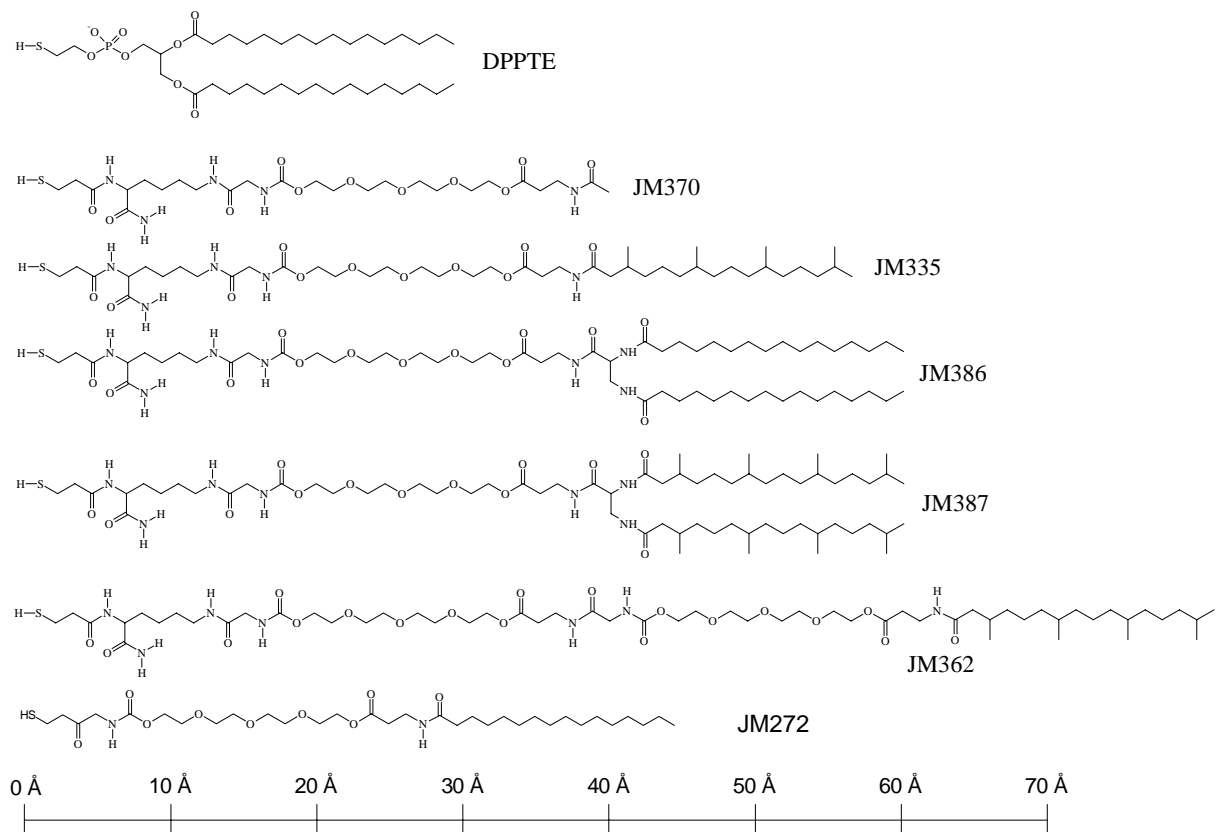


Abb. 5 Strukturformeln der verwendeten „Anker-Lipide“.

DPPTTE

(1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidyl-Thioethanol; $M=730.7$, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) besitzt in der polaren Kopfgruppe einen Thioethanolphosphorsäureester, welcher das Lipid zur Ausbildung von „kovalenten“ Au-S-Bindungen und somit zur Verankerung auf dem Au-Substrat befähigt. DPPTTE-Bilayer zeigen im Vesikel den Hauptphasenübergang bei $T_m=38^\circ\text{C}$ (s. Abb. 64).

Spacer-Thiolipide

Zur Bereitstellung eines hydrophilen Reservoirs zwischen Membran und Elektrode wurden Lipide verwendet, welche von Dr. Jürgen Mack [Mac 99] aus der Gruppe von Prof. Dr. G. Jung in Tübingen mittels kombinatorischer Chemie an Harzen synthetisiert wurden. Die Lipide variieren in Anzahl und Art der Fettsäuren sowie in der Länge des hydrophilen Spacers.

1.3.1.2 Füll-Lipide

Für den Aufbau des oberflächendistalen Monolayers und um die Zwischenräume zwischen den Ankerlipiden im oberflächenproximalen Layer zu füllen, werden Lipide verwendet, welche nicht zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zum Substrat befähigt sind. In dieser Arbeit fanden hierzu meist zwitterionische Phosphatidylcholine (PC) oder negativ geladene Phosphatidylserine (PS) Verwendung.

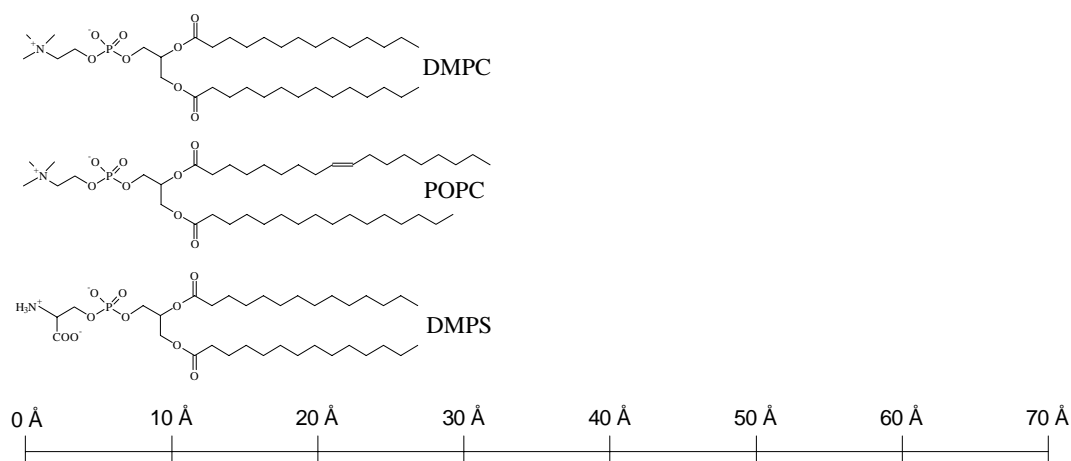


Abb. 6 Struktur der verwendeten „Füll-Lipide“.

DMPC

(1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin, $M=677.95$; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) ist ein Lipid aus der Klasse der Phosphatidylcholine. In Lipidbilayern zeigt es eine Vorumwandlung von der Gelphase L_{β} in eine sogenannte Ripple-Phase P_{β} . Der Hauptphasenübergang in die flüssig-kristalline Phase L_{α} findet bei $T_m=23.8$ °C statt. Damit lässt sich die Hauptphasenumwandlung in einem gut zugänglichen Temperaturbereich schalten (s. Abb. 4).

POPC

(1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin, $M=760.08$; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) ist ein gemischtkettiges Phosphatidylcholin. Die Bilayerumwandlungstemperatur liegt aufgrund der ungesättigten Oleoyl-Fettsäurekette bei $T_m=-2\text{ }^\circ\text{C}$.

Eigelb-PC

(Eigelb L- α -Phosphatidylcholin, $M=760.6$; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) ist ein Gemisch von Phosphatidylcholinen verschiedener Kettenlänge und Sättigungsgrades. Für Lipiddoppelschichten aus Eigelb-PC wurden Hauptphasenumwandlungstemperaturen zwischen $T_m=-5\text{ }^\circ\text{C}$ [Unt 77] und $T_m=-15\text{ }^\circ\text{C}$ [Clo 71] gefunden.

DMPS

(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylserin, $M=701,85$; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) ist ein Lipid aus der Klasse der Phosphatidylserine und besitzt bei neutralem pH-Wert eine negative Überschlußladung. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur des Bilayers in erdalkalifreien Puffern liegt bei $T_m=39\text{ }^\circ\text{C}$. In Anwesenheit von Ca^{2+} oder anderen bivalenten Kationen kann sie sich konzentrationsabhängig stark verschieben [Sil 84, Hau 84].

NBD-PE

(1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-n-(7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl); $M=877.04$; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) ist ein in der polaren Kopfgruppe fluoreszenzmarkiertes Lipid ($\lambda_{\text{excit}}=460\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=534\text{ nm}$), welches für die Fluoreszenzmikroskopie Verwendung fand.

1.4 Carrier, Kanäle und Transporter

Der Stoffwechsel findet in Zellen statt, die von ihrer Umgebung durch Plasmamembranen getrennt sind. Eukaryontische Zellen sind zusätzlich durch intrazelluläre Membranen in Organellen kompartimentiert. Ionische und polare Substanzen können das unpolare Innere biologischer Membranen nur mit Hilfe spezifischer Transportproteine passieren.

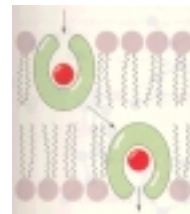
Dabei unterscheidet man zwischen **nichtkatalysiertem Transport**, der lediglich über Diffusion verläuft und **katalysiertem Transport**. Dieser wird nochmals in **passiv katalysierten Transport** (erleichterte Diffusion) und aktiven Transport unterteilt. Ersterer ermöglicht für spezifische Moleküle den Ausgleich ihrer Konzentrationsgradienten. Beim **aktiven Transport** werden Moleküle gegen ihren Konzentrationsgradienten transportiert [Voe 92].

Porenbildner:

Annexine

Carrier:

Valinomycin



Kanäle:

ungeregelt

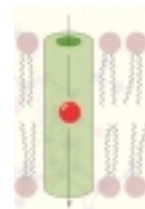
Porine, Gramicidin

spannungskontrolliert

Na⁺-Kanal

chemisch kontrolliert

nikotinischer Acetylcholinrezeptor



Transporter:

Passive Uniporter

Erythrocyten Glucose Transporter

Aktive Transporter

primäre aktive Transporter

redoxgetrieben

Cytochrom c Oxidase

lichtgetrieben

Bacteriorhodopsin

ATPasen

H⁺-ATPase

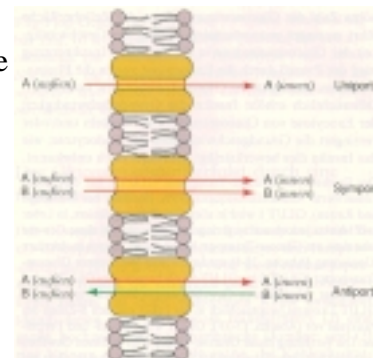
sekundäre aktive Transporter

Symporter

Lactose Permease

Antiporter

Band 3



Tab. 3 Verschiedene Klassen von Transmembranproteinen mit Beispielen [Gen 89, Voe 92].

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Membranproteine näher beschrieben.

1.4.1 Annexin V

Annexin V ist ein Vertreter der Annexine, welche man in einer Vielzahl niederer und höherer Eukaryonten findet. Sie sind amphipatisch und unterscheiden sich hierdurch von typischen löslichen bzw. membranintegralen Proteinen, weil sie Eigenschaften von beiden besitzen. Obwohl die physiologische Rolle der Annexine noch nicht vollends geklärt ist, schreibt man ihnen eine Funktion bei Membranfusionen und in der Exozytose zu. Humanes Annexin V ist ein fast ausschließlich α -helikales Protein, bestehend aus 320 Aminosäuren [Dem 94]. Die vier zyklisch angeordneten Wiederholungseinheiten bilden eine hydrophile Pore aus, welcher die Ionenleitfähigkeit und -selektivität zugeschrieben wird [Hub 92]. Freie Diffusion durch die Pore wird durch zwei Salzbrücken über die Pore verhindert, welche aber durch spannungsinduzierte Umorientierung Permeation zulässt. Annexin V bindet mit seiner konvexen Oberfläche Ca^{2+} -induziert an negativ geladene Phospholipidmembranen. Es dringt dabei nur unwesentlich in die Membran ein [Vog 94]. Die Ausbildung von Ionenkanälen durch die Membran beruht nach derzeitiger Meinung auf dem starken elektrostatischen Feld, welches Annexin V an der Bindungsstelle generiert. Das Zusammenspiel eines membranpenetrierenden Tryptophans (W187) und die Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} -bindenden Loops und Phospholipidkopfgruppen [s. Abb. 7] machen die Membran durch Generierung langlebiger, wassergefüllter Poren oder transients, ungeordneter Domänen lokal ionendurchlässig [Kar 92].

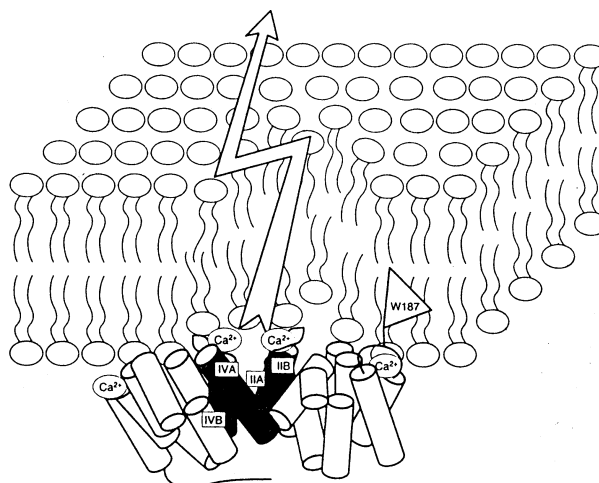


Abb. 7 Modell zur Bindung und Porenbildung von Annexin V [Dem 94].

Für diese Arbeit stand ein gentechnisch exprimiertes Fusionsprotein aus Annexin V und einem *strep*-Tag-Affinitätspeptid (AnnexinV-OmpA-*strep*) zur Verfügung [Sch 96, Ske].

1.4.2 Porine

Das in dieser Arbeit verwendete Porin ist ein homotrimeres, integrales Protein der äußeren Membran von *Rhodopseudomonas blastica*. Die 30.7 kD-Untereinheiten aus je 289 Aminosäureresten formen als Trimer eine 9x11 Å weite Pore, welche den Durchtritt von geladenen Stoffen mit $M < 600$ D erlaubt [Kre 94].

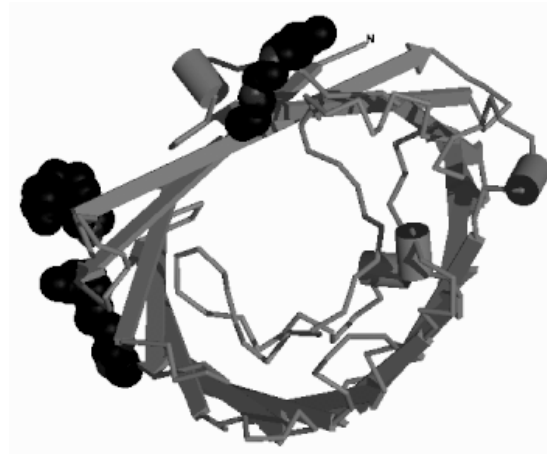


Abb. 8 Porin aus *Rhodopseudomonas blasticus*.

Ein in der Gruppe von Prof. Dr. P. Schulz [Sch a] entwickeltes Expressionssystem in *Escherichia coli* [Sch 96] erlaubt es die Porine gentechnisch zu verändern und in Einschlusskörpern cytosolisch zu überexprimieren. Mittels gezielter Mutationen von Alaninen und Serinen zu sterisch aufwendigeren, positiv geladenen Argininen auf einem internen Loop an der engsten Stelle der Pore, läßt sich die Leitfähigkeit der Porine für verschiedene Ionen beeinflussen [Bio 99].

1.4.3 H⁺-ATP-Synthase

CF₀F₁-ATPase ist eine F-ATPase aus Chloroplasten. Man findet F-ATPasen in respiratorischen und photosynthetischen Membranen von Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Die H⁺-ATPase nützt dabei einen aus der Atmungskette oder Photosynthese resultierenden pH-Gradienten zum Aufbau von ATP aus ADP und Phosphat und arbeitet somit als ATP-Synthase. Im Überschuß von ATP kann dieser Prozeß auch umgekehrt werden, wobei das Enzym dann als Protonenpumpe (ATPase) arbeitet und einen pH-Gradienten aufbaut.

Das Enzym besteht im wesentlichen aus einem membranintegralen F₀-Teil, der den Protonentransport über die Membran bewerkstelligt und einem globulären F₁-Teil, in welchem die ATP-Synthese bzw. -Hydrolyse stattfindet. Die drei jeweils alternierend angeordneten Kopien der α - und β -Untereinheit bilden hierbei eine Art Faß, in welchem die γ -Untereinheit während

eines katalytischen Zyklus drei verschiedene Konformationen annehmen kann. Diese resultieren in unterschiedlichen Konformationen der Nukleotid-Bindungstaschen auf den β -Untereinheiten (Boyer-Mechanismus [Abh 94, Boy 93, Boy 97]).

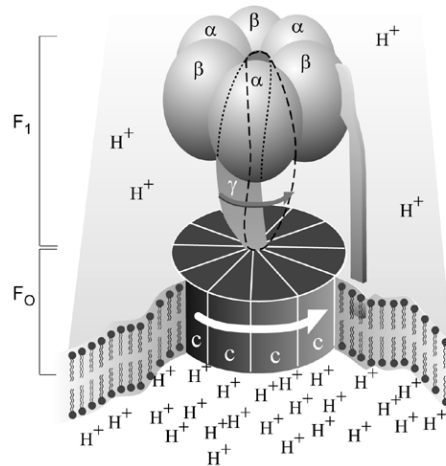


Abb. 9 Schematischer Aufbau der H^+ -ATPase (aus [Roy 97]).

Die in dieser Arbeit verwendete CF_1F_0 -ATPase wurde in der Gruppe von Prof. Dr. P. Gräber [Grä] aus der Thylakoidmembran des Blattspinnats extrahiert und anschließend in Eigelb-PC-Vesikeln rekonstituiert [s. Kap. 4.3.3].

1.4.4 Bande 3-Protein in Erythrocytenmembranen

Die Erythrocytenmembran gilt als die bestuntersuchte Zellmembran überhaupt. Die Membran besteht aus ca. 50% Protein, 42% Lipid und 8% Kohlenhydrat. Reife Säugererythrocyten enthalten keine Zellorganellen mehr und umschließen im wesentlichen eine Hämoglobinlösung. Zum CO_2 -Transport im Blut muß die Membran für HCO_3^- und Cl^- permeabel sein. Dies bewerkstelligt der spezifische Anionenkanal (Bande 3) der mit >30% einen Großteil der Membranproteine einnimmt [Jay 86, Vit 85, Voe 92].

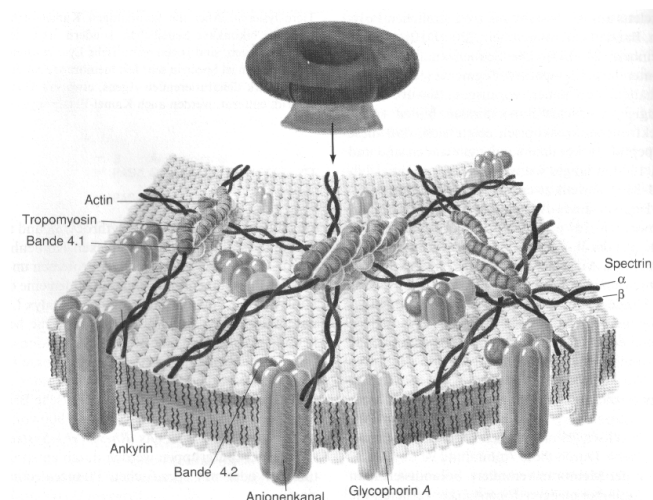


Abb. 10 Modell des Erythrocytenmembranskeletts (aus [Voe 92]).

1.5 Optik und Oberflächenplasmonenresonanz

Läßt man Licht von einem optisch dichteren in ein weniger dichtes Medium fallen (z.B. Glas/Luft) so kommt es nach Snellius oberhalb eines kritischen Winkels Θ_c zur **Totalreflektion** ($\Theta_t = \pi/2$) an der Grenzfläche.

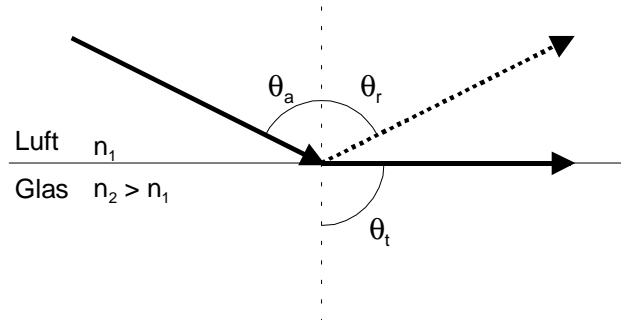


Abb. 11 Totalreflektion an der Luft-Glas-Grenzfläche.

Für den reflektierten Strahl gilt das Reflexionsgesetz: $\Theta_r = \Theta_i$

Der transmittierte Strahl wird nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz gebrochen:

$$\sin \Theta_t = \frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \Theta_i \quad \Theta_i; \Theta_a \text{ innerer und äußerer Einfallswinkel} \quad (\text{Gl. 1})$$

Θ_r Ausfallwinkel des reflektierten Strahls

Θ_t Ausfallwinkel des transmittierten Strahls

$$\text{Totalreflektion tritt ein für } \Theta_t = 90^\circ: \sin \Theta_c = \sin \Theta_i = \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{Gl. 2})$$

Beobachtet man für diesen Fall die Intensität des **reflektierten Strahls** in Abhängigkeit vom Einfallswinkel Θ_i (s. Abb. 12) so erreicht diese für Werte größer Θ_c („Grenzwinkel der Totalreflektion“) die des einfallenden Lichtes (Reflektivität $R = I_r/I_i = 1$) allerdings mit einem Phasenshift zwischen 0 und π .

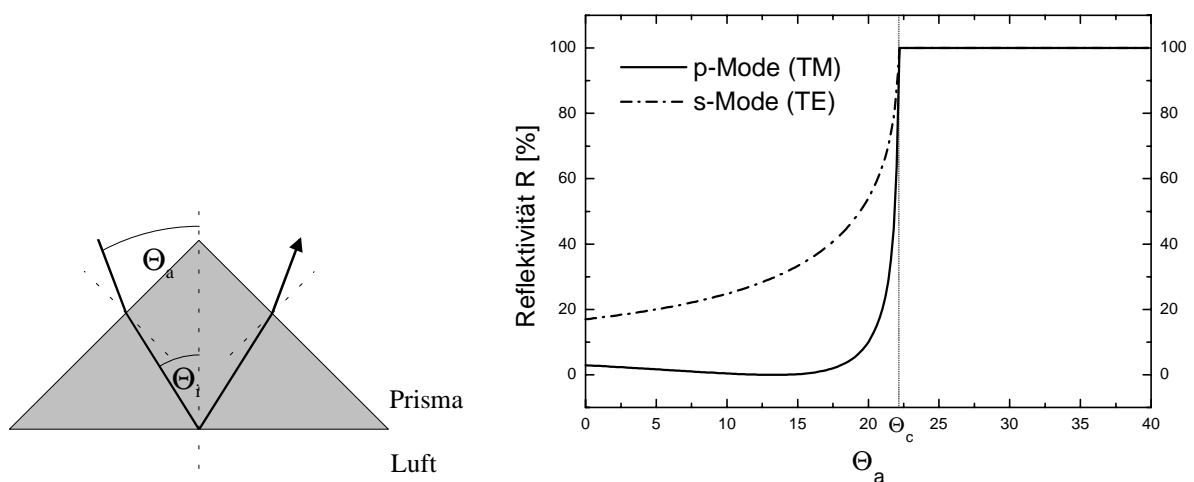


Abb. 12 Reflektivität für p- und s- Mode in Abhängigkeit vom äußeren Einfallswinkel Θ_a für die Reflexion an der Grenzfläche Prisma($n=1.845$)/Luft.

Der **transmittierte Strahl** nimmt die Form einer Oberflächenwelle an, welche sich entlang der Grenzfläche fortbewegt und deren Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abfällt. Der Verlauf von Amplitude und Intensität einer solchen **evaneszenten Welle** ist in Abb. 13 aufgezeigt.

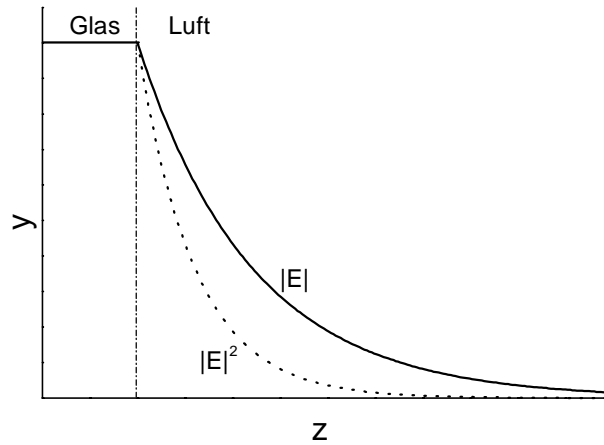


Abb. 13 Intensitäts- (.....) und Feld- (—) verlauf der evaneszenten Welle an der Glas/Luft-Grenzfläche.

Die Eindringtiefe d_p nach welcher die Amplitude des evaneszenten Feldes im optisch dünneren Medium auf $1/e$ abgefallen ist wird durch folgende Gleichung gegeben.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2 \Theta_i - 1 \right)^{-\frac{1}{2}} \tag{Gl. 3}$$

Durch die Existenz des evaneszenten Feldes an der Grenzfläche reagiert die Intensität des reflektierten Lichts auf optische Veränderungen, die sich innerhalb der Dicke einer Wellenlänge von der Grenzfläche ereignen.

Um eine Vergrößerung der Sensitivität zu erreichen, muß man das evaneszente Feld verstärken. Dies kann durch die Anregung von **Oberflächenplasmonen** (PSP; *plasmon surface polaritons*) [Rae 77; Rae 88, Kno 91] erreicht werden. In der sogenannten Kretschman-Anordnung [Kre 68] wird hierbei ein dünner Metallfilm auf die Basis eines Glasprismas aufgebracht und die Elektronen des nahezu freien Elektronengases durch p-polarisiertes Licht zum harmonischen und kohärenten Oszillieren angeregt.

Die Feldintensität der hieraus resultierenden evaneszenten Welle fällt sowohl in Ausbreitungsrichtung (x) als auch senkrecht zur Grenzfläche (z) in den beiden Medien (Metall und Dielektrikum) exponentiell ab (s. Abb. 14).

$$E_{z,t} \sim e^{-qz} \cdot e^{i(\omega t - k_x x)} \quad q \text{ Dämpfung} \tag{Gl. 4}$$

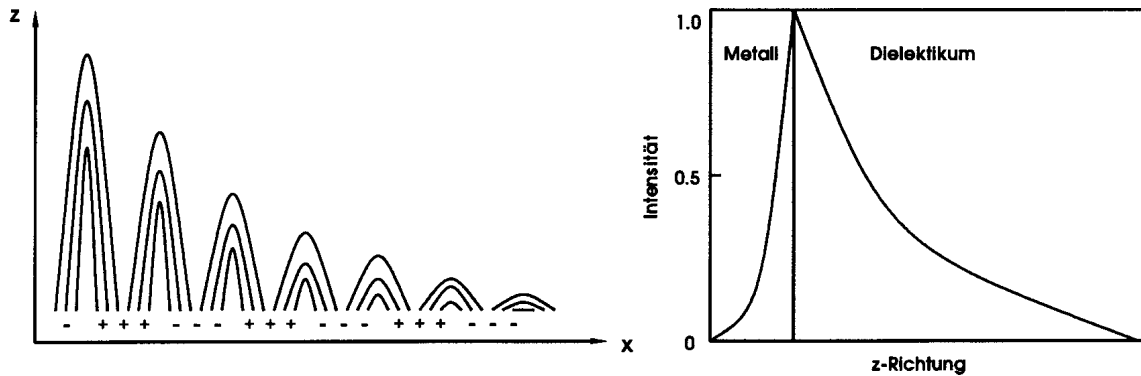


Abb. 14 Abfall der Feldintensität in Metall und Dielektrikum.

Um **Resonanz** zwischen anregendem Licht (Photonen) und der resultierenden Oberflächenplasmonenmode zu erreichen, müssen die beiden Wellen in Energie ($E=h\nu$) und Impuls ($p=h/\lambda$) übereinstimmen.

Dies läßt sich am einfachsten durch einen Vergleich der **Dispersionsrelationen** von Oberflächenplasmonen und von Licht an der Grenzfläche Medium/Metall zeigen. Für das Oberflächenplasmon ergibt sich der Wellenvektor zu:

$$k_{x,PSP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (\text{Gl. 5})$$

Für die Komponente des Lichtwellenvektors in Ausbreitungsrichtung im Probenmedium gilt:

$$k_x = \frac{\omega \sqrt{\epsilon_{\text{Prisma}}}}{c} \cdot \sin \Theta_i \quad (\text{Gl. 6})$$

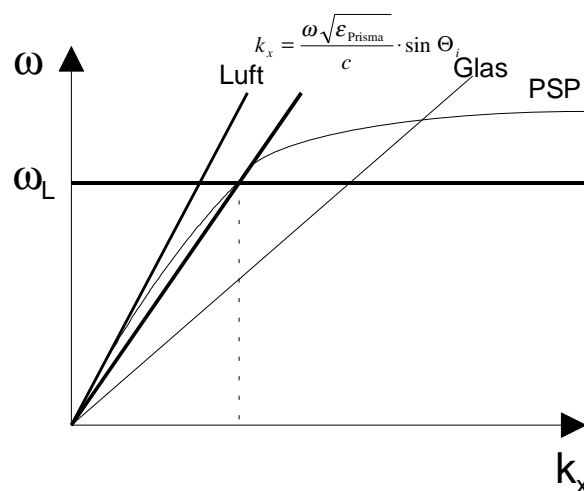


Abb. 15 Dispersion von Licht in Luft und Glas sowie des PSP an der Grenzfläche Metall/Luft.

Handelt es sich bei dem Medium um Luft, so findet man keinen Schnittpunkt in den Dispersionskurven. Der Wellenvektor der Photonen ist für alle Frequenzen zu gering und die

Photonen müssen 'abgebremst', d.h. c muß kleiner werden, um Plasmonen anzuregen. Dies kann mit Hilfe von Gittern oder durch Verwendung eines Mediums mit einem höheren Brechungsindex geschehen (Prismenkopplung).

Die Komponente des Impulses in Ausbreitungsrichtung der Oberflächenwelle ist dann nach Gl. 6 bei Verwendung monochromatischen Lichtes ω ($\lambda = \text{konstant}$) nur vom Einfallswinkel Θ_i abhängig und die Reflektivitätskurve erreicht bei maximaler **Resonanz** ein Minimum (s. Abb. 16).

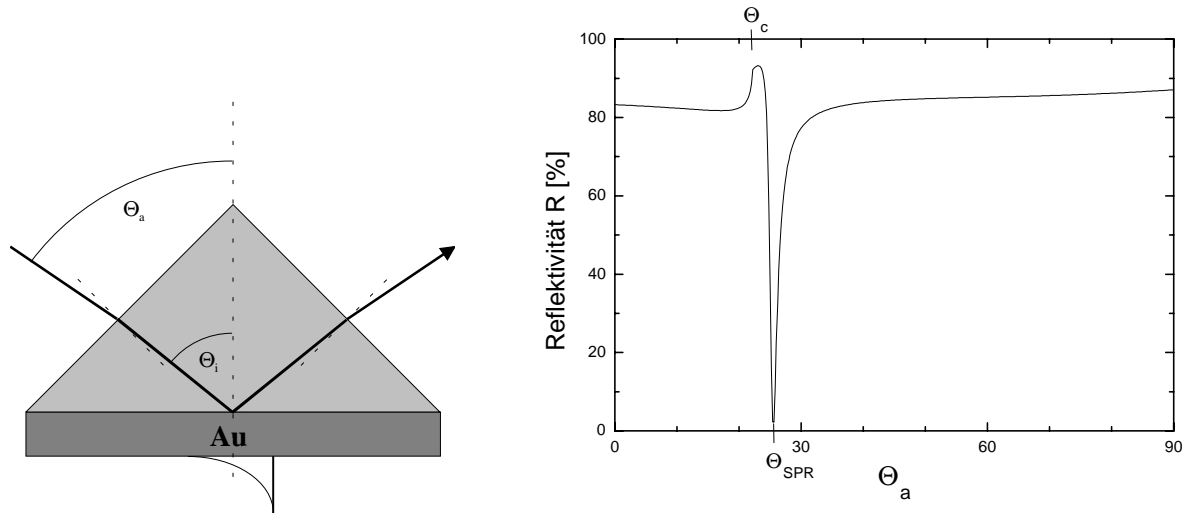


Abb. 16 Prismenkopplung auf Gold und zugehörige Reflektivitätskurve.

Da Θ_{SPR} oberhalb des kritischen Winkels Θ_c liegt bezeichnet man diese Anregung auch als ATR-Methode (*attenuated total reflection*).

Dünne dielektrische Schichten (mit $n_{\text{Schicht}} > n_{\text{Puffer}}$) verschieben die Plasmonendispersionskurve aus Abb. 15 zu höheren Wellenvektoren, wodurch sich die Resonanzkurve bei gleichbleibender Wellenlänge des anregenden Lichtes zu größeren Einfallswinkeln verschiebt (s. Abb. 17 und Abb. 18).

$$k_{\text{PSP}} = k_{\text{PSP},0} + \Delta k_{\text{PSP}} \quad \rightarrow \quad \Theta_{\text{SPR}} \uparrow$$

Man kann solche idealisierten Schichtsysteme durch Fresnelgleichungen beschreiben und die Reflektivitätskurven durch Variation der Parameter ϵ' , ϵ'' und d für jede Schicht anpassen. Durch Vergleich der Zustände vor und nach der Modifikation erhält man bei bekanntem Brechungsindex eine **optische Schichtdicke** d .

Ein anderer Weg, der allerdings nicht Veränderungen in der Form des Plasmons (z.B. durch Inhomogenitäten) berücksichtigt, ist die alleinige Verfolgung der Winkelverschiebung für das Resonanzminimum, welche dann einer Schichtdickenänderung zugeschrieben werden kann.

$$\Delta \Theta_{\text{SPR}} \sim (n_{\text{Schicht}} - n_{\text{Puffer}}) \cdot d = \Delta n \cdot d \quad \Delta n \text{ Kontrast} \quad \text{(Gl. 7)}$$

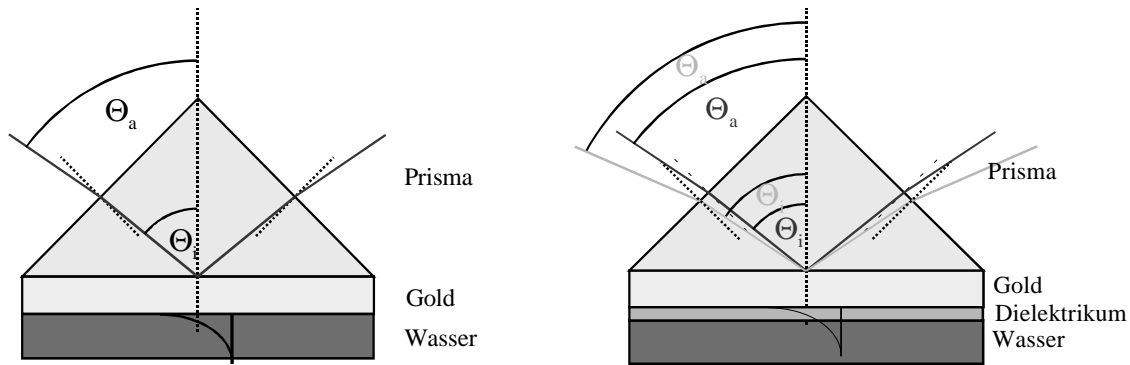


Abb. 17 Strahlengang vor und nach Adsorption eines Dielektrikums auf Gold.

Über die zeitabhängige Beobachtung der Verschiebung des Resonanzwinkels oder der Intensitätsänderung des reflektierten Lichtes bei einem festen Einfallswinkel in der nahezu linearen Flanke des Plasmons, kann man die **Kinetik** des Aufwachsens einer Schicht beobachten.

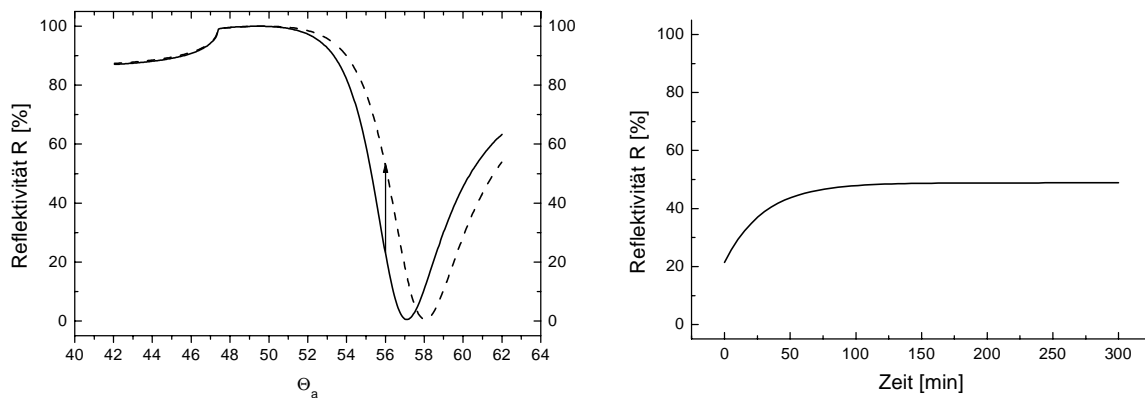


Abb. 18 Resonanzkurve vor (—) und nach (---) Adsorption einer dielektrischen Schicht ($n=1.5$, $d=40 \text{ \AA}$) auf Gold, sowie zeitliche Reflektivitätsänderung (Kinetik) bei festem Winkel.

Ist der Brechungsindex der Schicht nicht bekannt, so kann die beobachtete Verschiebung des Resonanzminimums durch eine Kontrast- oder eine Dickenänderung oder eine Kombination aus beiden, also beliebige Kombinationen aus Δn und d hervorgerufen worden sein.

1.6 Elektrochemie

Im theoretischen Teil zur Elektrochemie finden nur die Grundlagen der Impedanzspektroskopie und der zyklischen Voltammetrie Eingang. Aufgrund der besonderen Bedeutung für beide Methoden werden hier allerdings die Eigenschaften der elektrischen Doppelschicht genauer erörtert.

1.6.1 Die elektrische Doppelschicht

Bringt man eine Elektrodenoberfläche in Kontakt mit einem Elektrolyten, so kommt es an der Grenzfläche zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht. Die Ladung der Elektrode wird hierbei durch eine Schicht entgegengesetzt geladener Ionen in Lösung kompensiert.

Das einfachste **Modell von Helmholtz** geht von einer starren Schicht aus Kationen (inner Helmholtz plane IHP) aus, welcher eine weitere starre, weniger dicht gepackte Schicht aus hydratisierten Anionen (outer Helmholtz plane OHP) folgt. Das Potential fällt zwischen IHP und OHP linear ab und bleibt dann außerhalb der OHP im freien Elektrolyten konstant.

Diese elektrische Doppelschicht kann man als ebenen Plattenkondensator mit der Kapazität C ansehen.

$$C = \frac{Q}{U} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad (\text{Gl. 8})$$

Der Nachteil des Helmholtzschen Modells bestand in der Annahme starrer Schichten. Im **Gouy-Chapman-Modell** wurde die Wärmebewegung der Ionen und des Lösungsmittels mit berücksichtigt und die gesamte elektrische Doppelschicht als diffuse Ladungsverteilung behandelt.

Erst die Kombination beider Modelle zum **Sternschen Modell** führte zu einer guten Beschreibung des realen Verhaltens. Das Potential fällt linear über die starre innere und äußere Helmholtzfläche ab, an welche sich dann die diffuse Doppelschicht anschließt. In dieser fällt das Potential konzentrationsabhängig exponentiell auf den Wert des Elektrolyt-Potentials ab.

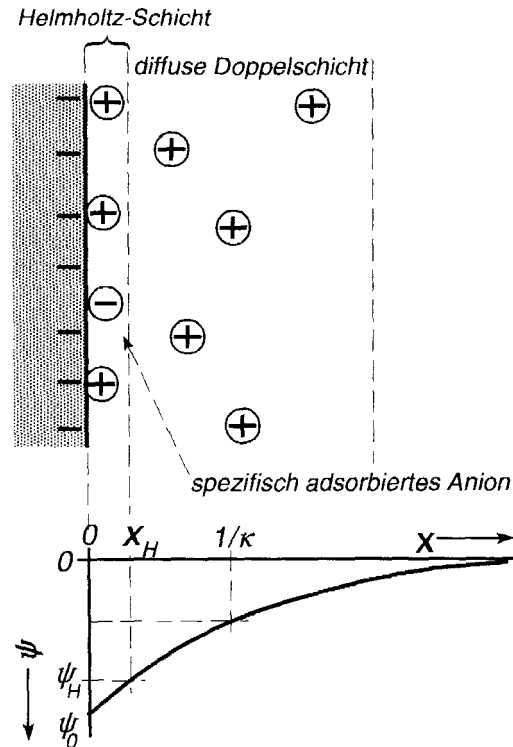


Abb. 19 Schematische Darstellung einer elektrischen Doppelschicht (oben) und Potentialverlauf nach dem Modell von Stern (unten) (aus [Gla 96]).

Kapazitäts-Defekt-Abschätzung für filmbedecktes Au

Zwischen einer reinen unbedeckten Goldelektrode und dem Elektrolyt bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus, welche man nach dem einfachsten Modell von Helmholtz als ebenen Plattenkondensator beschreiben kann. Sie besitzt für die Au/Elektrolyt-Grenzfläche eine spezifische Kapazität um $30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Ist die Goldoberfläche dagegen **vollständig** von einer dünnen isolierenden, dielektrischen Schicht **bedeckt**, so resultiert dies in der Serienschaltung einer kleinen spezifischen Schichtkapazität, welche nach Gl. 10 durch die Dicke und Dielektrizitätskonstante des Films gegeben ist ($\sim 0.5\text{-}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für Lipidbilayer), und der Kapazität einer Doppelschicht, welche für hohe Elektrolytkonzentrationen ($c > 0.1 \text{ M}$) typischerweise größer als $100 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ist. Somit fällt letztere in einer Serienschaltung nicht ins Gewicht. [Fin 96]

Für **teilbedeckte Elektroden** kann man über die Messung der Kapazität grob den Bedeckungsgrad bestimmen [Ste 89, Lan 94]. Die elektrische Doppelschicht auf einer Au-Elektrode ist mit $C_{\text{Au}} \approx 30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ um ein Vielfaches größer, als die Kapazität des Dielektrikums.

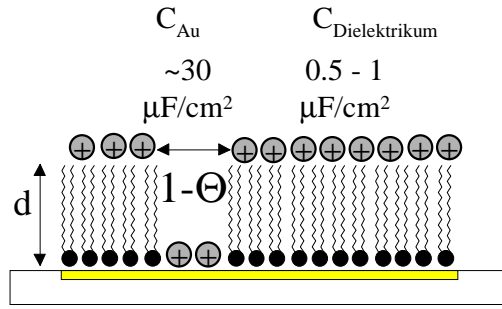


Abb. 20 Einfluß des Bedeckungsgrades auf die Gesamtkapazität.

Liegen nun Defekte parallel zu intaktem Dielektrikum („pinholes“), so ergibt sich die gemessene spezifische Kapazität aus dem Bedeckungsgrad Θ wie folgt:

$$C = \Theta \cdot C_{\text{Dielektrikum}} + (1 - \Theta) \cdot C_{\text{Au}} \tag{Gl. 9}$$

$$C_{\text{Dielektrikum}} = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0}{d} \quad \epsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12} \text{ [C}^2/\text{Jm]} \tag{Gl. 10}$$

Die folgende Tabelle (Tab. 4) zeigt dieses Verhalten für verschiedene Schichtdicken eines Dielektrikums mit $\epsilon=2.5$. Man erkennt, daß schon geringe Defektflächen einen großen Einfluß auf die gemessene Gesamtkapazität haben.

| Bedeckung % | Schichtdicke [Å] | | | |
|-------------|------------------|-------|-------|-------|
| | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 100 | 1,11 | 0,74 | 0,55 | 0,44 |
| 99,9 | 1,14 | 0,77 | 0,58 | 0,47 |
| 99,8 | 1,16 | 0,80 | 0,61 | 0,50 |
| 99,6 | 1,22 | 0,85 | 0,67 | 0,56 |
| 99,4 | 1,28 | 0,91 | 0,73 | 0,62 |
| 99,2 | 1,34 | 0,97 | 0,79 | 0,68 |
| 99 | 1,40 | 1,03 | 0,85 | 0,74 |
| 98 | 1,68 | 1,32 | 1,14 | 1,03 |
| 97 | 1,97 | 1,62 | 1,44 | 1,33 |
| 96 | 2,26 | 1,91 | 1,73 | 1,62 |
| 95 | 2,55 | 2,20 | 2,03 | 1,92 |
| 90 | 4,00 | 3,66 | 3,50 | 3,40 |
| 85 | 5,44 | 5,13 | 4,97 | 4,88 |
| 80 | 6,89 | 6,59 | 6,44 | 6,35 |
| 75 | 8,33 | 8,05 | 7,92 | 7,83 |
| 70 | 9,77 | 9,52 | 9,39 | 9,31 |
| 60 | 12,66 | 12,44 | 12,33 | 12,27 |
| 50 | 15,55 | 15,37 | 15,28 | 15,22 |
| 40 | 18,44 | 18,30 | 18,22 | 18,18 |
| 30 | 21,33 | 21,22 | 21,17 | 21,13 |
| 20 | 24,22 | 24,15 | 24,11 | 24,09 |
| 10 | 27,11 | 27,07 | 27,06 | 27,04 |
| 0 | 30,00 | 30,00 | 30,00 | 30,00 |

Tab. 4 Einfluß des Bedeckungsgrades auf die Gesamtkapazität (in $[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$) für verschiedene Schichtdicken ($C_{\text{Au}}=30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\epsilon_{\text{Diel}}=2.5$).

1.6.2 Zyklische Voltammetrie (CV)

In dieser Arbeit findet die zyklische Voltammetrie einerseits zur Abschätzung der Defektdichte als auch zur reduktiven Desorption von Alkanthiolen und Thiolipiden Anwendung.

In einem typischen CV-Experiment (*cyclic voltammetry*) wird an eine stationäre Arbeitselektrode ein sich zeitlich linear änderndes Potential angelegt, welches von einem Startwert über ein Umkehrpotential zu einem Endpotential läuft (Abb. 22). Als Observable dient die resultierende Stromantwort. Ein Zyklovoltammogramm kann man also als die direkte Aufeinanderfolge zweier potentiodynamischer Messungen (LSV; *linear sweep voltammetry*) ansehen.

Diese werden in der Regel in der **3-Elektroden-Anordnung** durchgeführt, in welchem der Strom über Arbeits- und Gegenelektrode fließt, während die Referenzelektrode stromlos bleibt und zum Abgreifen der Spannung zwischen Referenz- und Arbeitselektrode dient.

Im 2-Elektroden-Setup bleibt die Referenzelektrode dagegen nicht stromlos und das gemessene Potential zwischen Referenz- und Arbeitselektrode wird über den Spannungsabfall über die Lösung ($IR_{\text{Lösung}}$) vom Strom beeinflusst. Dieses Setup sollte dementsprechend nur in Experimenten Verwendung finden, in welchen $IR_{\text{Lösung}}$ kleiner 1 mV ist.

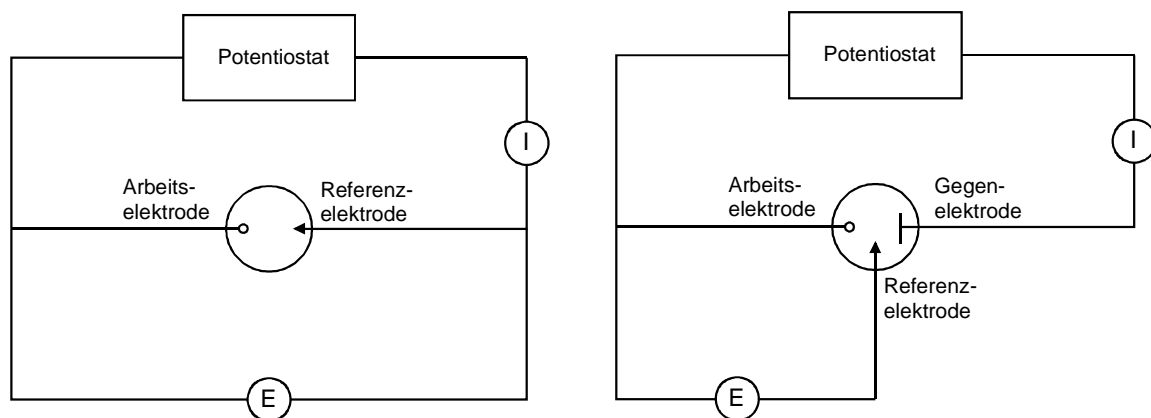


Abb. 21 2- und 3-Elektroden-Anordnung.

Eine **ideal polarisierbare Elektrode (IPE)** läßt unabhängig vom angelegten Potential keinen Ladungstransfer über die Metal-Elektrolyt-Grenzfläche zu, was umgekehrt auch wieder heißt, daß infinitesimale Ströme eine große Potentialänderung hervorrufen. Bsp. Gegenelektroden, Hg-Elektrode.

Eine **ideal unpolarisierbare Elektrode** ändert ihr Potential dagegen nicht beim Fließen eines Stroms über die Elektrode, besitzt also ein konstantes Potential. Bsp. Referenzelektroden, *saturated calomel electrode* (SCE).

Der Anteil der Polarisierung ist durch die Überspannung $\eta = E - E^0$ gegeben.

Die **Form** des zyklischen Voltammogramms resultiert aus dem Zusammenspiel von Stofftransport zur Elektrode und heterogenem Ladungstransfer an der Elektrode.

Für das Beispiel einer reversiblen Redoxreaktion an einer Elektrode mit zwei löslichen Redoxspezies (Ox und Red), welche sich durch Übertragung von n Elektronen ineinander überführen lassen,



nimmt das zyklische Voltammogramm typischerweise die folgende Form an.

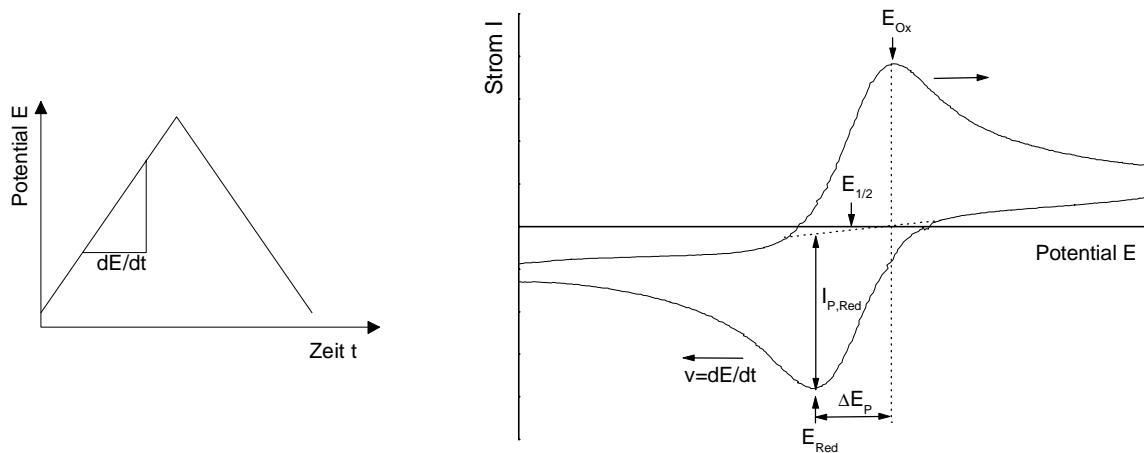


Abb. 22 Spannungsrampen und Zyklovoltammogramm mit wichtigsten Kenngrößen.

Nach Anlegen des Startpotentials, welches deutlich positiver als das Reduktionspotential des Redoxpaares ist, fließt zuerst ein nichtfaradayscher Ladestrom I_c zur Aufladung der elektrischen Doppelschicht (s. Kap. 1.6.1).

$$I_c = \frac{E}{R} \cdot e^{-\frac{t}{RC}} \tag{Gl. 11}$$

Ausgehend von diesem Startpotential wird das Potential mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit v (Scanrate) zu negativeren Werten verschoben. Dabei fließt weiterhin ein geringer Ladestrom, desweiteren setzt aber auch die Reduktion des Stoffes an der Oberfläche ein und ein kathodischer, faradayscher Strom fließt, welcher mit fortschreitender Annäherung an das Reduktionspotential ansteigt. Nach Erreichen und

Überschreiten des Reduktionspotentials ist die Oberfläche derart an der oxidierten Form verarmt, daß der Strom jetzt nur noch durch den diffusionskontrollierten Stofftransport von oxidierten Molekülen (Ox) zur Oberfläche hin und von reduzierten Molekülen (Red) von der Oberfläche weg bedingt ist. Im CV resultiert dies in einem Absinken des Stroms nach dem Überschreiten des Reduktionspotentials. Für die Prozesse beim Rückscan ergeben sich die gleichen Phänomene.

Die wichtigsten **Kenngrößen** zur Beschreibung eines CV's sind die Spitzenströme für den oxidativen bzw. reduktiven Prozeß $I_{p,Ox}$ bzw. $I_{p,Red}$ sowie die zugehörigen Potentiale $E_{p,Ox}$ bzw. $E_{p,Red}$. Desweiteren bestimmt man die Peakseparation ΔE zwischen kathodischem und anodischem Prozeß zu:

$$\Delta E_p = E_{Ox} - E_{Red} \quad (\text{Gl. 12})$$

sowie das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ zu:

$$E_{1/2} = \frac{E_{Ox} - E_{Red}}{2} \quad (\text{Gl. 13})$$

Bei dem CV-Experiment wurde zwischen faradayschen und nicht-faradayschen Strömen unterschieden.

Nichtfaradaysche Ströme sind rein elektrostatischer Natur und nicht mit chemischen Umwandlungen verbunden. Das Aufladen der Helmholtzschen Doppelschicht ist ein solches Beispiel.

Faradaysche Ströme hingegen beruhen, wie das Faradaysche Gesetz schon besagt, auf einer chemischen Umsetzung.

"Der elektrische Strom, der beim Anlegen einer geeigneten Spannung durch eine Elektrode fließt, ist proportional zu den chemischen Umsetzungen in Elektrodennähe."

$$I = \frac{q}{t} = \frac{znF}{t} \quad (\text{Gl. 14})$$

z Ladungswechsel

n umgesetzte Stoffmenge

F Faradaykonstante

Der Faradaysche Prozeß in obigem Beispiel beinhaltet zum einen den heterogenen Elektronentransfer über die Grenzfläche als auch den Stofftransport der redoxaktiven Spezies zur Grenzfläche hin. Die Form des CV's resultiert dabei aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten beider Prozesse zueinander.

Für den **Stofftransport** kommen im Allgemeinen Diffusion, Migration und Konvektion in Frage. Die **Migration** (Bewegung geladener Teilchen entlang eines Potentialgefälles) läßt sich

durch Zugabe einer ausreichenden Menge Leitsalz minimieren und die **Konvektion** (Bewegung aufgrund thermischer oder mechanischer Einflüsse) ist, so es sich denn um ein kurzes Experiment ohne Rühren bei Raumtemperatur handelt, auch zu vernachlässigen. Der somit einzige Beitrag zum Stofftransport, die **Diffusion**, folgt den Fick'schen Gesetzen.

Der Konkurrenzprozeß, der **heterogene Ladungstransfer**, wird hingegen durch die Butler-Volmer-Gleichung beschrieben.

$$i = nFAk_0 \left[c_{Ox} \cdot e^{-\frac{\alpha nF}{RT}(E-E^0)} - c_{Red} \cdot e^{\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)} \right] \quad (Gl. 15)$$

α Durchtrittsfaktor

E^0 Standardpotential

Je nach dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Stofftransport k_{mt} und heterogenem Ladungstransfer k_{ct} zueinander, unterscheidet man folgende Fälle:

$k_{ct} \gg k_{mt}$

Erfolgt der heterogene Elektronentransfer schnell gegen den Stofftransport, so spricht man von einer **reversiblen**, diffusionskontrollierten Elektrodenreaktion. Befindet sich das System in einem Gleichgewichtszustand und fließt somit kein Nettostrom ($i=0$), so vereinfacht sich die Butler-Volmer-Gleichung zur Nernst-Gleichung:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{Ox}}{c_{Red}} \quad (Gl. 16)$$

Die Spitzenpotentiale und somit auch das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ sind für den reversiblen Fall unabhängig von der Vorschubgeschwindigkeit v . Die Peakseparation beträgt für $T= 25 \text{ °C}$ $\Delta E=0.059/n \text{ V}$. Die Spitzenströme I_p sind durch die Randles-Sevich-Gleichung gegeben

$$I_p=(2.69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} AD^{1/2} v^{1/2} c_0 \quad (Gl. 17)$$

und das Verhältnis i_{Ox}/i_{Red} beträgt 1.

$k_{ct} \ll k_{mt}$

Ist andererseits der Elektronentransfer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so spricht man von einem **irreversiblen** System.

Sowohl für diesen als auch für intermediäre Fälle (**quasi-reversibles** System) sind sowohl I_p als auch E_p eine Funktion von Scanspeed v und Durchtrittsfaktor α und die Peakseparation ΔE ist größer als $0.059/n$ V. [Bar 80, Sou 85]

1.6.2.1 Zyklische Voltammetrie an filmbedeckten Elektroden

Das Auftreten faradayscher Ströme zu einem löslichen Redoxpaar und deren Ausmaß und Überspannung kann zur Charakterisierung von Filmen auf Elektroden bezüglich „pinholes“ und Defekten herangezogen werden. Als **Pinhole** bezeichnet man dabei eine Stelle an welcher die blanke Elektrode dem Elektrolyt exponiert ist. Dabei blockieren weder adsorbierte Moleküle noch Teile von benachbarten Molekülen diese Stelle. Im zyklischen Voltammogramm zeigen sich deutliche Strompeaks oder ausgeprägte Plateaus bei geringen Überspannungen. Ströme aufgrund faradayscher Reaktionen in Pinholes sind meist durch den Stofftransport kontrolliert.

Defekte dagegen sind als Stellen definiert, an welchen der Elektrolyt näher an die Elektrode gelangen kann als an intakten Stellen des optimal gepackten Films. Die Überspannungen liegen dementsprechend zwischen denen von Pinholes und denen des intakten Films. [Fin 96]

1.6.2.2 Reduktive Desorption von Thiolen

Führt man das Potential über einen Alkanthiol-SAM auf Au in 0.5 M KOH zu negativen Spannungen, so taucht zwischen -0.7 und -1.4 V (vs. Ag/AgCl) ein Reduktionspeak auf, der auf der Reduktion der Au-S-Bindung basiert. Das **Desorptionspotential** ist abhängig von der Kettenlänge, während die Peakfläche von der Belegung abhängt [Yan 96, Wal 95, Wid 91, Zho 97, Zho 97a].

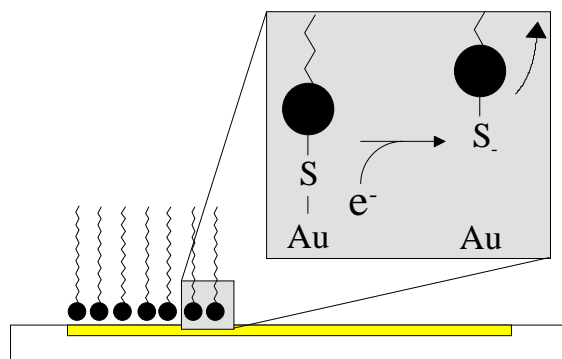
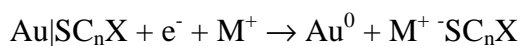


Abb. 23 Schema zur reduktiven Desorption von Alkanthiolen.

Die Reproduzierbarkeit von Peakfläche und Peakanzahl hängt stark von der Kristallinität der Goldelektrode ab [Fin 96].

Für die Angabe von Belegungsdichten aus den Desorptionspeakflächen [Wal 91] sollten gewisse Einschränkungen beachtet werden. Die Desorption ist durch das Freisetzen blanker Goldflächen und die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht mit einer starken Kapazitätserhöhung von ca. 1 auf 20 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (s.a. Kap. 1.6.1) verbunden [Yan 97]. In dem Peak ist dementsprechend auch ein Ladestrom enthalten, welcher durch das Setzen einer Ladestrom-Baseline nur teilweise korrigiert wird [Sch 93]. Zhong und Porter [Zho 94] schätzten diesen Anteil als maximal 20% des gesamten Desorptionspeaks ab.

Das bei der Reduktion entstehende Thiolat bildet je nach Löslichkeit, Diffusionsgeschwindigkeit und Scanspeed eine Akkumulationsschicht nahe der Elektrode, aus welcher Thiolate nach Verringerung des Potentials unter Ausbildung eines Oxidationspeaks readsorbiert werden können [Yan 97 a].

In manchen Fällen kann die Reduktion zur Aufklärung der **Zusammensetzung** eines Monolayers verwendet werden. Einerseits sind über das Vorhandensein einer Peakseparation Aussagen über Domänenbildung und Phasenseparation möglich. Bei ausreichender Peakseparation spiegelt das Verhältnis der Peakflächen dann zudem noch die Zusammensetzung des Monolayers wider [Arn 98, Ima 97].

1.6.3 Impedanzspektroskopie (IS)

Die Impedanzspektroskopie ist eine relativ neue und vielseitige Methode zur Untersuchung von elektrischen Eigenschaften von Materialien und deren Grenzflächen mit elektrisch leitenden Elektroden. Sie kann zur Untersuchung von Dynamiken gebundener oder mobiler Ladungen in der Bulk- oder Grenzflächenregion jedes festen oder flüssigen Materials ionischer, halbleitender und sogar nichtleitender Natur herangezogen werden. [Mac 87]

1.6.3.1 Prinzip

In der IS finden mehrere experimentelle Methoden Anwendung. Neben der Beobachtung der zeitlichen Stromantwort auf einen Spannungsschritt oder ein Signal aus weißem Rauschen registriert man vor allem die Impedanz bei Anlegen einer sinusidalen Spannung.

Hierzu wird an der Arbeitselektrode ein Frequenzspektrum sinusoidaler Wechselspannungen geringer Amplitude durchlaufen

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (\text{Gl. 18})$$

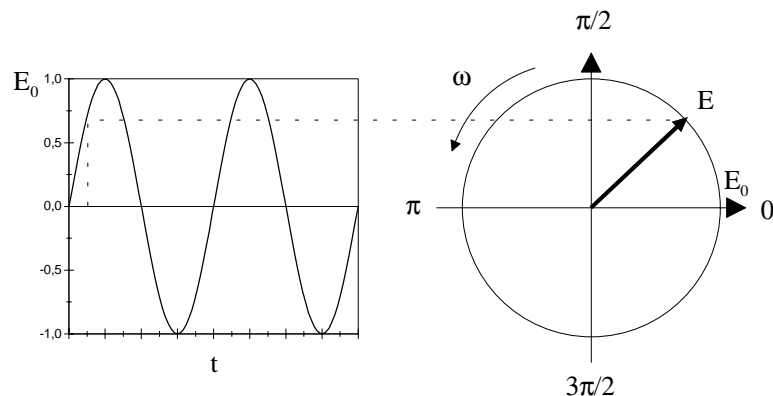


Abb. 24 E-t-Diagramm und Kreisfrequenz.

und für jede Frequenz Amplitude I_0 und Phase Φ des resultierenden Stroms aufgezeichnet.

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi) \quad (\text{Gl. 19})$$

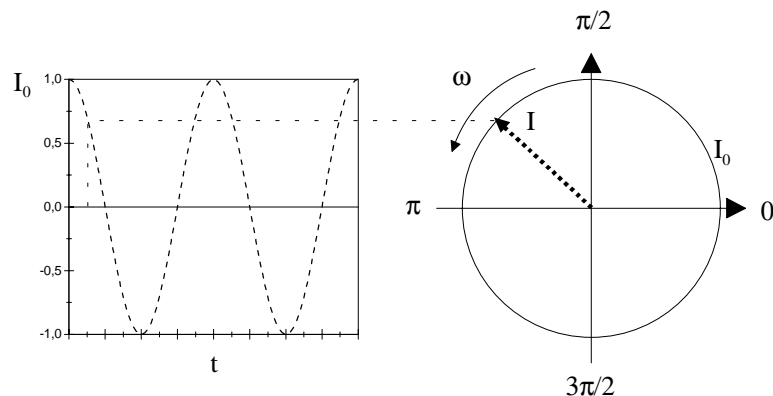


Abb. 25 I-t-Diagramm und Kreisfrequenz.

Hieraus lässt sich der komplexe Wechselstromwiderstand (Impedanz Z) des Systems für jede Frequenz berechnen.

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \Phi)} = |Z|(\cos \Phi + i \sin \Phi) = |Z| \cdot e^{i\Phi} = Z' + iZ'' \quad (\text{Gl. 20})$$

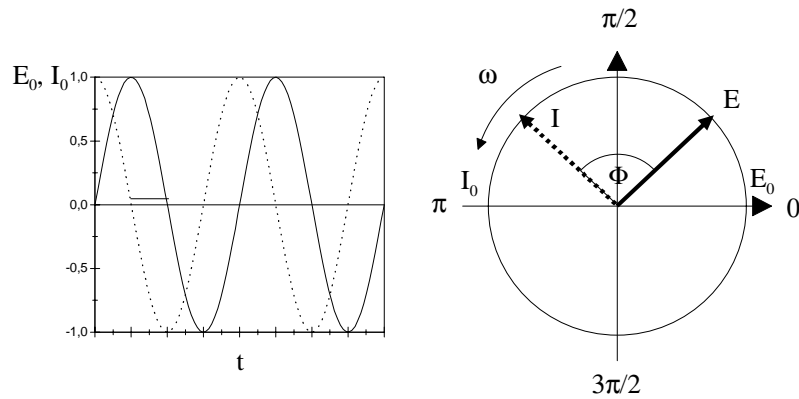


Abb. 26 Strom und Spannung für Winkelfrequenz ω und Kreisdiagramm.

Deren Betrag ergibt sich zu:

$$|Z| = \frac{E_0}{I_0} = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (\text{Gl. 21})$$

Der Phasenwinkel Φ ist gegeben durch:

$$\tan \Phi = \frac{Z''}{Z'} \quad (\text{Gl. 22})$$

1.6.3.2 Ersatzschaltkreise

Zur Diskussion der Impedanzspektren bedient man sich entweder exakter mathematischer Modelle die auf einer plausiblen, physikalischen Theorie beruhen oder aber relativ empirischer Ersatzschaltkreise, welche die Situation dafür etwas anschaulicher widerspiegeln.

Da in der Arbeit auch Modelle zur Darstellung der Impedanzspektren mittels **Ersatzschaltkreisen** entwickelt wurden, werden hier die Eigenschaften einzelner Elemente sowie einfacher Kombinationen nochmals aufgeführt.

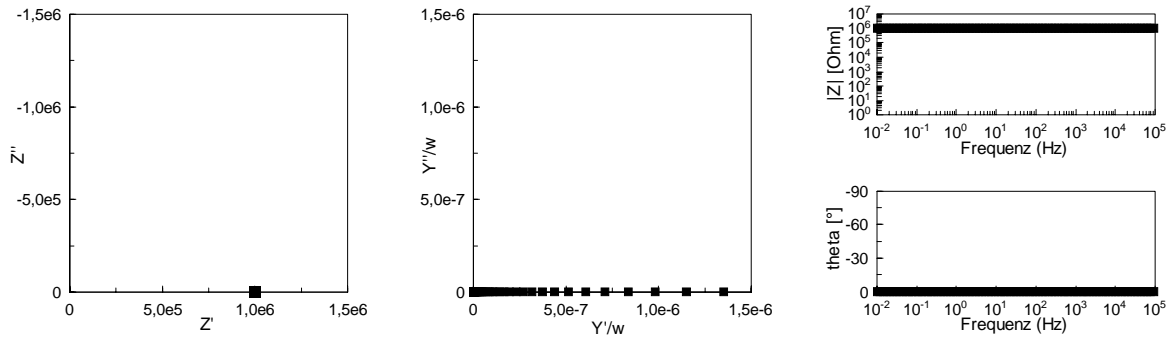
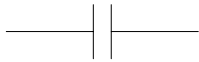
Die **Auftragungen** der Impedanzspektren in Ortskurve, frequenzreduzierter Admittanz und im Bode-Plot werden in Kap. 1.6.3.3 an einem konkreten Beispiel näher erläutert.

Widerstand:**Abb. 27** Schaltbild Widerstand –R–.

$$E = E_R$$

$$Z = \frac{E}{I} = Z' = R$$

$$\Phi = 0$$

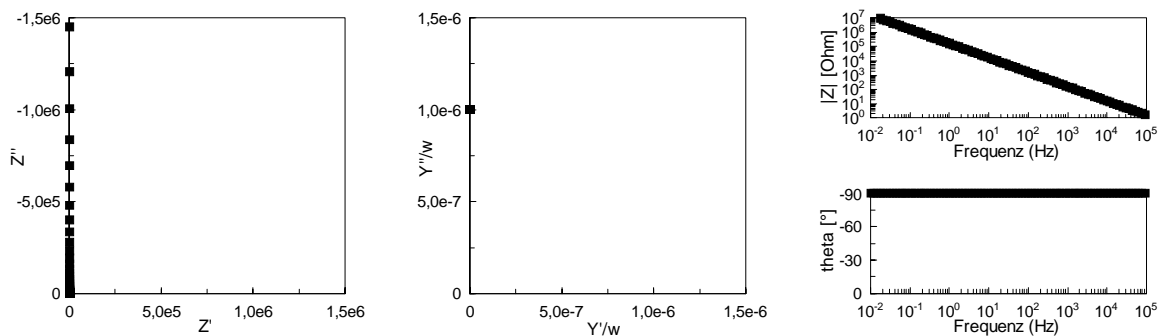
**Abb. 28** Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für einen rein ohmschen Widerstand von $R=1 \text{ M}\Omega$.**Kondensator:****Abb. 29** Schaltbild Kondensator –C–.

$$E = E_C = E_0 \cdot \sin(\omega t) = \frac{Q}{C}$$

$$I = \frac{dQ}{dt} = C \cdot \frac{dE}{dt} = \omega C \cdot E_0 \cdot \cos(\omega t)$$

$$Z = \frac{E}{I} = iZ'' = -\frac{i}{\omega C}$$

$$\Phi = \pi/2$$

**Abb. 30** Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für einen Kondensator mit einer Kapazität von $C=1 \mu\text{F}$.

Serienschaltung aus Widerstand und Kondensator:



Abb. 31 Schaltbild Serienschaltung -R-C-

$$E = E_R + E_C$$

$$Z = \frac{E}{I} = Z' + iZ'' = R - \frac{i}{\omega C} \quad \Phi = f(\omega)$$

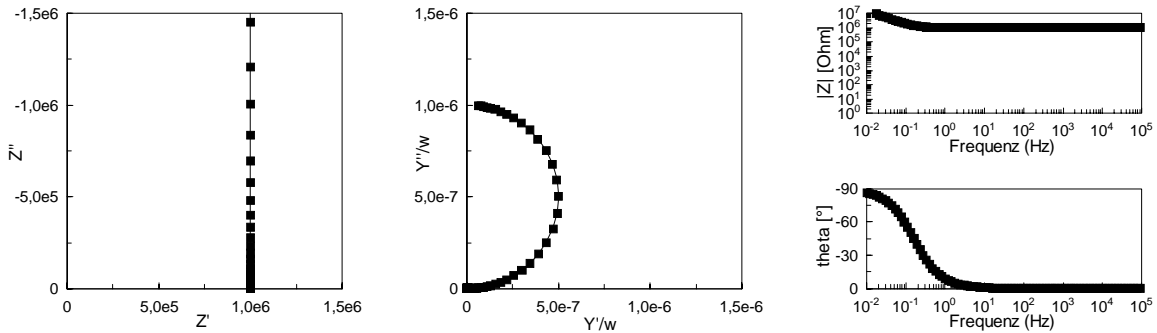


Abb. 32 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Serienschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem Kondensator mit $C=1\mu\text{F}$.

Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator :

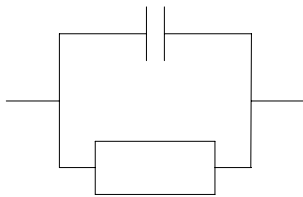


Abb. 33 Schaltbild Parallelschaltung -RC-

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{E_R} + \frac{1}{E_C}$$

$$Y = Y' + iY'' = \frac{1}{R} + i\omega C$$

$$Z = \frac{1}{Y} = \frac{R}{1 + i\omega RC} = \frac{R}{1 + i\omega\tau} \quad \tau=RC; \Phi=f(\omega)$$

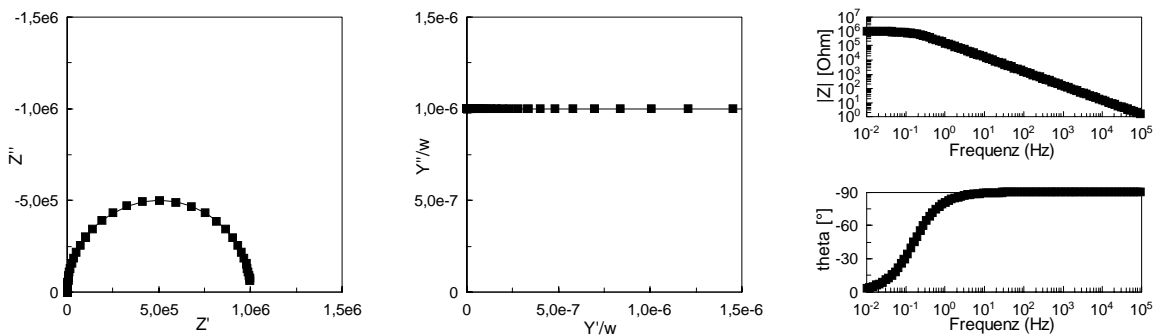


Abb. 34 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem Kondensator mit $C=1\mu\text{F}$.

Constant Phase element (CPE)



$$Z = \frac{1}{C(i\omega)^\alpha}$$

Das Constant Phase Element (CPE) wird oft verwendet um Inhomogenitäten und hieraus resultierende Verteilungen von Kapazitäten in einem System zu beschreiben. Es ist durch zwei Parameter α und C bestimmt. Ein idealer Kondensator besitzt $\alpha=1$. Für die elektrische Doppelschicht auf rauhen Elektroden findet man oft Werte zwischen 0.9 und 1.

Mit $\alpha=0.5$ ergibt sich eine 45° -Steigung in der komplexen Ebene, wodurch man eine mit einer elektrochemischen Umsetzung an der Elektrode verbundene diffusionsbedingte Warburg-Impedanz simulieren kann.

Für die Parallelschaltung aus CPE und Widerstand ergibt sich ein abgeflachter Halbkreis in der komplexen Ebene. [Zvi 99]

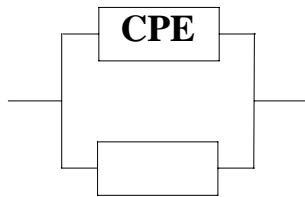


Abb. 35 Schaltbild Parallelschaltung $-R(CPE)-$.

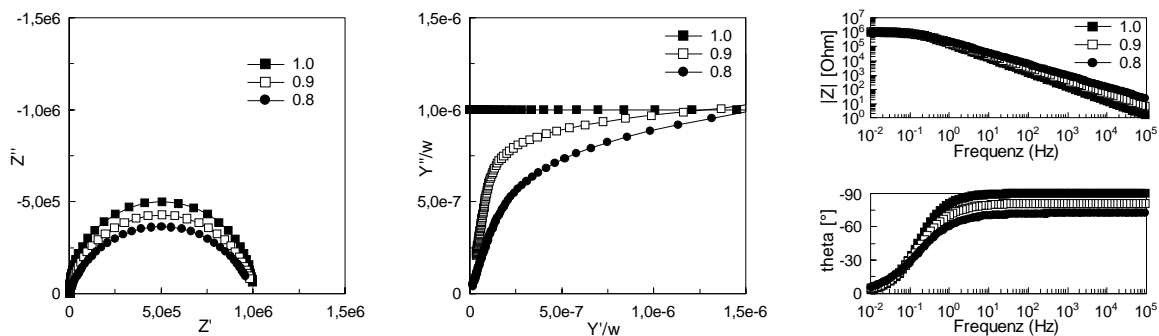


Abb. 36 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem CPE (mit $C=1\mu\text{F}$ und $\alpha=1$ ■, 0.9 □ und 0.8 ●).

Nimmt man jetzt noch einen Vorwiderstand (für den Widerstand des Elektrolyts und der Zuleitungen) hinzu, so erhält man einen Ersatzschaltkreis mit dem sich einfache reale Membransysteme beschreiben lassen. Der Exponent α des CPE gibt dabei Aufschluß über die Homogenität der Membran.

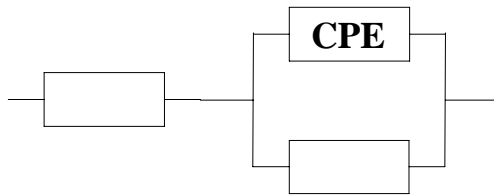


Abb. 37 Schaltbild -R-R(CPE)-.

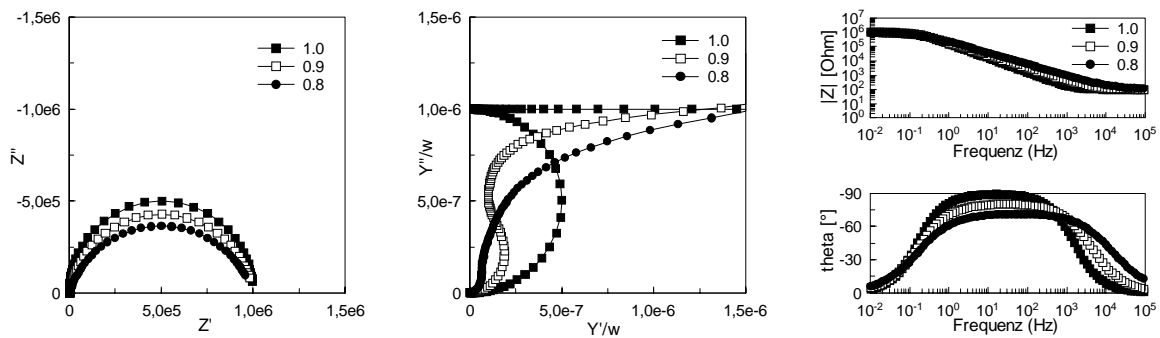


Abb. 38 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem CPE (mit $C=1\mu\text{F}$ und $\alpha=1$ ■, 0.9 □ und 0.8 ●) sowie einem Vorwiderstand von $R_a=100\ \Omega$.

1.6.3.3 Auftragungen

Die gängigsten **Auftragungen** von Impedanzspektren und deren Interpretation werden im folgenden am Beispiel des Ersatzschaltbildes aus Abb. 39 erklärt. Dieser entspricht dem Ersatzschaltkreis aus Abb. 37 wobei das CPE einen Exponenten von $\alpha=1$ besitzt.

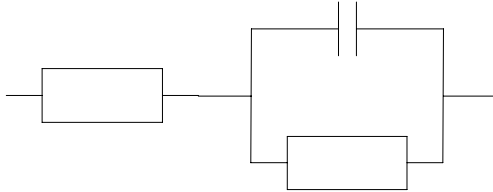


Abb. 39 Schaltbild -R-RC-.

Das einfachste Diagramm resultiert aus der Auftragung der frequenzabhängigen Impedanzen in der komplexen Ebene, der sogenannten **Ortskurve** (Nyquist-Plot/Argand-Diagramm).

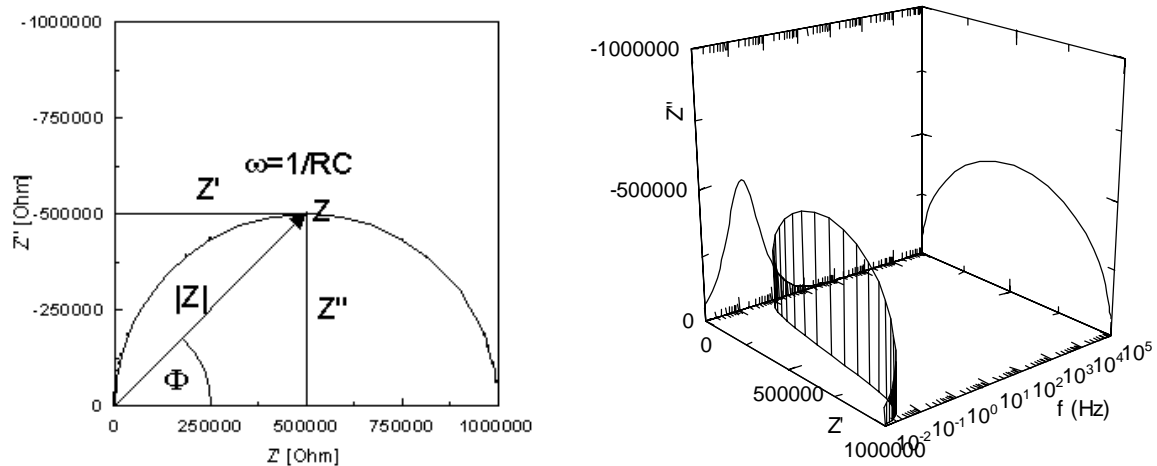


Abb. 40 Argand-Diagramm 2-D und 3-D.

Das Spektrum ist im Vergleich zu Abb. 33 um den unkompenzierten Außenwiderstand (des Elektrolyts) R_a auf der Z' -Achse verschoben. Die Schnittpunkte der Kurve mit der realen Z' -Achse sind durch R_a und R_a+R gegeben. Am Scheitelpunkt der Kurve gilt $\omega = 1/RC$.

Ein weiteres nützliches Diagramm ist die **Auftragung der frequenzreduzierten Admittanzen** in der komplexen Ebene.

Die Admittanz Y ist definiert als das Inverse der Impedanz und stellt somit eine komplexe Leitfähigkeit dar.

$$Y = 1/Z = Y' + i Y'' = G + G_a + i\omega C \quad G \text{ Leitwert} \quad (\text{Gl. 23})$$

Reduziert man diese Admittanz nun noch um ω so erhält man einen frequenzunabhängigen Plot in dem der Schnittpunkt mit der imaginären Achse direkt die Systemkapazität liefert.

$$\frac{Y}{\omega} = \frac{G + G_a}{\omega} + iC \tag{Gl. 24}$$

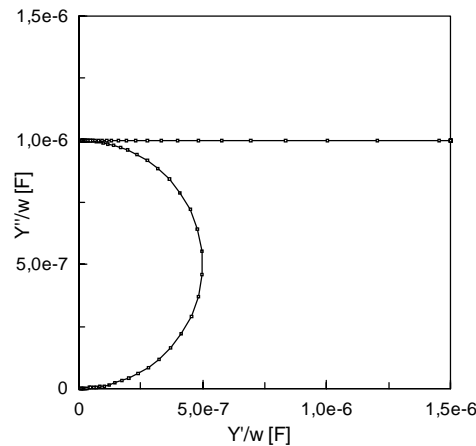


Abb. 41 Komplexer frequenzreduzierter Admittanz-Plot.

Für den Fall mehrerer in τ genügend voneinander getrennter RC-Glieder liefert jede Kapazität einen Schnittpunkt mit der imaginären Achse.

Sind diese RC-Glieder in ihren Zeitkonstanten τ deutlich voneinander getrennt, so sind die bisher aufgezeigten Diagramme in der komplexen Ebene ungeeignet. In diesem Fall sollten die obigen Diagramme entweder in log-log-Form aufgetragen werden oder man verwendet direkt die Auftragung in Form des sogenannten **Bode-Diagramms**, in welchem Phase und Betrag der Impedanz gegen die Anregungsfrequenz ν oder ω aufgetragen werden.

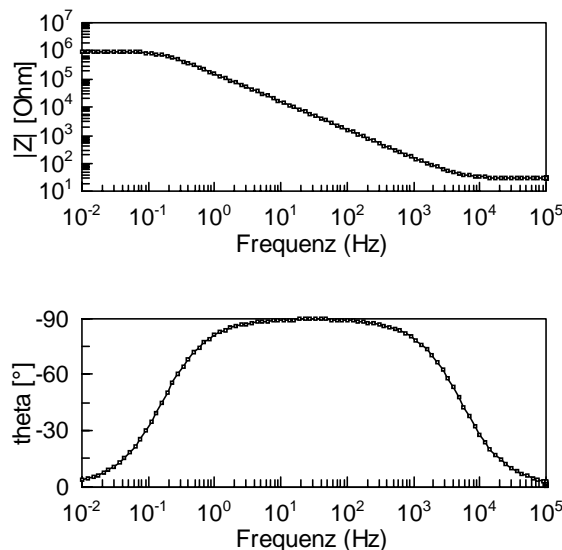


Abb. 42 Bode-Plot.

Der Betrag der Impedanz $|Z|$ nimmt für sehr hohe Frequenzen den Wert des Elektrolytwiderstandes und für sehr niedrige Frequenzen den des Systemwiderstandes an und hat in diesen Bereichen die Steigung 0. Für eine reine Kapazität beträgt die Steigung -1 während sie für die noch zu diskutierende Warburg-Impedanz einen Wert von $-1/2$ annimmt.

Der Phasenwinkel Φ läuft dementsprechend in den ohmschen Bereichen bei 0° und steigt in den kapazitiven auf Werte bis zu 90° an. Für die Warburg-Impedanz beträgt die Phase 45° .

[Mac 87, Sou 85, Old 94]

1.7 Kontaktwinkel und freie Oberflächenenergie

Ein System aus 2 Phasen, welche sich an einer Grenzfläche berühren, läßt sich thermodynamisch als die Summe der Energien G der beiden Einzelphasen (G_1 , G_2) plus die Erhöhung der Energie G_{12} durch Ausbildung der Grenzfläche A ausdrücken.

$$G = G_1 + G_2 + G_{12} \quad (\text{Gl. 25})$$

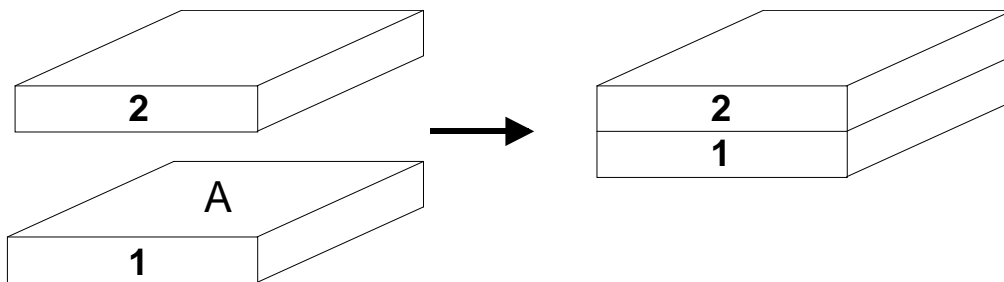


Abb. 43 Diagramm zur Definition der Grenzflächenenergie

Zur Flächennormierung definiert man die **spezifische freie Grenzflächenenergie g** :

$$g = G_{12}/A = (G - G_1 - G_2)/A \quad (\text{Gl. 26})$$

Eine differentielle Änderung von G_{12} ist demnach gegeben durch:

$$dG_{12} = -SdT + Vdp + \gamma dA + \sum_i \mu_i dn_i = d(G - G_1 - G_2) \quad (\text{Gl. 27})$$

γdA ist hierbei die zur Vergrößerung der Grenzfläche aufzuwendende reversible Arbeit und γ die **Grenzflächenspannung**. $\sum_i \mu_i dn_i$ stellt einen Beitrag von eventuell an der Grenzfläche angereicherten Molekülen dar.

Bei konstanter Temperatur T und Druck p ergibt sich

$$(dG_{12}/dA)_{T,p} = g = \gamma + \sum_i \mu_i (dn_i/dA)_{T,p} = \gamma + \sum_i \Gamma_i dn_i \quad (\text{Gl. 28})$$

Spezifische freie Grenzflächenenergie g und Grenzflächenspannung γ sind also nur in einkomponentigen Systemen bzw. bei vernachlässigbarer Adsorption einer Molekülart (Grenzflächenkonzentration Γ_i) identisch [Rab 71], was im weiteren Verlauf dieser Arbeit angenommen wird.

Handelt es sich in Abb. 43 um die Phasengrenze flüssig/gasförmig, so kann die freie Oberflächenenergie direkt gemessen werden und entspricht der Oberflächenspannung γ .

Im folgenden werden Methoden zur Ermittlung der Oberflächenenergie von Festkörpern erörtert.

Die Youngsche Gleichung

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cdot \cos\Theta \quad \Theta \quad \text{Gleichgewichts-Kontaktwinkel} \quad (\text{Gl. 29})$$

γ_S Oberflächenspannung (fest)

γ_{SL} Grenzflächenspannung (flüssig/fest)

γ_L Oberflächenspannung (flüssig)

γ_{SV} Grenzflächenspannung eines Festkörpers mit dem gesättigten Dampf der Flüssigkeit

$\pi_e = \gamma_S - \gamma_{SV}$ Gleichgewichts-Spreitungsdruck

verknüpft die Oberflächenenergien zweier reiner Phasen (hier: fest/flüssig) mit der Grenzflächenspannung zwischen den Phasen und dem ausgebildeten Randwinkel (**Kontaktwinkel** Θ). Er ist ein quantitatives Maß für die Benetzbarkeit eines Festkörpers mit einer Flüssigkeit.

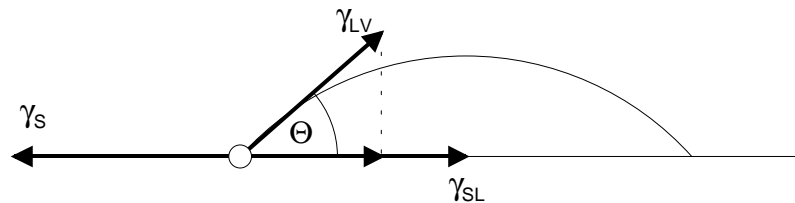


Abb. 44 Vektordiagramm zur Young'schen Gleichung.

Young-Duprésche Gleichung

Die Young-Duprésche Gleichung ergibt sich aus der Kombination der Young'schen Gleichung mit der Dupré-Gleichung:

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (\text{Gl. 30})$$

Sie setzt die Kohäsionsarbeit W_{SL} zwischen Flüssigkeit und Festkörper mit dem Randwinkel Θ und der Oberflächenspannung γ_L der Flüssigkeit in Beziehung.

$$W_{SL} = \gamma_L \cdot (1 + \cos\Theta) \quad (\text{Gl. 31})$$

1.7.1 Methoden zur Bestimmung der Oberflächen- und Grenzflächenspannungen von Festkörpern

1.7.1.1 Zisman

Der oben eingeführte Kontaktwinkel Θ wird für vollständig benetzte Oberflächen 0 und Gleichung (29) geht über in

$$\gamma_S = (\gamma_{SL})_c + \gamma_c \quad (\text{Gl. 32})$$

wobei γ_c die **kritische Oberflächenspannung der Benetzung** und $(\gamma_{SL})_c$ die kritische Grenzflächenspannung darstellen.

Für verschiedene Flüssigkeiten wird jetzt der Kontaktwinkel auf dem Festkörper bestimmt und $\cos\Theta$ gegen γ_L aufgetragen (Zisman-Plot, s.a. Abb. 90). Extrapolation auf $\cos\Theta = 1$ ergibt die Oberflächenspannung derjenigen Flüssigkeit, welche den Festkörper gerade benetzen würde [Fox 52]. Nachteile dieser Methode sind, daß die γ_c -Werte von den gewählten Testflüssigkeiten abhängen [Dam 70] und daß diese nicht der Grenzflächenenergie γ_S sondern der Differenz $\gamma_S - (\gamma_{SL})_c$ entsprechen.

1.7.1.2 Good und Girifalco

Good und Girifalco schlugen 1957 [Gir 57] eine Gleichung zur Vorhersage von Grenzflächenspannungen zwischen 2 Flüssigkeiten vor und übertrugen diese dann 1960 [Goo 60] auf die Phasengrenze flüssig-fest.

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\Phi\sqrt{\gamma_S\gamma_L} \quad ; \Phi \text{ von Molvolumina abhängiger Systemparameter} \quad (\text{Gl. 33})$$

Durch Kombination der Young'schen Gleichung Gl. 29 mit Gl. 33 und unter Berücksichtigung von $\gamma_{SV} = \gamma_S - \pi_e$ ergibt sich

$$\cos\Theta = 2\Phi \frac{\sqrt{\gamma_S\gamma_L}}{\gamma_L} - 1 - \left(\frac{\pi_e}{\gamma_L} \right) \quad (\text{Gl. 34})$$

Wenn der Spreitungsdruck π_e zu vernachlässigen ist bzw. wenn man der Diskussion von Schrader [Sch 96] um die Bedeutung von γ_S und γ_{SV} in den Beziehungen für die Grenzflächenspannung γ_{SL} folgt, so entfällt der Term mit dem Spreitungsdruck π_e und Gl. 34 reduziert

sich zu:
$$\cos\Theta = 2\Phi \frac{\sqrt{\gamma_S\gamma_L}}{\gamma_L} - 1 \quad (\text{Gl. 35})$$

1.7.1.3 Fowkes

1964 nahm Fowkes [Fow 64, Fow 67] erstmals an, daß die Oberflächenspannungen von Flüssigkeiten oder Festkörpern in verschiedene Anteile, so z.B. in eine Komponente aufgrund von London-Dispersions-Wechselwirkungen γ^d und eine weitere aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen γ^h , aufgespalten werden können.

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^h$$

Für Systeme in denen nur disperse London-Wechselwirkungen auftreten können schrieb er

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} \quad (\text{Gl. 36})$$

und erhielt durch die gleichen Substitutionen wie in Kap. 1.7.1.2 die Gleichung

$$\cos \Theta = \frac{2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d}}{\gamma_L} - 1 - \left(\frac{\pi_e}{\gamma_L} \right) \quad (\text{Gl. 37})$$

mit der sich der Kontaktwinkel in Abhängigkeit von den Dispersionskraftanteilen voraussagen läßt.

1.7.1.4 Owens und Wendt

Für Fälle in denen neben Dispersionskräften auch Wasserstoffbrückenbindungen bzw. andere gerichtete, polare Wechselwirkungen auftreten,

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p$$

wurde Gl. 36 1969 von Owens und Wendt [Owe 69] erweitert.

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (\text{Gl. 38})$$

Mit den obigen Substitutionen ergibt sich:

$$\cos \Theta = \frac{2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d}}{\gamma_L} + \frac{2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p}}{\gamma_L} - 1 - \left(\frac{\pi_e}{\gamma_L} \right) \quad (\text{Gl. 39})$$

Zur Ermittlung des polaren und dispersen Anteils an der Oberflächenenergie des Festkörpers formt man diese Gleichung um zu

$$\frac{1 + \cos \Theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\gamma_L^d} = \sqrt{\gamma_S^d} + \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} \quad (\text{Gl. 40})$$

Jetzt trägt man für verschiedene Lösungsmittel (mit bekanntem γ_L^p, γ_L^d) $y = \frac{1 + \cos \Theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}}$

gegen $x = \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ auf und ermittelt aus Steigung und Achsenabschnitt der Geraden den polaren

und dispersen Anteil an der Oberflächenenergie (s.a. Abb. 87).

1.8 Druck-Flächen-Diagramme

Amphiphatische Moleküle orientieren sich an der Phasengrenze Wasser/Luft spontan um ihre freie Energie zu minimieren. Der resultierende Oberflächenfilm ist nur ein Molekül dick und wird als Monolayer bezeichnet.

Die Präsenz eines Monolayers auf der Flüssigkeitsoberfläche verringert die Oberflächenspannung der reinen Flüssigkeit γ_0 . Die Differenz zwischen der Oberflächenspannung der reinen und der filmbedeckten Flüssigkeit wird Oberflächendruck oder Lateraldruck π des Films genannt.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \tag{Gl. 41}$$

Gibt man einen amphiphatischen Stoff, gelöst in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel, auf die Oberfläche der Subphase, so spreitet er spontan auf der Oberfläche.

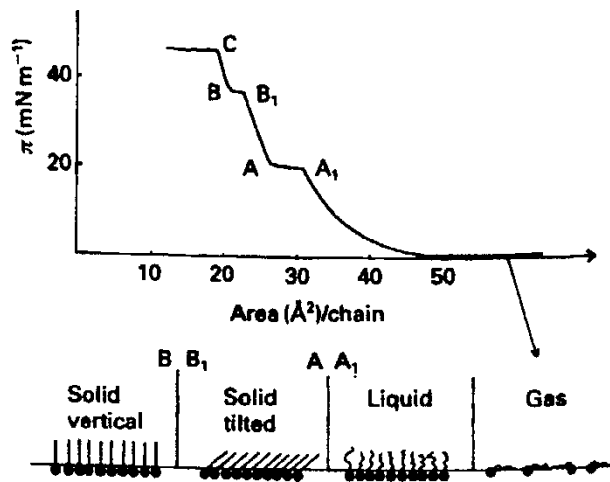


Abb. 45 Schematische Isotherme mit Phasen und Phasenübergängen für ein langkettiges Amphiphil.

Wird ein solcher Monolayer jetzt komprimiert, so durchläuft er mehrere Phasenübergänge die man am besten in einem sogenannten Druck-Flächen-Diagramm aufzeigt, welches Parallelen zu einem klassischen 3-dimensionalen p-V-Diagramm aufweist und woher auch die Nomenklatur der Phasen herrührt.

In dem **gasanalogen Zustand**, sind die Moleküle weit genug voneinander entfernt, so daß nur sehr geringe Kräfte aufeinander wirken. Wird die Fläche jetzt verringert, so fangen die hydrophoben Ketten des Amphiphils an zu wechselwirken und der Filmdruck steigt. Man spricht von der **flüssiganalogen expandierten Phase** in welcher die Ketten zwar interagieren aber noch ungeordnet vorliegen. Komprimiert man weiter, so kommt es zur Ausbildung von **kondensierten Phasen** in welchen die Moleküle dicht gepackt und mit orientierten Kohlenwasserstoffketten vorliegen. Komprimiert man über diesen Punkt hinaus, so kommt es zum **Kollaps**, bei welchem Moleküle aus der Oberfläche gedrängt werden und andersweitig aggregieren (Mizellen, Vesikel) [Pet 96].

1.9 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

In der DSC wird die zu untersuchende Probe mit einer Referenzprobe kontinuierlich mit der Heizrate (dT/dt) aufgeheizt. Findet in der Probe jetzt z.B. ein endothermer Phasenübergang statt, so erwärmt sich die Probe bei gleicher Heizleistung geringer als die Referenz, was sofort durch eine Zusatzheizleistung $N=dQ/dt$ ausgeglichen wird. Durch Auftragung dieser Meßgröße N über der Temperatur lassen sich **Umwandlungstemperaturen** in der Probe bestimmen. Desweiteren liefert die Integration über einen Umwandlungspeak die mit der Umwandlung verbundene Umwandlungenthalpie ΔH [Blu 91].

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p = N \left(\frac{dt}{dT} \right) \quad (\text{Gl. 42})$$

$$\Delta H = \frac{1}{n} \int_{T_A}^{T_E} c_p dT = \frac{1}{n} \int_{t_A}^{t_E} N dt \quad (\text{Gl. 43})$$

2 Problemstellung

In der Einleitung wurde die Bedeutung von Membranproteinen für physiologische Prozesse aufgezeigt. Um solche Proteine mit oberflächensensitiven Techniken zu untersuchen, benötigt man eine Matrix auf einer Festkörperoberfläche, in welcher die Proteine in ihrer nativen, funktionellen Form rekonstituiert und untersucht werden können.

In einer vorangegangenen Arbeit von Dr. Steffen Lingler [Lin 98] wurden zu diesem Zweck Hybridlipidmembranen (HBMs) durch Vesikelfusion auf selbstorganisierte Alkanthiol- oder Thiolipid-Monolayer auf Gold aufgebaut. Für die Rekonstitution von Transmembranproteinen erwiesen sich diese Membranen aber aufgrund der hohen Packungsdichte in der oberflächenproximalen Schicht als ungeeignet. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb **die Verringerung der Ankerdichte** mittels verschiedener Methoden. In diesem Rahmen sollten auch die aus der Fusion gemischter Thiolipid-/Lipid-Vesikel auf Gold resultierenden gemischten Lipidmembranen (MBMs) [Lin 98], sowie der Fusionsprozeß selbst, näher untersucht und weitergeführt werden.

Ein weiteres wünschenswertes Merkmal von festkörperunterstützten Membranen ist die **Schaffung eines wassergefüllten Reservoirs** zwischen Membran und Elektrode, welches Platz für hydrophile Protein-Domänen und transportierte Stoffe bieten soll. Hierzu sollten die von Dr. Jürgen Mack [Mac 99] mittels kombinatorischer Chemie synthetisierten Lipide mit hydrophilen Oligoethylenoxidspacern Verwendung finden.

Die Tauglichkeit der Matrices zur Rekonstitution von Proteinen in nativer Form sollte anhand einiger Vertreter der Membranproteine durch Aufzeigen ihrer spezifischen Aktivität mit elektrochemischen Methoden nachgewiesen werden.

Desweiteren war nach erfolgreicher Charakterisierung auf großen Elektroden der Übergang zu kleineren Elektroden und Mikroelektroden vorgesehen.

3 Diskussion der Ergebnisse

3.1 Entwicklung der Meßzelle

Zur gleichzeitigen Charakterisierung der Membranen mittels Impedanzspektroskopie, Elektrochemie und Oberflächenplasmonenresonanz wurde eine Meßzelle (s. Abb. 46) entwickelt, welche die folgenden Eigenschaften besitzt:

- 3-Elektroden-Setup (Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode)
- elektrischer Heiztisch mit Regelkreis
- Temperaturfühler in der Zelle ($n_{\text{Puffer}}=f(T)$)
- spülbar über Peristaltikpumpe
- durchsichtige Rückseite (zur Kontrolle auf Luftblasen und Laser-Spot)

Temperaturregelung, Spülen und Korrespondenz zwischen Oberflächenplasmonen- und Elektrochemiemeßrechner können allesamt rechnergesteuert erfolgen [Sch b].

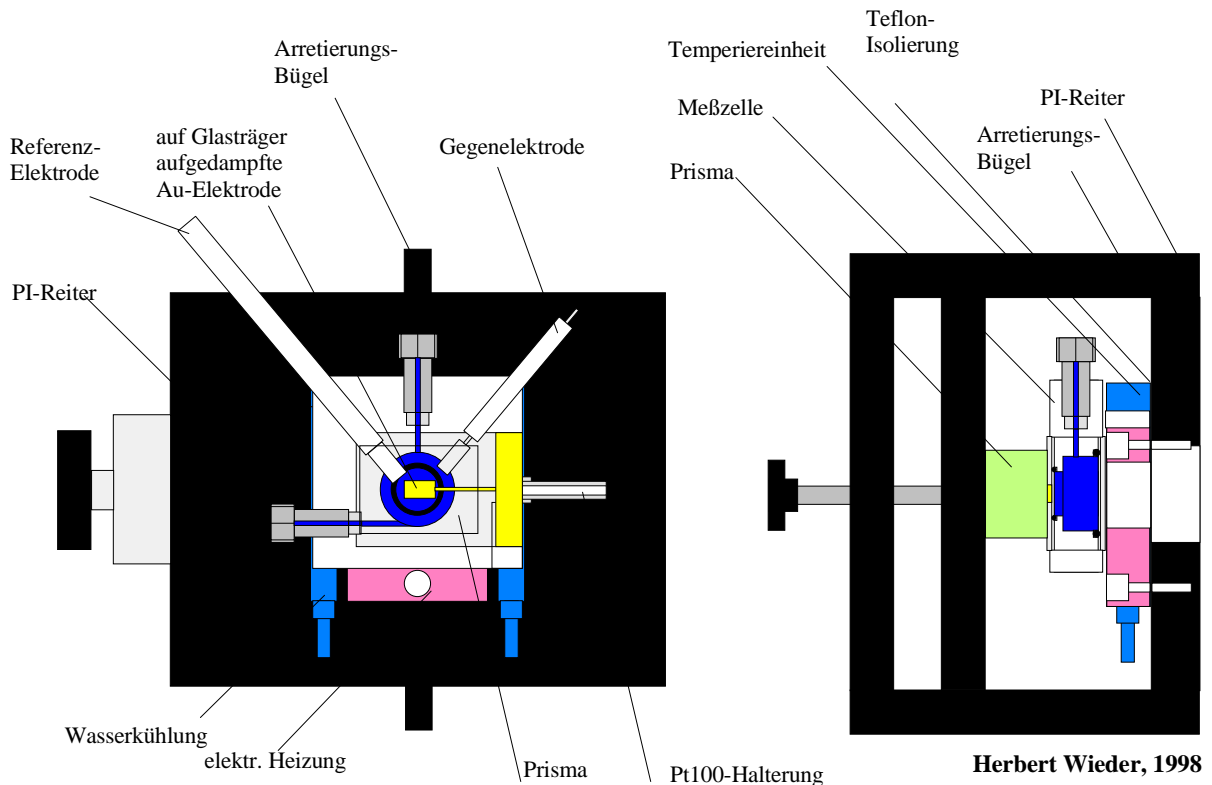


Abb. 46 Kombimeßzelle (Draufsicht und Schnitt).

Die technischen Zeichnungen zur Meßzelle befinden sich im Anhang (Kap. 7.1).

3.2 Hybrid-Bilayer-Membranen (HBM)

Unter Hybrid-Bilayer-Membranen versteht man Lipidbilayer, in welchen der oberflächendistale Monolayer komplett aus Ankerlipid oder Alkanthiol und der oberflächenproximale Layer komplett aus Fülllipid besteht.

3.2.1 Aufbau

DPPE-DMPC-Hybrid-Bilayer-Membranen wurden schon in der Arbeit von Dr. Steffen Lingler [Lin 98] beschrieben. Dort wurden sie nach Route A-C (s. Abb. 47) durch self-assembly des Thiolipids auf Gold und anschließende Vesikelfusion aufgebaut.

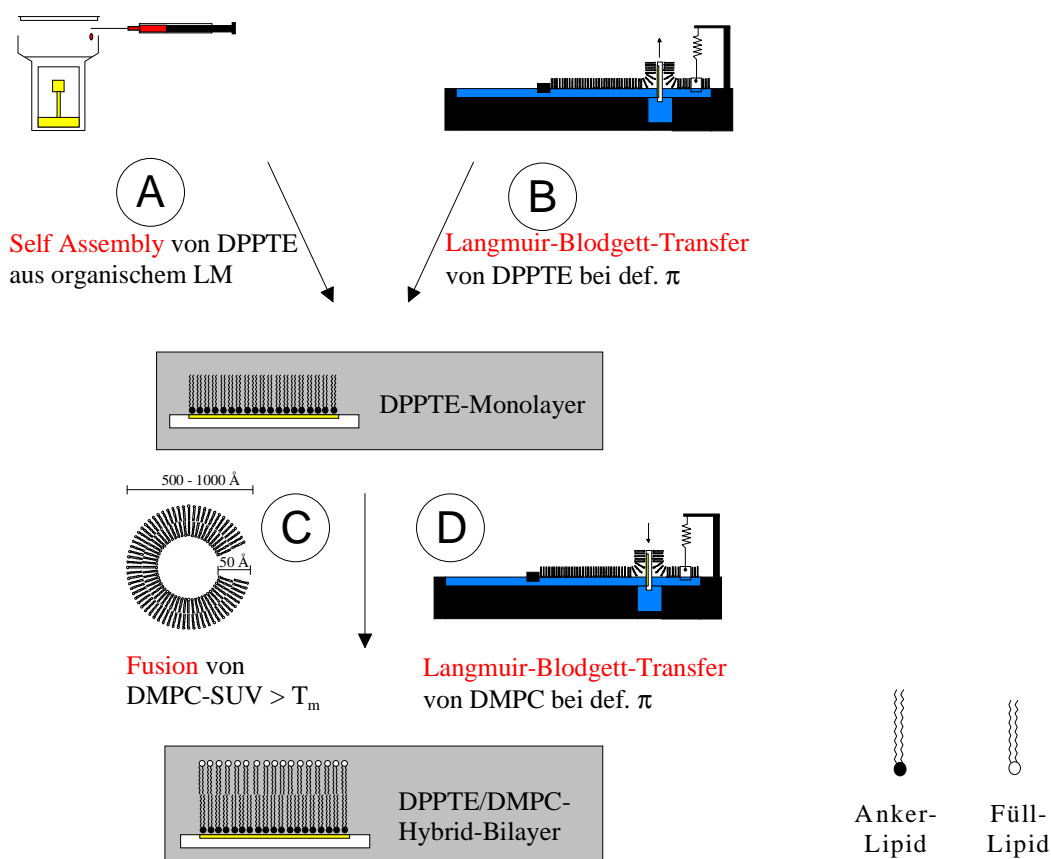


Abb. 47 Schema zum Aufbau von HBMs.

Eine weitere Möglichkeit diese HBMs aufzubauen besteht in der Verwendung von Langmuir-Blodgett-Kuhn-(LBK)-Techniken. Der oberflächenproximale Monolayer kann dann direkt durch einen hydrophilen Transfer des Thiolipids bei kontrolliertem Filmdruck auf das Gold übertragen werden, während die zweite Monolage wiederum über Vesikelfusion oder LBK-Transfer hinzugefügt wird.

3.2.2 Ersatzschaltkreis

Der Ersatzschaltkreis für Filme dieser Art ist sehr einfach und besteht lediglich aus einem RC-Glied (Membran) in Serie zu einem i.d.R. sehr kleinen Widerstand (10-200 Ω ; Zuleitungen, Elektrolyt).

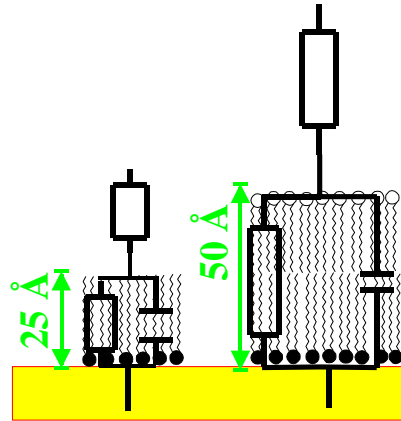


Abb. 48 Ersatzschaltkreis für DPSTE-Monolayer und DPSTE-DMPC-Hybrid-Bilayer

3.2.3 SA-DPSTE + DMPC-SUV (Route A-C)

DPSTE-SAMs erhält man durch Inkubation des Goldsubstrats in einer Lösung von DPSTE in Chloroform ($c=1\text{mM}$) über Nacht und anschließendes mehrmaliges Waschen mit Chloroform. Zum Vergleich mit den LBK-Techniken sind hier noch einmal die Filmparameter der Hybridlayer aufgezeigt, welche aus der DMPC-Vesikelfusion auf selbstorganisierte DPSTE-Monolayer resultieren.

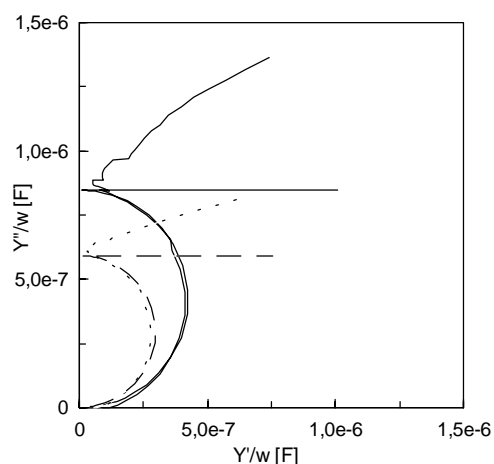


Abb. 49 Frequenzreduzierte Admittanzen für DPSTE-Monolayer (—) und DPSTE-DMPC-Hybrid-Bilayer (-----) sowie Fits anhand Ersatzschaltbild (Abb. 39).

Die Impedanzspektren sind sehr scharf und zeigen für hohe Frequenzen so gut wie keine Abweichung vom diskreten Ersatzschaltbild (s. Abb. 39). Die Koeffizienten α für ein CPE

(*constant phase element*) liegen zwischen 0.98 und 1 und sprechen für ein sehr homogenes System mit einer geringen Oberflächenrauigkeit.

| Element | Monolayer | Bilayer | Einheit |
|---------|-----------|---------|-------------------------------|
| R_a | 34 | 69 | $[\Omega]$ |
| R_1 | 1,6 | 2,1 | $[M\Omega \cdot \text{cm}^2]$ |
| C_1 | 0,85 | 0,59 | $[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$ |

Tab. 5 Typische Membranparameter für DPPTe/DMPC-Hybridmembranen nach Route A-C.

Die Kapazitäten aus Tab. 5 entsprechen ziemlich genau den Werten welche man schon von Schwarzfilmmembranen kennt. Sie lassen sich anhand von Gl. 10 in Schichtdicken des Dielektrikums umrechnen. Für den DPPTe-SAM ergibt sich dann eine elektrische Schichtdicke von 24 Å (mit $\epsilon=2.3$ [Pla 94, Pla 95]) und die DMPC-Vesikelfusion würde einer weiteren Zunahme um 13 Å (mit $\epsilon=2.7$ [Pla 94, Pla 95]) entsprechen.

Als optische Schichtdicken aus der Oberflächenplasmonenresonanz findet man für den DPPTe-SAM 24-26 Å (bei $n=1.5$; [Ulm 91]), gefolgt von einem Schichtdickenzuwachs von 19-20 Å (bei $n=1.5$) durch die Fusion der DMPC-Vesikel.

Die Bestimmung der Fluidität des oberflächendistalen Monolayers mittels FRAP scheitert für dieses System weil sich der Fluoreszenzmarker NBD-PE im Kopfgruppenbereich des oberflächenfernen Monolayers mit ca. 40-50 Å noch in einer Entfernung zur Goldoberfläche befindet, bei welcher Fluoreszenzenergietransfer stattfinden kann. Abb. 50 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DPPTe-HBM. Die hellen Flecken entsprechen hier demnach vereinzelt adsorbierten oder teilgespreiteten Vesikeln oder Clustern von Vesikeln.

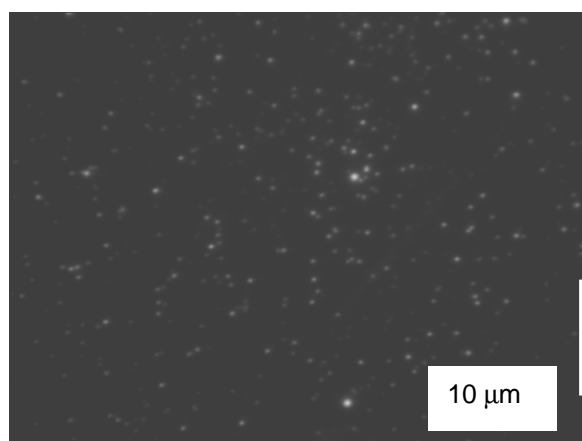


Abb. 50 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DPPTe/(Eigelb-PC/NBD-PE 1%)-Bilayers

Ein indirekter Mobilitätsnachweis ist allerdings über die Beobachtung der Phasenumwandlung möglich.

Phasenumwandlung

An so gut definierten Systemen können über die Temperaturabhängigkeit der Filmkapazität auch Aussagen über Phasenübergänge in festkörperunterstützten Lipidmembranen gemacht werden [Flo 93]. Im oberen Teil von Abb. 51 sind die DSC-Spektren für DMPC und DPPTE-Vesikeldispersionen dargestellt.

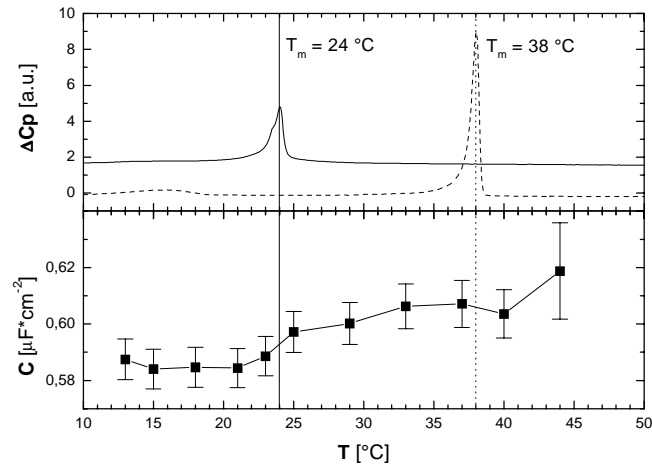


Abb. 51 DSC-Spektren für DMPC- (—) und DPPTE- (-----) Vesikeldispersionen sowie temperaturabhängige Filmkapazitäten ■ der HBM.

Sieht man sich nun im Vergleich dazu den Temperaturverlauf der HBM-Kapazitäten an, so erkennt man im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur von DMPC eine leichte Kapazitätserhöhung. Beim Übergang von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase bilden sich gauche-trans-gauche-Kinken in den Fettsäureketten der Lipide aus, welche zu einer Verringerung der Schichtdicke und wegen der schlechteren Packung auch zu erhöhter Permeabilität für Wasser und Ionen führt. Beide Effekte geben Anlaß zu einer Erhöhung der Membrankapazität.

Im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des DPPTE, welches den oberflächenproximalen Monolayer bildet, erkennt man keine deutlichen Änderungen. Allerdings findet man für Temperaturen oberhalb $T_m(\text{DPPTE})$ eine deutliche Kapazitätsverteilung in der Form der Impedanzspektren, was in Abb. 51 lediglich Eingang in den Fehlerbalken findet. Man benötigt ein α von 0.85 um die Spektren für diese Temperatur mittels eines CPE anzupassen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß jetzt auch Elektrolyt in den oberflächenproximalen Monolayer eindringen kann und hierdurch zu einer Vielfalt lokaler Kapazitäten beiträgt.

Während des Abkühlprozesses findet man lediglich eine stetige Abnahme der Membrankapazität ohne Sprünge bei den Phasenumwandlungstemperaturen der Lipide.

3.2.4 LB-Übertrag von DMPC auf SA-DPPTE (Route A-D)

Zum Vergleich der aus Vesikelfusion und LB-Transfer resultierenden Filme, wurde DMPC bei 35 mN/m auf selbstorganisierte DPPTE-Monolayer aufgezogen. Die Filme zeigten die gleiche Reduzierung der Membrankapazität von 0.9 auf 0.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, analog den durch DMPC-Vesikelfusion präparierten Filmen. Der Schichtdickenzuwachs durch den LB-Transfer betrug 19 Å ($n=1.5$) auf einen DPPTE-Monolayer von 26 Å.

3.2.5 LB-DPPTE + DMPC-SUV (Route B-C)

Auf dem Weg zur lateralen Verdünnung der festkörperunterstützten Membranen wurde auch versucht, die Ankerdichte durch LB-Transfer des Thiolipids DPPTE bei definiertem Lateraldruck π zu reduzieren.

Die Isothermen für DPPTE zeigen allesamt den Kollaps um 43 \AA^2 bei Filmdrucken um 60-65 mN/m. Der Phasenübergangsbereich wird mit zunehmender Temperatur enger und verschiebt sich zu höheren Lateraldrucken.

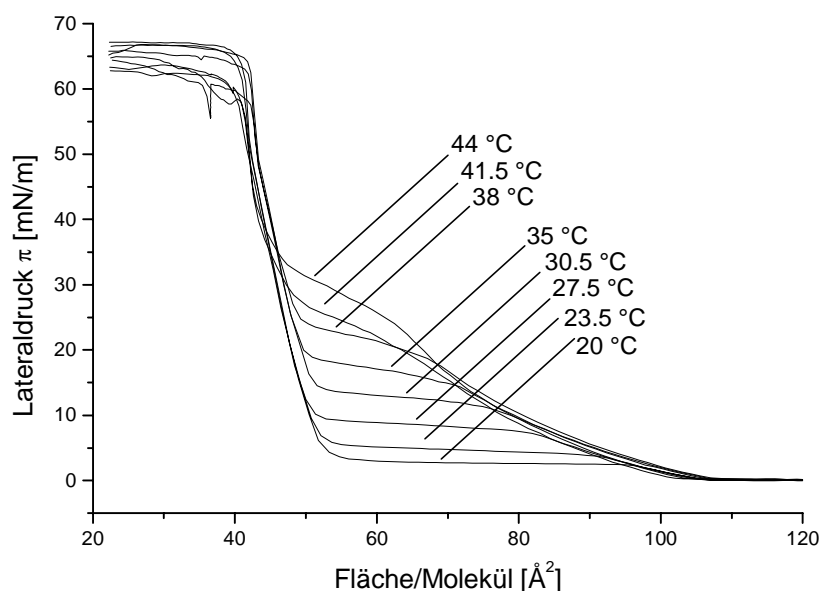


Abb. 52 Isothermen für $x=1$.

Seltsam ist, daß für Temperaturen ($> 38 \text{ °C}$), bei welchen entsprechende Bilayer schon in der flüssig-kristallinen Phase vorliegen, immer noch ein Phasenübergang sichtbar ist.

In Abb. 53 sind die **Kapazitäten** der DPPTTE-Monolayer nach LB-Transfer, sowie der aus der anschließenden DMPC-Vesikelfusion resultierenden Hybrid-Bilayer aufgetragen.

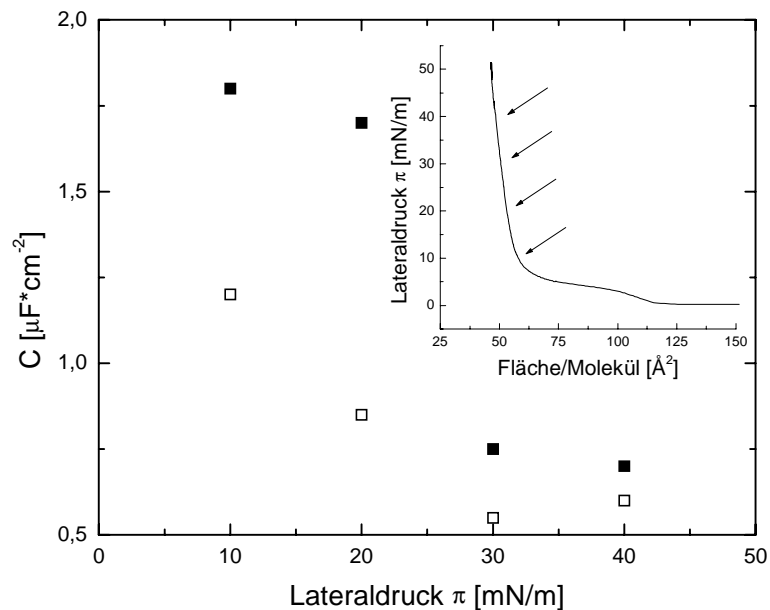


Abb. 53 Filmkapazitäten der DPPTTE-Monolayer ■ durch LB-Transfer bei verschiedenen Filmdrücken gefolgt von DMPC-Vesikelfusion □. Inset: Isotherme für DPPTTE bei $T=25$ °C.

In den Monolayer-Kapazitäten erkennt man einen deutlichen Sprung zwischen den Überträgen bei 20 und 30 mN/m, welcher auf das zunehmende Eindringen von Elektrolyt in den Monolayer zurückzuführen sein dürfte. Diese Defekte werden, den Kapazitätswerten für die aus den 10 und 20 mN/m-Monolayern resultierenden Bilayer zufolge, denn auch durch die Vesikelfusion nur teilweise aufgefüllt. Um Bilayer mit vernünftigen Kapazitätswerten zu erhalten, kann man den Lateraldruck und somit auch die Verdünnung (Fläche/Molekül) nur in einem sehr engen Fenster von ca. $40\text{-}50 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ variieren (vgl. [Far 90]).

Die **DMPC-Fusionskinetiken** (s. Abb. 54) zeigen große Unterschiede in Abhängigkeit vom Lateraldruck des DPPTTE-Monolayers.

Für die Monolayer mit hohen Filmdrücken findet man zuerst einen Anstieg, gefolgt von einem Abfall im **Widerstand**, welcher um so ausgeprägter ausfällt, je höher der Filmdruck ist. Der Widerstand des $\pi=10$ mN/m Films wächst dagegen stetig.

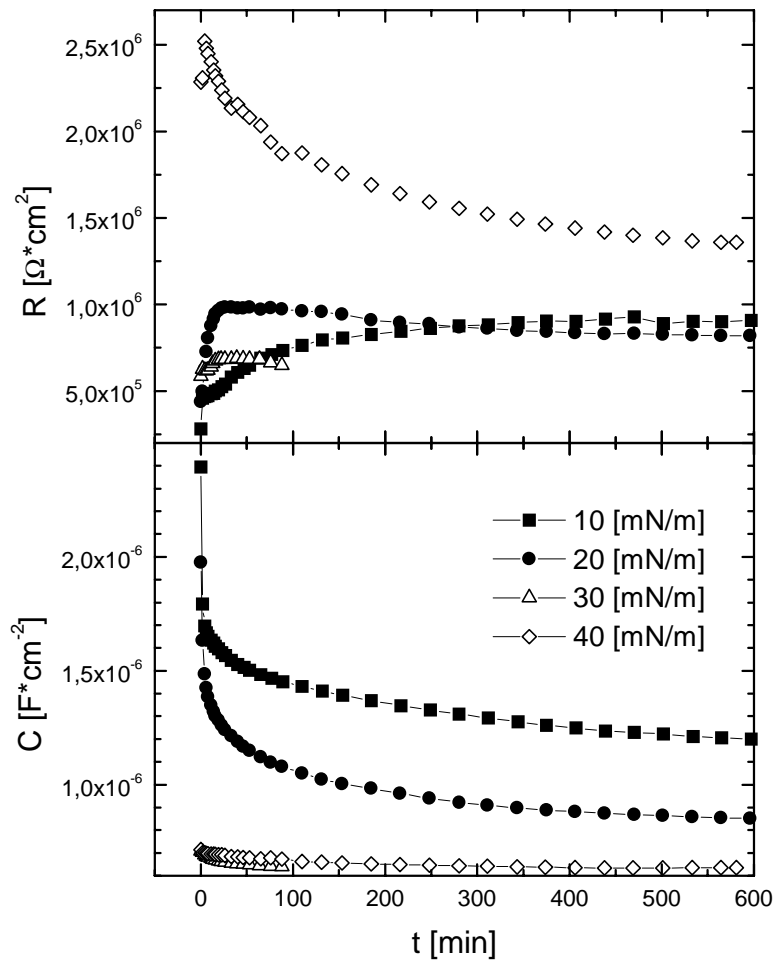


Abb. 54 Zeitlicher Verlauf von Membran-Widerstand und –Kapazität für die DMPC-Vesikelfusion ($T=30^\circ\text{C}$) auf DPPE-Monolayer mit unterschiedlichen Lateraldrukken.

Im zeitlichen Verlauf der **Kapazitäten** ist die Situation genau umgekehrt. Hier findet man die größten Änderungen für die Monolayer mit den niedrigsten Filmdrukken, da bei diesen Defekte durch Lipide aufgefüllt werden und hierdurch den Anteil der Defektkapazität an der Gesamtkapazität (s.a. Kap.1.6.1) verringern.

3.2.6 LB-Transfer von cogespreiteten DPPTe/DMPC-Filmen

Eine weitere Idee zum Aufbau von festkörperunterstützten Membranen mit reduzierter Ankerdichte war der LB-Übertrag von cogespreiteten DPPTe/DMPC-Filmen in verschiedenen Verhältnissen.

In Abb. 55 sind hierzu die Isothermen für einige Molenbrüche der binären DPPTe/DMPC-Filme bei $T=25^\circ\text{C}$ aufgetragen. Für den Übertragungsdruck von $\pi=45\text{ mN/m}$ befinden sich alle Filme außer dem reinen DMPC-Film in der fest-kondensierten oder flüssig-kondensierten Phase mit einem mittleren Flächenbedarf von $47\text{ \AA}^2/\text{Molekül}$.

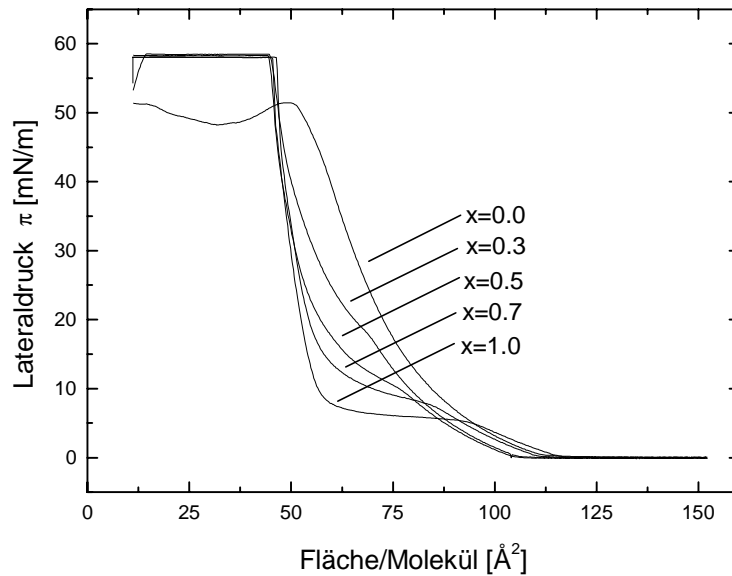


Abb. 55 Druck-Flächenisothermen für verschiedene Molenbrüche x_{DPPTe} bei $T=25^\circ\text{C}$.

Für entsprechend geringere Lateraldrucke variiert der mittlere Flächenbedarf über den Molenbruch.

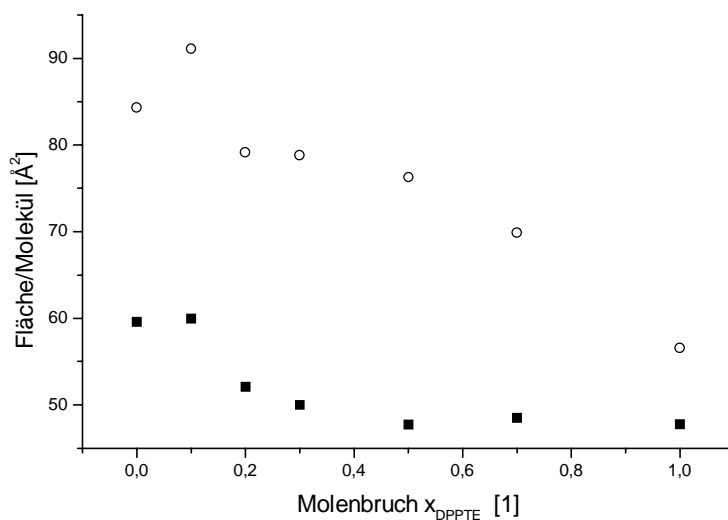


Abb. 56 Mittlerer Flächenbedarf pro Molekül in Abhängigkeit vom Molenbruch für $\pi=10\text{ O}$ und 40 ■ [mN/m] .

Idee war wiederum mittels der LB-Technik, Monolayer mit verschiedenen Lateraldrukken und Zusammensetzungen zu übertragen und dadurch die Ankerdichte zu variieren.

Für den reinen DPPTE-Film ($x=1.0$) findet man noch die übliche Monolayer-Kapazität von $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, welche sich nach Vesikelfusion auf $0.62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erniedrigt.

Für den **Transfer von cogespreiteten Filmen** ergibt sich aber ein komplett anderes Bild.

Der $x=0.7$ -Monolayer deutet mit einer Kapazität von $6-7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Widerstand von nur $8 \text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf einen sehr undichten Monolayer hin.

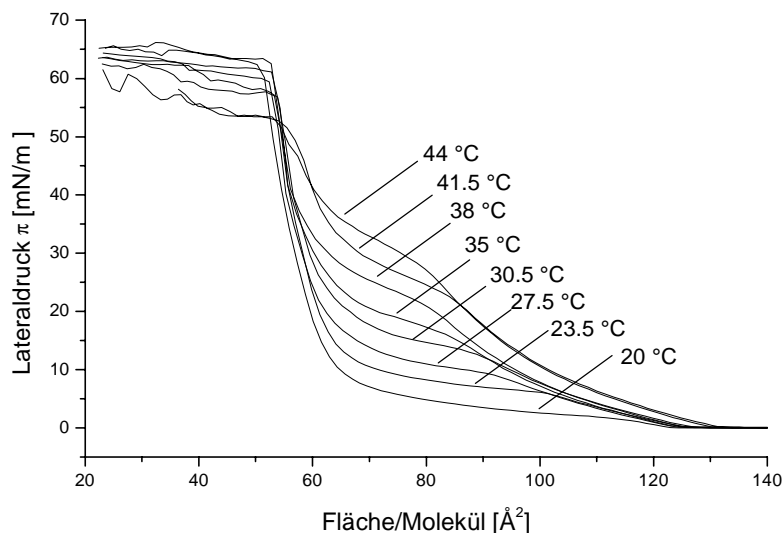


Abb. 57 Isothermen für $x=0.7$.

Für den $x=0.3$ -Monolayer wurde gar eine Kapazität von $60 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gefunden, die größer als die Kapazität der elektrischen Doppelschicht auf dem Gold und somit eigentlich nur durch eine Oberflächenvergrößerung zu erklären ist.

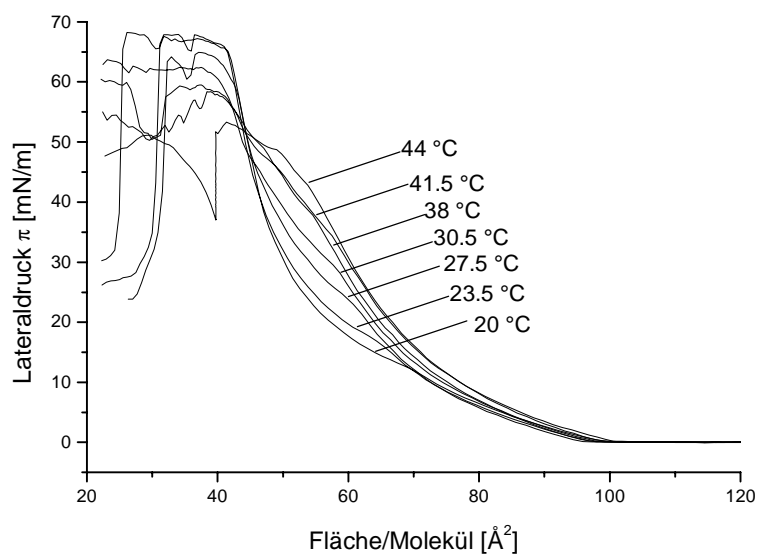


Abb. 58 Isothermen für $x=0.3$.

Da der LB-Transfer auf das Gold aus der Subphase heraus erfolgt, die impedanzspektroskopische Charakterisierung des Monolayers aber nur in Lösung geschehen kann, lösten sich beim Eintritt in die Elektrolytlösung wahrscheinlich die unverankerten DMPC-Moleküle aus dem Film heraus.

Dafür spricht auch, daß die für den $x=0.7$ -Monolayer gefundene Kapazität von $6-7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ziemlich gut dem theoretischen Kapazitätswert einer zu 70% mit einem $20-30 \text{ \AA}$ dicken dielektrischen Film ($\epsilon=2.5$) bedeckten Goldoberfläche entspricht (s. Tab. 4). Für die übergroße Kapazität des $x=0.3$ -„Monolayers“ kann eigentlich nur eine gewaltige Oberflächenvergrößerung, vielleicht durch „niedergelegte“ Ketten nach dem Verlust des Füll-Lipids, verantwortlich gemacht werden.

Da die Monolayer zum Aufbau des Bilayers aber immer ins wäßrige Medium eintauchen müssen und dieser Schritt anscheinend mit dem Verlust von Füll-Lipiden einher geht, wurde diese Technik nicht weiter verfolgt.

Ein **Langmuir-Schäfer-Transfer** zum Aufbringen des zweiten Monolayers hätte dem wohl Abhilfe schaffen können, war aber aufgrund des Formats der verwendeten Glasträger immer unvollständig.

3.3 Gemischte Bilayer-Membranen (MBM)

Die Eigenschaften der im vorigen Kapitel 3.2 beschriebenen HBMs sind stark durch den dicht gepackten, oberflächennahen Thiolipidmonolayer bestimmt. Dieser verhindert einerseits wie schon erwähnt den Einbau von Transmembranproteinen. Wenn andererseits Porenbildner oder Shuttles (wie Valinomycin [Lin 98]) in den oberflächenfernen Monolayer eingebaut werden, so sieht man den Widerstandsabfall in dieser Schicht nicht, weil der gemessene Gesamtmembranwiderstand immer noch hauptsächlich von dem dichten, unveränderten Thiolipidmonolayer herrührt.

Ziel war es deswegen, die Ankerdichte im oberflächenproximalen Layer zu reduzieren. Dies kann einerseits über strukturierte oder aber homogen verdünnte Membranen geschehen. In dieser Arbeit wird der Weg über die homogene Verdünnung verfolgt.

Die Experimente in Kapitel 3.2.5 zum LB-Übertrag des Thiolipids bei verringertem Druck resultierten für höhere Drucke ($> 20 \text{ mN/m}$) zwar in elektrisch guten Schichten, die laterale Verdünnung ist aber sehr gering ($48, 50, 53, 58 \text{ \AA}^2$ zwischen 40 und 10 mN/m ; max. 20%).

Experimente zum Übertrag von kogespreiteten DPPTE/DMPC-Monolayern (s. Kap. 3.2.6) zeigten für höhere Verdünnungen katastrophale elektrische Werte. Die Filme verloren wohl beim abermaligen Durchtritt durch die Wasser-Luft-Grenzfläche das lateral bewegliche Lipid. Da LB-basierende Präparationstechniken nicht zum Erfolg führten und sowieso relativ umständlich sind, sollte hier die **Fusion gemischter DPPTE/DMPC-Vesikel** [Ste 96, Lin 98] ausgebaut werden. Die Idee war, über das Verhältnis von DPPTE zu DMPC im Vesikel, die Ankerdichte auf der Oberfläche einzustellen.

3.3.1 Aufbau

Die Präparation der Filme geschieht durch Fusion der gemischten DPPTE/DMPC-Vesikel auf frisch gereinigtes Gold. Anschließend kann der oberflächenferne Layer entfernt werden, indem man die Luft-Wasser-Grenzfläche mehrmals über die Membran laufen läßt. Es ist auch möglich das gesamte lateral bewegliche Lipid mittels organischem Lösungsmittel herauszulösen.

Über Refusion von leeren Vesikeln oder Proteoliposomen können festkörperunterstützte Membranen mit oder ohne Protein aufgebaut werden.

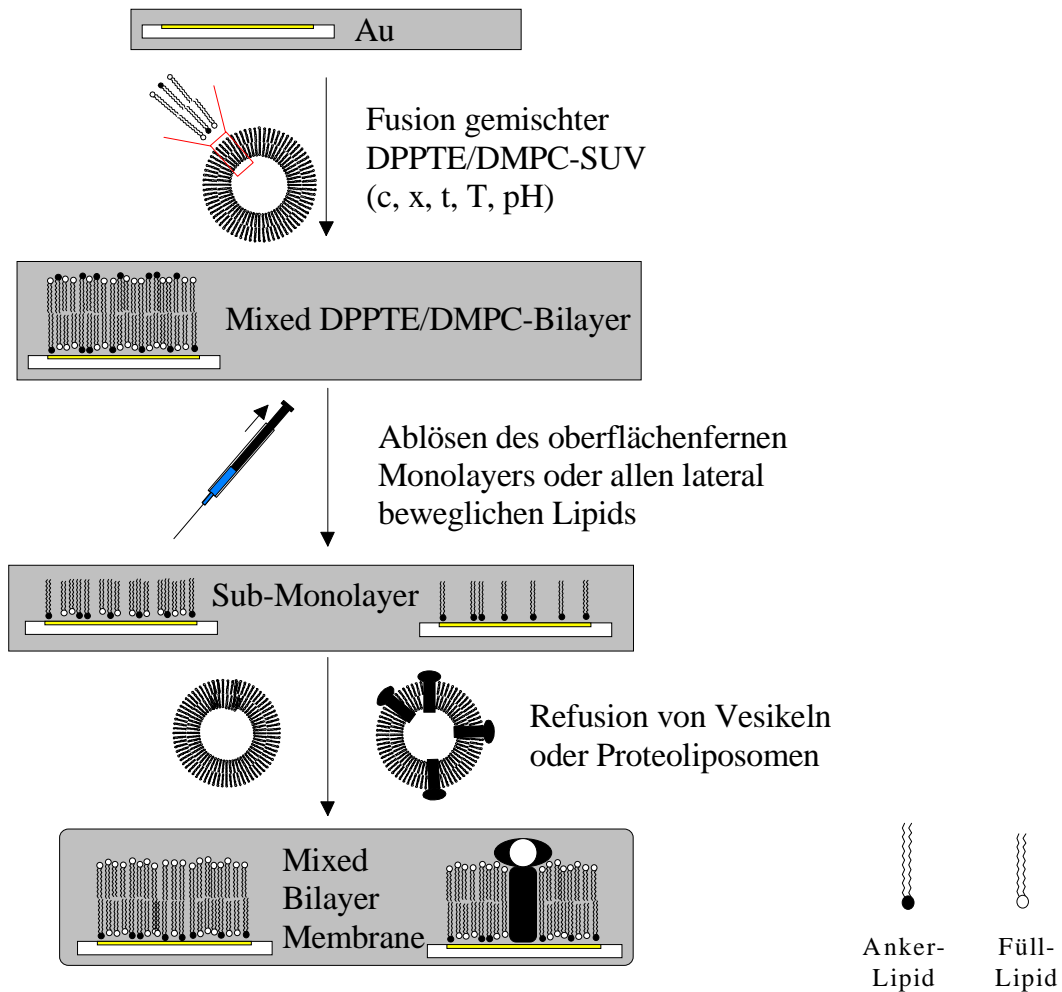


Abb. 59 Schema zum Aufbau von MBMs.

Im folgenden ist die **Standardprozedur** beschrieben. Für die Beobachtung des Einflusses eines Parameter auf den Fusionsprozeß wurde lediglich, falls nicht gesondert erwähnt, dieser eine Parameter variiert.

Au-Elektroden auf BK7 Glas (s. Kap. 4.3.1) wurden 5 min. in frischer „Piranha“-Lösung (H_2SO_4 conc., 30% H_2O_2 ; 3:1) gereinigt und anschließend gründlich mit MQ-Wasser gespült. Nach kurzem Spülen mit Ethanol (Fa. Riedel de Haen; Chromasolv) wurde die Probe im Stickstoffstrom trockengeblasen, sofort in die Zelle eingebaut und mit MES-Puffer (10 μM MES, 10 mM NaCl; pH 5.5) bedeckt. Die gemischten Vesikel wurden entsprechend der Vorschrift in Kap. 4.3.2 durch Extrusion durch 100 nm-Polycarbonatmembranen in obigem MES-Puffer bei $T=40 - 50$ °C präpariert und zeigten in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) einen mittleren Durchmesser von 80 ± 16 nm.

Anschließend wurde die vorgeheizte Vesikeldispersion in die ebenfalls auf 50 °C vor-temperierte Meßzelle injiziert.

Nach beendeter Fusion wurde gründlich mit MES-Puffer gespült und dieser anschließend gegen NaCl-Lsg. (100 mM) ausgetauscht.

Den Submonolayer erhält man indem man die Wasser-Luft-Grenzfläche mehrmals über die Probe laufen läßt und anschließend verbliebenes Lipid mittels Ethanol auswäscht.

Auf diesen Submonolayer kann dann die Refusion von reinen Lipidvesikeln oder Proteoliposomen erfolgen.

3.3.2 Ersatzschaltkreis

Die Impedanzspektren für die aus der gemischten Vesikelfusion resultierenden Filme konnten mit dem Ersatzschaltkreis aus Abb. 60 simuliert werden.

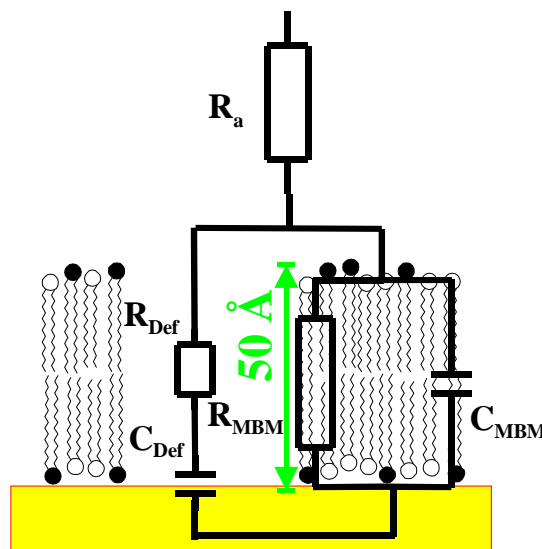
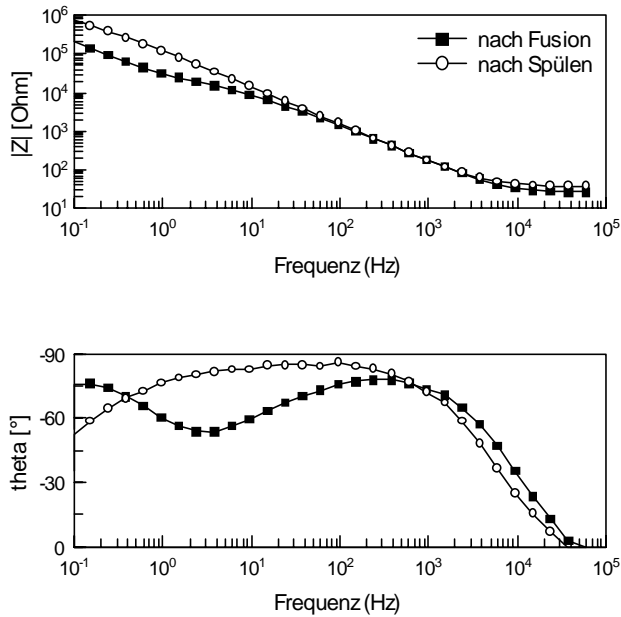


Abb. 60 Ersatzschaltkreis für Filme aus gemischter Vesikelfusion.

Der große Unterschied zu den Hybrid-Bilayern aus dem vorigem Kapitel (3.2) besteht darin, daß die Vesikel hier direkt auf dem Gold ausgerollt und nicht auf einen nahezu perfekten Monolayer fusioniert werden. Defekte während der Vesikelfusion schlagen deswegen im Fall der Hybridlayer (HBM) nur im oberflächenfernen Layer zu Buche, während sie in diesem Fall (MBM) direkt in blanken Goldflächen resultieren.

Defektfreie Filme zeigen nur eine Zeitkonstante τ ($\sim 1.5 \Omega/F$), die durch das $R_{MBM}C_{MBM}$ -Glied geprägt ist. Freie Goldflächen (R klein genug) resultieren im Auftreten einer zweiten Zeitkonstante.



$$R_a = 30 \Omega$$

$$C_{MBM} = 1.05 \mu\text{F}/\text{cm}^2$$

$$R_{MBM} = 1.5 \text{ M } \Omega\text{cm}^2$$

$$C_{Def} = 7.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$$

$$R_{Def} = 10 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$$

Abb. 61 Impedanzspektren während Fusion ■ und nach Spülen ○.

Während der Fusion findet man oft beide Zeitkonstanten, wobei nach Wegspülen der Vesikeldispersion die Defektkonstante meistens verschwindet. Wahrscheinlich werden durch den Spülvorgang adsorbierte oder teilgespreitete Vesikel destabilisiert, die dann spreiten und hierdurch vorhandene Defekte ausheilen.

3.3.3 Abhängigkeiten

Der in Abb. 59 schematisierte Fusionsprozeß der gemischten DPPE/DMPC-Vesikel reagiert empfindlich auf die Variation einiger Parameter.

Der interessanteste ist dabei sicherlich der Molenbruch, sprich das Verhältnis zwischen DPPE und DMPC in den gemischten Vesikeln, über welchen ja letztendlich die Ankerdichte auf der Oberfläche eingestellt werden soll. Desweiteren wurden der Einfluß von Temperatur T , pH, Konzentration c und Fusionsdauer t untersucht.

Für die Experimente zu den Abhängigkeiten wurden, falls nicht gesondert erwähnt, folgende **Standardparameter** verwendet und nur der jeweils zu untersuchende Parameter variiert.

$$x=0.3$$

$$T=50 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$\text{pH } 5.5 \text{ (MES, NaOH)}$$

$$c_{\text{Lipid}}=0.1 \text{ mM}$$

$$t=15\text{-}20 \text{ h}$$

3.3.3.1 Molenbruch

Schon in der Arbeit von Dr. Steffen Lingler [Lin 99] wurde der Einfluß des Molenbruchs im Vesikel auf Filmkapazität und Widerstand diskutiert. Für **4-5 stündige Fusion** fand er den in Abb. 62 wiedergegebenen Verlauf über dem Molenbruch. Die Filmkapazitäten liegen über große Teile des Molenbruchs bei $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und werden erst für Filme aus der Fusion von Vesikeln mit weniger als 20% Thiolipid ($x \leq 0.2$) schlechter.

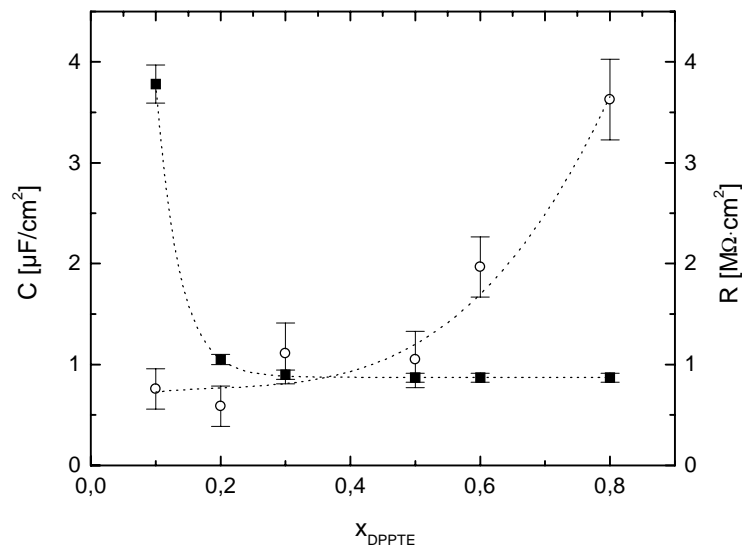


Abb. 62 Molenbruchabhängigkeit von Filmkapazität ■ und Widerstand ○ für 4-5 h Fusion (aus [Lin 99]).

In dieser Arbeit wurde in der Regel über Nacht (**15-20 h**) fusioniert. Dabei nehmen denn auch die Filme mit weniger als 20 % Thiolipid die gleichen Kapazitäten an und lediglich die Filme aus der Fusion reiner DMPC-Vesikel ($x = 0$) fallen aus dem Rahmen (s. Abb. 63).

Ein stetiges Verhalten des Widerstands über dem Molenbruch konnte nicht gefunden werden.

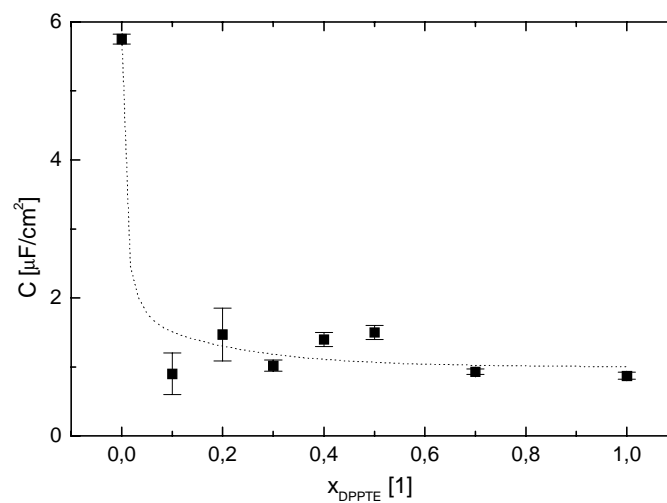


Abb. 63 Molenbruchabhängigkeit der Filmkapazität für 15-20 h Fusion.

Allein schon die Tatsache, daß die Molenbruchabhängigkeit der Kapazität für längere Fusionen weniger stark ausgeprägt ausfällt, deutet darauf hin, daß sich die Filme, wenn man lange genug fusioniert, unabhängig vom Molenbruch in den Vesikeln, in ihren elektrischen Werten angleichen.

3.3.3.2 Temperatur

Experimente zur Temperaturabhängigkeit des Vesikelfusionsprozesses ergaben, daß für Temperaturen von 40 und 50 °C Bilayer mit den üblichen, guten elektrischen Werten erhalten wurden, während sie für 30 °C viele Defekte ($7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; $100 \text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$) enthielten.

Um dies zu erklären, wurden von Herrn Dipl. Chem. Andreas Kerth (Universität Halle) DSC-Messungen für reine DMPC-, DPPTE- und für $x=0.3$ -Vesikel durchgeführt.

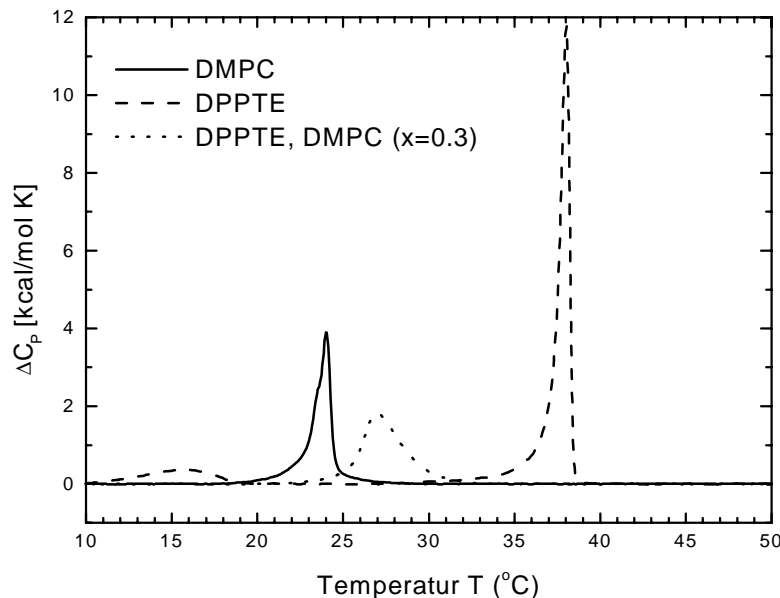


Abb. 64 DSC-Spektren für DMPC, DPPTE und DMPC/DPPTE (7:3)-Vesikel.

Der jeweils erste Aufwärtsscan (60 K/h) ist in Abb. 64 aufgezeigt. Der DPPTE-Bilayer besitzt eine Umwandlungstemperatur von 38 °C, der reine DMPC-Bilayer die bekannte T_m von annähernd 24 °C. Die gemischten Vesikel ($x=0.3$) zeigen nur einen, dafür aber breiten Umwandlungspeak um 27 °C. Dies spricht für homogen gemischte Vesikel ohne Phasenseparation. Da man sich für Fusionen bei $T \approx 30^\circ\text{C}$ noch im Phasenumwandlungsbereich befindet, ist die laterale Mobilität der Lipide in der Membran wohl eingeschränkt und Defekte können nicht so schnell ausheilen wie in der flüssig-kristallinen Phase. Die laterale Diffusionskonstante liegt für Lipide in der Gelphase bei $D < 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ und ist somit ca. zwei Dekaden kleiner als in der flüssig-kristallinen Phase ($D=10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$) [Gen 89].

3.3.3.3 pH-Wert

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit des Fusionsprozesses vom pH-Wert wurden, um einen möglichst großen pH-Bereich abzudecken, in einem Citrat-Phosphatpuffer ($2.6 < \text{pH} < 7.0$) [Moh 95] und nicht wie sonst in MES-Puffer durchgeführt. Die absoluten Kapazitätswerte der Membranen waren für pH 7.0 und 5.5 zwar etwas höher als für entsprechende Versuche in MES-Puffer, der Trend war allerdings der gleiche. Alle aus den Fusionen entstandenen Filme zeigten unabhängig vom pH-Wert optische Schichtdicken um 40-45 Å ($n=1.5$), sollten also größtenteils Bilayer-Strukturen zuzuordnen sein.

| pH | C[$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] | Resultat |
|-----|--------------------------------|---------------------|
| 7.0 | 4.1 | sehr löchriger Film |
| 5.5 | 1.7 | |
| 4.0 | 1.2 | Esterspaltung |
| 2.6 | 0.6 | Esterspaltung |

Tab. 6 Kapazitätswerte für Bilayer aus gemischter Vesikelfusion bei verschiedenen pH-Werten. Die Kapazitätsmessungen selbst erfolgten bei pH 7 in 100 mM NaCl.

Aus Fusionen bei pH 7.0 resultieren nur sehr löchrige Filme mit einer Kapazität um $4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Je saurer das System wird, um so kleiner werden auch die Filmkapazitäten. Um dieses Verhalten dem Vorliegen verschiedener Lipidspezies zuzuschreiben, wurden mit Material aus den Inkubationslösungen **Dünnschichtchromatogramme** angefertigt.

Für **pH 7.0 und 5.5** wurden nur die eingesetzten Lipide selbst gefunden.

Unter den beiden sauersten Bedingungen (**pH 4.0 und 2.6**) liegt allerdings, wie die DC-Messungen in Abb. 65 zeigen, schon ein Großteil der Lipide in Form von Fettsäuren bzw. Lysolipiden vor. Vor allem das Thiolipid DPPTE reagiert in diesem Bereich sehr drastisch auf den pH-Wert. Während man bei pH 4.0 noch einen Fleck für das intakte DPPTE in der Inkubationslösung findet, bleibt dieser für die saurere Lösung mit pH 2.6 völlig aus. Hier liegen also alle ehemaligen DPPTE-Moleküle entweder als Lysolipid oder Glycerophosphothioethanol vor.

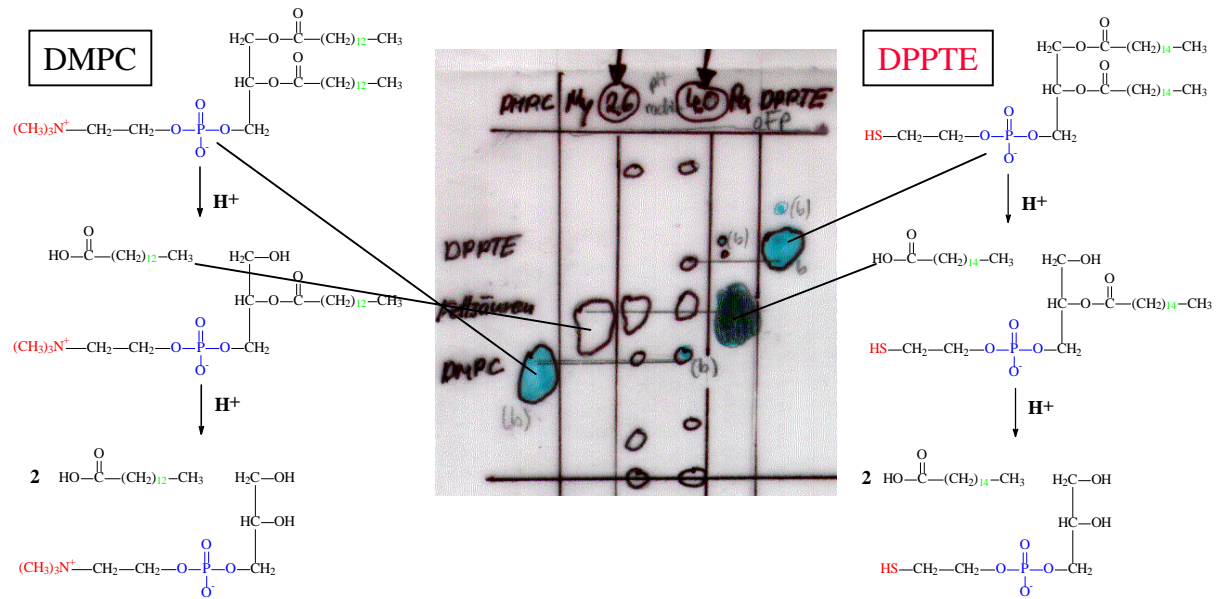


Abb. 65 Dünnschichtchromatogramm für gemischte DPPTE/DMPC-Vesikeldispersionen ($x=0.3$) bei pH 2.6 und 4.0 aus Inkubationslösung (Mitte). DMPC und Myristinsäure (links) sowie Palmitinsäure und DPPTE (rechts) wurden als Referenzen mitlaufen lassen. Laufmittel war $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ (13:5:1), Detektion erfolgte durch schwefelsaures Ammoniummolybdat und anschließendes Veraschen.

Es ist vorstellbar, daß die Moleküle mit nur einer Fettsäure eine höhere laterale Beweglichkeit besitzen und somit besser zum Auffüllen von Defekten befähigt sind.

Der starke Unterschied in den Filmkapazitäten zwischen pH 5.5 und 7.0 sollte aber nicht auf das Vorliegen einkettiger Moleküle zurückzuführen sein. Allerdings liegt auch kein pK_S -Wert einer funktionellen Lipid-Gruppe in diesem pH-Bereich. Die Thiofunktion hat in vergleichbaren Molekülen wie Cystein einen pK_S -Wert von 8.3 [Voe 92]. Bei pH 7 liegen also immer noch weit über 90 % als Thiol vor. Zudem sollte das Thiolat ebenfalls adsorbieren. Dieser Effekt ist demnach immer noch ungeklärt.

3.3.3.4 Konzentration

Die optischen Schichtdicken und elektrischen Endwerte zeigten keine eindeutige Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in der Inkubationslösung. Der Schichtdickenzuwachs war wie erwartet am schnellsten für die höchstkonzentrierte Vesikeldispersion. Nach Spülen mit Puffer lagen die Schichtdicken für alle Filme um 40 Å.

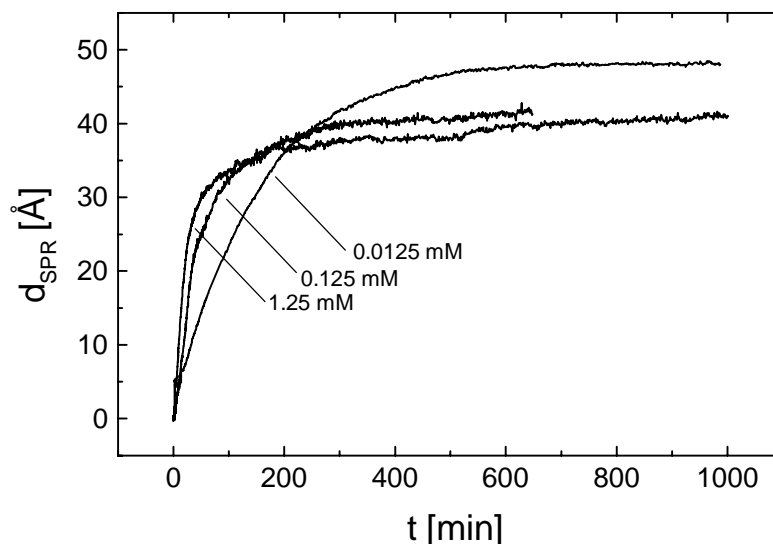


Abb. 66 Konzentrationsabhängigkeit der gemischten Vesikelfusion ($x=0.3$, $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.5$). Spülschritte sind nicht gezeigt.

Die Ermittlung von Diffusionskonstanten aus den Anfangssteigungen war aufgrund von Temperturgleichungsvorgängen nach Injektion der Vesikeldispersion (bei $T=50^{\circ}\text{C}$) nicht möglich.

3.3.3.5 Fusionsdauer

In Kap. 3.3.3.1 wurde bei der Diskussion des Einflusses des Molenbruchs auf die Bilayerkapazität schon zwischen 4-5- und 15-20-stündiger Fusion unterschieden. Dabei ging für längere Fusionen der Einfluß des Molenbruchs auf die Membrankapazität verloren, was einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines zeitabhängigen Austauschprozesses gab.

Für die gängige Lipidkonzentration von $c=0.125\text{ mM}$ und den üblichen Molenbruch von $x=0.3$, erreicht man in der **optischen Dicke** nach ca. 5 h ein Plateau.

Ergebnisse aus der zeitaufgelösten **Impedanzspektroskopie** waren in ihrem Zeitverlauf nicht so einheitlich, was aufgrund der in Kap. 1.6.3 geführten Diskussion über das Zustandekommen der gemessenen Kapazität aus Helmholtz- und Membrankapazität auch nicht zu verwunderlich ist. Auch geben Impedanzspektroskopie und optische Dicke keine Information über die molekulare Ursache der zeitlichen Änderungen.

Eine wesentlich geeignetere Meßgröße ist die Ankerdichte, also die Oberflächenbelegung mit Thiolipid. Der zeitliche Verlauf der Ankerdichte wurde mittels zeitaufgelöster reduktiver Desorption (s. Kap. 3.3.4.3) ermittelt und ist zusammen mit dem zeitlichen Verlauf der optischen Schichtdicke für 2 Konzentrationen in Abb. 72 aufgezeigt und wird dort näher diskutiert.

3.3.3.6 Ionenstärke

Um den Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf den Fusionsprozeß zu überprüfen, wurde dieser in MES-Puffer (100 μ M, pH 5.5) bei NaCl-Konzentrationen von 1, 10 und 100 mM durchgeführt. Anschließend wurde die Probe mit dem Inkubationspuffer gespült und in 100 mM NaCl mittels Impedanzspektroskopie vermessen.

| c_{NaCl} [mM] | C [μ F/cm ²] | R [$M\Omega \cdot \text{cm}^2$] |
|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 0.94 | 2.5 |
| 10 | 1.03 | 1.9 |
| 100 | 1.06 | 0.5 |

Tab. 7 Filmkapazitäten und Widerstände für Inkubationspuffer variabler Ionenstärke.

Die Unterschiede in den Kapazitäten waren minimal, während die Widerstände für Inkubationslösungen mit geringer Ionenstärke am höchsten ausfielen.

Die hier aufgezeigten Tendenzen sind sehr wahrscheinlich auf die durch die Ionenstärke des Puffers bedingte Dicke der diffusen Doppelschicht (s. a. Kap. 1.6.1) und deren möglichen Einfluß auf den Fusionprozeß zurückzuführen. Dieser würde dementsprechend bei geringer Elektrolytkonzentration, also einer großen Debye-Länge am effizientesten erfolgen.

Es könnte allerdings auch sein, daß durch die Fusion bei niedriger Ionenstärke und den anschließenden Wechsel auf eine einheitliche, höhere Ionenstärke (zur Ermittlung der Membrankapazität) sonst nur teilgespreitete oder adsorbierte Vesikel aufbrechen und ausrollen und hierdurch die elektrischen Werte verbessern.

3.3.4 Oberflächenbelegung mittels reduktiver Desorption

Die reduktive Desorption ist eine für **Alkanthiole** relativ gut etablierte Technik, welche sich unter den in Kap. 1.6.2.2 erwähnten Einschränkungen zur Bestimmung von Desorptionspotentialen und Oberflächenbelegungen eignet.

3.3.4.1 Durchführung

Zur reduktiven Desorption wurden Proben in eine mit Stickstoff oder Argon spülbare Meßzelle [Arn 98] eingespannt, mit 0.5 M KOH bedeckt und 15 min. unter Durchleitung von Stickstoff oder Argon von Sauerstoff befreit. Durchführung eines zyklischen Voltammogramms zwischen 0 und -1.25 V (vs. Ag/AgCl 3M) mit einer Geschwindigkeit $v = 100$ mV/s resultiert in reduktiver Desorption und eventueller oxidativer Readsorption.

3.3.4.2 Reduktive Desorption selbstorganisierter DPPTE-Monolayer

Für die Desorption von **Thiolipiden** kommen im Vergleich zu den Alkanthiolen zwei zusätzliche Probleme erschwerend hinzu. Während es sich bei selbstorganisierten Alkanthiolmonolayern um relativ gut gepackte, isolierende Schichten handelt, die sich auch unter den Desorptionsbedingungen nicht verändern, liegen Thiolipidmonolayer oder Submonolayer mit verringerter Ankerdichte wesentlich ungeordneter vor und ermöglichen hierdurch eventuell sogar den Zutritt von Elektrolyt zur Elektrode. Zudem findet man gerade in Glycerophospholipiden oft Esterbindungen zu Fettsäuren vor, welche unter den sehr alkalischen Desorptionsbedingungen irreversibel gespalten werden. Hierdurch tritt einerseits eine Vergrößerung der Anzahl möglicher Spezies auf der Oberfläche ein und zudem wird die Zugänglichkeit der Elektrode für den Elektrolyten erhöht, was wiederum zu einer Verbreiterung des Desorptionspeaks aufgrund eines undefinierten Spannungsabfalls über die Membran führt.

Im Falle des DPPTE können durch alkalische Esterspaltung theoretisch 3 weitere Thiolspezies auf der Oberfläche entstehen. Und zwar 2 Lysolipide mit nur noch einer veresterten Fettsäure in sn-1- oder sn-2-Position und ein Glycerophosphothioethanol, dessen beide Fettsäuren hydrolysiert wurden.

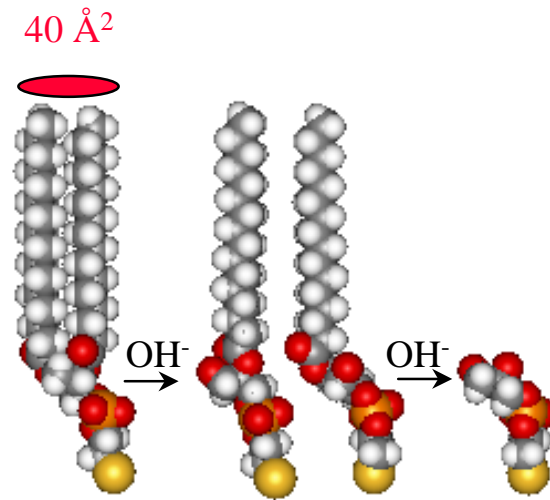


Abb. 67 Mögliche Produkte aus der alkalischen Hydrolyse von DPPTE.

Dies mag denn auch die Peakvielfalt aus Abb. 68 erklären, die man bei dem alleinigen Vorhandensein eines selbstorganisierten, stabilen Films von DPPTE (SAM) auf monokristallinem Au(111) sonst nicht erwarten würde.

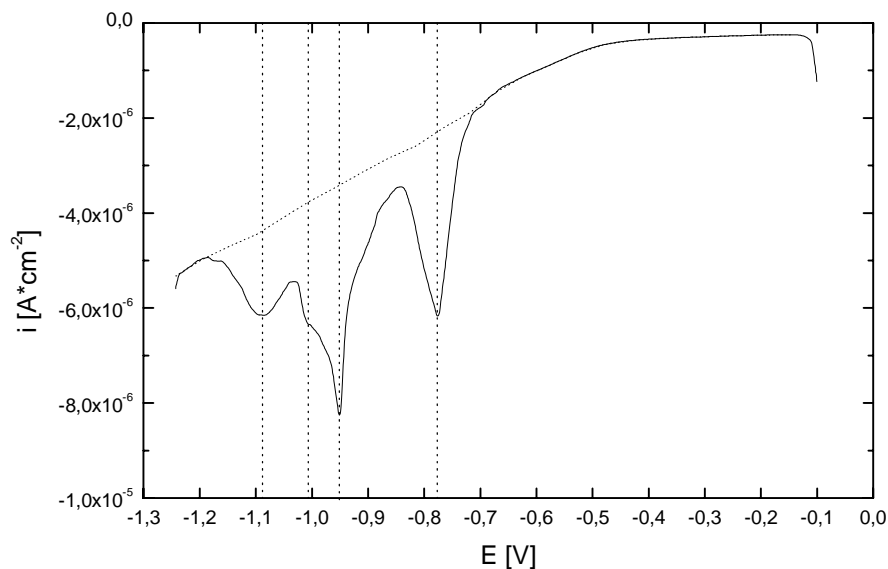


Abb. 68 Erster reduktiver Scan ($v=0.02$ V/s) für einen DPPTE-SAM auf Au(111) in 0,5 M KOH.

Integration:

Trotz des Vorhandenseins mehrerer Spezies sollte die Integration über alle Peaks die Anzahl der Au-S-Bindungen vor der Modifikation durch das alkalische Desorptionsmedium und somit die Anzahl der DPPTE-Anker widerspiegeln. Die **Ladungen/Fläche** erhält man, indem man die Peakfläche durch die Vorschubgeschwindigkeit $v=dE/dt$ der Spannung teilt.

$$\frac{Q}{A} = \int \frac{I}{A} dt = \frac{1}{v} \int i dE = 3.70 \cdot 10^{-5} [\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

Teilt man diesen Wert dann noch durch die Faraday-Konstante $F_A=96485$ [C/mol], so erhält man die **Anzahl der reduzierten Thiol-Au-Bindungen**.

$$\frac{n}{A} = \frac{Q}{A \cdot F_A} = \frac{3.7 \cdot 10^{-5}}{96485} = 3.83 \cdot 10^{-10} [\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

Dieser Wert entspricht einem mittleren Flächenbedarf von 43 [$\text{\AA}^2/\text{Molkül}$], was dem Flächenbedarf eines zweikettigen Glycerophospholipids von ca. 40 $\text{\AA}^2/\text{Molekül}$ ziemlich nahe kommt. Hierbei sind allerdings wieder die Einschränkungen bei der Angabe absoluter Belegungsdichten und Flächenbelegungen zu beachten (s. Kap. 1.6.2.2).

Peakzuordnung:

In dem ersten reduktiven Scan erkennt man 3 Peaks, wobei der mittlere noch eine Schulter aufweist. Im oxidativen Rückscan (s. Abb. 69) tauchen lediglich 2 Peaks auf.

| E_{red} [V] | E_{ox} [V] | Zuordnung |
|----------------------|---------------------|---------------------------|
| -0.78 | kein | Glycerophosphothioethanol |
| -0.95 -1.01 | -0.83 | Lysolipide |
| -1.09 | -0.93 | intaktes DPPTE |

Tab. 8 Desorptions- und Readsorptionspotentiale für einen DPPTE-SAM im 1. Zyklus.

Die Spezies welche als Erste, bei ca. -0.78 V desorbiert, scheint relativ gut löslich und während des Scans ausreichend weit von der Elektrodenoberfläche wegdiffundiert zu sein, da sich kein Reoxidationspeak bei weniger negativen Potentialen findet. Dies legt es nahe, diesen Peak dem **Glycerophosphothioethanol** zuzuschreiben, welches wegen der fehlenden Fettsäureketten die beste Löslichkeit in Wasser besitzen und aufgrund der geringsten Separation zwischen Elektrode und Elektrolyt auch das niedrigste Reduktionspotential aufweisen sollte.

Der verbreiterte Peak mit der Schulter könnte durch die Desorption der beiden möglichen **Lysolipide** hervorgerufen werden.

Der Peak mit dem höchsten Reduktionspotential müßte demnach auf Domänen des noch intakten **Thiolipids** zurückzuführen sein.

Die beiden letzteren Spezies können aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit nicht ausreichend weit von der Elektrode wegdiffundieren, so daß man entsprechende oxidative Readsorptionspeaks findet.

Im ersten Reoxidationsscan als auch im zweiten Reduktionsscan kann man noch zwischen zwei Spezies unterscheiden. Die Tatsache, daß man zwischen den einzelnen Spezies überhaupt differenzieren kann, legt die Vermutung nahe, daß die alkalische Hydrolyse in Domänen erfolgt. Dies ist auch einsichtig, wenn man bedenkt, daß zur Esterspaltung der Elektrolyt bis zur Esterbindung weit in den hydrophoben Teil des Monolayers eindringen muß und somit ein schon vorhandenes Lysolipid einen wesentlich besseren Angriffspunkt für die Hydrolyse eines benachbarten Lipids darstellt. Die Moleküle würden demnach aus Domänen desorbiert und sich im zunehmenden Verlauf des Experiments in der Akkumulationsschicht bzw. auf der Oberfläche vermischen, was sich in einem verbreiterten Peak für Adsorption und Desorption in den folgenden Zyklen niederschlägt.

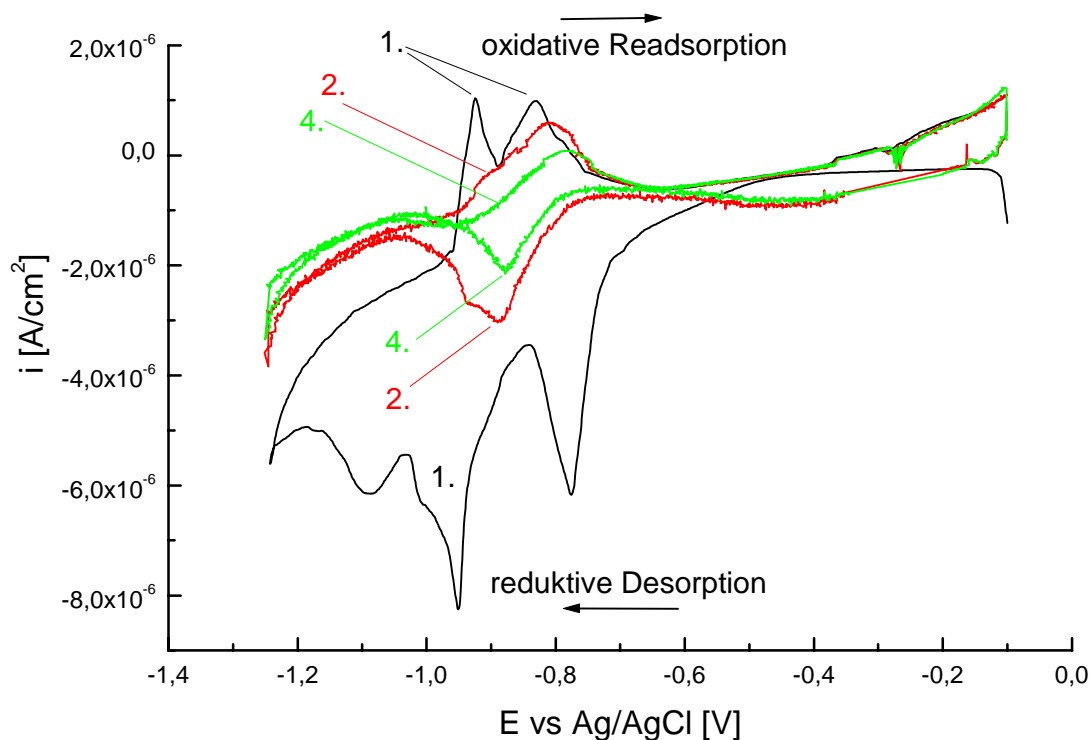


Abb. 69 Erster, zweiter und vierter Scan-Zyklus bei der reduktiven Desorption eines selbstorganisierten DPPTE-Monolayers auf Au(111) in 0.5 M KOH.

3.3.4.3 Zeitaufgelöste reduktive Desorption bei der Fusion gemischter Vesikel auf Gold

Bei der Diskussion der Zeitabhängigkeit der direkten Fusion gemischter Thiolipid/Lipid-Vesikel auf Gold (in Kap. 3.3.3.5) wurde erwähnt, daß die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Ankerdichte mehr Aufschlüsse über die Vorgänge auf der Oberfläche geben könnte als die alleinige Untersuchung von optischer Schichtdicke und Filmkapazität.

Hierzu wurde ein ganzer Satz BK7-Gläser mit aufgedampften Cr/Au-Elektroden in einem Färbekasten in der entsprechenden gemischten DPPTE/DMPC-Vesikeldispersion bei $T=50^{\circ}\text{C}$ inkubiert und zu bestimmten Zeiten wurden Proben aus der Inkubationslösung herausgenommen. Zur Entfernung allen nichtgebundenen Lipids wurde der Träger mehrfach durch die Wasser-Luft-Grenzfläche getaucht, 5 Minuten in Ethanol gelagert und abermals mit Wasser und Ethanol gespült und trockengeblasen. Anschließend wurde die reduktive Desorption durchgeführt und der Wasser-Kontaktwinkel bestimmt.

Die Messungen mußten auf polykristallinem Gold auf BK7-Glas mit einer Cr-Adhäsionsschicht durchgeführt werden, da monokristallines Au(111) auf Mica die lange Inkubationsprozedur unter erhöhter Temperatur nicht überstand. Durch die Verwendung polykristallinen Goldes kann es in hochgepackten Alkanthiolmonolayern zu einer Peakaufspaltung aufgrund der Thiolbindung zu Gold unterschiedlicher Kristallinität kommen [Wid 91, Zho 97, Zho 97a]. Im Falle der hier vorliegenden inhomogenen Submonolayer, welche zudem unter den alkalischen Desorptionsbedingungen weiter modifiziert werden können, sollte dieser Effekt aber allemal in einer weiteren Peakverbreiterung resultieren.

Abb. 70 und Abb. 71 zeigen den jeweils ersten reduktiven Scan nach verschiedenen Inkubationszeiten für zwei verschiedene Lipidkonzentrationen ($c=0.1$ und 1 mM) der Inkubationslösung.

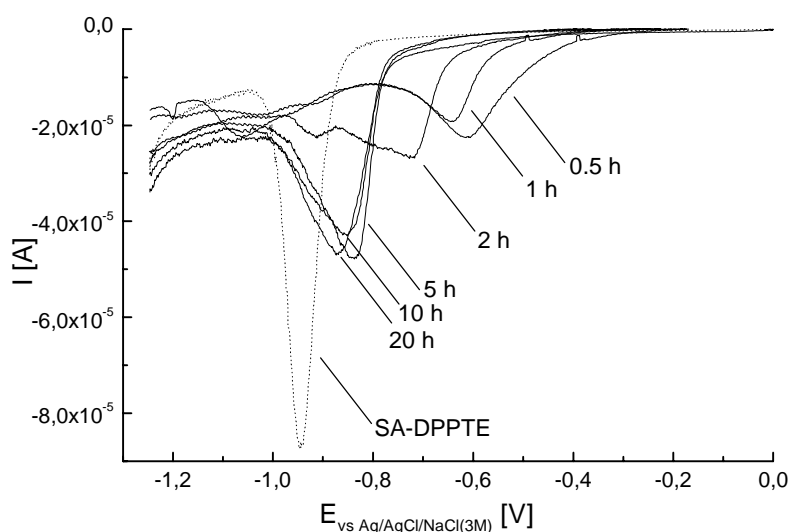


Abb. 70 Reduktive Desorption von DPPTE während gemischter Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$; $c=0.1$ mM).

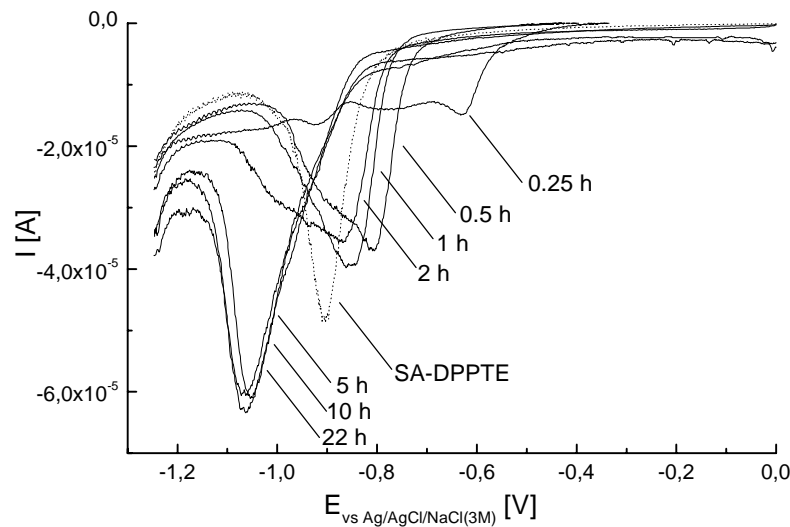


Abb. 71 Reduktive Desorption von DPPTE während gemischter Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$; $c=1.0$ mM).

Man erkennt, daß sich mit zunehmender Inkubationszeit die Desorptionspeaks zu negativeren Potentialen verschieben, schärfer werden und an Peakfläche gewinnen. All diese Phänomene können über eine Erhöhung der Ankerdichte und die damit verbundene bessere und schärfere Separation zwischen Elektrolyt und Elektrode erklärt werden. Zudem sind Domänen mit erhöhter Ankerdichte natürlich auch wieder weniger angreifbar für die alkalische Esterhydrolyse.

All diese Nebeneffekte wie alkalische Esterhydrolyse, schlechte Ladungsseparation, Polykristallinität des Goldes, usw. sollten hier aber lediglich zu einer Peakvielfalt und Peakverbreiterung führen.

Interessant ist auch anzumerken, daß SA-DPPTE-Monolayer auf polykristallinem Gold nur einen breiten Desorptionspeak um $- (0.9 - 0.95$ V) zeigen, also ziemlich genau im Zentrum der Peaks auf monokristallinem Gold (s. Abb. 68). Dies läßt vermuten, daß die Esterspaltung für Monolayer auf dem rauheren, polykristallinen Gold, aufgrund der besseren Zugänglichkeit der Esterbindung, nicht streng in Domänen erfolgt und somit in einer homogenen Mischung der Spezies aus Abb. 67 auf der Oberfläche resultiert.

Die **Integration** über alle Peaks sollte davon unbetroffen weiter die Anzahl der zur Desorption von Au-S-Bindungen verwandten Ladungen und somit die Ankerdichte widerspiegeln.

Da es sich um Relativmessungen in einer Goldcharge handelt, sollte auch der Einfluß unterschiedlicher Oberflächenrauigkeit bzw. Kristallinität nicht zur Geltung kommen.

Die **zeitabhängigen Flächenbelegungen**, normalisiert auf einen aus Chloroform selbstorganisierten DPPTE Film (100%), sind zusammen **mit den zugehörigen Kontaktwinkeln** in Abb. 72 aufgetragen. Es ist auffällig, daß sich die zeitlichen Änderungen von Kontaktwinkel und Oberflächenbelegung nahezu identisch verhalten. Zum Vergleich ist auch der Verlauf der optischen Schichtdicke einer identisch behandelten Probe aufgezeigt. Optische Schichtdicke, Flächenbelegung und Kontaktwinkel scheinen für beide Konzentrationen nach ca. 5 Stunden ein Plateau zu erreichen.

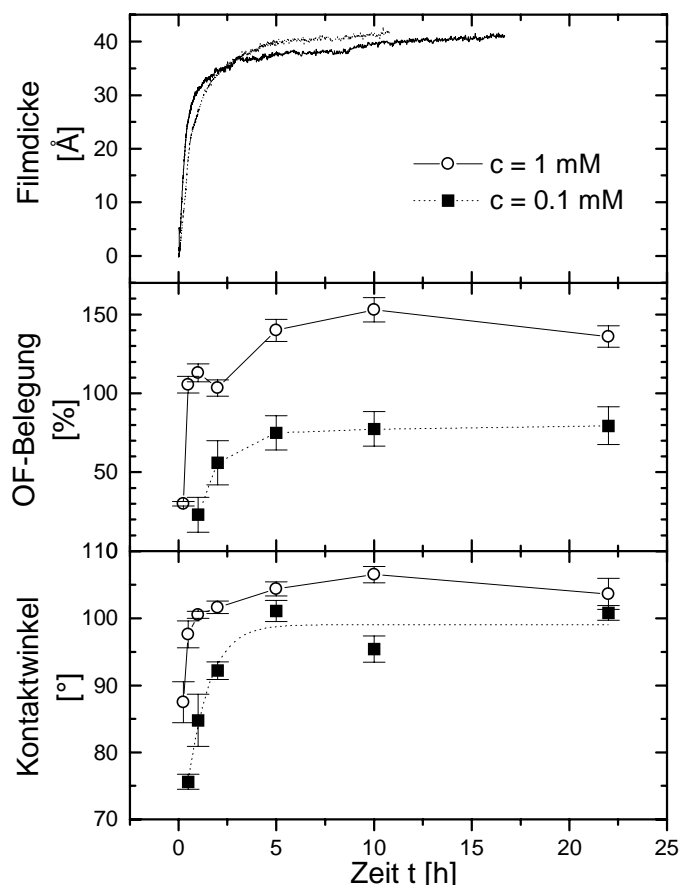


Abb. 72 Filmdicke, Flächenbelegung und Wasser-Kontaktwinkel für gemischte Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$) bei zwei verschiedenen Lipidkonzentrationen ($c=0.1$ mM ■ und 1 mM ○). Oberflächenbelegungen sind auf die reduktive Desorption eines DPPTE-SAM (=100%) auf derselben Goldcharge normiert.

Diese Studie zeigt aber auch eindeutig, daß sich während des Fusionsprozesses Thiolipide auf der Goldoberfläche akkumulieren und das hin zu Oberflächenbelegungen die der eines selbstorganisierten DPPTE-Monolayers ziemlich nahe kommen.

Für die hohe Lipidkonzentration ($c=1$ mM) ist die Normierung etwas kritisch und liefert Oberflächenbelegungen von >100 %, weil hier der DPPTE-Referenz-SAM auf welchen normiert wurde in der Desorption eine zu geringe absolute Belegung ergab.

Für den Fall der niedrigeren Standardkonzentration ($c = 0.1 \text{ mM}$) ergaben sich immer finale Belegungsdichten um 80-85% des DPPTTE-SAM und man kann zudem auch gut erkennen, daß sich die Oberflächenbelegung noch ziemlich stark ändert, wo die optische Schichtdicke schon fast den Plateauwert erreicht hat.

Demnach kommen eigentlich nur 2 **Prozesse** für diese Akkumulation in Frage (s. Abb. 73). Über die in der flüssig-kristallinen Phase schnelle Lateraldiffusion ($D = 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) können aus adsorbierten bzw. teilausgerollten Vesikeln weitere Thiolipide zur Elektrodenoberfläche gelangen und dort irreversibel binden.

Auch ein denkbarer flip-flop-Prozeß zwischen einem oberflächenproximalen DMPC- und einem oberflächendistalen DPPTTE-Molekül könnte zur Anreicherung von Thiolipid auf der Elektrode beitragen, obwohl vergleichbare flip-flop-Halbwertszeiten in Vesikeln ($\tau_{1/2} =$ viele Stunden bis Tage [Gen 89]) in dem Zeitfenster der Fusion keine große Rolle spielen sollten. Wahrscheinlich ist die Behinderung dieser Vorgänge auch der Grund dafür, daß die Akkumulation bei ca. 80-85% der Oberflächenbelegung des SAMs stoppt.

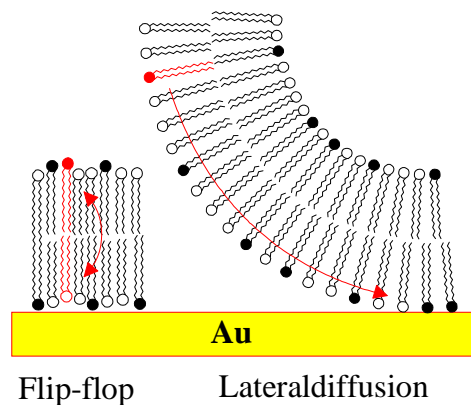


Abb. 73 Mögliche Prozesse zur Akkumulation von Thiolipid auf der Oberfläche

Mit Sicherheit kann man aber sagen, daß sich der Molenbruch der Lipide in den gemischten Vesikeln nicht einfach auf die Ankerdichte im oberflächennahen Monolayer überträgt. Wegen der aufgezeigten Akkumulationsprozesse muß auf jeden Fall eine Zeitabhängigkeit berücksichtigt werden. Lipidkonzentration und Temperatur beeinflussen wiederum indirekt über die Geschwindigkeit der Akkumulationsprozesse diese Zeitabhängigkeit.

Durch Inkubation von gemischten Vesikeln mit 30% Thiolipid läßt sich demnach nicht der festkörperunterstützte Bilayer mit genau 30% Ankerdichte aufbauen. Die Filme sind nach den üblichen Inkubationszeiten zwar gegenüber dem DPPTTE-SAM, zumindest für die Standardkonzentration ($c = 0.1 \text{ mM}$), leicht verdünnt, besitzen aber mit ca. 80-85% Thiolipiden im oberflächennahen Layer eine doch weitaus höhere Ankerdichte als gewünscht.

3.4 Spacer-Lipid Membranen

Als Thiolipid mit einem hydrophilen Spacer stand vor allem das Molekül **JM335** zur Verfügung. Es besteht im wesentlichen aus einer Phytansäure, welche über eine Amidbindung an den hydrophilen Spacer mit der endständigen Thiofunktion angekoppelt ist. Phytansäuren findet man in veresterter Form in Glycerophospholipiden vieler Archaeobakterien. Dort sorgen sie für tiefe Umwandlungstemperaturen der Zellmembranen bei geringer Permeabilität [Lou 73, Jan 77].

Beim Molekül **JM370** handelt es sich um den entsprechenden Spacer, welcher lediglich mit einer sehr kurzen Essigsäure anstatt langkettiger Fettsäuren terminiert ist.

Die Moleküle **JM386**, **387** und **362** standen nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung und wurden hauptsächlich auf dem Trog untersucht.

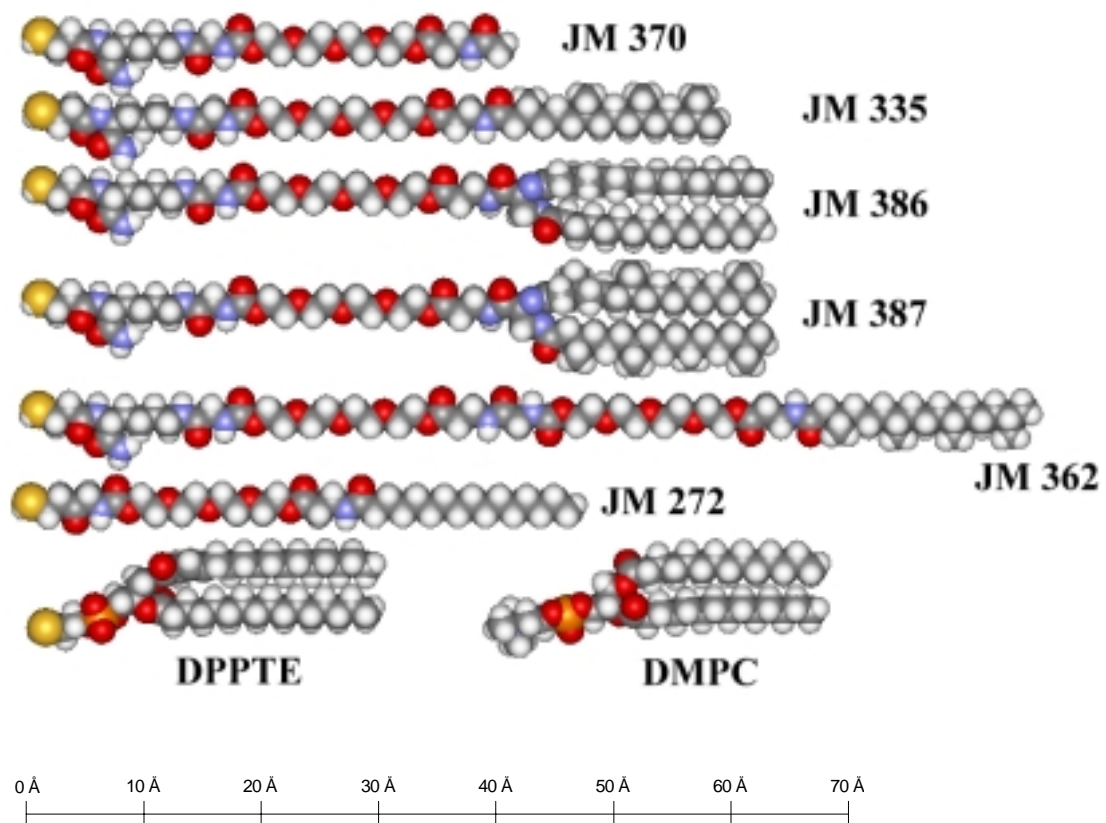


Abb. 74 Kalottenmodell der Thiolipide und DMPC.

Die Strukturformeln zu den Kalottenmodellen in Abb. 74 befinden sich in Abb. 5.

3.4.1 Ersatzschaltkreis

Der Ersatzschaltkreis für die Bilayer aus Spacerlipiden unterscheidet sich von den bisher untersuchten Systemen in dem wasserquellbaren, hydrophilen Spacerbereich.

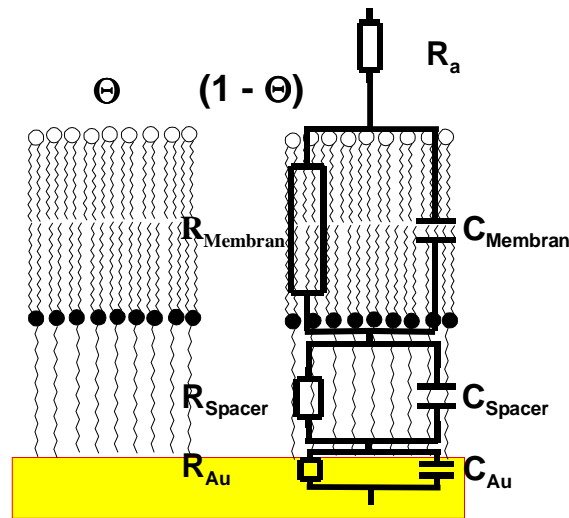


Abb. 75 Möglicher Ersatzschaltkreis für Bilayer aus Spacer-Lipiden

Hierdurch kann Elektrolyt bis nahe an die Elektrode herandrängen, was in einer großen Helmholtzkapazität resultiert. Selbstorganisierte Filme des nur mit einer Essigsäure veresterten Spacers JM370 sollten die elektrische Situation für den reinen Spacerbereich ziemlich gut widerspiegeln und sind durch niedrige Widerstände bei hohen Kapazitätswerten charakterisiert (s. Abb. 76, Tab. 9).

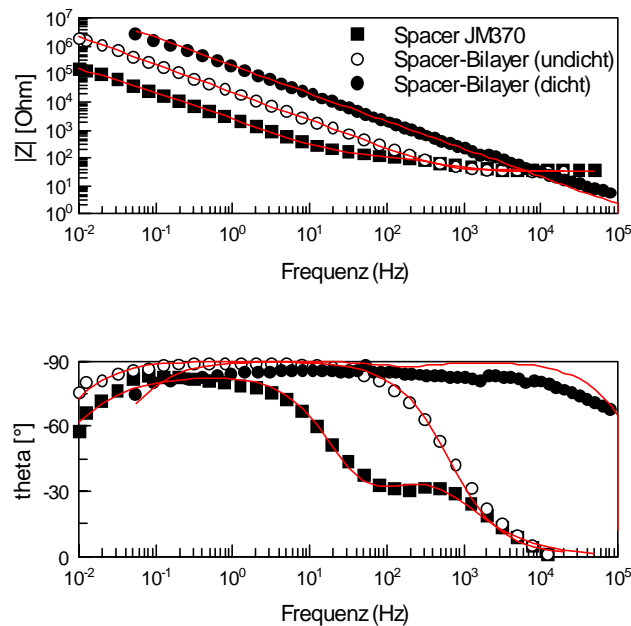


Abb. 76 Impedanzspektren für Spacer JM370 ■, JM335/EigelbPC-Bilayer auf großer Elektrode mit Defekten ○ und defektfrei auf Mikroelektrode ● sowie zugehörige Fits (—).

| Element | | Spacer JM370 | JM335/EigelbPC-Bilayer (defekt) | JM335/EigelbPC-Bilayer (defektfrei) |
|------------|----------------------|--|--|--|
| Elektrolyt | R_a | 35 Ω | 35 Ω | 2 Ω |
| Membran | R_{Membran} | | <i>10 Ω</i> | 15 MΩ |
| | C_{Membran} | | <i>0.72 μF</i> | 0.72 μF |
| Spacer | R_{Spacer} | 87 Ω (65) | 8 MΩ | <i>8 MΩ</i> |
| | C_{Spacer} | 8.6 μF (8.2) | 8.6 μF (8.2) | <i>8.6 μF (8.2)</i> |
| Au | R_{Au} | 270 kΩ (400) | <i>270 kΩ (400)</i> | <i>270 kΩ (400)</i> |
| | C_{Au} | 70μF (75; $\alpha=0.92$) | <i>70μF (75; $\alpha=0.92$)</i> | <i>70μF (75; $\alpha=0.92$)</i> |

Tab. 9 Werte für die Ersatzschaltkreis-Elemente für reinen Spacer JM370, sowie defekthaltige und defektfreie Bilayer mit JM335. Werte in Klammern resultieren aus Fits mit einem CPE statt einer konkreten Kapazität. **Fette große Werte** bestimmen die Zeitkonstanten während *kursive kleine Werte* so gut wie keinen Einfluß auf das Aussehen des Spektrums haben.

Bringt man auf den Spacer nun einen **elektrisch nahezu dichten Bilayer** mit einem hohen Widerstand R_{Membran} und einer vergleichsweise geringen Kapazität C_{Membran} auf, so sieht man in einer Serienschaltung nur die geringe Kapazität. Die elektrischen Werte des Spacers haben hier so gut wie keinen Einfluß auf das Impedanzspektrum. Für das Spacerlipid JM335 konnte diese Situation nur in Bilayern mit Eigelb-PC auf Mikroelektroden (mit Flächen um $5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$) verwirklicht werden (s. Kap. 3.4.3).

Ist die Bedeckung allerdings nicht vollständig, existieren also **Defekte** parallel zu intaktem Bilayer, so resultiert dies in einem Kurzschluß des Membranwiderstandes R_{Membran} und es stellt sich eine Kapazität in Abhängigkeit vom Bedeckungsgrad Θ bzw. der Defektdichte ein. Das ist die Situation, welche auf den üblicherweise verwendeten Makroelektroden für kombinierte Messungen in Elektrochemie und Optik (mit Flächen um $5 \cdot 10^{-1} \text{ cm}^2$) vorherrscht.

Für das **Lipid JM335** wurden 3 **verschiedene Techniken** zum Aufbau von Lipidbilayern auf Makroelektroden ausgetestet.

a) Self-assembly von JM335 + Vesikelfusion

Monolayer von JM335 auf Makroelektroden zeigten Schichtdicken zwischen 28-30 Å (für $n_{\text{Schicht}} = 1.5$, was hier für den hydrophilen Teil sicherlich zu hoch gegriffen ist) bei Wasserkontaktwinkeln von $\Theta_{\text{sessile drop}} = 94-100^\circ$. Durch Eigelb-PC-Vesikelfusion wuchs die Dicke um weitere 22-24 Å an. Die Kapazitäten für die Monolayer lagen bei 7-8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und

blieben durch die Vesikelfusion nahezu unverändert. JM335-Monolayer zeigten in zyklischen Voltammogrammen mit dem löslichen Redoxpaar $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($c=1\text{ mM}$, $v=50, 100, 250\text{ mV/s}$) kleine Ströme ($10\text{-}25\ \mu\text{A/cm}^2$) mit geringer Scanspeedabhängigkeit beim Standardpotential. Nach erfolgter Vesikelfusion waren die Stromdichten nahezu unverändert mit einer etwas definierteren Diffusionskontrolle.

b) LB-Transfer bei 35 mN/m + Vesikelfusion

LB-Filme zeigten direkt nach dem Übertrag ebenfalls Kapazitäten um $7.5\ \mu\text{F/cm}^2$, welche sich nach längerer Zeit im Puffer auf Werte um $10\ \mu\text{F/cm}^2$ erhöhten. Die Vesikelfusion hatte wiederum keine Änderung der Filmkapazität zur Folge.

c) Fusion von gemischten JM335/DMPC-Vesikeln

Die direkte Fusion gemischter Vesikel aus JM335 und DMPC auf Gold ($x_{\text{JM335}}=0.3$, $c=0.1\text{ mM}$) resultierte in Schichtdicken um $70\text{-}75\ \text{Å}$ mit Kapazitäten von $8\text{-}9\ \mu\text{F/cm}^2$. Herauslösen der Fülllipide ergab sub-Monolayer mit Schichtdicken um $25\ \text{Å}$ und Kapazitäten um $8\text{-}9\ \mu\text{F/cm}^2$. Refusion von Vesikeln auf den sub-Monolayer ergab einen Schichtdickenzuwachs um $25\ \text{Å}$ ohne Veränderung der Kapazitätswerte.

Allen 3 Methoden gemeinsam ist, daß sich Filmkapazitäten zwischen 7 und $9\ \mu\text{F/cm}^2$ für die Monolayer ausbilden, welche sich durch Vesikelfusion auch nicht verbessern. Der gewünschte isolierende Bilayer wird also in keinem Fall richtig dicht. Die Tatsache, daß man einen diffusionsabhängigen, geringen Redoxstrom sehr nahe am Standardpotential des löslichen Redoxpaares beobachtet, deutet darauf hin, daß hier pinhole-artige Defekte vorliegen, in welchen die Redoxspezies nahezu ungehindert an die Elektrodenoberfläche gelangen kann.

Dies wäre auch im Einklang mit den Messungen auf Mikroelektroden. Dort wurden sowohl defektfreie als auch defekthaltige Membranen gefunden. Die Wahrscheinlichkeit Defekte auf einer Fläche von nur $5 \cdot 10^{-5}\text{ cm}^2$ zu finden ist aber gegenüber den Makroelektroden mit Flächen um $5 \cdot 10^{-1}\text{ cm}^2$ deutlich reduziert.

Die Schichtdicken der Monolayer liegen bei Annahme eines homogenen Brechungsindex von 1.5 über das gesamte Molekül bei $28\text{-}30\ \text{Å}$. Für den hydrophoben Phytansäurerest von ca. $20\ \text{Å}$ ist $n=1.5$ sicherlich auch ein guter Wert [Ulm 91]. Der Brechungsindex des hydrophilen Molekülteils sollte aber alleine schon durch die Ethylenglykolgruppen niedriger liegen. Für Triethylenglykol findet man einen Brechungsindex um $n=1.45$ [Bay], welcher in Abhängigkeit

von der Quellung mit Puffer ($n \approx 1.33$) natürlich noch geringer, das heißt kontrastärmer zum Puffer ausfallen sollte.

Die vergleichsweise hohen Kontaktwinkel zwischen 94 und 100° im Fall der JM335-SAMs lassen erahnen, daß die Molekülketten hier gestreckt und einigermaßen geordnet vorliegen. In einem **Zweiblockmodell** mit $n=1.4$ als mittlerem Brechungsindex für das puffergequollene, hydrophile Kompartiment [Sch 98, Bay] ergibt sich für dieses eine Schichtdicke von $35-40 \text{ \AA}$, bei einer angenommenen Dicke von 20 \AA (mit $n=1.5$) des Fettsäureblocks. Dies trifft die Größenverhältnisse in Abb. 74 ganz gut.

| Lipid | Monolayer | | Bilayer | |
|-----------|------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | Dicke [\AA] | C [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] | Zunahme [\AA] | C [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] |
| DPPE | 24-26 | 0.85 | 19-20 | 0.59 |
| JM272 | 25-30 | 5 | 45 | 2.6 |
| JM335 | 28-30 | 7-8 | 22-24 | 7-8 |
| sub-JM335 | 25 | 8-9 | 25 | 8-9 |
| JM386 | 30 | 6 | 60 | 5.5 |
| JM362 | 33 | 12 | | |

Tab. 10 Schichtdicken ($n=1.5$) und Kapazitäten für selbstorganisierte Monolayer und Bilayer nach Vesikelfusion (Makroelektroden).

Das kürzeste Spacer-Lipid **JM272** zeigte in den festkörperunterstützten Bilayern von allen Spacerlipiden noch die besten Kapazitäten.

Monolayer erreichten Kapazitäten von $5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Schichtdicken von $25-30 \text{ \AA}$ ($n=1.5$), welche nach Fusion von DMPC-Vesikeln bei einem zu großen Schichtdickenzuwachs um 45 \AA eine Verringerung der Membrankapazität auf $2.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ zeigten.

Das zweikettige Spacer-Lipid **JM386** zeigte in selbstorganisierten Monolayern Kapazitäten von $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Schichtdicken um 30 \AA , wobei die Fusion von DMPC-Vesikeln einen wesentlich zu großen Schichtdickenzuwachs von 60 \AA und eine minimale Verringerung der Membrankapazität auf $5.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bewirkte.

Das Spacer-Lipid **JM362**, welches einen hydrophilen Spacer doppelter Länge besitzt, zeigte im selbstorganisierten Monolayer gar Kapazitäten von $12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei einer Schichtdicke von nur 33 \AA .

Ein weiterer Trend läßt sich in der Abhängigkeit der Filmkapazitäten von der **Spacerlänge** erkennen. Mit zunehmender Spacerlänge wachsen auch die Kapazitäten, was für mehr Defekte, bedingt durch eine schlechtere Ordnung der Molekülketten spricht.

Diese hat, wie in Kap. 1.1 gezeigt wird, entscheidenden Einfluß auf den Erfolg der anschließenden Vesikelfusion. Sind zu viele hydrophile Molekülteile zur Oberfläche exponiert, so sind die Wasserkontaktwinkel und entsprechend die Grenzflächenenergien zu gering um die Vesikel zu destabilisieren und eine Fusion der Vesikel auf den „hydrophoben“ Untergrund zu bewirken. Die Vesikel adsorbieren oder teilspreiten dann lediglich, was in hohen Schichtdicken und schlechten Kapazitäten resultiert.

Zur besseren Vororientierung, vor allem der längeren Spacerlipide, wurden deshalb Filmüberträge auf dem Trog durchgeführt.

3.4.2 Isothermen und LB-Überträge

In Abb. 77 sind die Isothermen für die **einkettigen Thiolipide** aufgetragen. Für keines der Lipide beobachtet man einen Phasenübergang von der gasanalogen in die flüssig-expandierte Phase, was auf die Durchführung der Kompression bei $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, also oberhalb der Umwandlungstemperaturen der Phytansäure- bzw. Myristinsäure-Ketten, zurückzuführen ist.

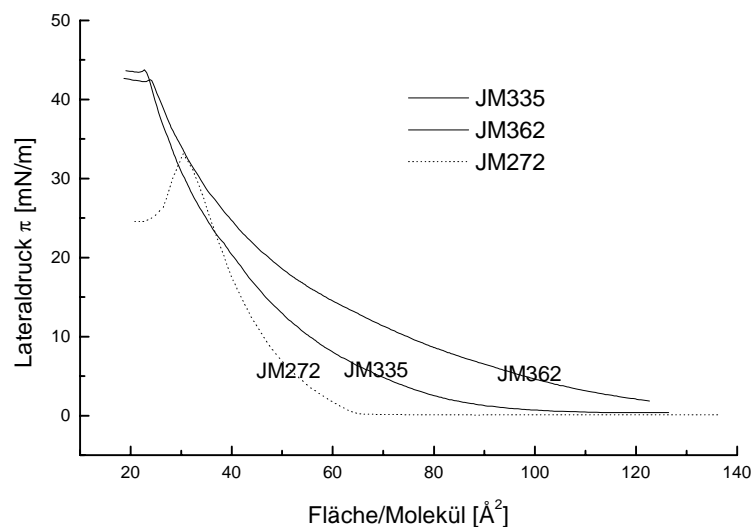


Abb. 77 Isothermen für die einkettigen Thiolipide bei $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Fläche pro Molekül für welche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Ketten sich im Lateraldruck bemerkbar machen, korreliert mit der Spacerlänge. Das Molekül mit der längsten Kette interagiert auch zuerst mit seinen Nachbarn. Auffällig ist ebenfalls, daß die beiden Thiolipide mit den Phytansäuren (JM 335, JM362) bei nahezu gleichem Lateraldruck von ca. 42 mN/m kollabieren, während Filme des Lipids (JM272) mit dem kürzeren Spacer und der Myristinsäure schon bei ca. 34 mN/m den Kollaps zeigen.

Abb. 78 zeigt die Isothermen der **zweikettigen Thiolipide** JM386 und JM387. Während das Lipid JM 387 mit den Palmitinsäuren einen gas-flüssig-Phasenübergang aufweist, findet man diesen nicht für das Lipid JM386 mit den niedrigschmelzenden Phytansäureketten.

Die Kollapsflächen liegen mit 25 \AA^2 deutlich unter dem theoretischen Wert für zweikettige Lipide. Dies ist wohl auf Fehler bei der Einwaage der wirklich sehr geringen Lipidmengen zurückzuführen, welche sich dann direkt in der Normierung auf die Fläche/Molekül niederschlagen. Der Kollapslateraldruck, welcher unabhängig von der Flächennormierung ist, liegt mit ca. 45 mN/m wieder im gleichen Bereich wie für die einkettigen Lipide in Abb. 77.

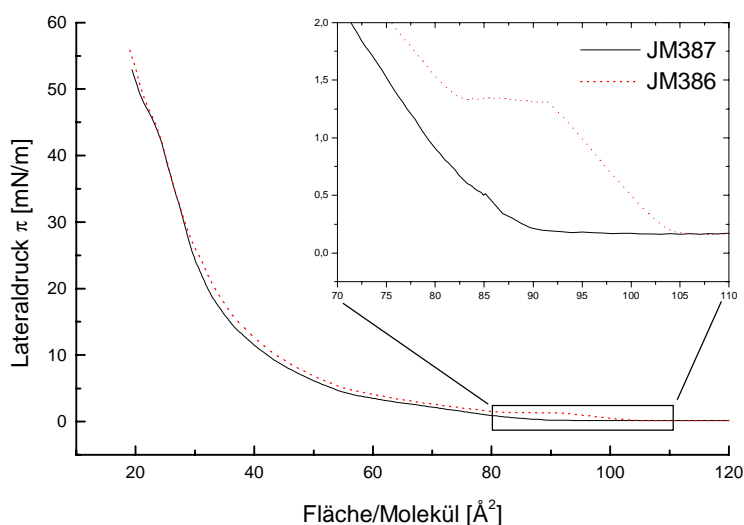


Abb. 78 Isothermen für die zweikettigen Thiolipide JM386 (.....) und JM387 (—) bei $T=25 \text{ °C}$.

Leider hatte weder die Vororientierung auf dem Trog, noch das Kospreiten mit DMPC einen positiven Einfluß auf die elektrischen Eigenschaften der resultierenden Mono- und Bilayer. In den meisten Fällen waren die Filmkapazitäten im Vergleich sogar höher und somit schlechter als die aus Self-Assembly resultierenden Filme.

3.4.3 Experimente auf Mini- und Mikroelektroden

Im vorigen Kapitel wurde bei der Charakterisierung der Spacerlipidmembranen erwähnt, daß diese in zyklischen Voltammogrammen auf Makroelektroden geringe Redoxströme nahe dem Standardpotential des löslichen Redoxpaares zeigten. Dies ließ vermuten, daß die hohen Kapazitäten in den Impedanzspektren auf parallel zur isolierenden Membran liegende pinholes oder tiefgreifende Defekte zurückzuführen sind.

Die Idee war deshalb durch eine Reduzierung der Elektrodenfläche auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten solcher Defekte zu reduzieren.

Die kombinierten Messungen in Optik und Elektrochemie wurden üblicherweise an aufgedampften Au-**Makroelektroden** auf Glas durchgeführt. Die Elektrodenflächen waren dabei entweder durch eine Bedampfungsmaske ($A=0.36 \text{ cm}^2$) oder aber einen O-Ring ($A=0.79 \text{ cm}^2$) definiert.

Für erste Messungen an kleineren Elektroden standen gesputterte Au-**Minielektroden** auf Silizium (s. Abb. 79) mit Durchmessern zwischen 2000 und 500 μm und entsprechenden Elektrodenflächen zwischen $3.14 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$ und $1.9 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ zur Verfügung. Das gesamte Elektrodenarray wurde über Nacht in der Lösung des Thiolipids inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit dem Lösungsmittel und Trocknen wurden die Zuleitungen mit Nagellack versiegelt. Dann wurden Impedanzspektren der Monolayer und der Bilayer nach Vesikelfusion aufgenommen. Die elektrischen Werte zeigten aufgrund der Definition der Elektrodenfläche über die Ablackung Schwankungen. Im Großen und Ganzen entsprechen sie aber im Falle des Spacerlipids JM335 mit Kapazitäten zwischen 5 und 8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ den zuvor auf Makroelektroden beobachteten Werten. Die Reduzierung der Fläche um den Faktor 100 erbrachte also nicht den gewünschten Effekt bezüglich der Verringerung der Defektwahrscheinlichkeit.

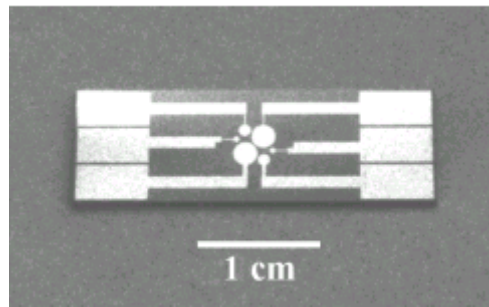


Abb. 79 Au-Minielktroden ($\varnothing = 2000, 1000$ und $500 \mu\text{m}$)

Zur weiteren Verringerung der Elektrodenfläche wurden Au-**Mikroelektroden**-Arrays herangezogen. Diese wurden im Rahmen der Dissertation von Herrn Michael Krause [Kra 00] zur Stimulation und zur Ableitung von Signalen von Neuronen und Herzmuskelzellen entwickelt. Die Ableitungselektroden besitzen Durchmesser zwischen 6 und $30 \mu\text{m}$ während die in den Ecken des Arrays platzierten Stimulationselektroden Durchmesser von 50 oder $100 \mu\text{m}$ aufweisen.

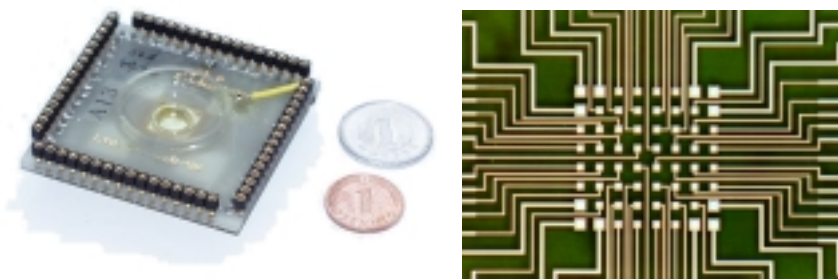


Abb. 80 Verkapseltes Mikroelektroden-Array (links) und Zoom auf das Array (rechts).

Durch die Verringerung der Elektrodenflächen handelt man sich nun ein neues Problem ein. Der zu messende Widerstand nimmt mit abnehmender Elektrodenfläche stetig zu und nach Modifizierung der Elektroden mit einem isolierenden Film fließen in der Impedanzspektroskopie mit ihren geringen Anregungsspannungen schnell nur noch Ströme im unteren pA-Bereich. Als Beispiel sei hier die Rechnung für eine $100 \mu\text{m}$ -Elektrode ($A = 7.85 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$) mit einer isolierenden Membran mit einem spezifischen Widerstand von nur $R = 1 \cdot 10^6 \Omega/\text{cm}^2$ aufgeführt. Der reale Widerstand beträgt dementsprechend $1.27 \cdot 10^{10} \Omega$ und bei einer Anregungsspannung von $U = 10^{-2} \text{ V}$ fließt bei niedrigen Frequenzen demnach nur noch ein Strom von $I = U/R = 7.85 \cdot 10^{-13} [\text{A}] = 0.78 [\text{pA}]$.

Um diese Ströme noch Messen zu können bedarf es eines Hochimpedanzmeßplatzes mit entsprechender Abschirmung der Elektroden. Die Impedanzspektren an Mikroelektroden wurden allesamt an einem Frequenz-Generator-Analysator (Fa. Zahner, Model IM6) mit

einem Verstärker zur Hochimpedanzspektroskopie (Fa. Zahner, HiZ-Probe) aufgenommen. In der Regel wurden dabei zwei 100 μm -Elektroden gegeneinander vermessen.

Im linken Teil von Abb. 81 sind die Impedanzspektren für den spacerlosen DPPTE-SAM und entsprechende HBMs nach Vesikelfusion auf Makro- und Mikroelektroden überlagert. Man erhält auf beiden Elektroden nahezu identische elektrische Werte.

Der rechte Teil von Abb. 81 zeigt die gleiche Überlagerung für das Spacerlipid JM335. Hier erkennt man den deutlichen Unterschied zwischen den Spektren auf Makro- und auf Mikroelektroden. Während die Kapazitäten für JM335-SAMs auf Makroelektroden zwischen 7 und 8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegen und durch Vesikelfusion nahezu unverändert bleiben, findet man auf Mikroelektroden Werte um 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, welche sich durch Vesikelfusion sogar auf 0.7 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ reduzieren. Hier wird das Impedanzspektrum also eindeutig vom Bilayer selbst und nicht von parallel liegenden Defekten bestimmt.

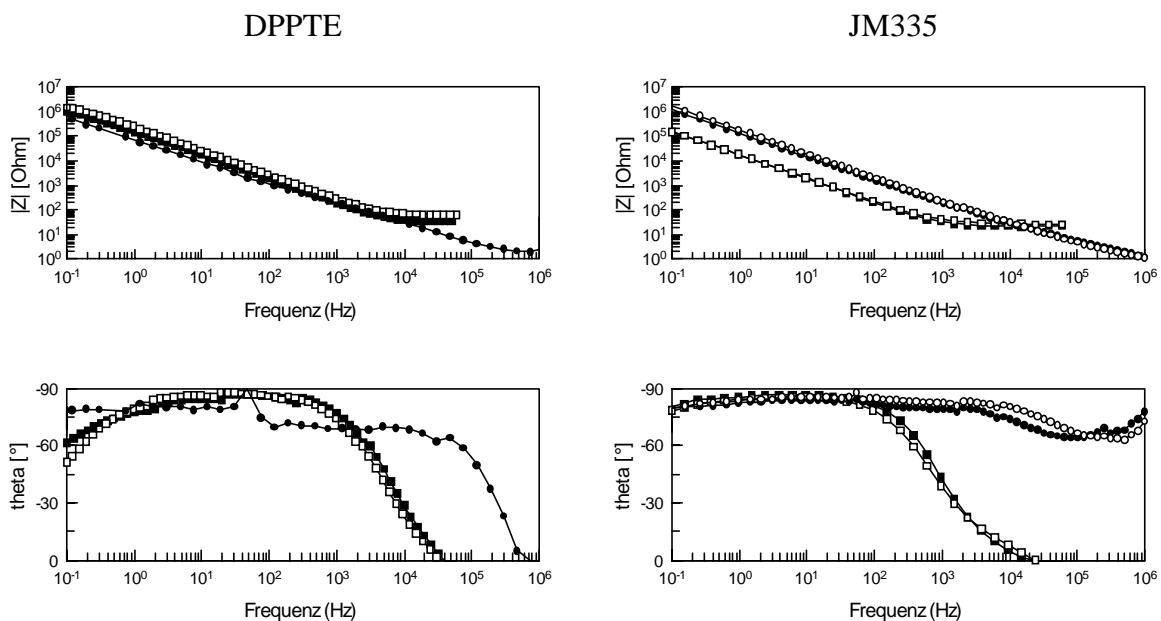


Abb. 81 Impedanzspektren für SAMs (■/●) und zugehörige Eigelb-PC-Bilayer (□/○) für DPPTE (links) und JM335 (rechts) auf Makro- ■□/ bzw. Mikro- ●○ Elektroden.

Durch Verringerung der Elektrodenfläche um den Faktor 10^4 gegenüber den Makroelektroden scheint man demnach in einen Größenbereich zu kommen, in welchem man nahezu defektfreie Membranen erhalten kann.

3.5 Vesikelfusion auf binäre Hydroxythiol-/Alkanthiol-Monolayer mit definierter Oberflächenenergie

Die Fusion von Vesikeln auf silanisierte oxidische [Mer 89; Mil 90; Ter 92] oder Thiol- [Pla; Sei 93; Ter 93; Ste 96] bzw. Thiolipid- [Ter 93; Lan 94; Lin 97] bedeckte Goldoberflächen ist eine inzwischen vielverwendete Technik zum Aufbau festkörperunterstützter Bilayer Lipid Membranen (sBLM) geworden. Der Mechanismus für diesen Prozeß ist allerdings, im Gegensatz zur Fusion von Vesikeln auf hydrophile Substrate [Bri 84, Cre 99, Nol 95, Räd 95, Tam 85], noch wenig untersucht. Kalb et al. [Kal 92] schlugen 1992 den in Abb. 82 abgebildeten Mechanismus vor.

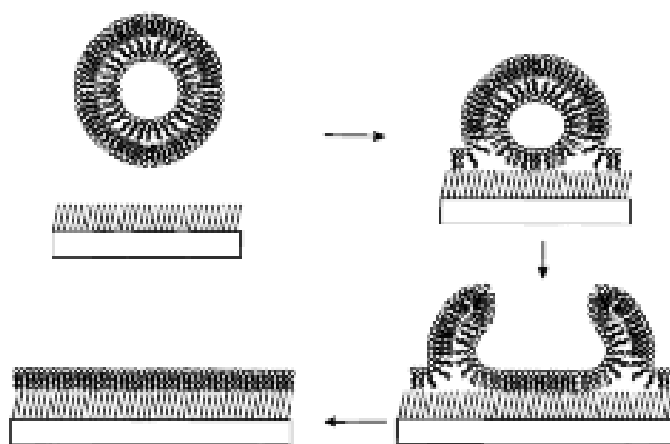


Abb. 82 Vorgeschlagener Mechanismus zur Vesikelfusion auf hydrophobe Monolayer (aus [Kal 92; Lin 97])

Er zeigt wie das Aufbrechen der für sich thermodynamisch stabilen Vesikel an der hochenergetischen Grenzfläche Alkanthiolmonolayer/Wasser vonstatten gehen könnte und zur Ausbildung des oberflächendistalen Monolayers führt.

Für sehr hydrophobe Monolayer wie die z.B. in Kap. 3.2 vorgestellten DPPE-SAMs funktioniert dieser Prozeß auch relativ problemlos. Speziell bei der Fusion von Vesikeln auf Monolayer von **Thiolipiden mit hydrophilen Spacern** zeigten sich dagegen ungewünschte Effekte. Die Schichtdicken nach Fusion waren oft wesentlich zu groß und die elektrischen Eigenschaften verbesserten sich durch die Fusion nur unmerklich (s.a. Kap.3.4, Tab. 10). In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 83) fand man dann fluoreszierende Flecken, welche sich nach Bleichen nicht regenerierten. Die fehlende laterale Mobilität und die erhöhten Schichtdicken lassen auf die Präsenz von adsorbierten oder teilgespreiteten Vesikeln schließen. Dabei war auffällig, daß diese Effekte vor allem dann auftraten, wenn die Hydrophobie des Monolayers deutlich reduziert war.

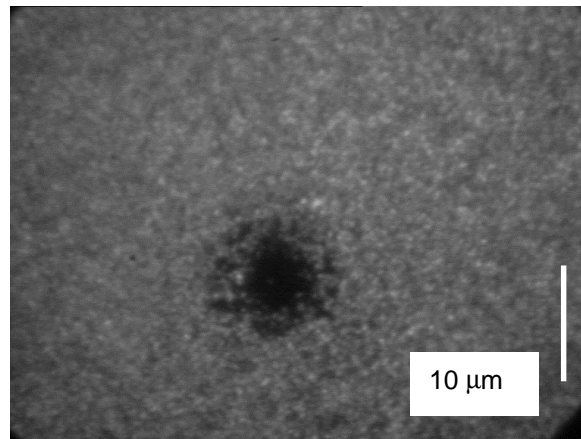


Abb. 83 Fluoreszenzmikroskopie an einem JM335/(Eigelb-PC/NBD-PE 1%)-Bilayer mit Bleichfleck.

Da die Einführung eines hydrophilen Reservoirs zwischen Membran und Elektrode aber fast immer mit der Reduzierung des Wasserkontaktwinkels einher geht und somit ein wesentliches Problem für die Anwendbarkeit der Vesikelfusion auf diese Systeme darstellt, wurde eine systematische Studie zum Einfluß der freien Oberflächenenergie auf die Vesikelfusion angestrebt.

Eine Studie ähnlicher Art wurde schon in der Gruppe von **Evans** in Leeds [Wil 97] durchgeführt. Sie koassemblierten binäre Mischungen eines spacergestützten Cholesterins mit dem reinen Spacer und beobachteten die Vesikelfusionskinetik sowie die Schichtdickenzunahme in Abhängigkeit vom Molenbruch auf der Oberfläche. Dabei fanden sie eine nahezu lineare Schichtdickenzunahme über den Molenbruch zwischen der eines Monolayers (auf dem reinen hydrophoben Spacercholesterinfilmm) und der eines Bilayers (auf dem reinen hydrophilen Spacerfilm). Allerdings handelt es sich hierbei um ein molekular rauhes System, d.h. hydrophile und hydrophobe Moleküle enden nicht im gleichen Abstand von der Elektrode und der Freiraum zwischen den Cholesterinmolekülen kann somit während der Fusion mit Lipiden aufgefüllt werden. Außerdem konnte in der Studie Phasenseparation, welche den linearen Verlauf der Schichtdicke über dem Molenbruch ebenfalls erklären würde, nicht ausgeschlossen werden.

Für die Beobachtung der Abhängigkeit der Vesikelfusion von der freien Oberflächenenergie ist ein System mit gleicher Moleküllänge vorzuziehen, um etwaige Effekte durch **molekulare Oberflächenrauigkeit** auszuschließen.

Solche Systeme sind z.B. binäre Hydroxythiol/Alkanthiolmonolayer gleicher Kettenlänge, wie sie von **Ulman** [Eva 91; Ulm 91; Ulm 92; Ulm 96] und Whitesides [Bai, Bai 89] eingehend

untersucht und vorgestellt wurden. Das bestuntersuchte System aus Dodekanthiol (DDT) und Hydroxyundekanthiol (HUT) hat zudem den Vorteil, daß der Molenbruch in der Lösung und auf der Oberfläche nahezu identisch sind, sofern das System aus THF ($\epsilon=7.3$) assembliert wird [Ulm 92], in welchem sich die Löslichkeiten von DDT und HUT nicht so stark unterscheiden wie in Ethanol ($\epsilon=24$) [Bai, Bai 89].

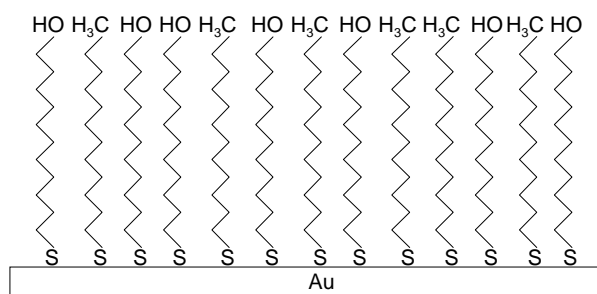


Abb. 84 Schema zu binären DDT/HUT-Monolayern.

Neben der Frage nach dem Zustand, der sich in Abhängigkeit von der Grenzflächenenergie des Monolayers nach der Fusion einstellt, ist auch die Fusionskinetik von Interesse, um Informationen über den immer noch unverstandenen Mechanismus der Vesikelfusion auf hydrophobe Substrate zu gewinnen.

Es war geplant, daß in der Gruppe von **Plant** am NIST aufgestellte **Modell** [Hub 98] für die Kinetik der Vesikelfusion auf reine Alkanthiolmonolayer auch auf dieses Problem anzuwenden. Es beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Fusionsprozesses von der Lipidkonzentration. Die Rate der Bilayerausbildung wird nach diesem Modell nicht durch Monomertransfer, sondern durch einen vesikelabhängigen Prozeß bestimmt. Für die Konzentrationsabhängigkeit fand man, daß die Fusion bei hohen Konzentrationen diffusionskontrolliert abläuft. Die Reorganisation an der Oberfläche scheint schnell zu geschehen, wodurch die Grenzschicht an Vesikeln verarmt und die Kinetik über die Diffusion von Vesikeln zur Oberfläche bestimmt wird. Für niedrige Lipidkonzentrationen ist der Reorganisationsprozeß dagegen langsam gegen die Diffusion und die Kinetik ist durch die Reorganisation selbst bestimmt. Es wurde ein mathematisches Modell für den zeitlichen Verlauf der Oberflächenkonzentration aufgestellt, welches Konzentration und Diffusion der Vesikel in der Bulk-Phase sowie eine Reorganisationsrate an der Oberfläche berücksichtigt.

Treibende Kraft für die Ausbildung des Bilayers ist die **freie Energie der Oberfläche** in Kontakt mit Wasser, welche anscheinend benötigt wird, um die mit der Vesikeldelaminierung oder Destabilisierung verbundene Aktivierungsbarriere zu überwinden.

In den folgenden Kapiteln wird zuerst der Aufbau der binären Dodekanthiol/Hydroxyundekanthiol-Monolayer sowie deren Charakterisierung bzgl. Kontaktwinkel, freier Oberflächen- bzw. Grenzflächenenergie und Phasenseparation beschrieben. Hierauf werden die aus der Fusion von POPC-Vesikeln auf die gemischten Monolayer resultierenden Schichtdicken, Fusionskinetiken, Impedanzspektren und kraftmikroskopische Aufnahmen mit den Oberflächenenergien korreliert und diskutiert.

Probenpräparation

BK7-Glassubstrate und Si-Wafer wurden am NIST wie in Kap. 4.3.1 beschrieben gereinigt und Gold-Magnetron-gesputtert. Die Proben wurden danach sofort in frisch angesetzte 1 mM Lösungen der binären Gemische von Dodekanthiol und Hydroxyundekanthiol in frisch destilliertem THF gestellt. Nach 24-stündiger Assemblierung wurden sie gründlich mit THF gespült und bis zur weiteren Verwendung auch unter THF gelagert.

3.5.1 Bestimmung des polaren und dispersen Anteils an der freien Oberflächenenergie durch Kontaktwinkelmessungen

Eigentlich wurde beabsichtigt den polaren und dispersen Anteil an der Oberflächenenergie mittels 5 verschiedener Lösungsmittel (Tab. 11) nach Owens und Wendt (s. Kap. 1.7) zu bestimmen.

| Lösungsmittel | γ_L [mN/m] | γ_L^d [mN/m] | γ_L^p [mN/m] | $\text{sqr}(\gamma_L^p/\gamma_L^d)$ |
|---------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Wasser | 72,3 | 18,7 | 53,6 | 1,69 |
| Glycerin | 65,2 | 28,3 | 36,9 | 1,14 |
| Ethylenglykol | 47,5 | 29,3 | 18,2 | 0,79 |
| Benzylalkohol | 38,9 | 29 | 9,9 | 0,58 |
| Methyliodid | 50,8 | 49,5 | 1,3 | 0,16 |

Tab. 11 Oberflächenspannungen (polarer und disperser Anteil) sowie $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ -Wert für verschiedene Lösungsmittel. Werte aus [Rab 71].

Leider zeigte es sich alleine schon an den Wasserkontaktwinkeln vor und nach der Messung mit einem Lösungsmittel, daß sich die binären Monolayer durch die Messung der Kontaktwinkel mit den Lösungsmitteln veränderten. Dies mag einerseits durch Einlagerung von Lösungsmittelmolekülen in die Filme oder durch Herauslösen von Thiolen bedingt sein. Eine Serie von Kontaktwinkelmessungen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf dem gleichen Träger schied deshalb aus.

Die Kontaktwinkelbestimmungen wurden deswegen auf Messungen mit **Methyliodid und**

Wasser, welche sich stark in ihren $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ -Werten unterscheiden, beschränkt. So war es

möglich für jedes Lösungsmittel einen eigenen Film zu verwenden.

Der Kosinus der Kontaktwinkel, welche die Lösungsmittel mit den binären DDT/HUT-Monolayern bilden, ist in Abb. 85 aufgetragen.

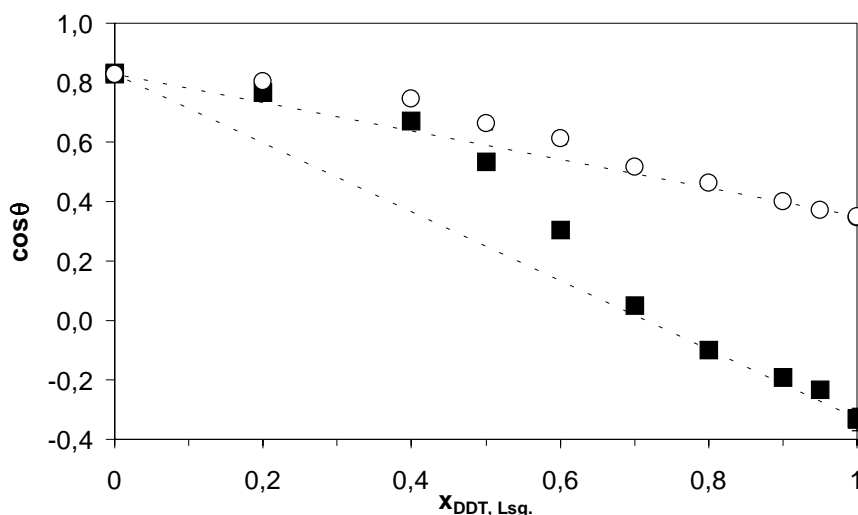


Abb. 85 Wasser- ■ und Methyliodid- ○ Kontaktwinkel in Abhängigkeit vom Molenbruch an Dodekanthiol in Lösung $x_{\text{DDT, Lsg.}}$. Gestrichelte Linien (---) entsprechen der Cassie-Gleichung für das jeweilige Lösungsmittel.

Es gilt zu beachten, daß es sich bei den Molenbrüchen um das Verhältnis von DDT zu HUT in der Lösung und nicht auf der Oberfläche handelt, welche sich geringfügig unterscheiden und somit zu einem Versatz auf der x-Achse führen. Die Kontaktwinkel, welche sich aus der **Cassie-Gleichung**

$$\cos \Theta = x \cdot \cos \Theta_{\text{DDT}} + (1-x) \cdot \cos \Theta_{\text{HUT}}$$

für die beiden Lösungsmittel ergeben würden, sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.

Der Kosinus der Kontaktwinkel verhält sich für $0.7 \leq x \leq 1$ für beide Lösungsmittel linear über dem Molenbruch der Lösung. Für Inkubationslösungen mit höherem Hydroxythiolgehalt weicht er aber doch stark von der Linearität ab. Dies geht einher mit XPS-Messungen von Ulman [Ulm 92], der ebenfalls die stärksten Abweichungen zwischen dem Molenbruch in der Inkubationslösung und auf der Oberfläche für Lösungen mit höherem Anteil an dem Hydroxythiol HUT fand. In diesem Molenbruchbereich ist eine ganz leichte Bevorzugung für die Assemblierung des Hydroxythiols festzustellen.

Geht man von der Gültigkeit der Cassie-Gleichung aus, so kann man aus den Daten in Abb. 85 ein $x_{\text{Lösung}}-x_{\text{Oberfläche}}$ -Diagramm erstellen.

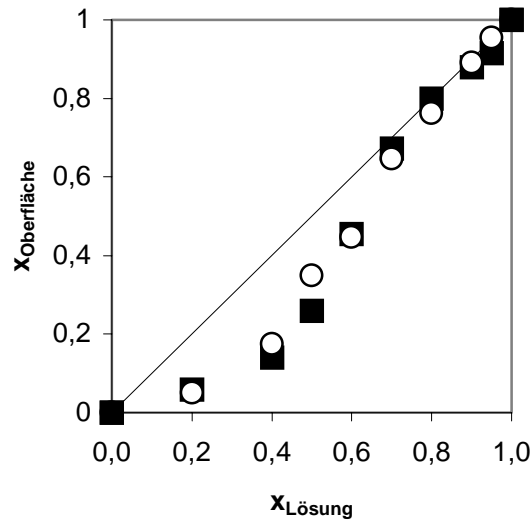


Abb. 86 Aus Cassie-Gleichung ermittelte Abweichungen des Molenbruchs auf der Oberfläche von der Inkubationslösung (ermittelt über Wasser ■ und Methyljodid ○).

Andererseits ist die Kontaktwinkelmessung für die hydrophileren Filme etwas kritisch, weil diese wegen ihrer hohen Oberflächenenergien an Luft, leicht zu Verschmutzung oder Umorientierungen neigen [Ulm 92]. Beides führt zu höheren Kontaktwinkeln und somit geringerer Benetzung.

Die Abweichung von der Linearität hat aber für die kommende Vorgehensweise keinen Einfluß. Es ist leicht möglich mittels eines bestimmten Molenbruchs in der Lösung einen Monolayer mit ähnlichem Verhältnis auf der Oberfläche zu generieren, dessen freie Oberflächenenergie nach der Methode von Owens und Wendt (s. Kap. 1.7) zu bestimmen und diese dann mit den Ergebnissen aus der Vesikelfusion zu korrelieren.

| $x_{\text{DDT Lsg.}}$ | 1 | 0,95 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 0 |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Kontaktwinkel [°] | | | | | | | | | | |
| Wasser | 109,5 | 103,6 | 101,2 | 95,7 | 87,2 | 72,4 | 57,9 | 47,9 | 40,1 | 33,5 |
| Methyljodid | 69,7 | 68,3 | 66,4 | 62,5 | 58,8 | 52,2 | 48,7 | 41,9 | 36,5 | 34,1 |
| cos(θ) | | | | | | | | | | |
| Wasser | -0,33 | -0,23 | -0,19 | -0,10 | 0,05 | 0,30 | 0,53 | 0,67 | 0,77 | 0,83 |
| Methyljodid | 0,35 | 0,37 | 0,40 | 0,46 | 0,52 | 0,61 | 0,66 | 0,74 | 0,80 | 0,83 |
| γ (Gl. 44) | | | | | | | | | | |
| Wasser | 5,57 | 6,40 | 6,74 | 7,53 | 8,77 | 10,89 | 12,81 | 13,96 | 14,76 | 15,33 |
| Methyljodid | 4,86 | 4,94 | 5,05 | 5,28 | 5,48 | 5,82 | 5,99 | 6,30 | 6,51 | 6,60 |
| Freie Oberflächenenergien | | | | | | | | | | |
| γ_s^d [mN/m] | 22,9 | 22,9 | 23,8 | 25,4 | 26,3 | 28,0 | 27,8 | 30,1 | 31,8 | 32,2 |
| γ_s^p [mN/m] | 0,2 | 0,9 | 1,2 | 2,2 | 4,6 | 10,9 | 19,8 | 25,1 | 29,0 | 32,5 |
| γ_s [mN/m] | 23,2 | 23,8 | 25,0 | 27,6 | 30,9 | 38,9 | 47,6 | 55,2 | 60,8 | 64,7 |

Tab. 12 Kontaktwinkel Θ , $\cos \Theta$ sowie freie Oberflächenenergien γ_s (Dispersionsanteil γ_s^d und polarer Anteil γ_s^p) in Abhängigkeit vom Molenbruch an Dodekanthiol $x_{\text{DDT, Lsg.}}$.

Mit den Werten aus Tab. 11 und Tab. 12 wurde für jeden Molenbruch ein

$$y = \frac{1 + \cos \Theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} \quad (\text{Gl. 44})$$

ermittelt und gegen $x = \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ des Lösungsmittels in Abb. 87 aufgetragen. Nach Gl. 40 ergibt sich aus dieser Auftragung der Achsenabschnitt zu $\sqrt{\gamma_S^d}$, während die Steigung durch $\sqrt{\gamma_S^p}$ gegeben ist.

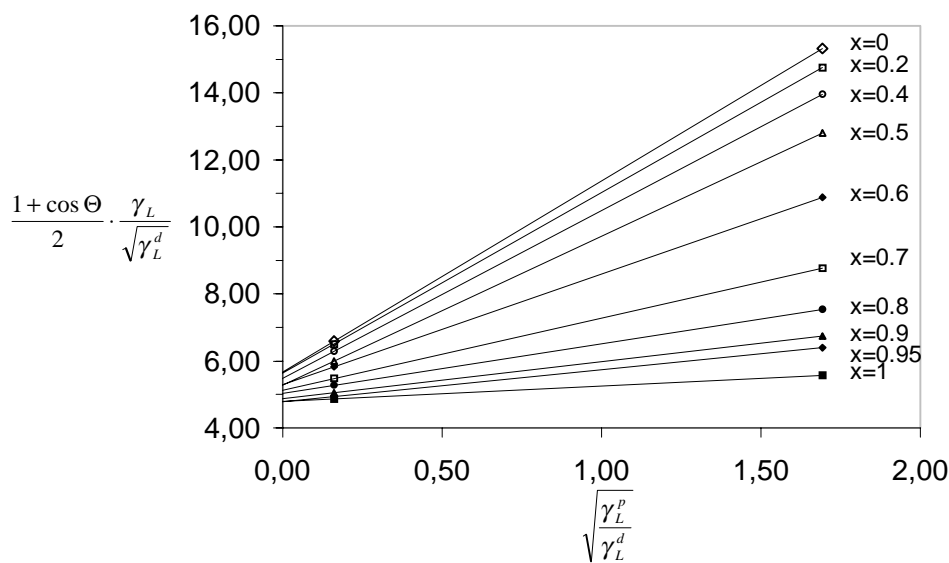


Abb. 87 Owens- und Wendt-Auftragung zur Ermittlung der freien Oberflächenenergien für verschiedene Molenbrüche an Dodekanthiol x_{DDT} . Der Achsenabschnitt ergibt sich zu $\sqrt{\gamma_S^d}$, während die Steigung durch $\sqrt{\gamma_S^p}$ gegeben ist.

Die für jeden Molenbruch erhaltenen Werte für die freie Oberflächenenergie γ_S , als Summe aus polarem γ_S^p und dispersem Anteil γ_S^d , sind in Abb. 88 aufgetragen. Man erkennt deutlich wie der polare Anteil über den Molenbruch abnimmt und für den reinen Dodekanthiollayer praktisch völlig verschwindet, während der disperse Anteil relativ konstant über den gesamten Molenbruch verläuft.

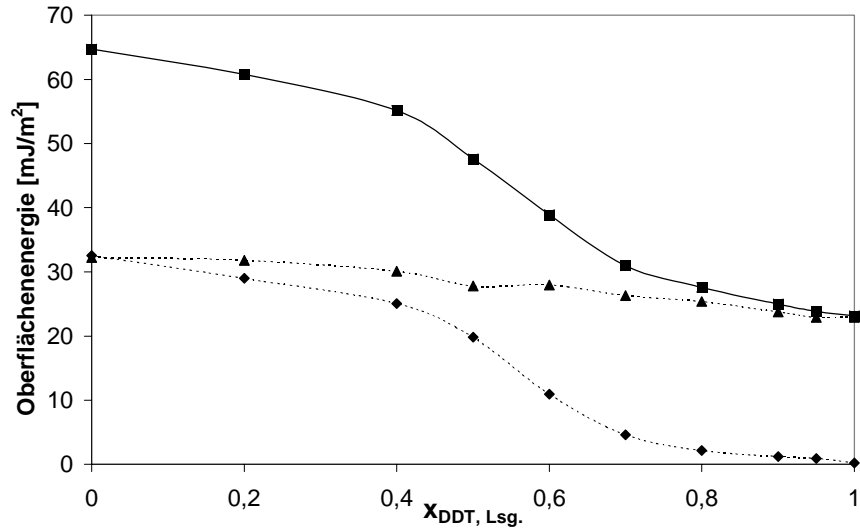


Abb. 88 Polarer ◆ und disperser ▲ Anteil an der freien Oberflächenenergie sowie gesamte freie Oberflächenenergie ■ als Summe der beiden.

Die hier erhaltenen Werte sind sehr gut vergleichbar mit Messungen von Ulman [Ulm 92], welche aber um den geringfügig verschiedenen Molenbruch auf der Oberfläche korrigiert sind.

Für den Vesikelfusionsprozeß selbst ist nicht die Grenzfläche gegen Luft sondern gegen Wasser bzw. Puffer von Interesse. Die **Grenzflächenspannung** γ_{SL} zwischen den binären Monolayern und Wasser kann aus den Daten in Tab. 11 und Tab. 12 nach Owens und Wendt zu

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} \quad (\text{Gl. 45})$$

errechnet werden. Sie ist in Tab. 13 tabelliert und in Abb. 89 gegen den Molenbruch aufgetragen.

| x _{DDT} [1] | γ_S [mJ/m²] | γ_S^d [mJ/m²] | γ_S^p [mJ/m²] | γ_{LS} [mJ/m²] |
|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 0 | 64,7 | 32,2 | 32,5 | 4,4 |
| 0,2 | 60,8 | 31,8 | 29,0 | 5,5 |
| 0,4 | 55,2 | 30,1 | 25,1 | 6,7 |
| 0,5 | 47,6 | 27,8 | 19,8 | 9,2 |
| 0,6 | 38,9 | 28,0 | 10,9 | 17,1 |
| 0,7 | 30,9 | 26,3 | 4,6 | 27,4 |
| 0,8 | 27,6 | 25,4 | 2,2 | 34,7 |
| 0,9 | 25,0 | 23,8 | 1,2 | 39,0 |
| 0,95 | 23,8 | 22,9 | 0,9 | 40,8 |
| 1 | 23,2 | 22,9 | 0,2 | 47,3 |

Tab. 13 Oberflächen- und Grenzflächenenergien (SAM/Wasser) in Abhängigkeit vom Molenbruch.

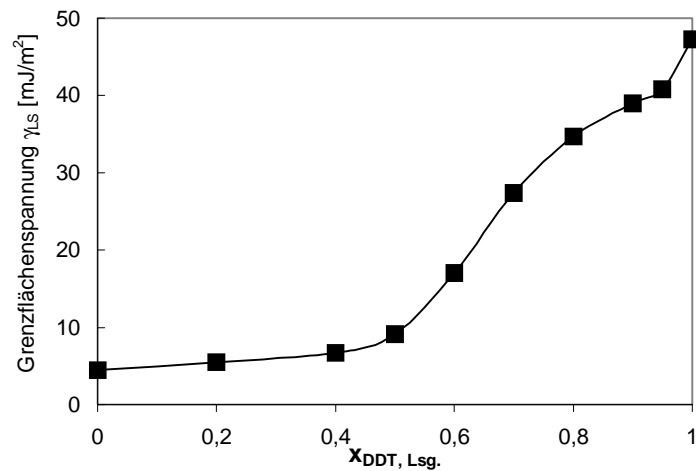


Abb. 89 Grenzflächenspannung zwischen Wasser und den binären Monolayern.

Zum Vergleich sind in Abb. 91 auch einmal die weniger aussagekräftigen kritischen Oberflächenenergien γ_c nach **Zisman** über dem Molenbruch aufgetragen. Sie wurden mit Wasser und Benzylalkohol ermittelt, welche sich von den Lösungsmitteln aus Tab. 11 in ihren γ_L -Werten am stärksten unterscheiden.

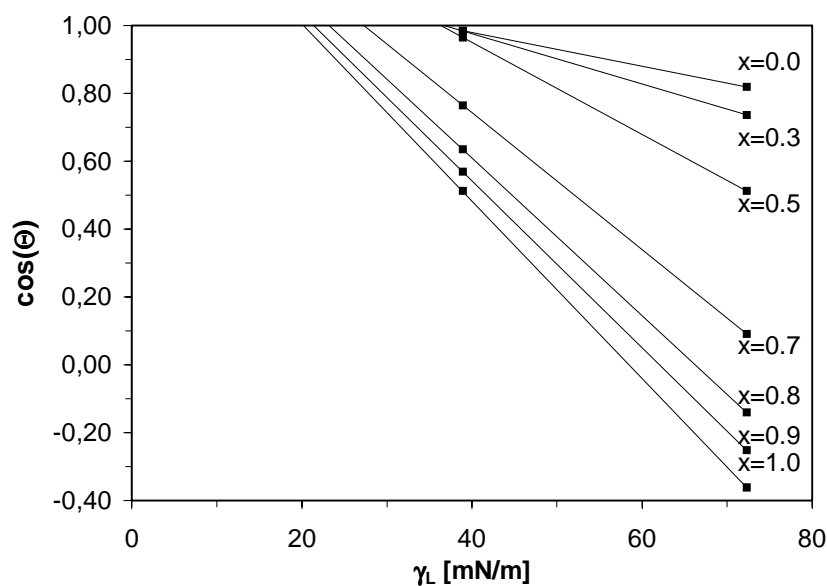


Abb. 90 Zisman-Auftragung der Kontaktwinkel gegen die Oberflächenenergien der Lösungsmittel Wasser und Benzylalkohol.

Extrapolation der Geraden in Abb. 90 auf $\cos\Theta=1$ ergibt den γ_c -Wert. Dieser entspricht der Oberflächenenergie des Lösungsmittels, welches die Oberfläche gerade vollständig benetzen würde.

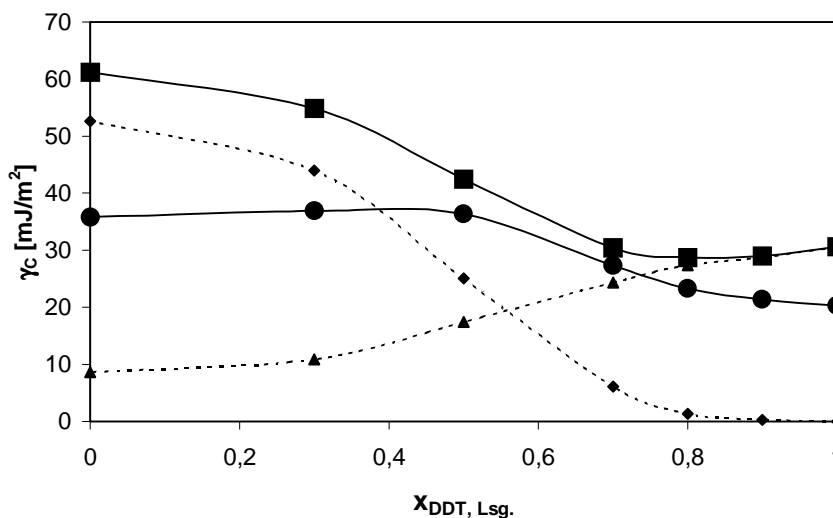


Abb. 91 Kritische Oberflächenenergien γ_c ● (nach Zisman), sowie polarer ◆ und disperser ▲ Anteil an der freien Oberflächenenergie und gesamte freie Oberflächenenergie ■ als Summe der beiden (nach Owens & Wendt) hier ermittelt mit Wasser und Benzylalkohol.

Die kritischen Oberflächenenergien nach Zisman zeigen zwar den gleichen Trend wie die Oberflächenenergien nach Owens und Wendt, sind aber aufgrund der in Kap. 1.7.1.1 erwähnten Gründe immer kleiner.

3.5.2 Phasenseparation, Domänenbildung?

Der im vorigen Kapitel bestimmte Kontaktwinkel ist eine makroskopische Größe welche nur im Hystereseverhalten gravierend von den mikroskopischen Eigenschaften des Systems bestimmt wird. Für die im folgenden untersuchte Vesikelfusion ist der mikroskopische Aufbau des Systems aber von großem Interesse, denn es sollte einen großen Unterschied machen ob die Vesikel einen homogen gemischten Monolayer oder Domänen von Hydroxy- und Alkanthiolen sehen.

Aufgrund der gleichen Kettenlängen und annähernd gleichen Löslichkeiten von DDT und HUT in THF ist Domänenbildung eigentlich nicht zu erwarten [Bai 89]. Ebenso deutet der absolut nichtlineare Verlauf im Schichtdickenzuwachs durch Vesikelfusion über dem Molenbruch (Abb. 93) darauf hin, daß in den binären Monolayern keine Phasenseparation vorliegt.

Um diese aber wirklich auszuschließen, wurden reduktive Desorptionsmessungen für reine DDT und HUT-Filme, sowie für ein 1:1-Gemisch durchgeführt. Die Resultate sind in Abb. 92 aufgezeigt.

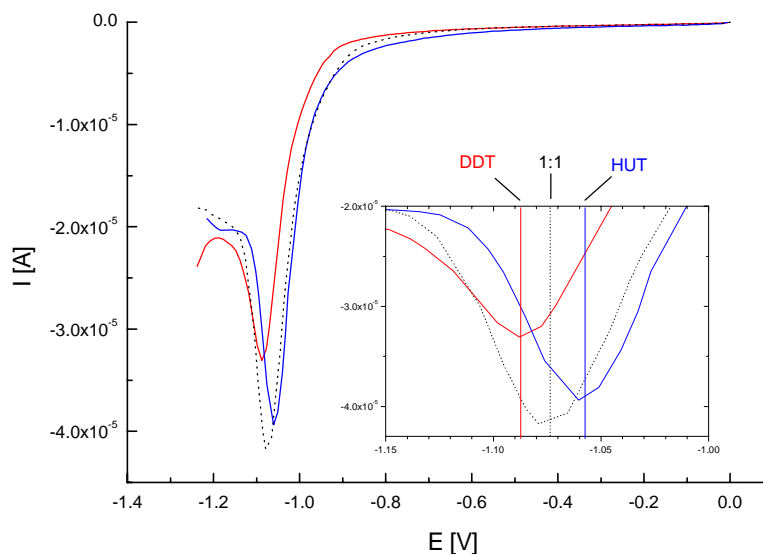


Abb. 92 Reduktive Desorption der DDT/HUT-Monolayer ($x_{\text{DDT}}=0, 0.5, 1$). Inset: Zoom auf die Peakminima

Wie erwartet fiel der Unterschied in den Desorptionspotentialen von DDT und HUT, welche sich nur um eine Methyleneinheit unterscheiden, sehr gering aus. Das längere DDT desorbierte bei ca. 3 mV negativerer Überspannung als das HUT.

Der Peak der 1:1-Mischung lag zwischen den Desorptionspeaks der reinen Filme und ist im Vergleich zu den reinen Filmen etwas verbreitert, was darauf hindeutet, daß keine merkliche Phasenseparation vorliegt. Zumindest nicht wenn die Filme aus THF ($\epsilon=7.3$) assembliert werden, in welchem HUT und DDT annähernd die gleiche Löslichkeit besitzen.

Dies geht einher mit Aussagen von Ulman et al. [Ulm pm] die für dasselbe System ebenfalls keine Anzeichen von Phasenseparation fanden.

3.5.3 Korrelation des Schichtdickenzuwachses und der Fusionskinetik mit den Oberflächeneigenschaften

Der Fusionsprozeß der POPC-Vesikel (Präparation s. Kap. 4.3.2) wurde u.a. über die **Oberflächenplasmonenresonanz** verfolgt. Aus diesen Untersuchungen erhält man zwei Ergebnisse. Einerseits die Schichtdickenzunahme durch den Fusionsprozeß, welche bedingt etwas über die Struktur des Adsorbats (Monolayer, Bilayer, Multilayer, adsorbierte Vesikel) aussagt und andererseits den zeitlichen Verlauf der Fusion, welcher wiederum Aufschluß über die Art des Fusionsprozesses (Diffusionskontrolle, Reorganisationskontrolle) geben kann.

In Abb. 93 sind die nach Vesikelfusion und Spülen erhaltenen **Schichtdicken** über dem Molenbruch aufgetragen. Man erkennt, daß man für die Fusion auf den reinen hydrophoben Dodekanthiol-Monolayer ($x=1$) ungefähr einen Schichtdickenzuwachs in der Größe eines Lipidmonolayers ($d \sim 20 \text{ \AA}$) verzeichnet, während die Fusion auf das hydrophile Hydroxyundekanthiol ($x=0$) in der Ausbildung eines Bilayers ($d \sim 40 \text{ \AA}$) auf dem Substrat resultiert.

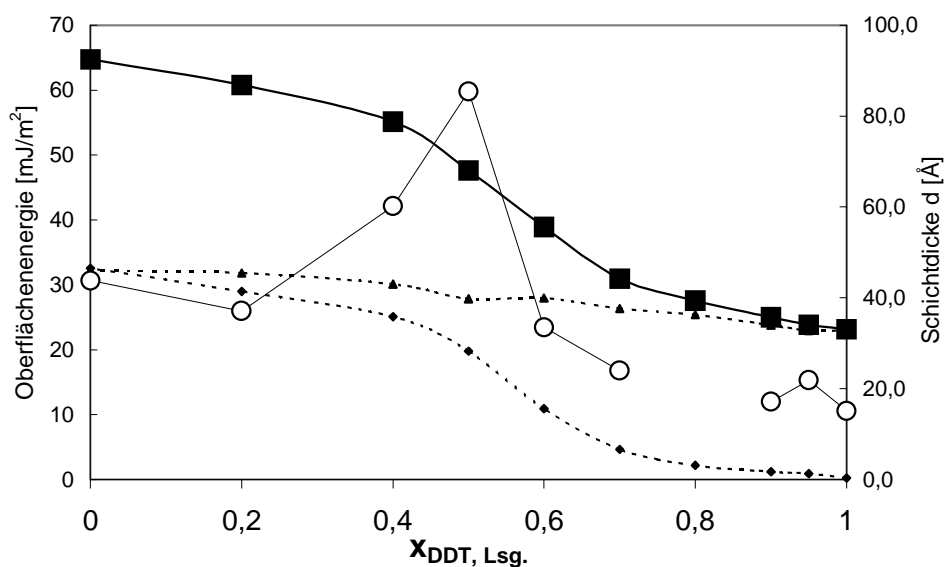


Abb. 93 Abhängigkeit der optischen Schichtdicke \circ vom Molenbruch an Dodekanthiol x_{DDT} im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien \blacksquare (polarer \blacklozenge und disperser \blacktriangle Anteil).

Für binäre Monolayer mit zunehmend hydrophilen Anteilen ($x=0.95-0.6$) steigt die Schichtdicke langsam an, was wahrscheinlich auf einen geringen Anteil an adsorbierten Vesikeln neben einer Monolage an Lipid zurückzuführen ist. Erstaunlich ist die extrem hohe Schichtdicke für den Molenbruchbereich um das 1:1-Gemisch. Hier ist die Grenzflächenenergie anscheinend nicht mehr hoch genug um die Vesikel zu destabilisieren

und die Fusion auszulösen. Andererseits ist das Substrat noch zu hydrophob um einen Lipidbilayer auf einem dünnen Wasserfilm auszubilden. Die hohe optische Schichtdicke ist dementsprechend wohl durch eine Vielzahl adsorbierter oder teilgespreiteter Vesikel, welche sich im übrigen nicht wegspülen lassen, gegeben (s. hierzu auch die AFM-Aufnahmen Abb. 104). Für den Aufbau von Hybridbilayern kann man hieraus folgern, daß für eine nahezu vollständige Vesikelfusion (mit zu vernachlässigender Vesikeladsorption) der Molenbruch größer gleich $x=0.7$ sein sollte. Falls die Ergebnisse mit den hier verwendeten binären DDT/HUT-Monolayern auf andere Systeme (z.B. Lipidmonolayer mit hydrophilem Spacer) übertragbar ist, so sollte die Grenzflächenenergie $\gamma_{LS} > 27 \text{ mJ/m}^2$ und der Wasser-Kontaktwinkel Θ somit größer 87° sein.

Eigentlich war es vorgesehen, die **Vesikelfusionskinetiken** mittels des Modells aus der Gruppe von Plant [Hub 98] auszuwerten. Leider zeigte es sich, daß sich selbst die Fusion auf binäre Monolayer mit nur geringem Hydroxythiolanteil nicht mehr mit diesem Modell anpassen ließ. In Abb. 94 und Abb. 95 sind die POPC-Fusionskinetiken für Substrate mit verschiedenen Molenbrüchen in zwei verschiedenen Zeitskalen aufgetragen.

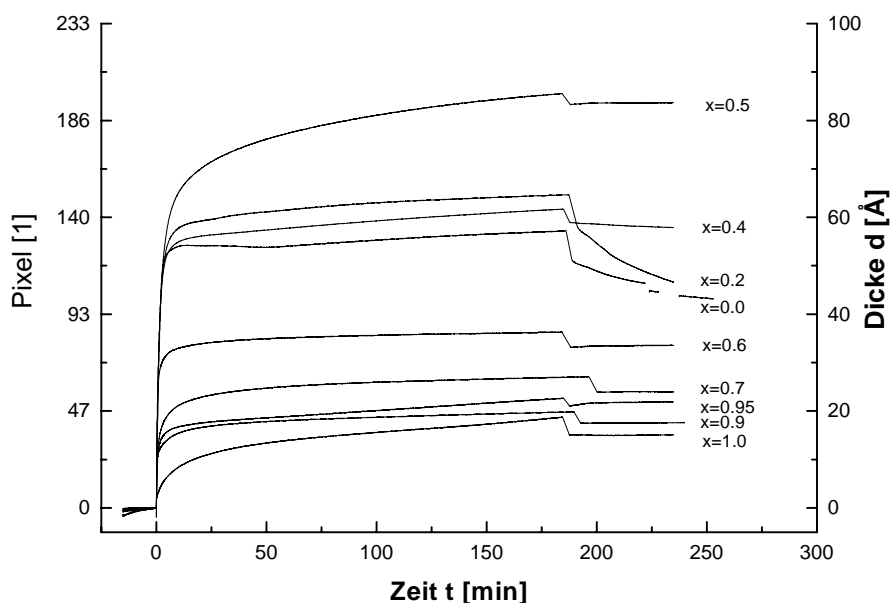


Abb. 94 SPR-Fusionskinetiken für POPC-Vesikel auf binären DDT/HUT-Monolayern (0-250 min.)

Auffällig ist, wie auch schon in Abb. 93 zu sehen war, daß die finale Schichtdicke mit abnehmendem Molenbruch erst geringfügig zunimmt, um dann in Filmen mit 50% Hydroxythiolgehalt sprunghaft anzusteigen. Ebenfalls interessant ist das Verhalten beim Spülen mit Puffer.

In fast allen Fällen sieht man nur einen Sprung von ca. 5 Pixeln, der dem Brechungsindexunterschied zwischen Puffers und der isopropanolhaltigen (0.5%) Vesikeldispersion entspricht. Nur für die Filme ohne bzw. mit nur 20% Dodekanthiol findet man, dann aber ein sehr ausgeprägtes Abspülen von Material. Dies spricht wiederum für teilgespreitete und somit schwer ablösbare Vesikel in den anderen Fällen.

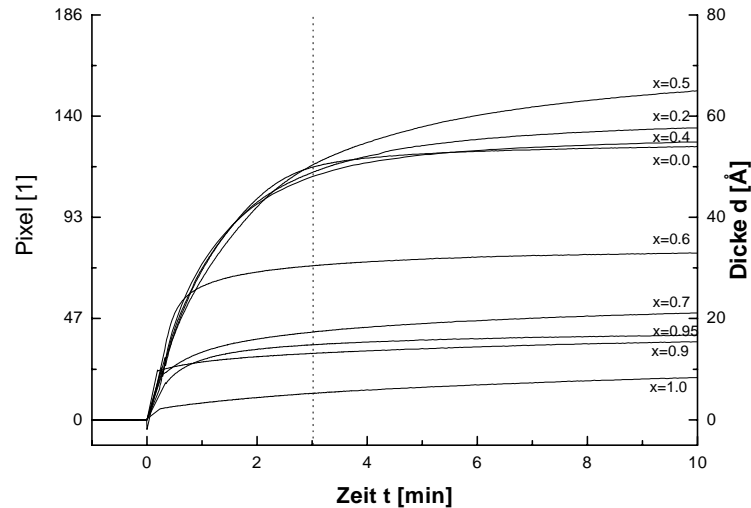


Abb. 95 SPR-Fusionskinetiken für POPC-Vesikel auf binären DDT/HUT-Monolayern (0-10 min.)

In Abb. 95 sind nur die ersten 10 Minuten des Fusionsprozesses aufgezeigt. Man erkennt, daß Filme mit hohem Hydroxythiolgehalt ($\geq 50\%$) annähernd die gleiche Startkinetik zeigen, während sie mit Erhöhung des Alkanthiolgehalts zunehmend langsamer wird. Dies mag mit einer repulsiven Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der Lipide in den Vesikeln und der hydrophoberen Oberfläche zu erklären sein, welche für die hydrophilere Oberfläche nicht existiert und somit eine sofortige Anlagerung der Vesikel zuläßt. Man sieht dies auch sehr schön in Abb. 96 in welcher die Schichtdicken nach 3-minütiger Fusion aufgetragen sind.

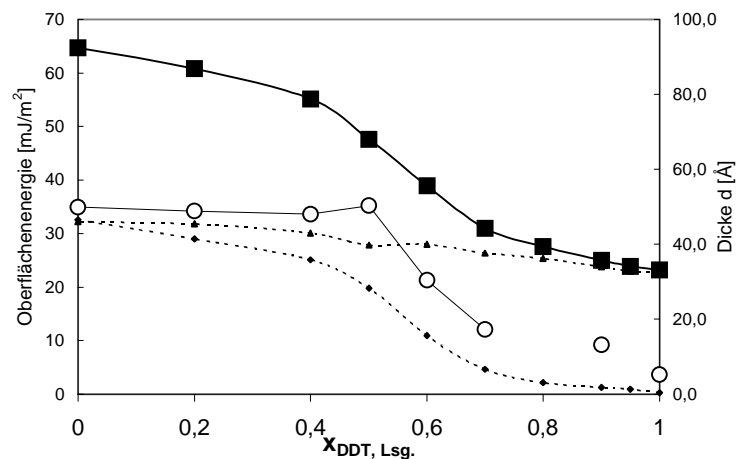


Abb. 96 Optische Schichtdicken d \circ nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} und im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien (total γ_s \blacksquare , polar γ_s^p \blacklozenge , dispers γ_s^d \blacktriangle).

Desweiteren wurde der Anfangsbereich der Fusionskinetik gegen \sqrt{t} aufgetragen und über das umgeformte 1. Fick'sche Gesetz

$$c_{surface}(t) = 2c_{bulk} \sqrt{\frac{D}{\pi}} \cdot \sqrt{t}$$

der Diffusionskoeffizient berechnet und in Tab. 14 aufgelistet.

| x_{DDT} | D [cm ² /s] |
|-----------|------------------------|
| 1 | 4,87E-09 |
| 0,95 | 2,52E-10 |
| 0,9 | 1,54E-07 |
| 0,7 | 7,61E-08 |
| 0,6 | 2,66E-06 |
| 0,5 | 1,27E-06 |
| 0,4 | 1,50E-06 |
| 0,2 | 1,40E-06 |
| 0 | 1,34E-06 |

Tab. 14 Diffusionskoeffizienten D in Abhängigkeit vom Molenbruch.

Die so ermittelten Diffusionskoeffizienten für die Fusion auf hydrophile Substrate ($x < 0.6$) liegen gut eine Zehnerpotenz über denen der Vesikel ($D = 7.5 \cdot 10^{-8}$ cm²/s; ermittelt über DLS), während sie für sehr hydrophobe Substrate auf Werte unterhalb abfallen.

Die Diffusionskoeffizienten korrelieren wie erwartet und in Abb. 97 aufgezeigt sehr gut mit den Schichtdicken nach 3-minütiger Fusion.

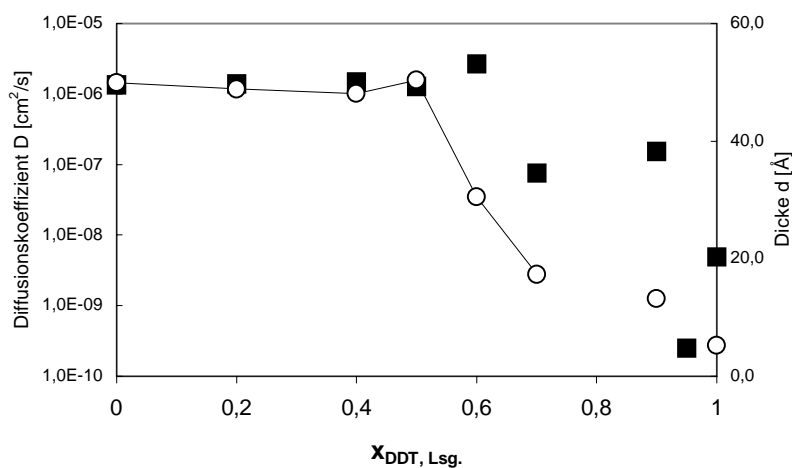


Abb. 97 Diffusionskoeffizienten D ■ und Schichtdicke d ○ nach 3-minütiger Fusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} .

In den bisherigen Abbildungen wurden die ermittelten Parameter jeweils zusammen mit dem polaren und dispersen Anteil, sowie der gesamten Oberflächenenergie des Substrats über dem Molenbruch aufgetragen, wodurch sich sehr gut der Einfluß des hydrophilen Anteils an der Oberflächenenergie auf Kinetik und Schichtdicke zeigen läßt. Wie zuvor erwähnt, handelt es sich bei dem Molenbruch um das Verhältnis von Alkanthiol zu Hydroxythiol in der

Inkubationslösung. Im Anhang (Kap. 7.2) sind Abb. 93, Abb. 96 sowie Abb. 89 nochmals gegen den nach der Cassie-Gleichung bestimmten Molenbruch im SAM aufgetragen.

Die Auftragung der Parameter gegen die in Tab. 13 tabellierten und in Abb. 89 aufgetragenen Grenzflächenenergien (zwischen Wasser und den binären SAMs) ist dagegen unabhängig von den Molenbrüchen.

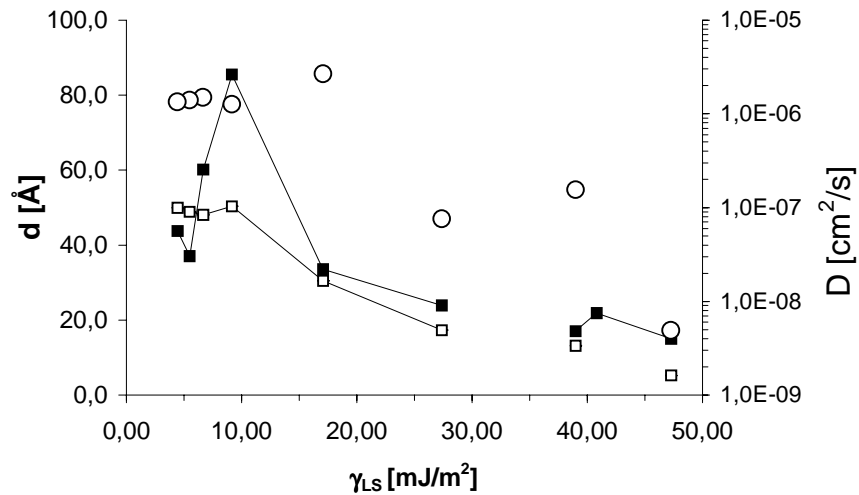


Abb. 98 Diffusionskoeffizient D ○, sowie Schichtdicken nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion □ und finale Schichtdicke ■ in Abhängigkeit von der Grenzflächenenergie zwischen den binären Monolayern und Wasser.

Man erkennt, daß die kinetischen Parameter wie Diffusionskoeffizient und Schichtdicke nach 3-minütiger Fusion unterhalb 10-15 mJ/m² nahezu konstant sind und erst bei höheren Grenzflächenenergien abnehmen. Die finale Schichtdicke erreicht ihr Maximum für 10 mJ/m².

3.5.4 Impedanz-Spektroskopie

Der Vesikelfusionsprozeß auf die binären Monolayer wurde auch mittels zeitaufgelöster Impedanzspektroskopie untersucht. In Abb. 99 sind die frequenzreduzierten Admittanzspektren der **Monolayer** geplottet. Die Filmkapazitäten bewegen sich zwischen der Kapazität des Dodekanthiolmonolayers $C=1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und der des Hydroxyundekanthiolmonolayers $C=3.15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

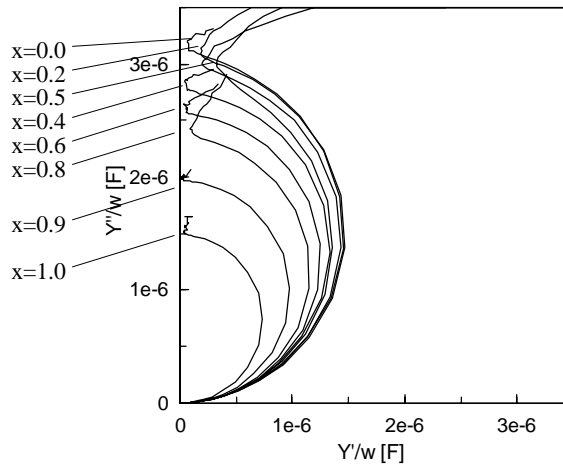


Abb. 99 Frequenzreduzierte Admittanzspektren der binären Monolayer.

Die Filmkapazität des DDT-Layers entspricht Mit $1.45 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ derjenigen, die man für ein C_{12} -Alkanthiol erwarten würde. Mit $\epsilon=2.3$ [Pla 94, Pla 95]) ergibt sich eine elektrische Schichtdicke von 14 \AA bei einer realen Dicke von 16 \AA . Die Kapazität des HUT-Layers mit annähernd gleicher Länge ist mit $3.15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ außergewöhnlich hoch. Finklea [Fin 96] berichtet von lediglich $1.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für einen HUT-SAM. Der HUT-Layer packt in diesem Fall wohl nicht sonderlich gut, was vielleicht auch auf den Assemblierungsprozeß aus THF zurückzuführen ist.

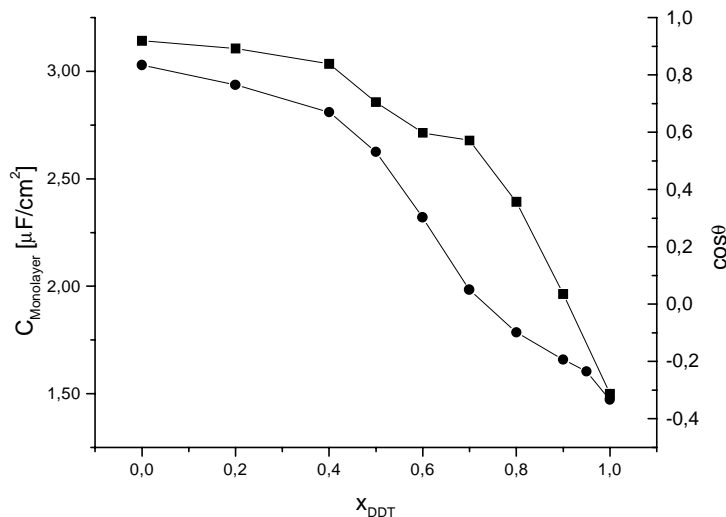


Abb. 100 Monolayer-Kapazitäten ■ und Kontaktwinkel ● über dem Molenbruch x_{DDT} .

Der deutliche Unterschied in den Kapazitäten hat aber andererseits auch den Vorteil, daß man sich den Verlauf der Filmkapazität über den Molenbruch anschauen kann. Tut man dies (Abb. 100), so findet man nicht die erwartete Linearität zwischen den beiden Grenzwerten. Dies mag wiederum auf dem schon für die Kontaktwinkel erwähnten Unterschied zwischen dem Molenbruch in der Inkubationslösung und an der Oberfläche basieren. Beide Kurven zeigen über den Molenbruch den gleichen Trend in der Abweichung von der Linearität. Dieser spricht von der Richtung der Abweichung her dafür, daß der Molenbruch in Lösung größer als auf der Oberfläche ist, was wiederum einer bevorzugten Adsorption des Hydroxyundekanthiols HUT aus der THF-Lösung entspricht.

Schaut man sich jetzt den **zeitlichen Verlauf der Filmkapazitäten** während der Vesikelfusion für die verschiedenen Substrate an, so erkennt man, daß die relativen Kapazitätsänderungen von den hydrophoben zu den hydrophileren Layern abnehmen und für den reinen HUT-Layer komplett verschwinden.

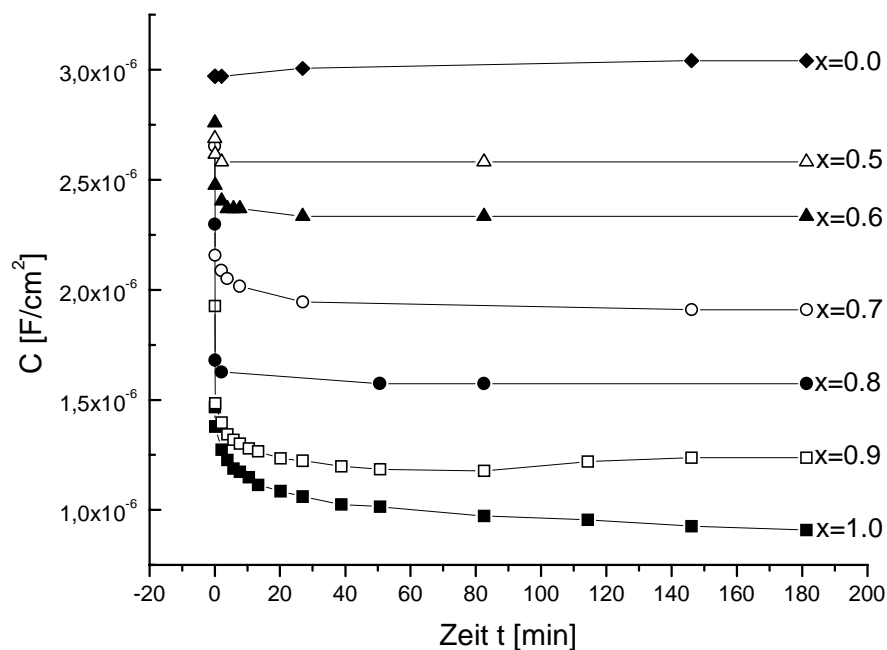


Abb. 101 Zeitlicher Verlauf der Filmkapazitäten während der Vesikelfusion.

Für den rein hydrophoben Fall ($x=1.0$) findet man eine deutliche Kapazitätsabnahme von 1.45 auf 0.9 [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]. Mit $\epsilon=2.7$ [Pla 94, Pla 95] errechnet sich hieraus eine Erhöhung der elektrischen Schichtdicke um lediglich 10 Å. Bei Verwendung eines ϵ von 3.9 überlagern die Kinetiken aus IS und SPR dagegen exakt (s. Abb. 102).

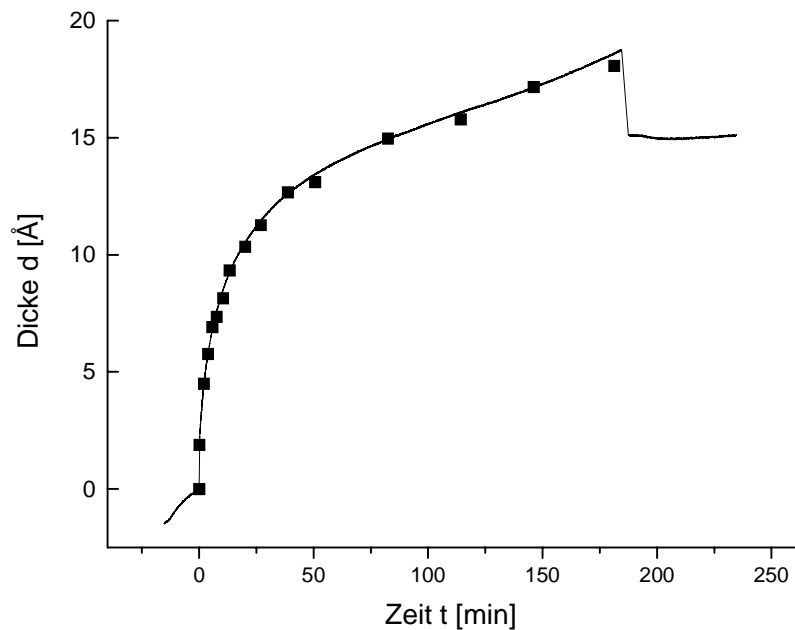


Abb. 102 Vergleich der Schichtdickenzunahme aus SPR --- und IS ■.

Für die rein hydrophilen Filme, für welche man in der SPR eine Schichtdickenzunahme in der Dicke eines Bilayers findet, beobachtet man in der Filmkapazität nach der Fusion so gut wie keine Änderung. Für Bilayer auf Glas wird die Existenz einer 10-30 Å dicken Wasserschicht zwischen Glas und Bilayer diskutiert [Bay 90, Joh 91, Sac 96]. Nimmt man an, daß sich diese auch auf hydrophilen Hydroxythiolmonolayern ausbildet, so könnte ein undichter, löchriger Film auf diesem Wasserpolster das Verhalten in den Impedanzspektren erklären.

3.5.5 Kraftmikroskopie (AFM)

Um die Ergebnisse aus Oberflächenplasmonenresonanz und Impedanzspektroskopie zu bestätigen und um vor allem Aussagen über die sich durch die Vesikelfusion ausbildenden Strukturen machen zu können, wurde als quasi-bildgebende Methode die Rasterkraftmikroskopie herangezogen. Dabei wurden als Extreme die Fusion von POPC-Vesikeln auf reine DDT- und HUT-Monolayer als auch auf einen 1:1-Monolayer betrachtet.

DDT-Monolayer

Für die Fusion auf die rein hydrophoben Dodekanthiol-Monolayer sah man durch die Vesikelfusion nur geringe Änderungen in den AFM-Aufnahmen. In Abb. 103 ist links die Aufnahme des DDT-Monolayers vor der Vesikelfusion (links) abgebildet. Man erkennt lediglich die vom Magnetronsputterprozeß herrührenden Goldcluster mit Korngrößen um 20 nm. Der aus dem Vesikelfusionsprozeß resultierende zusätzliche POPC-Monolayer sorgt für eine Glättung im AFM-Bild (rechts).

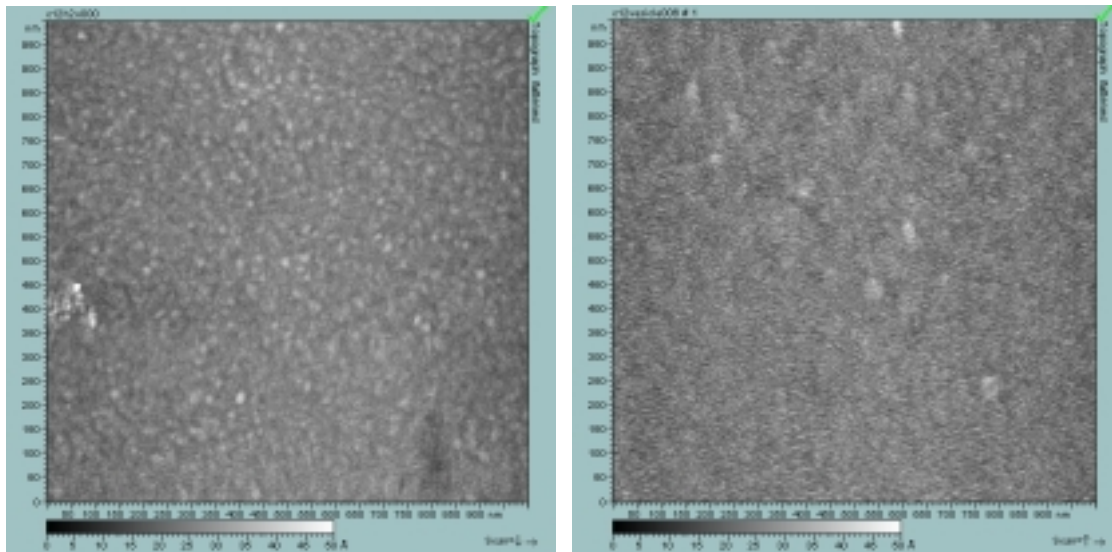
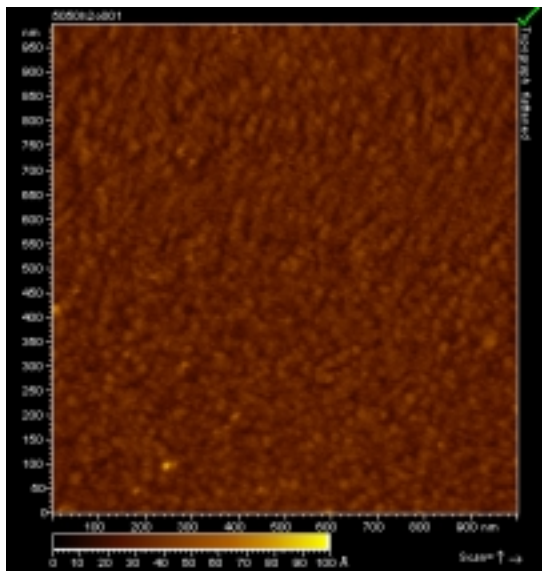
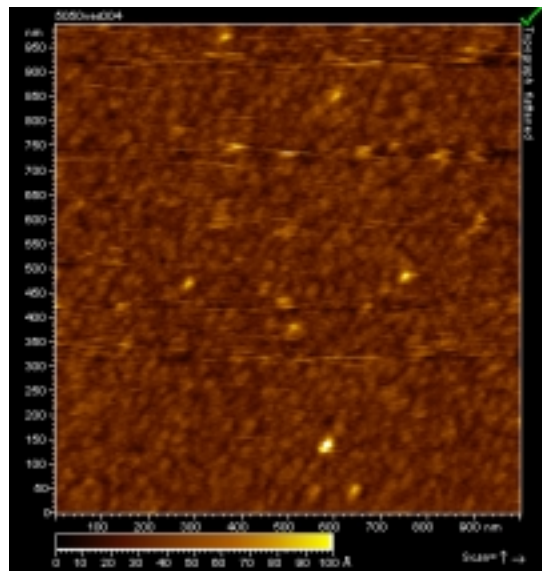
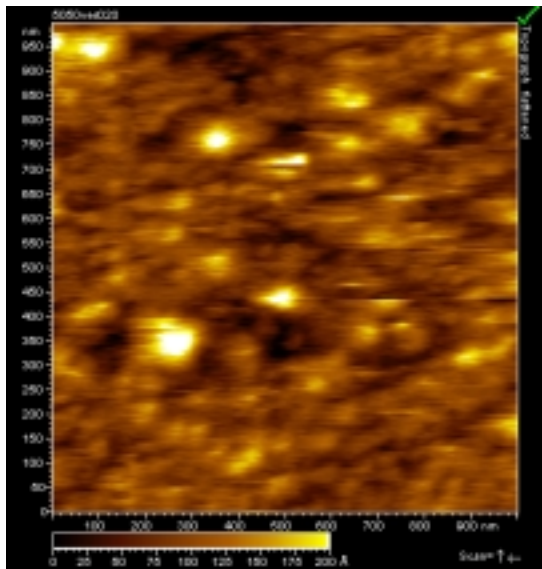


Abb. 103 AFM-Aufnahmen vor (links) und nach (rechts) POPC-Vesikelfusion auf einen DDT-Monolayer.

Das Fehlen von adsorbierten oder teilgespreiteten Vesikeln steht im Einklang mit der Schichtdickenzunahme um lediglich einen Monolayer in der Oberflächenplasmonenresonanz und der drastischen Kapazitätsabnahme in der Impedanzspektroskopie.

DDT/HUT-Monolayer (1:1)

In Abb. 104 sind die AFM-Aufnahmen vor, während und nach der Vesikelfusion auf einen gemischten DDT/HUT-Monolayer aufgezeigt. Man erkennt auch hier wieder zuerst die Goldcluster auf welchen sich aber mit zunehmender Fusionsdauer größere Gebilde abscheiden.

A: $t=0$ B: $t = 10 \text{ min}$ C: $t > 1 \text{ h}$ 

D: nach Fusion und Spülen

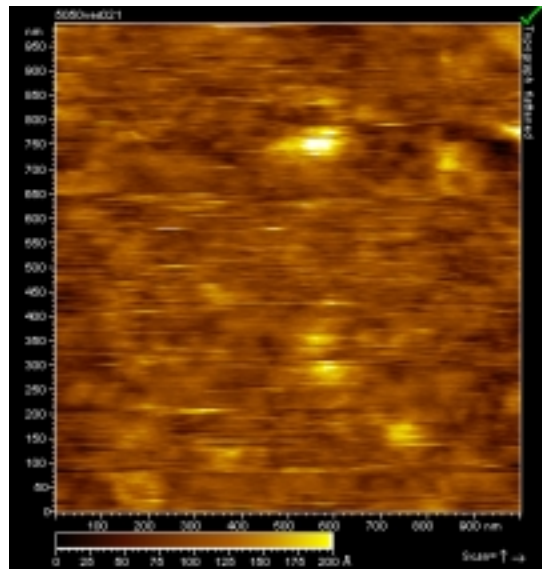


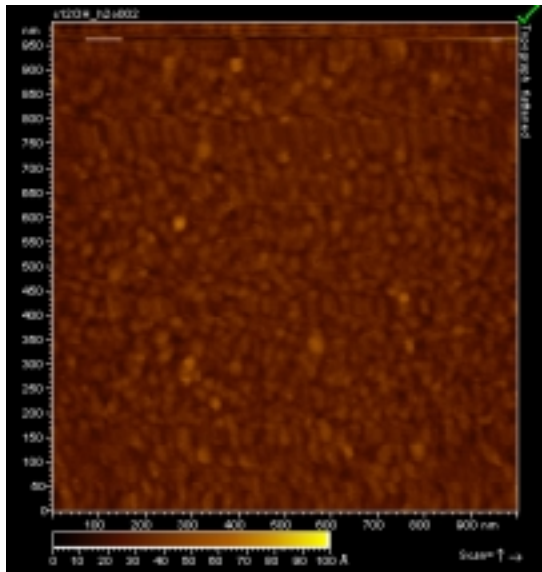
Abb. 104 AFM-Aufnahmen während der POPC-Vesikelfusion auf einem gemischten HUT-DDT-Monolayer ($x=0.5$).

Diese sind sehr weich und lassen sich nur mit geringster Kraft überhaupt noch sichtbar machen. Mit einem mittleren Durchmesser um 50 nm und einer zugegebenermaßen im tapping-Mode wenig aussagekräftigen Höhe um 20 nm liegen die sich ausbildenden Strukturen in der Größenordnung der verwendeten Vesikel ($d=58 \text{ nm}$).

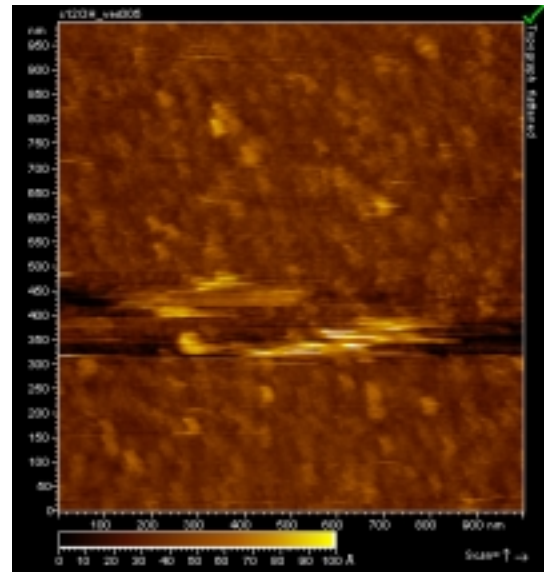
HUT-Monolayer

Bei der Untersuchung der Fusion auf den hydrophilen HUT-Monolayer scheint der AFM-Tip Einfluß auf den Fusionsprozeß genommen zu haben. Abb. 105 C zeigt den Beobachtungsbereich zu fortgeschrittener Fusionszeit. Es hat sich eine relativ homogene Schicht ausgebildet. Allerdings erkennt man an den seitlichen Bildrändern einen deutlichen Sprung. Ein anschließender Scan D in der Umgebung des vorigen Meßbereichs zeigt, daß sich die Struktur aus C nur in dem zuvor beobachteten $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ -Quadrat ausgebildet hat.

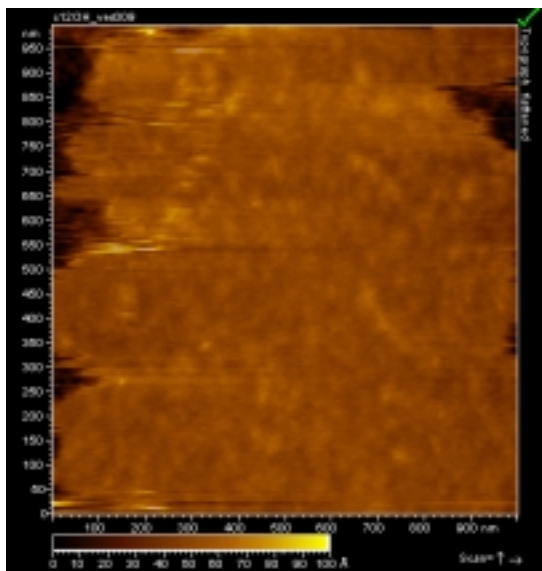
A: $t=0$



B: $t= 10 \text{ min}$



C: $t > 1 \text{ h}$



D: Umfeld von Bild C

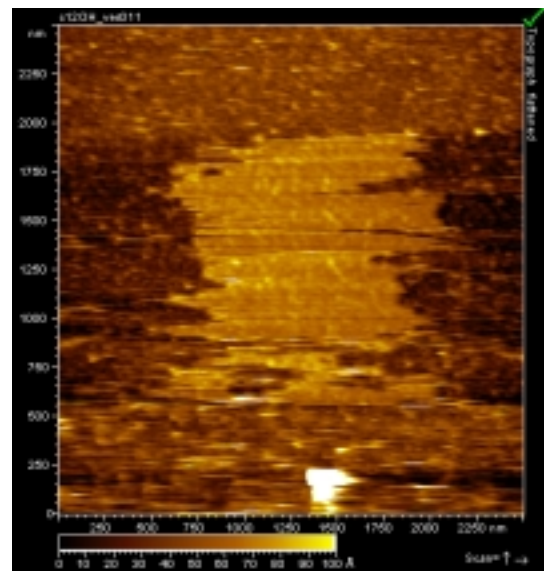


Abb. 105 AFM-Aufnahmen während der POPC-Vesikelfusion auf einen HUT-Monolayer.

Der Scanvorgang scheint hier zu der Ausbildung der Struktur beigetragen zu haben, weshalb hier kein Vergleich zu den IS- und SPR-Daten möglich ist.

3.5.6 Ergebnis

Mittels self-assembly von binären Hydroxyundekanthiol/Dodekanthiol-Mischungen in THF war es möglich binäre Monolayer ohne Phasenseparation auf Gold zu generieren, welche eine leichte Bevorzugung für die Adsorption des hydrophilen Thiols aufwiesen.

Kontaktwinkelmessungen mit geeigneten Lösungsmitteln nach der Methode von Owens erlaubten die Bestimmung des polaren und dispersen Anteil an der freien Oberflächenenergie sowie der Grenzflächenenergie zwischen Monolayer und Wasser.

Die Fusion von POPC-Vesikeln auf das rein hydrophobe DDT-Substrat resultiert in der Ausbildung eines zusätzlichen Monolayers, während sich auf dem rein hydrophilen HUT-Substrat ein zusätzlicher Bilayer ausbildet. Die zusätzliche Schichtdicke erreicht ihr Maximum auf gemischten Monolayern mit einer Grenzflächenenergie von ca. 10 mJ/m^2 . In diesem Fall liegt, wie auch die Rasterkraftmikroskopie zeigt, ein Maximum an adsorbierten bzw. teilgespreiteten Vesikeln vor.

Die Geschwindigkeiten des Fusionsprozesses sind für Monolayer mit hohem Hydroxythiolanteil und Grenzflächenenergien kleiner $10\text{-}20 \text{ mJ/m}^2$ nahezu identisch und schnell Sie nehmen zu größeren Grenzflächenenergien hin drastisch ab.

Die Kinetiken ließen sich nicht an das Modell von Hubbard et al. [Hub 98] für die Konzentrationsabhängigkeit der Fusion auf rein hydrophobe Monolayer anpassen, was dafür spricht, daß auf den Substraten mit hydrophilem Anteil zusätzliche oder andere Aggregationsmechanismen vorliegen.

Für die Anwendbarkeit der Vesikelfusion zur Generierung des oberflächendistalen Monolayers in Hybridmembranen läßt sich sagen, daß die Grenzflächenenergien $\gamma_{LS} > 27 \text{ mJ/m}^2$ und somit der Wasser-Kontaktwinkel $\Theta > 87^\circ$ sein sollten. Ansonsten kommt es zur Bildung von adsorbierten oder teilgespreiteten Vesikeln mit entsprechend schlechten Membrankapazitäten.

3.6 Proteine in festkörperunterstützten Lipidmembranen

In den folgenden Kapiteln werden die zuvor beschriebenen festkörperunterstützten Lipidmembranen auf ihre Fähigkeit zur Rekonstitution von Membranproteinen getestet. Es werden Vertreter der Kanäle, Porenbildner und Transporter (s. Tab. 3) in den Membranen rekonstituiert und auf ihre funktionelle Aktivität mittels elektrochemischer Techniken geprüft. Am Beispiel der Erythrozytenmembran wird schließlich die Eignung von festkörperunterstützten Membranen zur Immobilisierung ganzer Zellfragmente erörtert.

3.6.1 Porine

Das in Kapitel 1.4.2 beschriebene Porin aus *Rhodopseudomonas blastica* ermöglicht über die gentechnische Manipulation des Porendurchmessers eine Einstellung der Ionenselektivität, was durch Messungen an BLMs auch schon gezeigt wurde [Bra 99].

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Rekonstitution in festkörperunterstützte Membranen untersucht werden. Ein wesentliches Problem gegenüber Schwarzfilm-Membranen (BLMs) ist die nicht vorhandene Möglichkeit zur Detektion von Einzelkanaleinbauereignissen. Da das Porin zudem keinen definierten Schalter besitzt, wurde zunächst einmal versucht den Einbau über die Variation der Redoxaktivität eines löslichen Redoxpaares nachzuweisen.

Durchführung:

Zur Rekonstitution wurden die in Kap. 3.3 diskutierten gemischten DPPTE/DMPC-Bilayer-Membranen nach der in Kap. 3.3.1 beschriebenen Methode aufgebaut. Der Einbau selbst sollte analog zu den BLM-Experimenten über die Triton-X-Methode erfolgen. Hierzu wurde die Porin-Stammlösung (Porin in Mizellen des Detergens C8E4) mit Triton X versetzt und durch Injektion in die über der sBLM stehenden NaCl-Lösung (100 mM) unter die cmc verdünnt. Als Blindprobe diente jeweils ein Experiment in welchem nur Triton X ohne Porin injiziert wurde.

Der Einbauprozess wurde über die Aufnahme zeitaufgelöster Impedanzspektren (ohne Redoxpaar) verfolgt, wobei sowohl für die Probe als auch für die Blindprobe die vor der Inkubation relativ scharfen Bilayer-Kapazitäten von $1.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ deutlich auswaschen (s. Abb. 106). Die alleinige Präsenz des Detergens Triton X schien die Membran schon zu schädigen und hierdurch zur Inhomogenität der Impedanzspektren beizutragen.

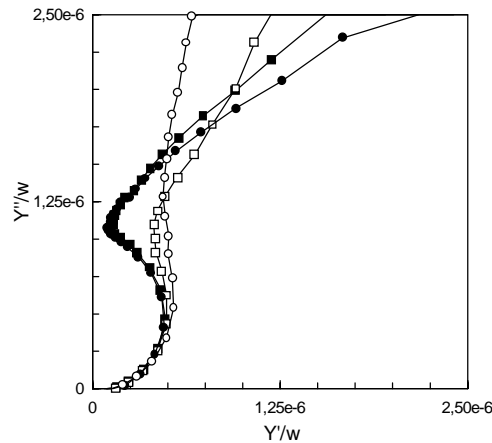


Abb. 106 Frequenzreduzierte Admittanzspektren der MBM vor (■/●) und nach Inkubation mit Triton-X/Porin □ bzw. nur mit Triton X ○.

Um die Änderungen zu quantifizieren wurde die Redoxaktivität eines löslichen Redoxpaares vor und nach der Inkubation anhand von zyklischen Voltammogrammen bestimmt. Die Baseline-korrigierten Differenz-Cyclovoltammogramme sind in Abb. 107 aufgetragen. Das CV einer durch die Inkubation unveränderten Membran würde in dieser Auftragung demnach auf der Abszisse laufen. Man erkennt aber schon für die nur mit Triton-X behandelte Referenzmembran eine deutliche Zunahme des Redoxstromes, was mit den zuvor in den Impedanzspektren gesehenen Änderungen schlüssig ist. Die Stromzunahme nach Inkubation mit porinhaltigen Detergenzlösungen fällt allerdings noch wesentlich deutlicher aus. Die Tatsache, daß weder für die Probe noch für die Referenz ein Zuwachs des Redoxstromes beim Redoxpotential von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($E^0 = +200 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$) gefunden werden konnte, spricht dafür, daß das Redoxpaar nie ungehindert in größerem Ausmaß an die Goldoberfläche gelangen kann. Es bedarf immer einer gewissen Überspannung, um den Redoxprozeß anzutreiben.

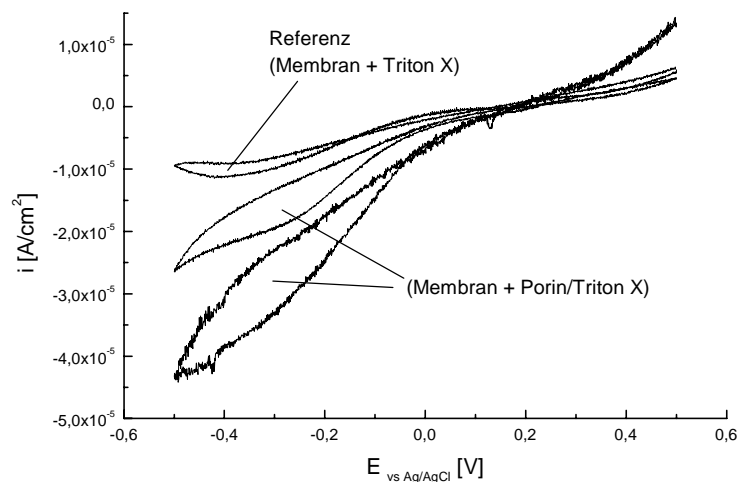


Abb. 107 Zyklische Voltammogramme ($v=100 \text{ mV/s}$) für $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($c=1\text{mM}$). Die Kurven ergeben sich als Differenz aus Voltammogrammen vor und nach Inkubation.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich über die Triton-X-Methode Porine in festkörperunterstützten gemischten Bilayermembranen einbauen lassen, wobei allerdings die alleinige Präsenz des Detergens schon die Membranhomogenität beeinflusst.

Durch Rekonstitution des Porins in Vesikeln und deren Fusion auf sub-Monolayer sollte es möglich sein dieses Problem zu umgehen. Experimente zur Rekonstitution des Porins in Vesikeln werden derzeit von Dr. Kerstin Braig durchgeführt.

Allerdings bleibt das Problem eines fehlenden Schalters für den Kanal bestehen. Ohne die Möglichkeit zum Vergleich der beiden Zustände „offen“ und „geschlossen“ für jede Membran, wird sich auch die Ionenselektivität der Porine mit unterschiedlichem Porendurchmesser nicht nachweisen lassen.

3.6.2 CF_0F_1 -ATPase

Das Problem eines fehlenden Schalters, wie es bei den Porinen auftritt, existiert für die ATPase nicht. Hier kann ATP als Schalter, bzw. die ATP-Konzentration sogar als Regler verwendet werden. In Abb. 108 ist schematisch aufgezeigt, wie durch die ATP-Konzentration der Protonenfluß durch die Membran und somit der Membranwiderstand beeinflusst wird.

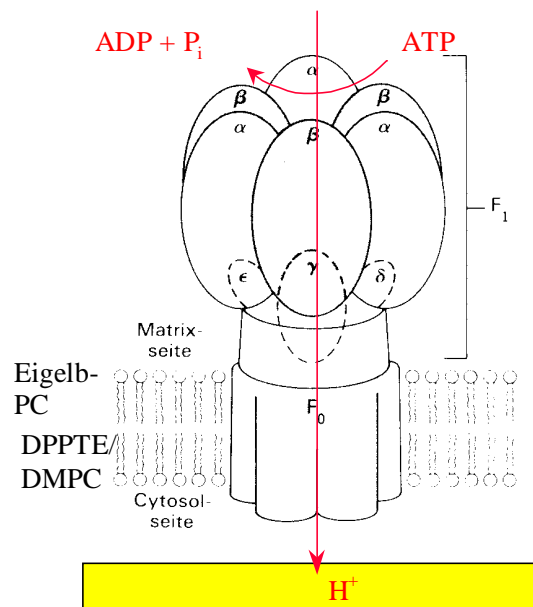


Abb. 108 Schema zur Funktionsweise der ATPase in festkörperunterstützten Membranen.

ATPasen wurden schon zuvor in festkörperunterstützten Membranen untersucht, wobei der Funktionsnachweis allerdings meist über die elektrochemische Protonenentladung erfolgte [Nau 95, Nau 97]. Dieser Prozeß geschieht auf Au-Elektroden erst bei relativ hohen Überspannung von ca. -700 mV, bei welchen die Membranen allerdings einen nur mehr vernachlässigbar kleinen Widerstand besitzen.

Im Rahmen der Dissertation von Dr. Steffen Lingler wurde ein impedanzspektroskopischer Funktionsnachweis, allerdings auch bei negativen Überspannungen geführt [Lin 98].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die ATPase-Aktivität bei Potentialen nachzuweisen, bei welchen die Membran noch ihren hohen Widerstand besitzt.

Hierzu wurden ATPasen einerseits durch Fusion von Proteoliposomen auf Submonolayer von DPPTE (s. Abb. 59) oder aber auf Monolayer des Spacerlipids JM335 rekonstituiert.

ATPase in spacerlosen Membranen

Die Präparation der DPPTE-Submonolayer erfolgte wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Hierauf wurden ATPase-Proteoliposomen (Präparation s. Kap. 4.3.3; $c=1.4$ mM, $\varnothing=400$ nm) in ATPase-Puffer (Tricin 0.5 mM; Na₂HPO₄ 0.5 mM; MgSO₄ 2 mM; KCl 100 mM; pH 7.4) bei T=30 °C auf die Submonolayer fusioniert und anschließend mit ATPase-Puffer gespült.

Die Schichtdicken betragen 38 Å ($1.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) nach Fusion des gemischten Monolayers, 14 Å ($8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) nach mehrmaligem Auswaschen von Fülllipid mittels Ethanol und 64 Å ($2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) nach Fusion der ATPase-Proteoliposomen (s. Tab. 15). Der Schichtdickenzuwachs von 50 Å durch letzteren Fusionsprozeß ist vergleichbar mit Werten aus der Literatur [Nau 95, Nau 97].

| | MBM | DPPTE-sub-Monolayer | sBLM mit ATPase |
|---------------------------------|-----|---------------------|-----------------|
| d [Å] | 38 | 14 | 64 |
| C [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] | 1.1 | 8 | 2 |

Tab. 15 Schichtdicken d und Kapazitäten C während der Rekonstitution der ATPase.

Zum Nachweis der ATPase-Aktivität wurde das Potential über die Membran zur Aktivierung des Enzyms [Jun 87] erst für 1 min. bei +300 mV (vs. Ag/AgCl) gehalten. Anschließend wurde die Leitfähigkeit der Membran in Abhängigkeit von der zutitrierten ATP-Menge, bei einer konstanten Meßfrequenz von 20 Hz, einem Biaspotential von 0 mV und 10 mV Wechselfspannung, impedanzspektroskopisch detektiert (s. Abb. 109).

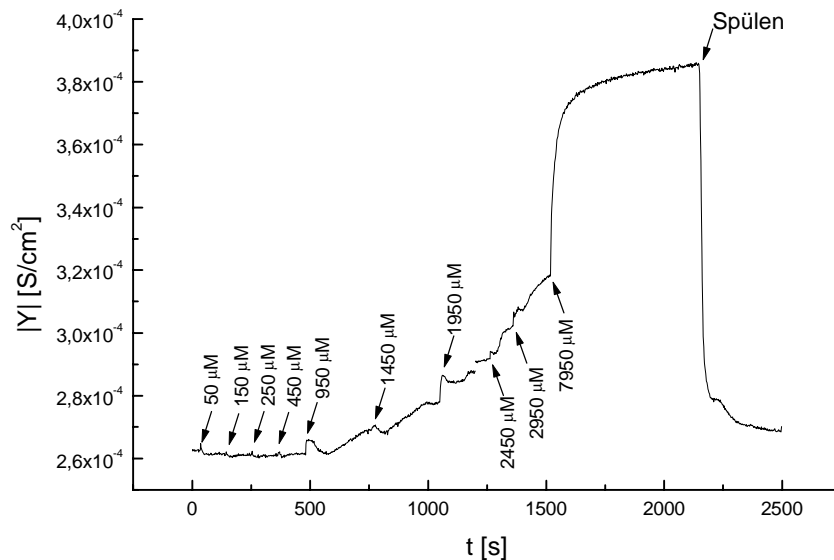


Abb. 109 Titration der Admittanz mittels ATP ($f=20$ Hz, Bias=0 mV, $U_{\sim}=10$ mV). Angegeben sind die jeweiligen ATP-Konzentrationen nach jeder Zugabe.

Die Admittanz steigt ATP-abhängig an und geht nach Wegspülen des ATPs auch wieder auf den Ausgangswert zurück. Allerdings erreicht man selbst bei maximaler ATP-Konzentration lediglich eine Verdoppelung der Admittanz.

Messungen kompletter Impedanzspektren nach diversen ATP-Zugaben zeigen, daß die Zunahme der Leitfähigkeit hier auch mehr auf einem kapazitiven Effekt, als auf einem Rückgang des Membranwiderstands beruht (s. Abb. 110). Bei höheren ATP-Konzentrationen decken sich das Impedanzspektrum des Submonolayers und das der Membran mit der aktiven ATPase. Die Aktivität der Pumpe kompensiert hier demnach den Einfluß der Lipidmembran auf das Impedanzspektrum.

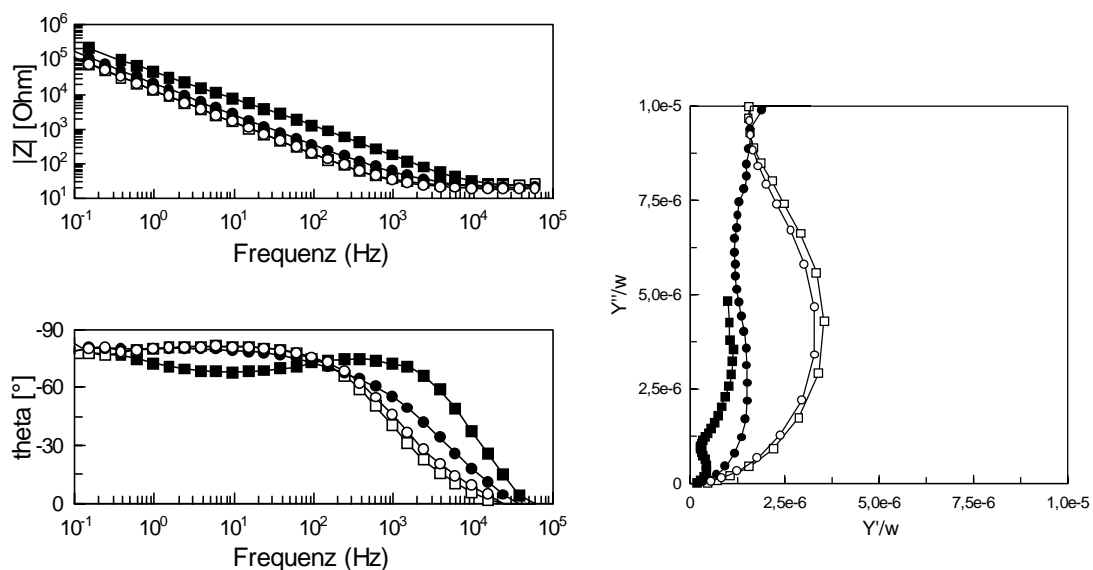


Abb. 110 Impedanzspektren (Bode-Plot und frequenzreduzierte Admittanz) für gemischte Membran ■, DPPE-Submonolayer □, Membran mit inaktiver ● und aktiver ○ ATPase.

ATPase in Spacerlipidmembranen

Die Präparation der Spacerlipid-Monolayer erfolgte durch Inkubation der Goldprobe in einer 1 mM Lösung des Spacerthiolipids JM335 (s. Abb. 74) in Ethanol. Hierauf wurden ATPase-Proteoliposomen (Präparation s. Kap. 4.3.3; $c=1.4$ mM, $\varnothing=400$ nm) in ATPase-Puffer bei $T=30$ °C auf die Monolayer fusioniert und anschließend mit ATPase-Puffer gespült.

Selbstorganisierte Monolayer des Thiolipids JM335 besitzen Schichtdicken um 28-32 Å mit einer Kapazität um 7-8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die anschließende Fusion der ATPase-Proteoliposomen zum Bilayer mit rekonstituiertem Protein resultiert nach einem sehr schnellen Fusionsprozeß (komplett nach ca. 30 min.) in einem Schichtdickenzuwachs zwischen 50 und 60 Å ohne merkliche Veränderung der ohnehin schon hohen Kapazität.

| | JM335-Monolayer | JM335-Hybrid-Bilayer mit ATPase |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| d [Å] | 30 | 80-90 |
| C [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] | 7-8 | 7-8 |

Tab. 16 Schichtdicken d und Kapazitäten C während der Rekonstitution der ATPase.

Zugabe von ATP bewirkt allerdings im Gegensatz zur Blindprobe (Bilayer ohne ATPase) einen sofortigen ATP-abhängigen Anstieg in der Membrankapazität, welcher auch nicht, wie im Fall der spacerlosen Membranen, durch Spülen mit ATPase auf die Ausgangswerte zurück geht (s. Abb. 111).

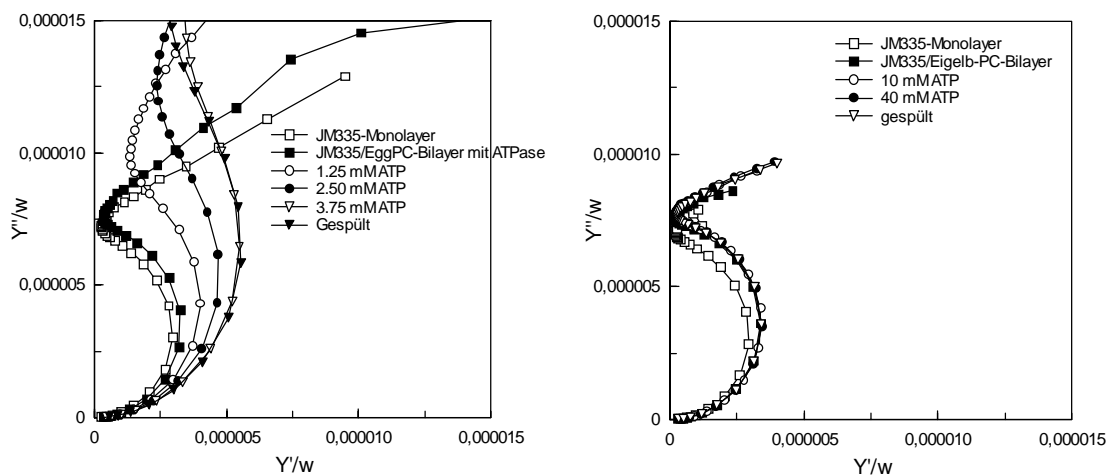


Abb. 111 Frequenzreduzierte Admittanzplots zum Verhalten der Membrankapazitäten während der Aktivitätstests. Bilayer mit rekonstituierter ATPase (links) und Referenz-Bilayer ohne ATPase (rechts).

Scheinbar hat der aufgebaute Gleichgewichts-Protonengradient hier, genauso wie im Fall der spacerlosen Membranen, einen Einfluß auf die gemessenen Kapazitäten und erhöht diese. Aufgrund des hier vorhandenen Reservoirs könnte man denken, daß die Relaxation der Protonenkonzentration hier vielleicht langsamer vonstatten geht als im Fall der quasi reservoirfreien, spacerlosen Membranen.

Andererseits spricht die Tatsache, daß auch 2 h nach dem Spülen noch keine Erholung der ursprünglichen Membrankapazität eintrat eher für eine irreversible Modifikation durch den aufgebauten Protonengradienten. In der SPR wurde während dieser Experimente ein minimaler Rückgang der Reflektivität bei festem Detektionswinkel festgestellt, was entweder auf Materialverlust oder auf den Brechungsindex ändernde Umorientierungen zurückgeführt werden kann.

Tatsache bleibt aber, daß dieses System durch die Aktivität der Pumpe irreversibel verändert wird und damit für weitere Titrations- und Inhibierungsstudien nicht geeignet ist.

Einige Überlegungen zu den Dimensionen des Reservoirs, des lateralen Platzbedarfs und deren Bedeutung für die Rekonstitution von aktiven Transportern

Die obigen Messungen führten dazu, daß einige Überlegungen zu den Dimensionen des Systems angestrebt wurden.

Zuerst einmal soll der **laterale Platzbedarf** in den festkörperunterstützten Membranen abgeschätzt werden. Der nahezu kreisrunde, membranintegrale F₀-Teil des Proteins besitzt einen gewaltigen Durchmesser von 22 nm (220 Å) (s.a. Abb. 112) und belegt somit eine Fläche von 380 nm² (38000 Å²). Dies ist das nahezu 1000-fache des Flächenbedarfs eines Lipid von 0.4 nm² (40Å²) bei einem gedachten Durchmesser von 0.7 nm (7Å).

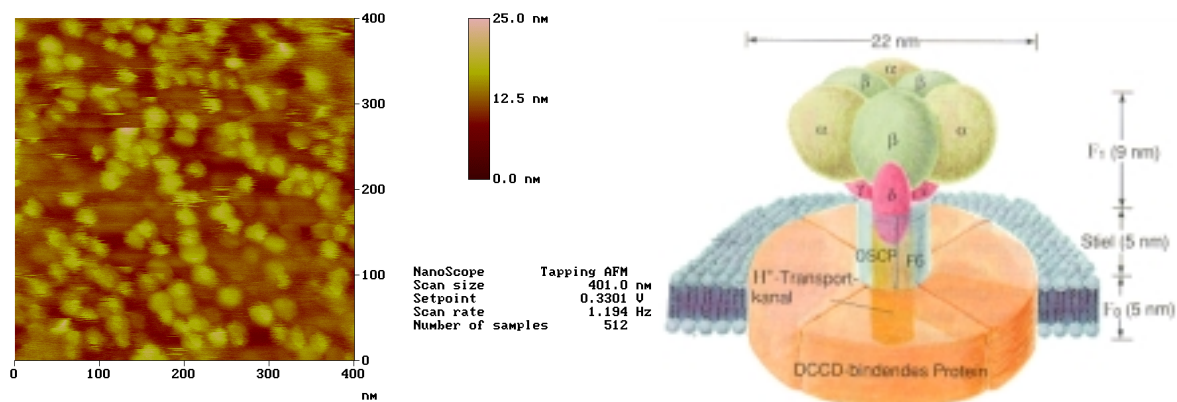


Abb. 112 Tapping-Mode-AFM-Aufnahme von H⁺-ATPase in festkörperunterstützter Membran (links) und schematische Größenverhältnisse (rechts; aus [Voe 92]).

Für die **spacerlosen Membranen** aus Fusion von ATPase-Proteoliposomen auf DPPE-sub-Monolayer wurde mittels reduktiver Desorption, leider erst nach Durchführung der ATPase-Experimente, eine Flächenbelegung mit ca. 80 % Ankerlipiden ermittelt (s. Kap. 3.3.4.3). Bei einer homogenen Verteilung der Thiolipide besteht demnach keine Möglichkeit das Protein in den oberflächennahen Monolayer einzubetten. Ein ungehinderter Einbau wäre demnach nur in eventuell vorhandenen thiolipidfreien Domänen möglich, wo das Protein allerdings wiederum auf der hochenergetischen Goldoberfläche denaturieren sollte.

Für die **Spacer-Membranen** aus Fusion von ATPase-Proteoliposomen auf selbstorganisierte, lateral unverdünnte Spacerlipidmonolayer gilt aufgrund der noch höheren Ankerdichte bei einer vernachlässigbaren Spacerlänge um 40 Å die oben geführte Diskussion bzgl. des lateralen Platzbedarfs natürlich erst recht.

Ein weiteres Problem ist die **Größe des Reservoirs zwischen Elektrode und Membran**. Bei der H⁺-ATPase handelt es sich um einen aktiven Transporter. Aktive Transporter besitzen im Vergleich zu Ionenkanälen (10^7 s^{-1}) nur sehr geringe Transportraten (10^2 s^{-1}) [Gen 89]. Dafür ist der Transport aber gerichtet und somit mit dem aktiven Aufbau eines Konzentrationsgradienten verbunden. Im Fall der CF₀F₁-ATPase handelt es sich um einen aktiven Uniporter (s. Tab. 3), welcher Protonen unidirektional mit einer Hydrolyserate von 10-20 ATP s⁻¹ (bei 4 H⁺/ATP) [Sch 87] über die Membran transportiert. Der Transport resultiert also hier in einem pH-Gradienten über die Membran.

Im folgenden ist eine **Beispielrechnung** zum zeitlichen Aufbau des Protonengradienten aufgeführt.

Es wird wieder von einem lateralen Platzbedarf von 380 nm² für eine ATPase ausgegangen. Bei einer gedachten Flächenbelegung von nur 10 % aktivem Protein (laut AFM ist sie höher, s. Abb. 112) und einer Spacerlänge von 4 nm beträgt das Reservoir-Volumen pro ATPase $V = 10 \times 380 \text{ nm}^2 \times 4 \text{ nm} = 15200 \text{ nm}^3 (= 1.52 \cdot 10^{-20} \text{ l})$. Eine Pumprate von 100 s⁻¹ entspricht einer zeitlichen Stoffmengenänderung von $\Delta n(\text{H}^+) = 100/6.022 \cdot 10^{23} = 1.66 \cdot 10^{-22} \text{ Mol/s}$ was im obigen Volumen einer **zeitlichen Konzentrationsänderung** von $\Delta c(\text{H}^+) = 0.011 \text{ [Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] = 11 \text{ [mM/s]}$ entspricht.

In einem ungepufferten System mit einem Anfangs-pH von 7.4 ist dieser bereits nach nur 1 ms Aktivität um 2.44 pH-Einheiten auf 4.96 abgefallen. Nach nur 1 s wäre er, wenn sich nicht vorher schon ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen ATP-Konzentration und H⁺-Gradient über die Membran einstellen würde, auf pH 1.96 abgefallen.

In gepufferten Systemen verlängert sich die Einstellungsphase entsprechend der Pufferkapazität. Im konkreten Beispiel puffert der Tricin-Phosphat-Puffer ($pK_S=8.05$) mit einer Pufferstärke von $c = 10 \text{ mM}$ das System ca. 1 s bevor auch hier der schnelle pH-Abfall einsetzt.

Während den vergleichsweise langsamen impedanzspektroskopischen Messungen befindet sich das System also längst im thermodynamischen Gleichgewicht und eventuell gemessene Effekte auf den Widerstand sollten höchstens aus dem pH-Ausgleich über Membrandefekte resultieren.

Die Titration der Admittanz in Abb. 109, welche ja hauptsächlich kapazitiven Ursprungs ist (s. Abb. 110), könnte mit diesem Modell erklärt werden. Je größer die ATP-Konzentration in der überstehenden Lösung ist, um so größer wird auch der pH-Gradient bzw. die Protonenkonzentration im Reservoir ausfallen. Je größer wiederum dieser Protonengradient über die Membran ausfällt, um so schneller sollten auch die Ausgleichprozesse über Defekte in der Membran oder die Membran selbst ablaufen. Dies würde erklären warum man bei höheren ATP-Konzentrationen plötzlich wieder das Impedanzspektrum des Submonolayers erhält.

Auch die Rechteckvoltammogramme, die chronoamperometrischen und potentiodynamischen Messungen [Nau 95, Nau 97, Lin 98], welche auf der Entladung der Protonen zu Wasserstoff beruhen, können mit diesem Modell erklärt werden. Demnach überlagern sich wahrscheinlich zwei Effekte. Zum einen wird die Messung zu einem Zeitpunkt gestartet, in welchem sich das System in obigem Gleichgewicht befindet. Der anfängliche Redoxstrom bei Erreichen entsprechender Überspannungen würde also von der Gleichgewichts-Protonenkonzentration im Reservoir abhängen, welche letztendlich wieder durch die ATP-Konzentration bestimmt wird. Dies ist der Zustand der mittels der Rechteckvoltammogramme [Nau 95, 97] detektiert wird und einem pH-Gradienten von pH 7.4 nach maximal pH 5.0 entspricht [Sch 87]. Erst durch die Entladung wird das System aus dem Gleichgewicht gebracht und die Pumpe liefert Protonen nach, welche wiederum entladen und mittels der Chronoamperometrie [Nau 97] detektiert werden können. Welcher der beiden Effekte den größeren Einfluß auf den Redoxstrom hat, hängt demnach in den potentiodynamischen Messungen [Lin 98] von Parametern wie Vorschubgeschwindigkeit und Pufferkonzentration ab.

Es gilt also zwei Effekte gegeneinander abzuwiegen. Einerseits muß man die Protonen entladen um das System aus dem Gleichgewicht zu bringen und die eigentliche Pumpaktivität

zu sehen. Andererseits liegt die Überspannung für diesen Prozeß auf Gold mit ca. -700 mV (vs. Ag/AgCl) in einem Bereich in dem der Membranwiderstand schon zusammenbricht. Abhilfe könnte hier eventuell der Aufbau entsprechender Membranen und Durchführung des Experiments auf Silber bringen, auf welchem die Überspannung für die Protonenentladung deutlich reduziert ist.

Die oben geführte Diskussion bezüglich der Funktion von aktiven Transportern in festkörperunterstützten Membranen gilt natürlich auch für andere aktive Transporter. Und dies um so mehr als im Fall der H⁺-ATPase das gepumpte Ion sogar noch gepuffert werden konnte, was für andere Ionen nicht möglich ist. Das Reservoirvolumen ist einfach zu klein um einen aktiven Fluß längere Zeit aufrecht zu erhalten und das System geht sehr schnell in ein durch den aufgebauten Konzentrationsgradienten bedingtes thermodynamisches Gleichgewicht über.

3.6.3 Annexin V

Bei Annexin V handelt es sich um einen Porenbildner und die im vorigen Kapitel erwähnten Bedenken bezüglich der Tauglichkeit von festkörperunterstützten Membranen für die Rekonstitution von aktiven Transportern entfallen hier. Zudem ist Annexin V kein membran-durchspannendes Molekül, so daß andere Punkte der Kritik wie zu hohe Ankerdichte oder Denaturierung von Proteindomänen an der Goldoberfläche ebenfalls unbegründet sind.

Natürliches Annexin V lagert Ca^{2+} -induziert an negativ geladene Membranen an und bildet durch Störung der Membranstruktur eine Pore aus. Leider fehlt dem Wildtyp dabei ein vernünftiger Schalter. Dem hat die Gruppe von Prof. Dr. A. Skerra an der TU München durch die Entwicklung eines Expressionssystems für ein Fusionsprotein aus Annexin V und einem *strep*-tag abgeholfen [Ske]. Damit besitzt das System einen potentiellen Biotin-Streptavidin-Schalter, der im Rahmen des Verbundprojektes [Bio 99] an festkörperunterstützten Biomembranen auf seine Tauglichkeit getestet werden sollte.

Annexin V benötigt zur Ca^{2+} -induzierten Anbindung an Lipidmembranen negativ geladene Lipide wie zum Bsp. Phosphatidylserine. Es wurden deshalb verschiedene Versuche unternommen um stabile DMPS-haltige festkörperunterstützte Bilayer auf Gold aufzubauen.

Experimente zur Fusion reiner DMPS-Vesikel auf DPPTE-Monolayer, DPPTE-Submonolayer oder über elektrostatische Anbindung auf kationische Cysteamin-Monolayer (Mercaptoethylamin) schlugen alle aufgrund mangelnder Stabilität in Ca^{2+} -haltigem Puffer fehl [Sil 84, Hau 84].

Erst die Fusion gemischter DMPS/DMPC-Vesikel mit geringem DMPS-Anteil (10%) [analog Sau 98] auf DPPTE-Monolayer bzw. DPPTE-Submonolayer resultierte in stabilen festkörperunterstützten Membranen.

Für diese Experimente wurde den spacerlosen DPPTE-Systemen der Vorzug gegenüber den Spacerthiolipiden gegeben, da kein Reservoir für gepumpte Ionen oder zur Beherrschung von hydrophilen Proteindomänen benötigt wird und das spacerfreie System dann die wesentlich besseren elektrischen Eigenschaften besitzt.

3.6.3.1 Optische Messungen an DPPTE/(DMPS/DMPC)-Hybridmembranen

In ersten Experimenten wurde in der Oberflächenplasmonenresonanz geprüft, ob die Bindungsvorgänge von Annexin V, einer Streptavidinmutante und EDTA wie gedacht ablaufen.

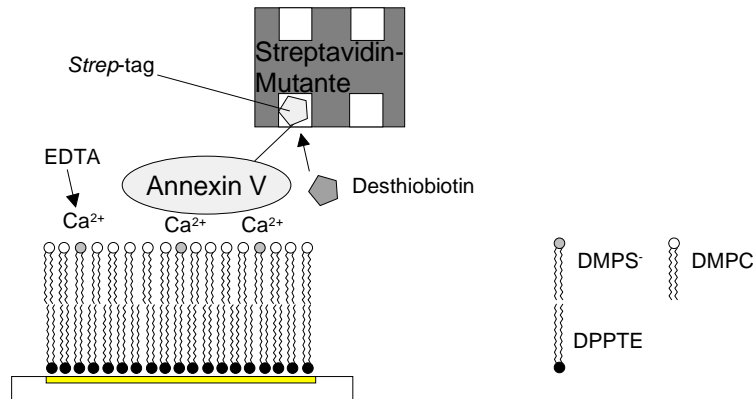


Abb. 113 Schema zur Modifizierung einer festkörperunterstützten Hybridmembran in den optischen Experimenten.

Der DPPTE-SAM wurde wie in Kap. 3.2.3 beschrieben durch Selbstorganisation aus Chloroform ($c=1\text{mM}$) hergestellt.

Die Fusion der DMPS/DMPC-Vesikel ($x_{\text{DMPS}}=0.1$, $c=100\ \mu\text{M}$) auf die **SA-DPPTE-Monolayer** erfolgte aus NaCl-Lsg. (100 mM) bei $T=40\ ^\circ\text{C}$ über 5 Stunden.

Nach vollendeter Fusion wurde mit NaCl-Lösung gespült und dann gegen Ca-Puffer (5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 20 mM TRIS/HCl pH8, 0.02% NaN_3) ausgetauscht. Dabei blieben die Schichten stabil und zeigten in der Plasmonenresonanz nach abermaligem Wechsel auf die NaCl-Lösung unveränderte Reflektivität. Der Schichtdickenzuwachs durch die Fusion betrug zwischen 15 und 20 Å ($n=1.5$) und liegt damit in der Größenordnung eines Monolayers. Auch das Absinken der Membrankapazität von 0.8 auf 0.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ verbunden mit einer Widerstandserhöhung ähnelt dem schon bei den DPPTE-DMPC-HBMs beobachteten Verhalten.

Durch Zugabe von Annexin V in NaCl-Lösung erfolgte keine Adsorption des Annexins. Durch Zugabe geringer Mengen Ca^{2+} konnte aber spontane Adsorption ausgelöst werden, was die **Ca^{2+} -induzierte Anbindung** beweist.

In der Regel wurden geringe Mengen Annexin V ($c = 0.385\ \mu\text{M}$) in den Ca-Puffer über der Membran injiziert. Die Anbindung erfolgte sehr schnell in nur wenigen Minuten und durch anschließendes Spülen mit Ca-Puffer ließ sich keinerlei Material von der Oberfläche entfernen, was für eine hohe Affinität des Annexins zur Membran spricht.

Um die **Reversibilität** dieser Bindung zu kontrollieren, wurde der Ca-Puffer durch Spülen mit EDTA-Puffer (10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM TRIS/HCl pH8, 0.02% NaN₃) ausgetauscht. Dabei verbleiben ca. 10% des Proteins auf der Oberfläche, was auf unspezifische Adsorption des Proteins oder schlechte Zugänglichkeit der Bindungsplätze für EDTA zurückzuführen sein mag.

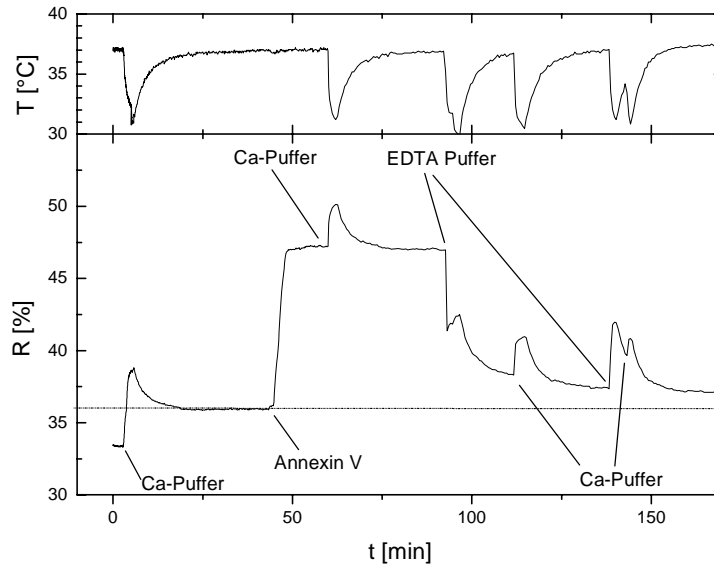


Abb. 114 Schichtdickenänderungen nach Annexin V-Zugabe und Ablösung mittels EDTA.

Eine Besonderheit des hier verwendeten Annexin V ist sein *strep*-tag. An diesen sollte im nächsten Modifikationsschritt eine **Streptavidinmutante** (Streptavidinmutante 1, [Ske]; $K \approx 1 \mu\text{M}$) angebunden und anschließend durch Desthiobiotin kompetitiv verdrängt werden.

Abb. 115 zeigt, daß die Anbindung der Streptavidinmutante erfolgt. Die Bindungskonstante ist so schwach, daß sich nach Ersetzen der Streptavidin-Inkubationslösung ($c = 0.985 \mu\text{M}$ in Ca-Puffer) durch reinen Ca-Puffer alles Streptavidin ablöst.

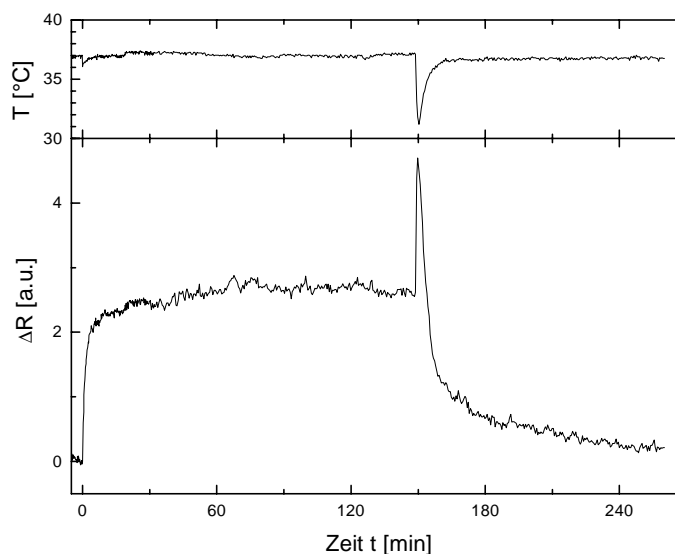


Abb. 115 Adsorption und Ablösung der Streptavidinmutante aufgrund des Verteilungsgleichgewichts.

Zugabe von **Desthiobiotin** ($c = 0.125 \text{ mM}$) zu der über der Membran stehenden Streptavidin-Inkubationslösung führte zu der erwarteten kompetitiven Verdrängung und somit der Ablösung der Streptavidin-Mutante vom *strep*-tag des Annexins.

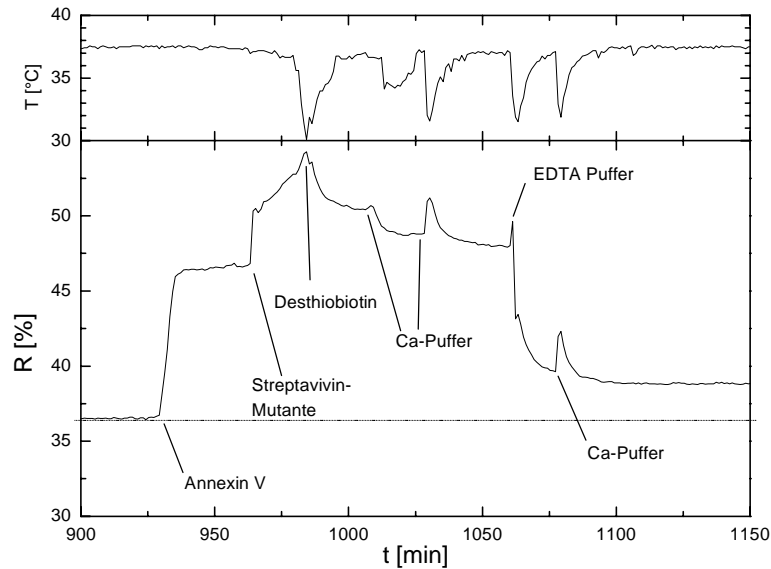


Abb. 116 Schichtdickenänderungen nach Zugabe von Annexin V, Streptavidin-Mutante, Desthiobiotin und EDTA.

Leider resultierte die Anbindung des Annexin V in den Hybridmembranen in keiner Verringerung des Membranwiderstands durch Ausbildung von Poren. Dies mag durch den Aufbau des Hybridbilayers bedingt sein. Der oberflächenproximale DPPTE-Monolayer bestimmt durch seine dichte Packung das Widerstandsverhalten der Membran und die Ausbildung einer Pore im oberflächendistalen Monolayer hat somit so gut wie keinen Einfluß auf das Impedanzspektrum.

Deshalb wurde als System für die elektrischen Messungen ein DMPS/DMPC-Monolayer auf einem sub-DPPTE-Monolayer mit verringerter Ankerdichte herangezogen.

3.6.3.2 Impedanzspektroskopie an sub-DPPTE/(DMPS/DMPC)-Membranen

DPPTE-Submonolayer wurden wie in Kap. 3.2.3 beschrieben aufgebaut und die Fusion der DMPC/DMPS-Vesikel erfolgte wie im vorigen Kapitel für den DPPTE-SAM beschrieben.

Der DPPTE-Submonolayer erholte sich dabei durch die Fusion der DMPS/DMPC-Vesikel von einer Kapazität von 2.5 auf $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerstandswerten im $100 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ -Bereich.

Nach jedem der jetzt folgenden Modifikationsschritte wurden die Membranen bei verschiedenen Bias-Spannungen in 50 mV -Schritten zwischen $+100$ und -100 mV impedanzspektroskopisch vermessen.

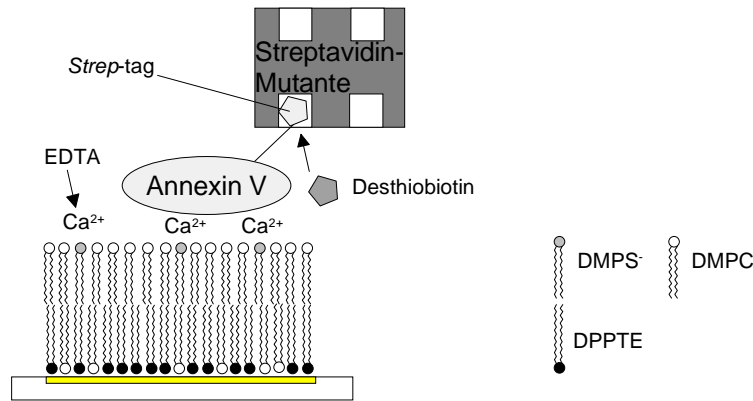


Abb. 117 Schema zur Modifizierung einer festkörperunterstützten Hybridmembran in den elektrochemischen Experimenten.

Die reine Membran im Ca-Puffer zeigte keine Bias-Abhängigkeit in den Impedanzspektren. Nach **Annexin**-Zugabe fiel der Membranwiderstand bei konstanter Membrankapazität um fast zwei Dekaden erst auf ca. $2.5 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ und nach einer weiteren Stunde dann sogar auf ca. $1 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ab (s. Abb. 118).

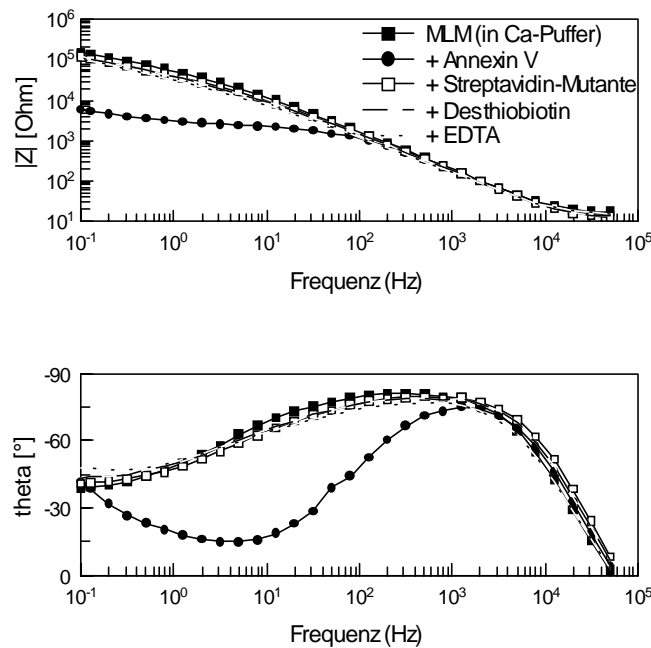


Abb. 118 Impedanzspektren im Bode-Plot während den Modifikationsschritten (Bias = 0 mV)

Durch Zugabe der **Streptavidin-Mutante** erholte sich der Membranwiderstand und die Membran zeigte wieder das Ausgangsspektrum vor der Annexin-Modifikation. Das Binden der Mutante blockiert dabei entweder die Pore oder führt zu strukturellen Änderungen, welche die Passage von Ionen durch die Pore verhindern.

In den optischen Messungen (Kap. 3.6.3.1) wurde gezeigt, daß die Streptavidin-Mutante bei Zugabe von **Desthiobiotin** kompetitiv vom *strep*-tag des Annexins abgelöst wird. Der

Widerstandsabfall, den man für die hieraus resultierende Situation erwarten würde, trat allerdings nicht wieder auf. Vielleicht waren 45 Minuten nicht genügend Zeit um die vollständige Ablösung der Mutante oder das Stören der Membranintegrität zu gewährleisten.

Ein anschließender Ablöseversuch des Annexins mit **EDTA** zeigte dann wiederum wie erwartet keine Änderung im Impedanzspektrum.

Im Übrigen schien es eine kritische Notwendigkeit zu sein, daß die Membran vernünftige elektrische Eigenschaften besitzt. Während man für den Bilayer mit $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ die Porenbildung elektrochemisch beobachten konnte, zeigten parallel durchgeführte Experimente an Bilayern mit schlechteren Kapazitäten im Bereich um $1,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ schon keine Reaktion mehr auf inkorporiertes Annexin. Dafür fand sich bei diesen aber schon für die reinen Bilayer bei gleichbleibender Kapazität eine deutliche Abhängigkeit des Widerstands vom Biaspotential (s. Abb. 119).

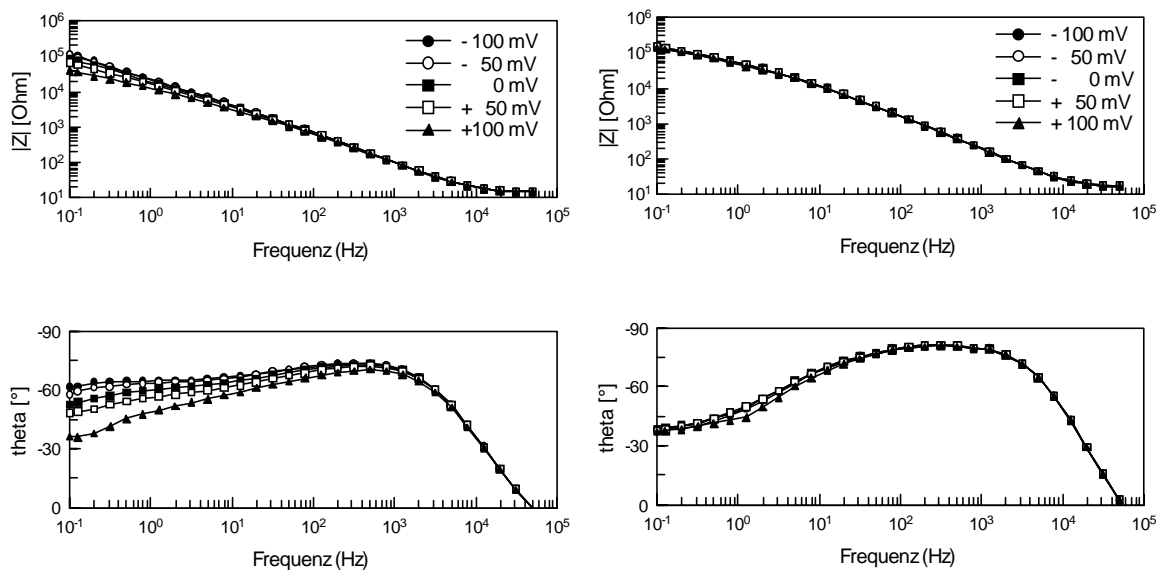


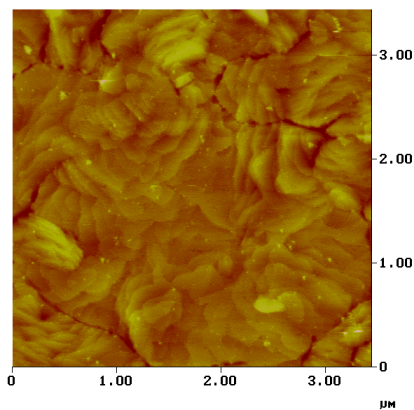
Abb. 119 Biasabhängigkeit der Impedanzspektren für löchrigen (links) und intakten (rechts) Bilayer

Die Tatsache, daß aus der Fusion in der kombinierten Meßzelle resultierende Membranen meist etwas schlechtere elektrische Werte aufwiesen als jene aus den reinen Elektrochemiezellen, verhinderte die impedanzspektroskopische Aufzeigung der Porenbildung in kombinierten Plasmonen-/Impedanzexperimenten.

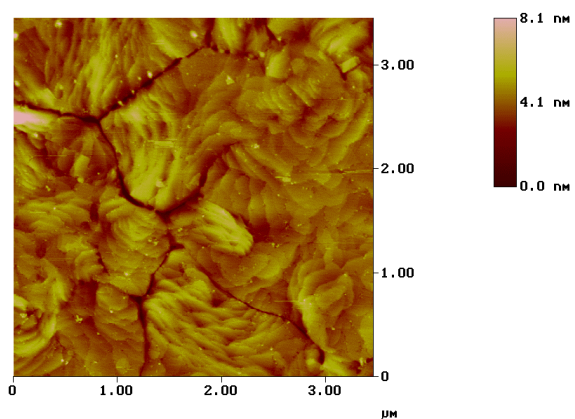
3.6.3.3 Kraftmikroskopie (AFM)

Die in der Plasmonenoptik durchgeführten Modifikation an der HBM (Kap. 3.6.3.1) wurden im AFM wiederholt. In Abb. 120 A und B erkennt man lediglich den Au-Untergrund. Die Lipidbilayer selbst waren wiederum zu weich um detektiert zu werden. In C erkennt man die Ca^{2+} -induzierte Adsorption des Annexin V. Sie scheint in Domänen zu erfolgen. Die anschließende Anbindung der Streptavidin-Mutante resultiert in einer deutlichen Kontrasterhöhung in welcher die Domänen noch deutlicher werden.

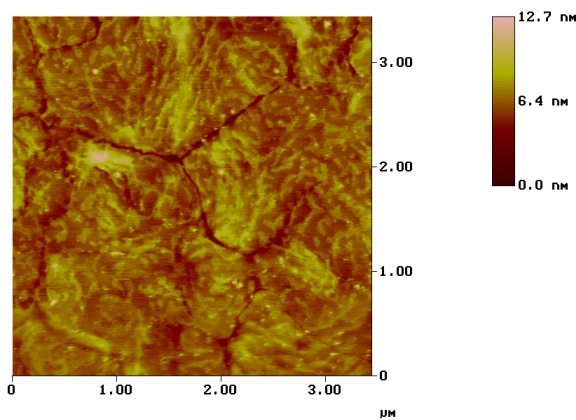
A: HBM in NaCl



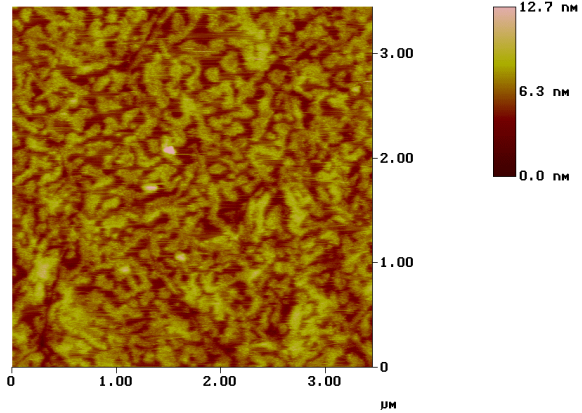
B: HBM in Ca-Puffer



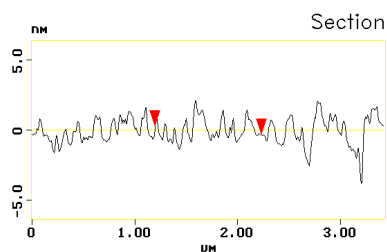
C: HBM mit Annexin V



D: HBM mit Annexin V und Streptavidin-Mutante



E: Schnitt durch C



F: Schnitt durch D

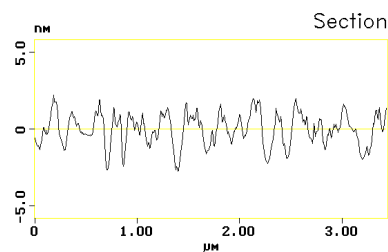


Abb. 120 Tapping-Mode AFM Aufnahmen während den Modifikationsschritten; A: HBM in NaCl; B: HBM in Ca-Puffer; C: HBM mit Annexin V; D: HBM mit Annexin V und Streptavidin-Mutante; E: Schnitt durch C; F: Schnitt durch D.

3.6.4 Bande 3-Protein in roten Blutzellen

Als Beispiel für die Rekonstitution ganzer Membran- bzw. Zellfragmente in festkörperunterstützten Biomembranen, ohne vorherige Isolierung und Rekonstitution der Membranbestandteile, wurde die Fusion Hämoglobin-entleerter roter Blutzellen (Erythrocyten, RBC) auf hydrophobe Substrate gewählt. Untersuchungen zu Systemen dieser Art wurden bereits in der Gruppe von Dr. A. Plant an Alkanthiolmonolayern durchgeführt [Rao 97]. Dort wurden die Alkanthiol-RBC-Hybridmembranen mittels Ellipsometrie, Oberflächenplasmonenresonanz, Kontaktwinkel, Kapazität, Voltammetrie, Elektronenmikroskopie sowie Atomarer Kraftmikroskopie charakterisiert.

In der hier durchgeführten Studie wird ein Vergleich zwischen den aus RBC-Fusion auf Dekanthalmonolayer bzw. DPPTE-Submonolayer resultierenden Schichten angestellt.

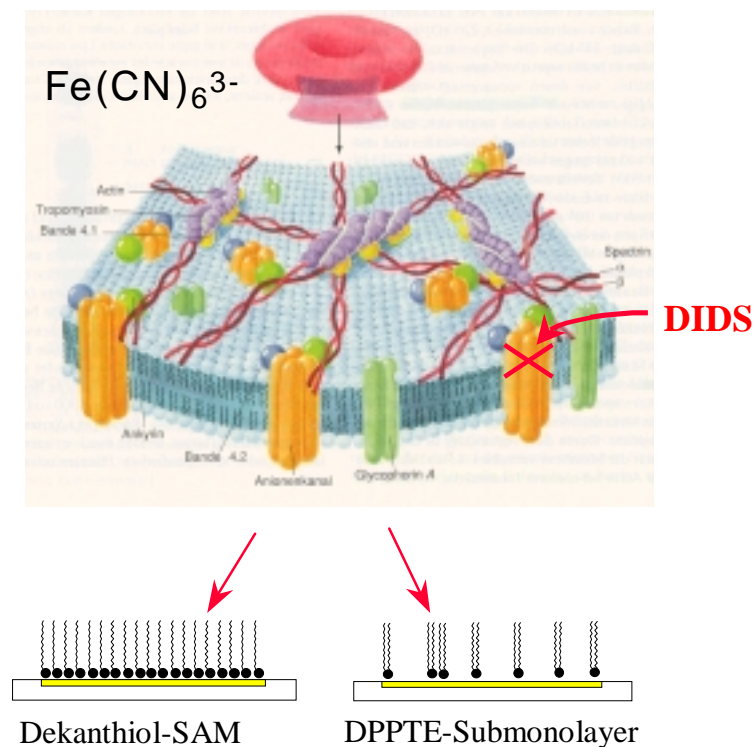


Abb. 121 Schema zur Fusion von RBC-Ghosts auf Dekanthalmonolayer bzw. DPPTE-Submonolayer.

Fusion von Erythrocytenmembranen auf Dekanthalmonolayer

Die Experimente an den Alkanthiolmonolayern wurden analog der Literatur [Rao 97] durchgeführt. Dekanthalmonolayer wurden durch self-assembly über Nacht ($t > 12$ h; $c=1$ mM in Ethanol) assembliert. Die Fusion der Erythrocytenmembranen (Präparation s. Kap. 4.3.4) geschah über Nacht bei $T = 25-30^\circ\text{C}$. Dann erfolgte Austausch des Puffers (s. Kap. 4.3.4) gegen den identischen Puffer mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($c=1$ mM) und die Cyclovoltammogramme wurden bei 3 verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten ($v= 50, 100, 250$ mV/s) gemessen

und um den Hintergrund vor Zugabe des Redoxpaares (ebenfalls bei 3 Geschwindigkeiten) korrigiert. Man findet eine leichte Abhängigkeit der Redoxströme und der Überspannung von der Scangeschwindigkeit v was auf einen diffusionskontrollierten Prozeß, wahrscheinlich durch den Anionenkanal, hindeutet. Nach Auswaschen des Redoxpaares mit Puffer erfolgte die Inhibierung des Anionenkanals mittels einer Lösung von 4,4'-Diisothiocyanato-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS, $c = 2 \text{ mM}$) in Puffer für $t = 30 \text{ min}$. Hierauf wurde wiederum mit Puffer gewaschen, der Hintergrund aufgenommen, das Redoxpaar eingespült, die Cyclovoltammogramme nach Inhibierung aufgenommen und wiederum um den Hintergrund korrigiert. Man findet eine deutliche Reduzierung des Redoxstromes, keinen Peak mehr im untersuchten Meßbereich und keine Abhängigkeit mehr von der Scangeschwindigkeit. All diese Tatsachen gehen gut einher mit der Annahme, daß das Redoxpaar nicht mehr wie zuvor durch den jetzt blockierten Anionenkanal bis zum Alkanthiollayer vordringen kann.

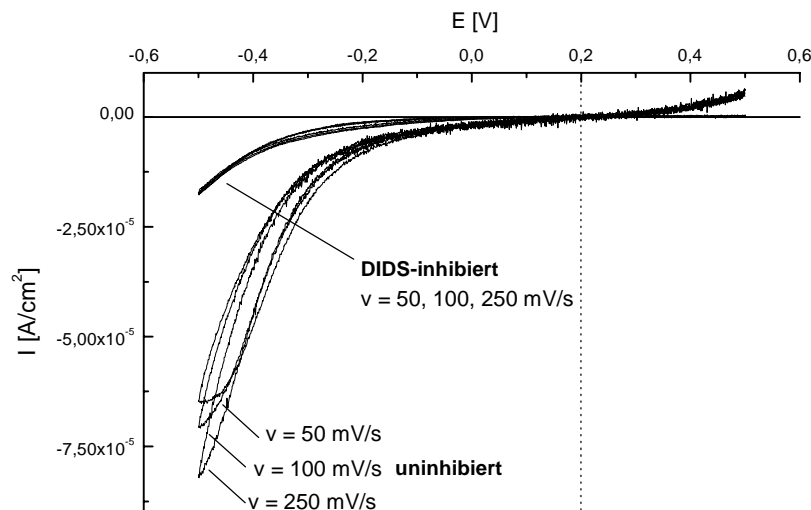


Abb. 122 Cyclovoltammogramme an Dekanthiol-RBC-Hybridmembranen vor und nach Inhibierung mit DIDS.

Fusion von Erythrocytenmembranen auf DPPTE-Submonolayer

Die DPPTE-Submonolayer wurden wie in Kap. 3.3.1 beschrieben aufgebaut.

Bei der Präparation der DPPTE-sub-Monolage erkennt man in Abb. 123 deutlich, den intakten Bilayer nach Beendigung der gemischten Vesikelfusion, welcher im Gegensatz zu dem sub-Monolayer nur sehr geringe Redoxströme zuläßt. Die Abhängigkeit von Überspannung und Redoxstrom von der Scangeschwindigkeit für letzteren Fall zeigt, daß der Redoxprozeß hier diffusionskontrolliert ist.

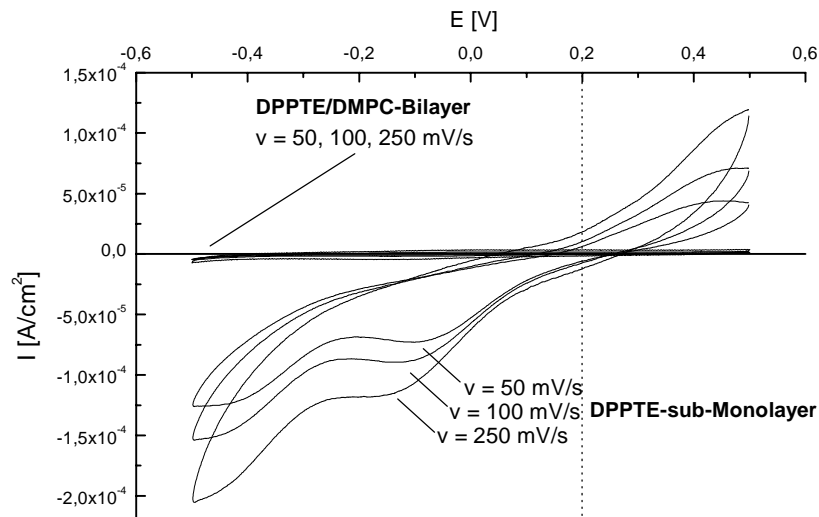


Abb. 123 Cyclovoltammogramme für DPPTe/DMPC-Bilayer nach gemischter Vesikelfusion und DPPTe-sub-Monolayer nach Herauslösen von DMPC mit Ethanol.

Durch Fusion der Erythrocytenmembran über Nacht (bei $T=25-30\text{ °C}$) nimmt der Redoxstrom wieder ab (s. Abb. 124), erreicht allerdings nicht ganz die Ausgangswerte des gemischten Bilayers. Der Zuwachs im Strom gegenüber dem Bilayer vor DMPC-Herauslösung wird hier dem Durchtritt von Redoxmolekülen durch den Anionenkanal (Bande 3) zugeschrieben, wofür auch die Diffusionskontrolle spricht.

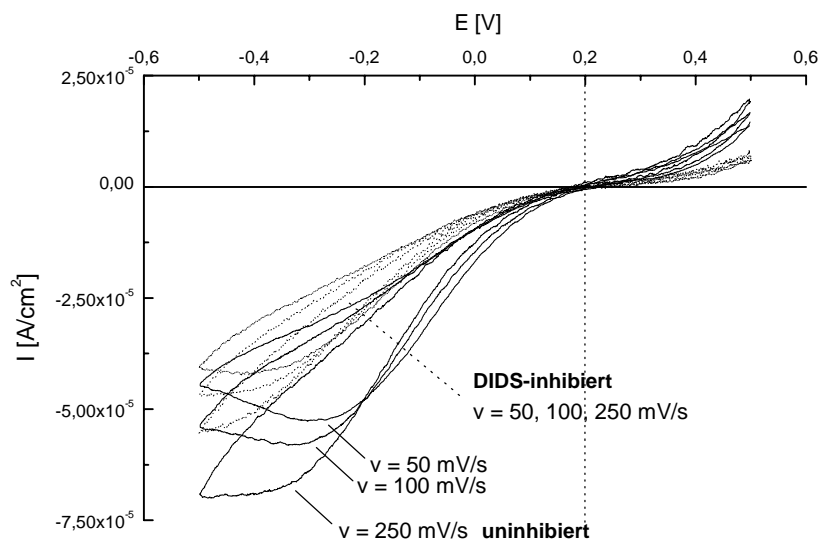


Abb. 124 Cyclovoltammogramme an DPPTe-Submonolayer-RBC-Hybridmembranen vor und nach Inhibierung mit DIDS.

Die Inhibierung bewirkt auch hier eine Reduzierung des Redoxstromes, welche aber geringer ausfällt als im Alkanthiol-Vergleichssystem. Dies mag auf Defekte in dem oberflächenfernen Layer zurückzuführen sein, durch welche sich das Redoxpaar bei dem lateral verdünnten System (im Gegensatz zu dem Alkanthiolssystem) dann sehr dicht an die Elektrode annähern

kann. Die dem Durchtritt von Redoxpaar durch den Anionenkanal zugeschriebenen diffusionsabhängigen Peaks bei ca. -300 mV verschwinden nach Inhibierung allerdings vollständig.

Vergleich der Systeme

Zum besseren Vergleich der beiden Systeme wurden die Cyclovoltammogramme vor Inhibierung von den CVs nach Inhibierung subtrahiert und in Abb. 125 aufgetragen. In diesen **Differenz-Cyclovoltammogrammen** sieht man also direkt bei welchem Potential der Inhibitor einen Effekt zeigte, wo also der Redoxstrom reduziert wurde.

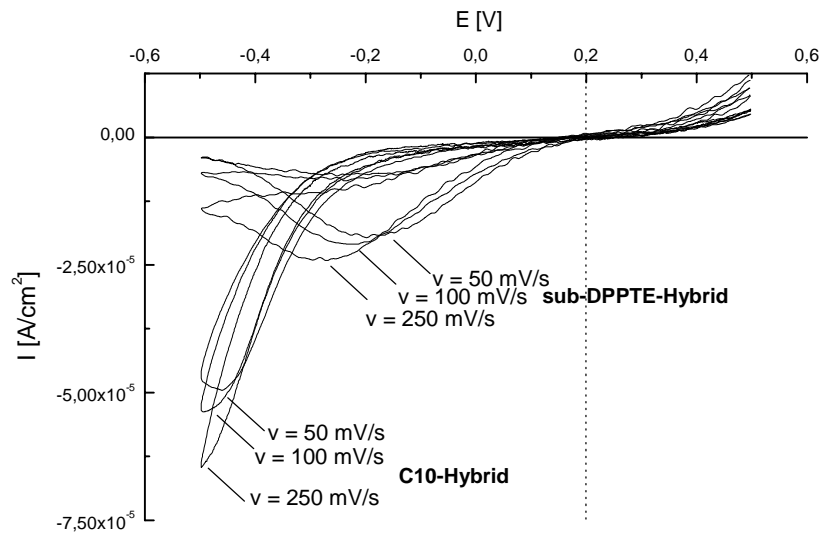


Abb. 125 Differenzvoltammogramme resultierend aus Subtraktion der CV's vor und nach Inhibierung mit DIDS. Ein ungehinderter Redoxprozeß, wie man ihn auf freien Goldflächen erwarten würde, findet hier aufgrund fehlender Peaks beim Redoxpotential $E^0 = +200$ mV vs. Ag/AgCl in keinem der beiden Systeme statt.

Die Überspannung für den Redoxprozeß ($E^0 = 200$ mV vs. Ag/AgCl) beträgt für den Alkanthiol-RBC-Hybridlayer mehr als 600 mV, während sie für den Hybridlayer auf dem DPPTE-Submonolayer lediglich zwischen 300 und 400 mV ausmacht. Dies kann durch die Unterschiede in den oberflächenproximalen Schichten erklärt werden. Im Falle des Alkanthiols kann das Redoxpaar nach Durchtritt durch den Anionenkanal maximal bis an die Alkanthiollage an die Elektrodenoberfläche herantreten, was mit hohen Überspannungen für den Redoxprozeß einher geht. Im Falle des lateral verdünnten DPPTE-Submonolayers kann das Redoxpaar anscheinend näher, wenn auch nicht in größerem Ausmaß, bis an die Oberfläche selbst herankommen.

Die Tatsache, daß die Blockade des Anionenkanals überhaupt zu einer Reduzierung des Redoxstroms führt, ist ein Indiz dafür, daß der Kanal in beiden Fällen in der richtigen

Orientierung in der Hybridmembran eingebaut wird. Es ist kein Nachweis für dessen funktionelle Aktivität als $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Dieser gestaltet sich für ein festkörperunterstütztes System schwierig.

Dennoch zeigt diese Studie, daß die direkte Fusion von Zellfragmenten auf Alkanthiolmonolayer bzw. Submonolayer einen schnellen Weg zur Rekonstitution von Proteinen auf Oberflächen darstellt, welcher die sonst übliche aufwendige Solubilisierung und Rekonstitution des zu untersuchenden Proteins umgeht. Für manche Systeme mag dies einen Schritt in Richtung des *high-throughput-screening* ermöglichen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

Lipide

DPPE, DMPC, POPC, Eigelb-PC, DMPS und NBD-PE kamen alle von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA.

Salze und Lösungsmittel

Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, N-Morpholinoethansulfonsäure und -sulfonat (MES), TRIS, Zitronensäure und Trinatriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat sowie Natriumazid kamen von Sigma. Magnesiumchlorid und EDTA·2Na wurden von Fluka, die Redoxpaare Kaliumhexacyanoferrat und Ferrocencarbonsäure von Aldrich bezogen.

Chloroform, Dichlormethan und Ethanol kamen von Riedel de Haen in Chromasolv-Qualität. Für Reinigungsschritte und wässrige Lösungen wurde Reinstwasser (Milli-Q, R=18.2MΩ/cm, Fa. Millipore) verwendet.

Die Lösungsmittel für Ermittlung der Oberflächenenergien über Kontaktwinkelmessungen (Methyliodid, Glycerin, Ethylenglykol und Benzylalkohol) kamen alle von Aldrich.

4.2 Methoden

1.1.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Messungen am MPIP wurden in dem in Abb. 126 skizzierten Aufbau für kombinierte oberflächenplasmonenoptische und elektrochemische Messungen durchgeführt.

Das Licht eines 5 mW He-Ne-Lasers ($\lambda = 632,8$ nm, Fa. Uniphase, Modell 1105 P) wurde mittels eines Lightchoppers (Fa. EG&G, Modell 197) frequenzmoduliert, durch Polarisatoren (Fa. Halle) linear polarisiert (in p-Richtung bzgl. des Substrats) und auf die Drehachse eines Zweikreisgoniometers (Fa. Huber) mit 5-Phasen-Schrittmotoren (Fa. Huber, $\Delta\theta = 1/1000^\circ$) gelenkt. Auf dem x-y-Probentisch wurde der Probenreiter mit der EC-SPR-Teflon-Zelle (Eigenbau, s. Abb. 46 und Abb. 127) montiert. Die Prismen waren aus BK7- ($n = 1.516$; Fa. Schott) oder LaSFN9-Glas ($n = 1.845$; Fa. Spindler & Hoyer) und wurden im Reiter über Immersionsöle ($n = 1.516$ bzw. 1.700 ; Fa. Cargille) auf das entsprechende B270- (Fa. Hellma) oder LaSFN9-Glas (Fa. Hellma) gepreßt. Die Abdichtung zwischen Glas und Zelle erfolgte über Dichtringe aus einem lösungsmittelresistenten Perfluorelastomer (Fa. Greene & Tweed, CHEMRAZ). Auf dem Detektorarm wurde der Strom einer Photodiode als Spannungsabfall an einem Arbeitswiderstand mit einem Lock-In-Verstärker (Fa. EG&G, Modell 5210) gemessen. Die Steuerung der gesamten Anlage erfolgte mittels der WASP-Software (Andreas Scheller, MPIP).

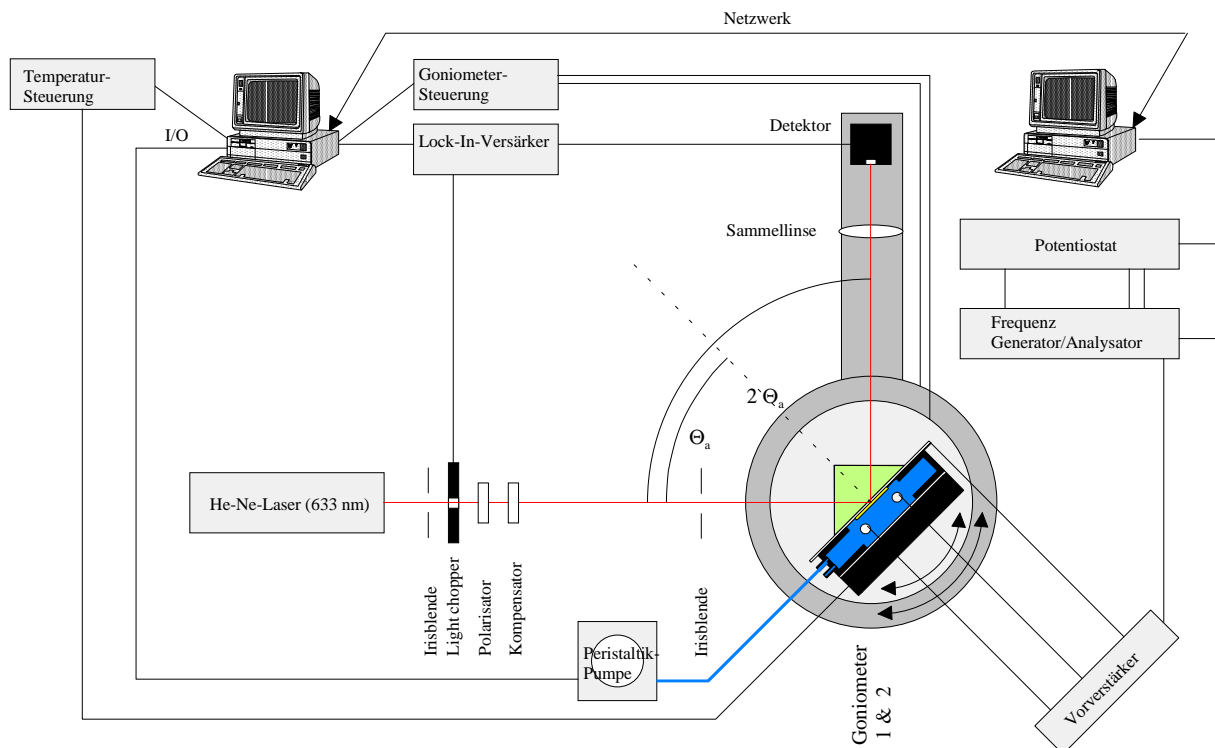


Abb. 126 Experimentelles Setup.

SPR-Messungen am NIST wurden dagegen an einem in der Literatur [Sil 97, Hub 98] näher beschriebenen Aufbau durchgeführt.

4.2.2 Elektrochemie (IS/CV)

Für **elektrochemische Experimente** standen zwei Potentiostaten (Fa. EG&G, Typ 263 und Typ 273) zur Verfügung welche über Corrware (Fa. Scribner Associates Inc., V 2.1a) kontrolliert wurden. Für die **Impedanzspektroskopie** wurde der Potentiostat mit einem Frequenz-Generator-Analysator (Fa. Solartron, SI 1260) kombiniert und mittels Zplot (Fa. Scribner Associates Inc., V 1.5 bzw. 2.1b) gesteuert. Die Experimente wurden in einer 3-Elektrodenanordnung durchgeführt und auf das Potential einer Referenzelektrode (Ag/AgCl/3M NaCl; Fa. Bioanalytical Systems, Model Re-5) bezogen. Als Gegenelektrode diente ein spiralförmiger Pt-Draht, welcher vor den Experimenten in Piranha gereinigt wurde. Für die Experimente zur **Impedanzspektroskopie auf Mikroelektroden**, standen sogenannte „extended gate electrodes“ (EGE) zur Verfügung, welche im Rahmen der Dissertation von Dipl.-Phys. Michael Krause [Kra 00] am MPI-P entwickelt wurden. Es handelt sich dabei um Au-Mikroelektrodenarrays mit Elektrodendurchmessern zwischen 6 und 100 μm welche impedanzspektroskopisch mit einem Frequenz-Generator-Analysator (Fa. Zahner, Model IM6) mit einem Verstärker zur Hochimpedanzspektroskopie (Fa. Zahner, HiZ-Probe) vermessen wurden.

4.2.3 Filmwaage

Druck-Flächenisothermen wurden i.d.R. auf einer Filmwaage (Fa. Nima, Model 611) mit 280 cm^2 Trogfläche und einem Längen-Breitenverhältnis von 3:1 durchgeführt. Die Ermittlung des Oberflächendrucks erfolgte mittels einer Wilhelmy-Waage und einem Filterpapier (1 cm). Zur Thermostatisierung diente ein Umwälzbad. Steuerung und Datenaufnahme erfolgten mittels der Software Trough (Fa. Nima, V 4.8).

Filmüberträge erfolgten entweder auf einer Filmwaage (Fa. Nima, Model 611) mit 600 cm^2 und Längen-Breitenverhältnis 5:1 oder auf einem 1000 cm^2 -Trog mit Langmuir-Barriere (Fa. Lauda, Model FW2).

4.2.4 Kontaktwinkelmessungen (CA)

Am MPIP wurden Kontaktwinkel mittels eines Kontaktwinkelmikroskops (Fa. Krüss, Model G1) ermittelt, während die Messungen am NIST an einem NRL C.A. Goniometer (Fa. Ramé-

Hart, Model 100-00-115) erfolgten. $\Theta_{\text{advancing}}$ und Θ_{receding} wurden als die Winkel vor Wanderung des 3-Phasenpunkts bei Volumenvergrößerung bzw. -verringerng bestimmt, während Θ_{sessile} dem Kontaktwinkel eines frei sitzenden Tropfens entspricht.

4.2.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Ermittlung von Vesikelgrößen über dynamische Lichtstreuung erfolgte durch Herrn Andreas Kerth in der Gruppe von Prof. Dr. A. Blume an einem Zetasizer 3 mit Multi-8-Correlator (Fa. Malvern, Series 7032) oder in der Service-Gruppe des MPIP.

Am NIST stand ein Sub Micron Particle Analyzer (Fa. Coulter, Model N4MD) zur Verfügung.

4.2.6 Kraftmikroskopie (AFM)

AFM-Messungen am MPIP wurden von Herrn Volker Scheumann an einem NanoScope 3a (Fa. Digital Instruments, Multimode, Scanner J) im Tapping-Mode mit Tips aus Siliziumnitrit (Fa. Digital Instruments, NPS, $C \sim 0,12 \text{ N/m}$, $f_0 \sim 10\text{-}30 \text{ kHz}$) in Lösung durchgeführt.

Messungen am NIST erfolgten durch Dr. John Woodward an einem PicoSPM (Fa. Molecular Imaging) im MAC-Mode mit Tips aus Silizium (Fa. Molecular Imaging).

4.2.7 Differenz-Thermoanalyse (DSC)

DSC-Scans wurden durch Herrn Andreas Kerth an einem Kalorimeter (Fa. MicroCal Inc., Northampton, MA, USA; VP-DSC MicroCalorimeter) mit einer Heizrate von 60 K/h an Vesikeldispersionen ($c=1.5 \text{ mM}$) durchgeführt.

4.2.8 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatogramme wurden in einem Färbekasten auf fluoreszenzgelabelten Silica-beschichteten Aluminiumplatten (Silica Gel 60 F₂₅₄, Fa. Merck) mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ (13:5:1 v,v,v) durchgeführt. Detektion erfolgte zuerst mittels einer UV-Lampe ($\lambda=254 \text{ nm}$). Besprühen und Erhitzen mittels einer schwefelsauren Lösung von Ammoniummolybdat resultiert in Blaufärbung der phosphatgruppenhaltigen Fraktionen [Hah 56]. Durch anschließendes Ausglühen der Platte mit einem Heizgebläse wurden alle organischen Fraktionen verascht.

4.3 Probenpräparation

4.3.1 Herstellung dünner Au-Filme auf Glas, Mica und Si

Glasreinigung (für BK7 und LASFN9):

Die Glassubstrate wurden vor der Bedampfung nach der folgenden Prozedur in einem Farbekasten gereinigt:

1. 15 min. in 2% alkalischer Detergenzlösung (Fa. Helma, Helmanex II) bei 35°C im Ultraschallbad (Fa. Sonorex, Model Super RK510 H)
2. mehrfaches Spülen mit Milli-Q-Wasser
3. 15 min. in 2% alkalischer Detergenzlösung bei 35°C im Ultraschallbad
4. gründliches Spülen mit Milli-Q-Wasser
5. 15 min. in Milli-Q-Wasser bei 35°C im Ultraschallbad
6. Spülen mit Milli-Q-Wasser
7. 15 min. in EtOH bei 35°C im Ultraschallbad

Die so gereinigten Proben wurden mit Stickstoff trockengeblasen und dann in die entsprechende Aufdampfanlage eingebaut.

Au auf LaSFN9

48 nm Au (Fa. Balzers, 99.99 %) wurden in einer Bedampfungsanlage (Fa. Edwards, Model FL 400 mit Auto 306) mit einer Rate von 0.1-0.2 nm/s unter einem Druck von $1 \cdot 10^{-6}$ mbar auf LASFN9-Glas aufgedampft.

Au auf BK7

2-3 nm Cr (Fa. Balzers, 99.9 %) und 48 bzw. 150 nm Au wurden in einer Bedampfungsanlage (Fa. Balzers, Model BAE 250) mit einer Rate von 0.1-0.2 nm/s unter einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ mbar auf BK7-Glas unter einer Messing-Maske (Eigenbau, s. Abb. 130 links) aufgedampft.

Au auf Glimmer (Mica)

Die Glimmerplatten (Muskovit, Fa. Mica New York Inc.) wurden zuerst auf die Größe eines Objektträgers zugeschnitten. Durch Abspalten der oberen Schichten wurden saubere, glatte Oberflächen generiert. Zur Verdampfung eingeschlossenen Wassers wurden die Substrate in einem Röhrenofen (Fa. Heraeus Instruments, Ro 7/50 mit Temperatursteuereinheit thermicon) 1 min. bei 650 °C im Stickstoffstrom behandelt und anschließend sofort in eine

Aufdampfanlage (Fa. Edwards, FL 400 mit Auto 306) eingebaut. Dort wurden bei einem Druck von $1 \cdot 10^{-6}$ mbar 80 nm Au mit einer Rate von 0.1-0.2 nm/s aufgedampft. Das Tempern der Substrate erfolgte danach für 1 Minute im Stickstoffstrom bei 650°C im Röhrenofen.

Die so hergestellten Substrate wurden dann bis zu ihrer weiteren Verwendung entweder unter Ethanol oder Argon gelagert.

Au auf Si-Wafern und BK7 am NIST

Polierte BK7-Gläser (14 x 25 x 1.5 mm) und Si-Wafer (<100>, N-Type, Fa. Virginia Semiconductors) wurden 20-30 Minuten in Nochromix-Lösung (125 g/l Kaliumpersulfat in konz. Schwefelsäure) gereinigt und anschließend gründlich mit Reinstwasser (Fa. Milli-Q) gespült. Nach Waschen mit hochreinem Acteon wurden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet und in ein Vakuumsystem (Fa. Edwards, Model 306) mit zwei Magnetron-Sputter-Quellen (Chrom und Gold) eingebaut. Das Grundvakuum betrug $2 \cdot 10^{-7}$ mbar. Bei einem Argon-Druck von $2 \cdot 10^{-3}$ mbar wurden 20 Å Chrom und anschließend 490 Å Gold aufgebracht. Man erhält eine Goldschicht mit Clustern kleiner 20 nm und einer Rauigkeit kleiner 0.3 nm (rms) über 1 µm [Sil].

4.3.2 Vesikelpräparation [Szo 80, Lic 87]

... durch Extrusion [Hop 85, Mac 91]

Die entsprechende Menge Lipid wurde in Puffer aufgenommen, für 15 min. oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m hydratisiert und anschließend ca. 15 s gevortext. Danach wurde nochmals 15 min. hydratisiert und abermals gevortext. Die hieraus resultierende Lipiddispersion wurde anschließend 15x oberhalb T_m in einer Extrusionsapparatur (Fa. Milch, LiposoFast) durch einen Polycarbonatfilter (Fa. Milch; 50, 100 oder 200 nm) extrudiert.

... durch Isopropanol-Injektion

Die entsprechende Menge POPC-Lipid ($n = 2 \mu\text{Mol}$) wurde in 50 µl Isopropanol aufgenommen und über ca. 10 s in 1 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.4) unter vortexen injiziert. Anschließend erfolgte die Verdünnung auf 10 ml Puffer. Mittels dieser Prozedur erhält man eine 0.2 mM Dispersion unilamellarer Vesikel mit einem Durchmesser von 58 ± 12 nm (95% in ± 2 nm).

4.3.3 Proteoliposomen

Die Rekonstitution der CF_0F_1 -ATPase erfolge durch Dialyse des solubiliserten Proteins nach einer Vorschrift von Ursula Gremminger aus der Gruppe von Prof. Dr. P. Gräber in Freiburg.

Für die Rekonstitution wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

| | | |
|---|---|-------------|
| Beschallungspuffer (F-2): | Tricin | c=10 mM |
| | Na-Cholat | c=41.8 mM |
| | Na ₂ -EDTA | c=0.1 mM |
| | pH 8 mit NaOH | |
| | 1,4-Dithio-DL-threitol (Fa. Applichem) | c=0.5 mM |
| EggPC-Lösung: | Eigelb-PC (Fa. Lipoid) in CHCl ₃ | c=25mg/ml |
| EggPA-Lösung: | Eigelb-PA (Fa. Sigma) in CHCl ₃ | c=2.5 mg/ml |
| Lipid-Detergens-Lösung: | - 7.6 ml EggPC-Lsg. mit 4 ml EggPA-Lsg. mischen und einrotieren (= 190/10 mg Lipid) | |
| | - in 12 ml detergenshaltigem Beschallungspuffer (F-2) aufnehmen und homogenisieren | |
| | -> Gesamtlipid = 20.9 mM | |
| | -> Detergens c= 41.8 mM | |
| | Detergens/Lipid = 2 (Mol/Mol) --> Mischmizellen | |
| CF₀F₁-ATPase-Lösung: | CF ₀ F ₁ -ATPase aus Spinat (M=550 kD) | c=7.3 μM |
| | Dodecylmaltosid | c=4 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | c=30 mM |
| | MgCl ₂ | c=2 mM |
| | Na ₂ -EDTA | c=0.5 mM |
| | Na ₂ -ATP | c=1 mM |
| | Saccharose | c=1.25 M |
| | pH 7.2 mit NaOH | |
| Dialyse-Puffer (40-fach): | Tricin | c=400 mM |
| | MgCl ₂ | c=100 mM |
| | Na ₂ -EDTA | c=8 mM |
| | pH 8 mit NaOH | |
| | 1,4-Dithio-DL-threitol (Fa. Applichem) | c=10 mM |

Die Lipid-Detergens-Lösung wurde mit dem Ultraschallschwingstab dreimal in 30 s-Intervallen (mit 30 s Pause) unter Eiskühlung beschallt und anschließend über Nacht tiefgefroren. Nach dem Auftauen ergibt sich eine klare Mischmizellen-Lösung.

Zu 840 µl Mischmizellenlösung gibt man 103 µl CF₀F₁-Lösung und 57 µl Dialysepuffer, füllt diese 1000 µl in die Dialysekammer und dialysiert über eine Cellulose-Dialysemembran (Fa. Dianorm, MWC 5 kD; 25±1 µm) bei T=30 °C für t=5 h gegen das ca. 3000-fache Austauschvolumen an Dialysepuffer (1-fach).

Man erhält durch obige Prozedur ca. 1.25 ml Proteoliposomen-Dispersion mit durchschnittlich 10 ATPasen pro Vesikel.

4.3.4 Hämolysierte Erythrocyten („Red Blood Cell Ghosts“)

Annähernd cytoplasmafreie Erythrocyten kann man durch Wiederversiegelung hämolysierter Erythrocyten nach Steck [Ste 74] präparieren. Man erhält sogenannte „Ghosts“ welche lediglich die jetzt puffergefüllten Zellmembranen in der ehemaligen Orientierung darstellen.

Wenige ml menschliches Blut (freundliche Spende des Projektleiters Dr. A. Offenhäusser ☺) wurden durch dreimalige Zentrifugation (2300 g, t=10 min) im 5-fachen Volumen PBS-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM Natriumphosphat, pH 7.4) gewaschen, wobei jeweils der schleimige Überzug durch Absaugen entfernt wurde. Die gewaschenen Erythrocyten wurden dann schnell in dem 20-fachen Volumen 5P74-Puffer (5 mM Natriumphosphat, pH 7.4) aufgenommen, gemischt und zentrifugiert (20000 g, t= 10 min.). Die durchsichtigen weißen Membransäckchen wurden abpipetiert und noch dreimal mit 5P74-Puffer gewaschen. Alle obigen Schritte erfolgten bei 0-4 °C.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, festkörperunterstützte Membranen für die Rekonstitution von Membranproteinen auf Goldoberflächen zu generieren und deren funktionelle Aktivität mittels elektrochemischer Methoden nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden zuerst durch Kombination von self-assembly-, Vesikelfusions- und LBK-Techniken sogenannte **Hybridmembranen** aufgebaut, welche zwar exzellente elektrische Eigenschaften aber auch den Nachteil eines zu dicht gepackten oberflächennahen Monolayers besitzen. Dem konnte auch nicht durch LB-Monolayerüberträge bei reduziertem Lateraldruck bzw. durch den Übertrag kogespreiteter Filme abgeholfen werden.

Deswegen wurde die **direkte Fusion gemischter Vesikel** aus Thio- und Füll-Lipiden auf Goldoberflächen weiterverfolgt. Dabei fand sich ein gravierender Einfluß diverser Fusionsparameter (Molenbruch, Temperatur, pH, Konzentration und Fusionsdauer) auf die elektrischen Membraneigenschaften. Ursprünglich war die Idee, die Ankerdichte auf der Oberfläche über den Molenbruch an Thiolipiden in den gemischten Vesikeln einzustellen. Dieses Vorhaben scheitert letztendlich, wie durch zeitaufgelöste reduktive Desorptionsmessungen bewiesen wurde, an Prozessen, die zur irreversiblen Akkumulation von Thiolipiden an der Oberfläche führt. Als solche sind Lateraldiffusion aus adsorbierten Vesikeln bzw. flip-flop-Prozesse denkbar. Der Schichtaufbau stoppt sich durch Hinderung dieser Prozesse selbst und resultiert dann in einer Flächenbelegung von ca. 80% der durch Selbstorganisation in organischem Lösungsmittel erhaltenen Monolayer.

Neben der lateralen Verdünnung der Ankerlipide war ein weiteres Ziel die Schaffung eines hydrophilen Reservoirs zwischen Elektrode und Bilayer. **Lipiddoppelschichten auf der Basis ethylenglykolunterstützter Thiolipide** zeigten allerdings durch die Reihe weg schlechte Filmkapazitäten, was auf Defekte in dem eigentlichen Bilayer schließen läßt. Erst durch eine drastische Reduzierung der Elektrodenoberfläche um den Faktor 10000 konnte auf Au-Mikroelektroden die Wahrscheinlichkeit für parallel zur Membran liegende Defekte drastisch verringert und hierdurch elektrisch dichte Bilayer generiert werden.

Eine Studie zum **Einfluß der Grenzflächenenergie auf die Fusion von Vesikeln** auf binäre Hydroxythiol-/Alkanthiolmonolayer zeigte, daß die Fusion auf rein hydrophobe Substrate langsam erfolgt und in einem zusätzlichen elektrisch dichten Monolayer resultiert, während die Fusion auf rein hydrophile Substrate sehr schnell vonstatten geht und in einem zusätzlichen, undichten Bilayer endet. Für intermediäre Fälle findet man je nach Ausmaß der

Grenzflächenenergie zunehmend adsorbierte oder teilgespreitete Vesikel. Für die Generierung des oberflächendistalen Monolayers in Hybridmembranen sollte die Grenzflächenenergie $\gamma_{LS} > 27 \text{ mJ/m}^2$ und der Wasser-Kontaktwinkel somit $\Theta > 87^\circ$ sein. Für den Aufbau von Spacerlipidmembranen bedeutet dies, daß in den Monolayern möglichst wenig hydrophile Spacerfragmente zur Oberfläche exponiert vorliegen sollten, da diese sonst zur Reduzierung der Grenzflächenenergie und somit lediglich zur Teilspreitung bzw. Adsorption von Vesikeln führen.

Der **Einbau von Porinen** in festkörperunterstützte Membranen konnte mittels zyklischer Voltammetrie an einem löslichen Redoxpaar demonstriert werden. Allerdings zeigte es sich, daß die Rekonstitutionsmethode über Detergensverdünnung schon alleine die Bilayer schädigte, weshalb die Rekonstitution der Porine in Vesikeln und deren Fusion hier als Inkorporationsmethode vorzuziehen wäre. Auch fehlt dem System ein Schalter zur Unterscheidung zwischen geschlossenen und offenen Porinen.

Die **H⁺-ATPase** aus Chloroplasten besitzt diesen Schalter in Form von ATP. Hier kann die ATP-Konzentration sogar als Regler für die H⁺-Pumprate dienen. Zum Einbau der H⁺-ATPase wurde diese in Eigelb-PC-Vesikeln rekonstituiert und auf hydrophobe Thiolipid-Monolayer oder sub-Monolayer fusioniert. Es konnte die Verringerung der Leitfähigkeit des Systems durch Titration mit einer ATP-Lösung impedanzspektroskopisch erfaßt werden. Die Tatsache, daß es sich aber hierbei eher um einen kapazitiven Effekt handelt, führte zusammen mit einer Modellrechnung zu der Vermutung, daß aufgrund der Dimension des Reservoirs lediglich ein Gleichgewichtszustand zwischen ATP-Konzentration und Protonengradient über die Membran beobachtet wird. Die Modellrechnung zeigt auch, daß festkörperunterstützte Lipidmembranen mit hydrophilen Spacern im Bereich von wenigen nm generell nicht zur Beobachtung der Transportvorgänge aktiver Transporter geeignet sind.

Als für die Beobachtung in festkörperunterstützten Membranen wirklich vorzüglich geeignetes Protein zeichnete sich ein **Fusionsprotein aus Annexin V und einem strep-tag** aus. Zu dessen Rekonstitution wurden festkörperunterstützte Lipidmembranen mit einem geringem Anteil an Phosphatidylserinen aufgebaut. Über die hierdurch auf der Oberfläche generierten negativen Ladungen lagert Annexin V Ca²⁺-induziert an die Membran an und verringert durch Ausbildung einer Pore den Membranwiderstand um nahezu 2 Dekaden. Die Bindung einer Streptavidinmutante, welche gegenüber dem Wildtyp eine verringerte Bindungsaffinität zu dem *strep-tag* besitzt, führt durch Blockade der Pore zur

Wiederherstellung des Membranwiderstands. Die kompetitive Verdrängung der Streptavidinmutante durch Desthiobiotin konnte nur in der Optik gezeigt werden.

In einem Experiment zur Fusion ganzer Membranfragmente, ohne die umständliche Solubilisierung und anschließende Rekonstitution der Bestandteile, wurden **hämoglobinentleerte rote Blutzellen** auf hydrophobe Thiol-Monolayer und Thiolipid-Submonolayer fusioniert. Zum Nachweis des Einbaus des membranintegralen Anionentransportproteins **Bande 3** in der richtigen Orientierung wurden zyklische Voltammogramme an einem löslichen Redoxpaar vor und nach der irreversiblen Blockade des Kanals mit einem Stilben aufgenommen. Die Messungen zeigen, daß der Anionenkanal vor der Blockade in beiden Fällen für das Redoxpaar zugänglich, und der Kanal somit in der richtigen Orientierung in der Hybridmembran eingebaut ist. Die mit dem Redoxprozeß verbundenen Überspannungen zeigen auch, daß im Fall der Fusion auf sub-Monolayer das Redoxpaar wesentlich näher an die Membran gelangt als im Fall kompletter Monolayer.

6 Literatur

- [Abr 94] Abrahams J.P., Leslie A.G., Lutter R., Walker J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature* **370**, 621-628.
- [And 74] Andreoli T.E. (1974) Planar Lipid Bilayer Membranes in Fleischer S., Packer L. (eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Biomembranes, S. 513, Academic Press, New York.
- [Ahl 90] Ahlers M., Müller W., Reichert A., Ringsdorf H., Venzmer J. (1990) Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten – Wege zur Simulation von Biomembranprozessen, *Angew. Chem.* **102**, 1310-1327.
- [Arn 98] Arnold S. (1998) Selbstassemblierte Monolagen von Alkanthiolen auf Goldoberflächen: Charakterisierung, Strukturierung, Modifikation und biophysikalische Anwendung, Dissertation, Universität Mainz.
- [Aus 94] Aust E.F., Ito S., Sawodny M., Knoll W. (1994) Investigation of Polymer Thin Films Using Surface Plasmon Modes and Optical Waveguide Modes. *Trends Polym. Sci.* **2**, 313-323.
- [Bab 97] Babowsky U. (1997) Herstellung, Funktionalisierung und physikochemische Charakterisierung von substratgestützten Oberflächenschichten, Dissertation, Universität Halle.
- [Bai] (i) Bain C.D., Whitesides G.M. (1989) *Langmuir* **5**, 1370. (ii) Bain C.D., Whitesides G.M. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7164. (iii) Bain C.D., Evall J., Whitesides G.M. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7155. (iv) Bain C.D., Whitesides G.M. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6560.
- [Bai 89] Bain C.D., Evall J., Whitesides G.M. (1989) Formation of Monolayers by the Codadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Head Group, Tail Group and Solvent, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7155-7164.
- [Bar 80] Bard A.J., Faulkner L.R. (1980) *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, Wiley, New York.
- [Bay] Bayer AG, GB CH Marketing/Petrochemicals, Produktinformation.
- [Bay 90] Bayerl T.M., Bloom M. (1990) Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads – A new vesicular model system studied by ²H-nuclear magnetic resonance, *Biophys. J.* **58**, 357-362.

- [Bio 99] Präsentation eines BMBF-Verbundprojektes 0310895 im Rahmen des Programms Biotechnologie 2000; „Bioelektrische Signalwandlung in Membran-FET-Verbundarchitekturen“; Projektträger Biologie Energie Umwelt; 22.04.1999; Mainz.
- [Blu 91] Blume A. (1991) Biological calorimetry: membranes, *Thermochim. Acta.* **193**, 299-347.
- [Boy 93] Boyer P.D., The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities, *Biochim. Biophys. Acta* (1993) **1140**, 215-250.
- [Boy 97] Boyer, P.D., The ATP synthase - a splendid molecular machine, *Annual Review in Biochemistry* (1997) **66**, 717-749.
- [Bra 99] Dr. Kerstin Braig, Universität Freiburg, persönliche Mitteilung.
- [Bri 84] Brian A.A., McConnell H.M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 6159-6163.
- [Cev 87] Cevc G., Marsh D. (1987) Phospholipid Bilayers – Physical Principles and Models, John-Wiley, New York.
- [Clo 71] Clowes A., Cherry R., Chapman D. (1971) *Biochimica et Biophysica Acta* **249**, 301-317.
- [Cor 97] Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L.B., King L.G., Osman P.D.J., Raguse B., Wiczorek L., Pace R.J. (1997) A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* **387**, 580-583.
- [Cos 96] Coster H.G.L., Chilcott T.C., Coster A.C.F. (1996) Impedance spectroscopy of interfaces, membranes and ultrastructures, *Biochem. Bioenergetics* **40**, 79-98.
- [Cre 99] Cremer P.S., Boxer S.G. (1999) Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports, *J. Phys. Chem. B* **103**, 2554-2559.
- [Dam 70] Damn I.R. (1970) *J. Colloid and Interface Sci.* **32** 302&321.
- [Del 98] Della Volpe C., Deimichei A., Riccò T. (1998) A multiliquid approach to the surface free energy of flame-treated surfaces of rubber-toughened polypropylene, *J. Adhesion Sci. Technol.* **12**, 1141-1180.
- [Dem 74] Demel R.A. (1974) Monolayers – Description of Use and Interaction in Fleischer S., Packer L. (eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Biomembranes, S. 539, Academic Press, New York.

-
- [Dem 94] Demange P., Voges D., Benz J., Liemann S., Göttig P., Berendes R., Burger A., Huber R. (1994) Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation?, *TIBS* **19**, 272-276.
- [Ede 00] Ederth T., Liedberg B. (2000) Influence of Wetting Properties on the Long-Range „Hydrophobic“ Interaction between Self-Assembled Alkylthiolate Monolayers, *Langmuir* electronic preprint la9909650.
- [Eib 84] Eibl H. (1984) Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen, *Angew. Chem.* **96**, 247-314.
- [Eva 91] Evans S.D., Sharma R., Ulman A. (1991) Contact Angle Stability: Reorganization of Monolayer Surfaces?, *Langmuir* **7**, 146-161.
- [Far 90] Fare T.L. (1990) Electrical Characterization of Dipalmitoylphosphatidylethanolamine and Cadmium Stearate Films on Platinum Surfaces in Aqueous Solutions, *Langmuir* **6**, 1172-1179.
- [Fin 96] Finklea H.O. (1996) Electrochemistry of Organized Monolayers of Thiols and Related Molecules on Electrodes in *Electroanalytical Chemistry*, Bard A.J., Rubinstein I. Vol. 19., Marcel Dekker, New York.
- [Flo 93] Florin E.L., Gaub H.G. (1993) Painted Supported Lipid Membranes, *Biophys. J.* **64**, 375-383.
- [Fol 92] Folkers J.P., Laibinis P.E., Whitesides G.M. (1992) Self-Assembled Monolayers of Alkanthiols on Gold: Comparison of Monolayers Containing Mixtures of Short- and Long-Chain Constituents with CH₃ and CH₂OH Terminal Groups, *Langmuir* **8**, 1130-1342.
- [Fol 94] Folkers J.P., Laibinis P.E., Whitesides G.M. (1994) Phase Behaviour of 2-Component Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold, *J. Phys. Chem.* **98**, 563-571.
- [Fow 64] Fowkes F.M. (1964) Attractive Forces at Interfaces, *Ind. Eng. Chem.* **56**, 40-52.
- [Fow 67] Fowkes F.M. (1967) Attractive Forces at Solid Liquid Interfaces, *S.C.I. Monograph* **25**, 3-30.
- [Fox 52] Fox H.W., Zisman W.A. (1952) *J. Colloid Sci.* **7**, 428.
- [Gai 66] Gaines G.L. (1966) Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, John Wiley, New York.
- [Gen 89] Gennis R.B. (1989) Biomembranes: Molecular Structure and Function, Springer, New York.

- [Gir 57] Girifalco L.A., Good R.J. (1957) A Theory For The Estimation Of Surface And Interfacial Energies. I. Derivation And Application To Interfacial Tension, *J. Phys. Chem.* **61**, 904-909.
- [Gla 96] Glaser R. (1996) Biophysik, 4. Auflage, Fischer, Jena.
- [Goo 60] Good R.J., Girifalco L.A. (1960) A Theory For Estimation Of Surface And Interfacial Energies. III. Estimation Of Surface Energies Of Solids From Contact Angle Data, *J. Phys. Chem.* **64**, 561-565.
- [Grä] Prof. Dr. Peter Gräber, Universität Freiburg.
- [Hah 56] Hahn F.L., Luckhaus R. (1956) „Ein vorzügliches Reagenz zur colorimetrischen Bestimmung von Phosphat und Arsenat“, *Z. Anal. Chem.* **149**, 172-177.
- [Hau 84] Hauser H., Shipley G.G. (1984) Interactions of Divalent Cations with Phosphatidylserine Membranes, *Biochemistry* **23**, 34-41.
- [Hel 92] Helm C.A., Israelachvili J.N., McGuiggan P.M. (1992) Role of Hydrophobic Forces in Bilayer Adhesion and Fusion, *Biochemistry* **31**, 1794-1805.
- [Hop 85] Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R. (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55-65.
- [Hub 92] Huber R., Berendes R., Burger A., Schneider A., Karshikov A., Luecke H., Roemisch J., Paques E. (1992) Crystal and Molecular Structure of Human Annexin V after Refinement – Implications for Structure, Membrane-binding and Ion Channel Formation of the Annexin Family of Proteins, *Mol. Biol.* **223**, 683-704.
- [Hub 98] Hubbard J.B., Silin V., Plant A.L. (1997) Self assembly driven by hydrophobic interactions at alkanethiol monolayers: mechanism of formation of hybrid bilayer membranes, *Biophys. Chem.* **75**, 163-176.
- [Ima 97] Imabayashi S., Hobarra D., Kakiuchi T. (1997) Selective Replacement of Adsorbed Alkanethiols in Phase-Separated Binary Self-Assembled Monolayers by Electrochemical Partial Desorption, *Langmuir* **13**, 4502-4504.
- [Jay 86] Jay D., Cantley L. (1986) Structural Aspects of the Red Cell Anion Exchange Protein, *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 511-538.
- [Jan 77] Janko K., Benz R. (1977) Properties of lipid bilayer membranes made from lipids containing phytanic acid, *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 8-16.

-
- [Joh 91] Johnson S.M., Bayerl T.M., McDermott D.C., Adam G.W., Rennie A.R., Thomas R.K., Sackmann E. (1991) Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons, *Biophys. J.* **59**, 289-294.
- [Jun 87] Junesch U., Gräber P. (1987) Influence of the Redox State and the Activation of the Chloroplast ATP Synthase on Proton-Transport-Coupled ATP Synthesis/Hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 275-288.
- [Jun 89] Junesch U. (1989) Untersuchungen zum Mechanismus der Protonentransportgekoppelten ATP-Synthase/Hydrolyse an der ATPase in Chloroplasten, Dissertation, TU Berlin.
- [Jun 91] Junesch U., Gräber P. (1991) The rate of ATP-synthesis as a function of ΔpH and $\Delta\Psi$ catalyzed by the active, reduced H^+ -ATPase from chloroplasts, *FEBS Lett.* **294**, 275-278.
- [Kae 70] Kaelble D.H., Uy K.C. (1970) A Reinterpretation of Organic Liquid-Polytetrafluorethylene Surface Interactions, *J. Adhesion* **2**, 50-60.
- [Kal 92] Kalb E., Frey S., Tamm L.K. (1992) Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers, *Biophys. Biochim. Acta* **1103**, 307-316.
- [Kar 92] Karshikov A., Berendes R., Burger A., Cavalie A., Lux H.D., Huber R. (1992) Annexin-V Membrane Interaction – An electrostatic potential study, *Eur. Biophys. J.* **20**, 337-344.
- [Kel 98] Keller CA, Kasemo B. (1998) Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance, *Biophys. J.* **75**, 1397-1402.
- [Kno 91] Knoll W. (1991) Optical Characterization of Organic Thin Films and Interfaces with Evanescent Waves, *MRS Bulletin* **16**, 29-40.
- [Kor 72] Kortüm G. (1978) Lehrbuch der Elektrochemie, Verlag Chemie, Weinheim.
- [Kra 00] Krause M. (2000), Dissertation, FB Chemie, Universität Mainz.
bzw. Krause et al., *Sensors & Actuators*, in press.
- [Kre 68] Kretschmann E., Raether H. (1968) *Z. Naturf.* **23**, 2135.
- [Kre 71] Kretschmann E. (1971) Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmonenschwingungen, *Z. Physik* **241**, 313-324.

- [Kre 94] Kreuzsch A., Schulz G.E. (1994) Refined structure of the porin from *Rhodospseudomonas blastica* and comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*, *J. Mol. Biol.* **243**, 891-905.
- [Lai 91] Laibinis P.E., Fox M.A., Folkers J.P., Whitesides G.M. (1991) Comparison of Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold: Mixed Monolayers Derived from $\text{HS}(\text{CH}_2)_{21}\text{X}$ and $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{Y}$ (X, Y = CH_3 , CH_2OH) Have Similar Properties, *Langmuir* **7**, 3167-3173.
- [Lai 92] Laibinis P.E., Nuzzo, R.G., Whitesides G.M. (1992) Structure of Monolayers Formed by Coadsorption of 2 Normal-Alkanethiols of Different Chain Lengths on Gold and its Relation to Wetting, *J. Phys. Chem.* **96**, 5097-5105.
- [Lan 94] Lang H., Duschl C., Grätzel M., Vogel H. (1992) Self-Assembly of Thiolipid Molecular Layers on Gold Surfaces – Optical and Electrochemical Characterization, *Thin Solid Films* **210**, 818-821.
- [Lan 94] Lang H., Duschl C., Vogel H. (1994) A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces, *Langmuir* **10**, 197-210.
- [Li 91] Li D., Neumann A.W. (1991) Thermodynamics of Contact Angle Phenomena In The Presence of A Thin Liquid Film, *Adv. Coll. Interfac. Sci.* **36**, 125-151.
- [Lic 87] Lichtenberg D. (1987) Liposomes: Preparation, Characterization and Preservation, *Meth. Biochem. Anal.* **33**, 337-453.
- [Lin 97] Lingler S., Rubinstein I., Knoll W., Offenhäuser A. (1997) Fusion of Small Unilamellar Lipid Vesicles to Alkanethiol and Thiolipid Self-Assembled Monolayers on Gold, *Langmuir* **13**, 7085-7091.
- [Lin 98] Lingler S. (1998) Entwicklung und Charakterisierung von festkörperunterstützten Modellmembranen zur Rekonstitution von Valinomycin und F_0F_1 -ATPase, Dissertation, Uni Mainz.
- [Lou 73] Lough A.K. (1973) The chemistry and biochemistry of phytanic, pristanic and related acids, *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **14**, 1-48.
- [Mac 87] Macdonald J.R. (1987) Impedance Spectroscopy – Emphasizing Solid Materials and Systems, Wiley, New York.
- [Mac 91] MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P.M., Takeshita K., Subbarano N.K., Hu L. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297-303.

-
- [Mac 99] Mack J. (1999) Organische Festphasensynthese von oligomeren T-Zell-Epitopen und von Komponenten zur Oberflächenmodifizierung unter Verwendung heterobifunktioneller Tetraethylenglykole, Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen.
- [McC 86] McConnell H.M., Watts T.H., Weis R.M., Brian A.A. (1986) Supported Planar Membranes in Studies of Cell-Cell Recognition in the Immune System, *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 95-106.
- [Mer 89] Merkel R., Sackmann E., Evans E. (1989) Molecular Friction and Epitactic Coupling between Monolayers in Supported Bilayers, *J. Phys. (Paris)* **50**, 1535-1555.
- [Mil 90] Miller C., Cuendat P., Grätzel M.J. (1990) K⁺ Sensitive Bilayer Supporting Electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **278**, 175-192.
- [Moh 95] Mohan C. (1995) Buffers – A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. Calbiochem-Novabiochem International, La Jolla, CA, USA.
- [Nau 95] Naumann R., Jonczyk A., Kopp R., van Esch J., Ringsdorf H., Knoll W., Gräber P. (1995) Inkorporation von Membranproteinen in festkörperunterstützte planare Lipidfilme, *Angew. Chem.* **107**, 2168-2171.
- Naumann R., Jonczyk A., Kopp R., van Esch J., Ringsdorf H., Knoll W., Gräber P. (1995) Incorporation of membrane proteins in solid-supported lipid layers, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **34**, 2056-2058.
- [Nau 97] Naumann R., Jonczyk A., Hampel C., Ringsdorf H., Knoll W., Bunjes N., Gräber P. (1997) Coupling of proton translocation through ATPase incorporated into supported lipid bilayers to an electrochemical process, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **42**, 241-247.
- [Nol 95] Nollert P., Kiefer H., Jähmig F. (1995) Lipid Vesicle Adsorption versus Formation of Planar Bilayers on Solid Surfaces, *Biophys. J.* **69**, 1447-1455.
- [Old 94] Oldham K.B., Myland J.C. (1994) Fundamentals of Electrochemical Science, Academic Press, San Diego, Kap. 10, S. 357.
- [Owe 69] Owens D.K., Wendt R.C. (1969) Estimation of the Surface Free Energy of Polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741-1747.
- [Pet 96] Petty M.C. (1996) Langmuir-Blodgett films – An introduction, Cambridge University Press, Cambridge.

- [Pla] (i) Plant A.L. (1993) *Langmuir* **9**, 2764. (ii) Plant A.L., Gueguechkeri M., Yap W. (1994) *Biophys. J.* **67**, 1126. (iii) Meuse C.W., Niaura G., Lewis M.L., Plant, A.L. (1998) *Langmuir* **14**, 1604. (iv) Meuse C.W., Krueger S., Majkrzak C.F., Dura J.A., Fu J., Conner J.T., Plant A.L (1998) *Biophys. J.* **74**, 1388.
- [Pla 95] Plant A.L., Brigham-Burke M., Petrella E.C., Oshannessy D.J. (1995) Phospholipid Alkanethiol Bilayers for Cell-Surface Receptor Studies by Surface Plasmon Resonance, *Anal. Biochem.* **226**, 342-348.
- [Pla 99] Plant A. (1999) Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics, *Langmuir* **15**, 5128-5135.
- [Rab 71] Rabel W. (1971) Einige Aspekte der Benetzungstheorie und ihre Anwendung auf die Untersuchung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Polymeren, *Farbe und Lack* **10**, 997-1006.
- [Räd 95] Rädler J., Strey H., Sackmann E. (1995) Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir* **11**, 4539-4548.
- [Rag 98] Raguse B., Braach-Maksvytis V., Cornell B.A., King L.G., Osman P.D.J., Pace R.J., Wieczorek L. (1998) Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization, *Langmuir* **14**, 648-659.
- [Rae 77] Raether H. (1977) In *Physics of Thin films*; Hass G., Francombe M., Hoffman R., Eds; Academic Press, New York, Vol. 9, S. 145.
- [Rae 88] Raether H. (1988) Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, Springer, Berlin.
- [Rao 97] Rao N.M., Plant A.L., Silin V., Wight S., Hui S.W. (1997) Characterization of Biomimetic Surfaces Formed from Cell Membranes, *Biophys. J.* **73**, 3066-3077.
- [Rin 88] Ringsdorf H., Schlarb B., Venzmer J. (1988) Molekulare Architektur und Funktion von polymeren orientierten Systemen – Modelle für das Studium von Organisation, Oberflächenerkennung und Dynamik bei Biomembranen, *Angew. Chem.* **100**, 117-162.
- [Roh 97] Rohdahl M., Hook F., Fredrikson C., Keller CA, Krozer A., Brzezinski P., Voinova M. Kasemo B. (1997) Simultaneous Frequency and Dissipation Factor QCM Measurements of Biomolecular Adsorption and Cell Adhesion, *Farad. Disc.* **107**, 229-246.
- [Roy 97] Royal Swedish Academy of Sciences, Information Department (1997) Press Release.

-
- [Sac 96] Sackmann E. (1996) Supported Membranes: Scientific and Practical Applications, *Science* **271**, 43-48.
- [Sal 97 a] Salamon Z., Macleod H.A., Tollin G. (1997) Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles, *Biochim. Biophys. Acta.* **1331**, 117-129.
- [Sal 97 b] Salamon Z., Macleod H.A., Tollin G. (1997) Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems, *Biochim. Biophys. Acta.* **1331**, 131-152.
- [Sau 98] Saurel O., Cézanne L., Milon A., Tocanne J., Demange P. (1998) Influence of Annexin V on the Structure of Phosphatidylserine Bilayers: A Fluorescence and NMR Study, *Biochemistry* **32**, 1403-1410.
- [Sch 96] Schmid B., Krömer M., Schulz G.E. (1996) Expression of porin from *Rhodospseudomonas blastica* in *Escherichia coli* inclusion bodies and folding into exact native structure, *FEBS Lett.* **381**, 111-114.
- [Sch 85] Schmidt G., Gräber P. (1985) The rate of ATP synthesis by reconstituted CF₀F₁ liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 46-51.
- [Sch 87] Schmidt G., Gräber P. (1987) The rate of ATP Synthesis Catalyzed by Reconstituted CF₀F₁-Liposomes – Dependence on ΔpH und $\Delta\psi$, *Biochim. Biophys. Acta* **890**, 392-394.
- [Sch 87] Schmidt G., Gräber P. (1987) The Role of ATP Hydrolysis Catalyzed by Reconstituted CF₀F₁-Liposomes, *Z. Naturforsch. C* **42**, 231-236.
- [Sch 98] Schmidt E.K. (1998) Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen, Dissertation, Universität Hannover.
- [Sch 96] Schmidt T.M.G., Koepke J., Frank R., Skerra A. (1996) Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target Streptavidin, *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.
- [Sch 93] Schneider T.W., Buttry D.A. (1993) Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Studies of Adsorption and Desorption of Self-Assembled Monolayers of Alkyl Thiols on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12391-12397.
- [Sch 97] Schrader M.E. (1996) Contact Angle and Vapour, *Langmuir* **12**, 3728-3732.
- [Sch a] Prof. Dr. G.E. Schulz, Universität Freiburg.

- [Sch b] Andreas Scheller, EDV-Abteilung, Max-Planck-Institut für Polymerforschung.
- [Sei 93] Seifert K., Fendler K., Bamberg E (1993) Charge Transport by Ion Translocating Membrane Proteins on Solid Supported Membranes, *Biophys. J.* **64**, 384-391.
- [Shi 93] Shinitzky M. (1993) Biomembranes, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- [Sil 84] Silvius J.R., Gagné J. (1984) Calcium-induced Fusion and Lateral Phase Separations in Phosphatidylcholine-Phosphatidylserine Vesicles. Correlation by Calorimetric and Fusion Measurements, *Biochemistry* **23**, 3241-3247.
- [Sil 97] Silin V., Weetall H., Vanderah D.J. (1997) SPR studies of nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers, *J. Colloid Interface Sci.* **185**, 94-103.
- [Sil] Silin V. et al., in preparation, Preparation of gold films by a magnetron sputtering process.
- [Sin 72] Singer S.J., Nicolson G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* **175**, 720-731.
- [Sin 91] Singh S., Keller D.J. (1991) Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers, *Biophys. J.* **60**, 1401-1410.
- [Ske] Prof. Dr. Arne Skerra, TU München.
- [Sou 85] Southampton Electrochemistry Group (1985) Instrumental Methods in Electrochemistry, Wiley, New York.
- [Ste 74] Steck T.L., Kant J.A. (1974) Preparation of Impermeable Ghosts and Inside-out Vesicles from Human Erythrocyte Membranes, *Methods Enzymol.* **31**, 172-180.
- [Ste 96] Steinem C., Janshoff A., Ulrich W.-P., Sieber M., Galla, H.-J. (1996) Impedance Analysis of Supported Lipid Bilayer Membranes: A Scrutiny of Different Preparation Techniques, *Biochim. Biophys. Acta* **1279**, 169-180.
- [Ste 89] Stelzle M., Sackmann E. (1989) Sensitive Detection of Protein Adsorption to Supported Lipid Bilayers by frequency dependent capacitance measurements and microelectrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta* **981**, 135-142.
- [Ste 93] Stelzle M., Weissmüller G., Sackmann E. (1993) On the Application of Supported Bilayers as Receptive Layers for Biosensors with Electrical Detection, *J. Phys. Chem.* **97**, 2974-2981.
- [Str 96] Stranick S.J., Atre S.V., Parikh A.N., Wood M.C., Allara D.L., Winograd N, Weiss P.S. (1996) Nanometer-scale phase separation in mixed composition self-assembled monolayers, *Nanotechnology* **7**, 438-442.

-
- [Szo 80] Szoka F., Papahadjopoulos D. (1980) Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467-508.
- [Tam 85] Tamm L.K., McConnell H.M. (1985) Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **47**, 105-113.
- [Ter 92] Terrettaz S., Vogel H., Grätzel M.J. (1992) Ca²⁺- Sensitive Monolayer Electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **326**, 161-176.
- [Ter 93] Terrettaz S., Stora T., Duschl C., Vogel H. (1993) Protein-Binding to Supported Lipid-Membranes – Investigation of the Cholera-Toxin Ganglioside Interaction by Simultaneous Impedance Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance, *Langmuir* **9**, 1361-1369.
- [Ulm 91] Ulman A. (1991) An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Academic Press, San Diego.
- [Ulm 91] Ulman A., Evans S.D., Shnidman Y., Sharma R., Eilers J.E., Chang J.C. (1991) Concentration-driven Surface Transition in the Wetting of Mixed Alkanethiol Monolayers on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1499-1506.
- [Ulm 92] Ulman A., Evans S.D., Shnidman Y., Sharma R., Eilers J.E. (1992) Mixed Alkanethiol Monolayers on Gold Surfaces: Wetting and Stability Studies, *Adv. Colloid Interf. Sci.* **39**, 175-224.
- [Ulm 96] Ulman A. (1996) Wetting studies of molecularly engineered surfaces, *Thin Solid Films* **273**, 48-53.
- [Ulm pm] Ulman A. persönliche Mitteilung
- [Unt 77] Untracht S., Shipley G. (1977) *Journal of Biological Chemistry* **252**, 4449-4457.
- [Vit 85] Viitala J., Järnefelt J. (1985) The red cell surface revisited, *TIBS* **10**, 392–395.
- [Voe 92] Voet D., Voet J.G. (1992) Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- [Vog 94] Voges D. et al. (1994) 3-Dimensional Structure of Membrane-Bound Annexin V – A Correlative Electron Microscopy-X-Ray Crystallography Study, *J. Mol. Biol.* **238**, 199-213.
- [Wal 91] Walczak M.M., Popenoe D.D., Deinhammer R.S., Lamp B.D., Porter M.D. (1991) Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers At Gold – A Measure of Surface Coverage, *Langmuir* **7**, 2687-2693.
- [Wal 95] Walczak M.M., Alves C.A., Lamp B.D., Porter M.D. (1995) Electrochemical an X-Ray Photoelectron Spectroscopic Evidence for Differences in the Binding Sites

- of Alkanthiolate Monolayers Chemisorbed at Gold, *J. Electroanal. Chem.* **396**, 103-114.
- [Wid 91] Widrig C.A., Chung C., Porter M.D. (1991) The Electrochemical Desorption of n-Alkanethiol Monolayers from Polycrystalline Au and Ag Electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **310**, 335-359.
- [Wil 97] Williams L.M., Evans S.D., Flynn T.M., Marsh A., Knowles P.F., Bushby R.J., Boden N. (1997) Kinetics of the Unrolling of Small Unilamellar Phospholipid Vesicles onto Self-Assembled Monolayers, *Langmuir* **13**, 751-757.
- [Win 90] Winter R. (1990) Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen, *Chemie i. u. Zeit* **24**, 71-81.
- [Yan 96] Yang D.F., Wilde C.P., Morin M. (1996) Electrochemical Desorption and Adsorption of Nonyl Mercaptan at Gold Single Crystal Electrode Surfaces, *Langmuir* **12**, 6570-6577.
- [Yan 97] Yang D.F., Morin M (1997) Reorganization of the Electrical Double Layer following Reduction of a Self-Assembled Alkanthiol Monolayer on a Gold 111 Electrode, *Canadian Journal of Chemistry – Revue Canadienne de Chimie* **75**, 1680-1686.
- [Yan 97a] Yang D.F., Wilde C.P., Morin M. (1997) Studies of the Electrochemical Removal and Efficient Re-formation of a Monolayer of Hexadecanethiol Self-Assembled at an Au(111) Single Crystal in Aqueous Solutions, *Langmuir* **13**, 243-249.
- [Yan 98] Yang D.F., Morin M. (1998) Chronoamperometric Study of the Reductive Desorption of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers, *J. Electroanal. Chem.* **441**, 173-181.
- [Zho 94] Zhong C.J., Porter M.D. (1994) Evidence for Carbon-Sulfur Bond-Cleavage in Spontaneously Adsorbed Organosulfide-Based Monolayers at Gold, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11616-11617.
- [Zho 97] Zhong C.J., Porter M.D. (1997) Fine Structure in the Voltammetric Desorption Curves of Alkanethiolate Monolayers Chemisorbed at Gold, *J. Electroanal. Chem.* **425**, 147-153.
- [Zho 97a] Zhong C.J., Zak J., Porter M.D. (1997) Voltammetric Reductive Desorption Characteristics of Alkanethiolate Monolayers at Single Crystal Au(111) and (110) Electrode Surfaces, *J. Electroanal. Chem.* **421**, 9-13.
- [Zvi 99] Zview Software Help V 2.1b, Scribner Associates, (1999).

7 Anhang

7.1 Technische Zeichnungen zur Meßzelle

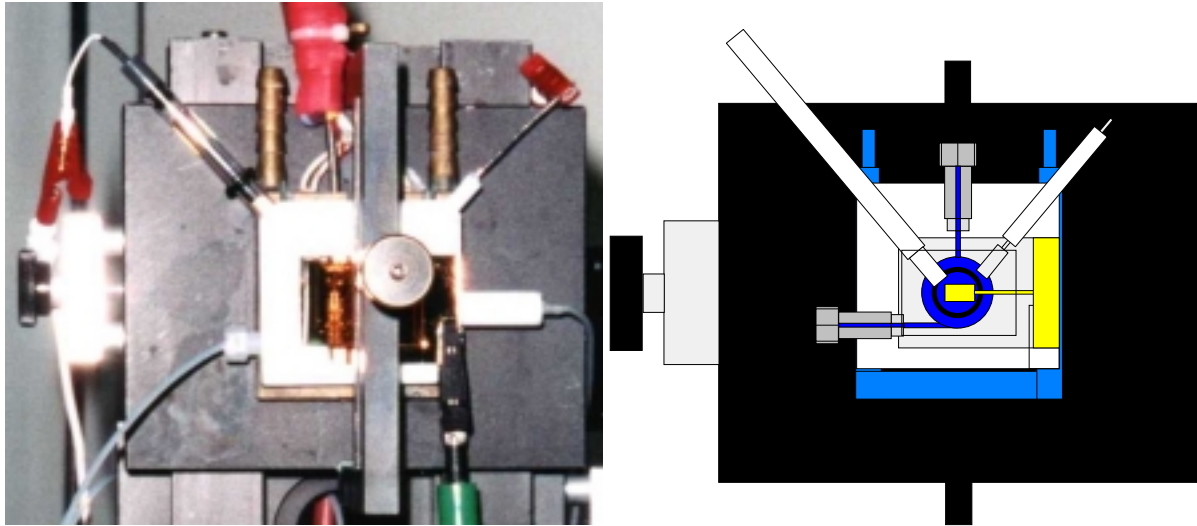


Abb. 127 Meßzelle mit Halterung in Bild und Schema.

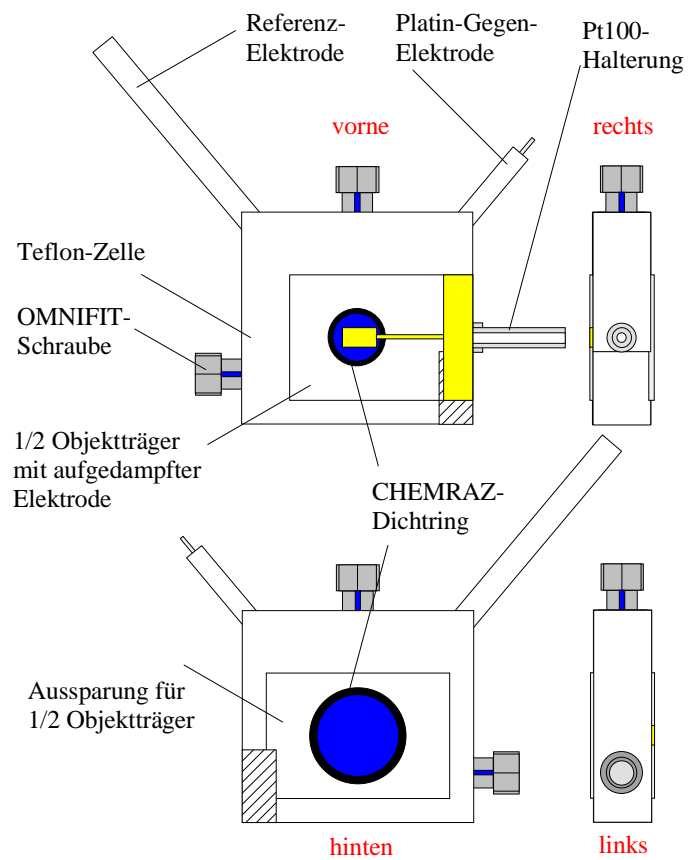


Abb. 128 Alle Ansichten der Meßzelle.

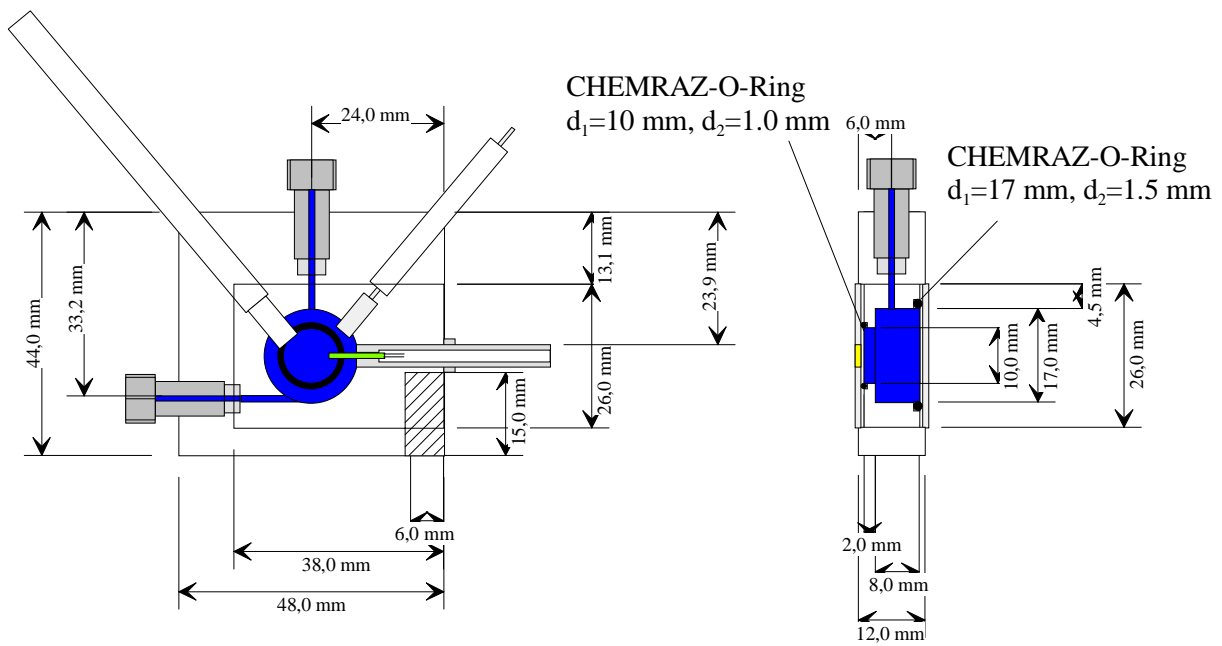


Abb. 129 Abmessungen der Teflon-Meßzelle.

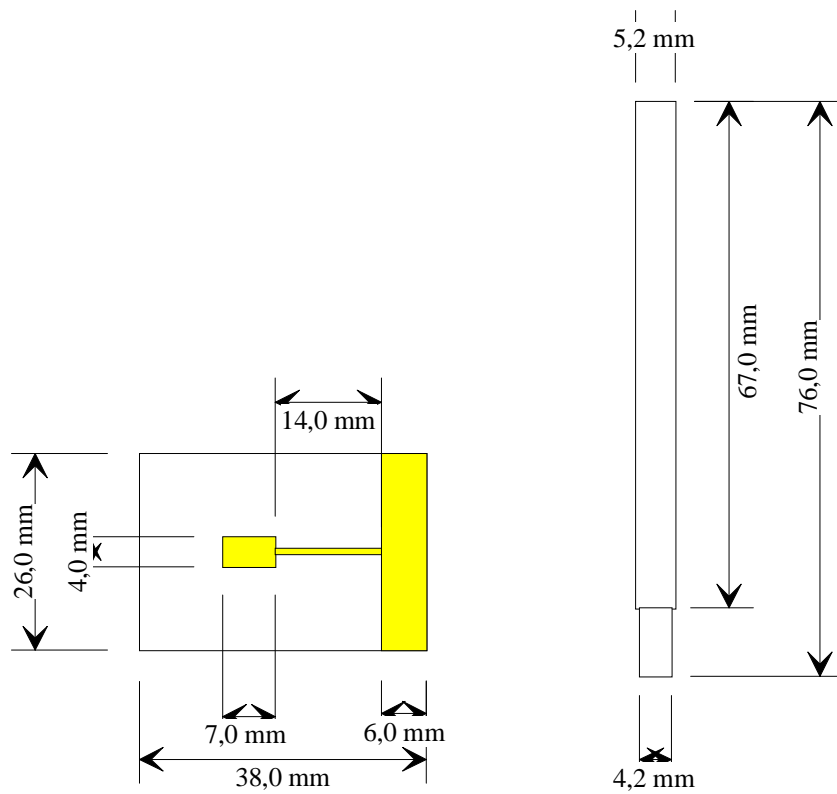


Abb. 130 Aufgedampfte Au-Arbeitselektrode auf Glas (links) und Blindstopfen für Referenzelektrode BAS Re-5 (rechts).

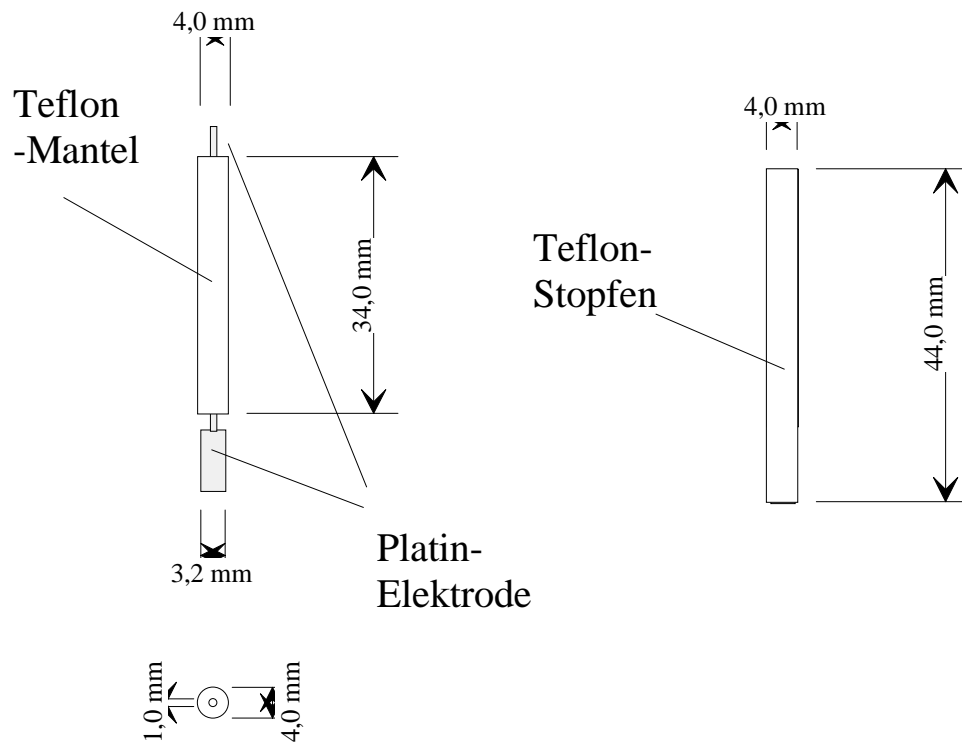


Abb. 131 Pt-Gegenelektrode in Teflonfassung (links) und Blindstopfen (rechts).

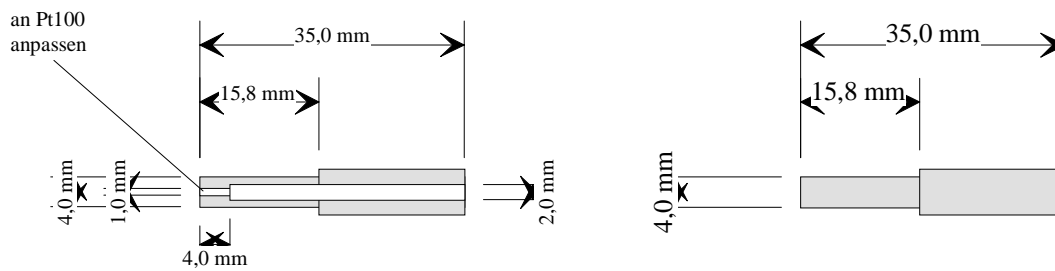


Abb. 132 Teflonfassung für Pt100-Temperaturfühler (links) und entsprechender Blindstopfen (rechts).

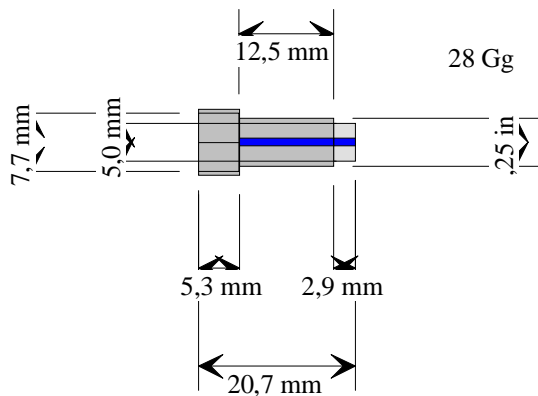


Abb. 133 OMNIFIT-Schraube (1/4\", 28 Gg) für Spül-Zu- und Ableitung.

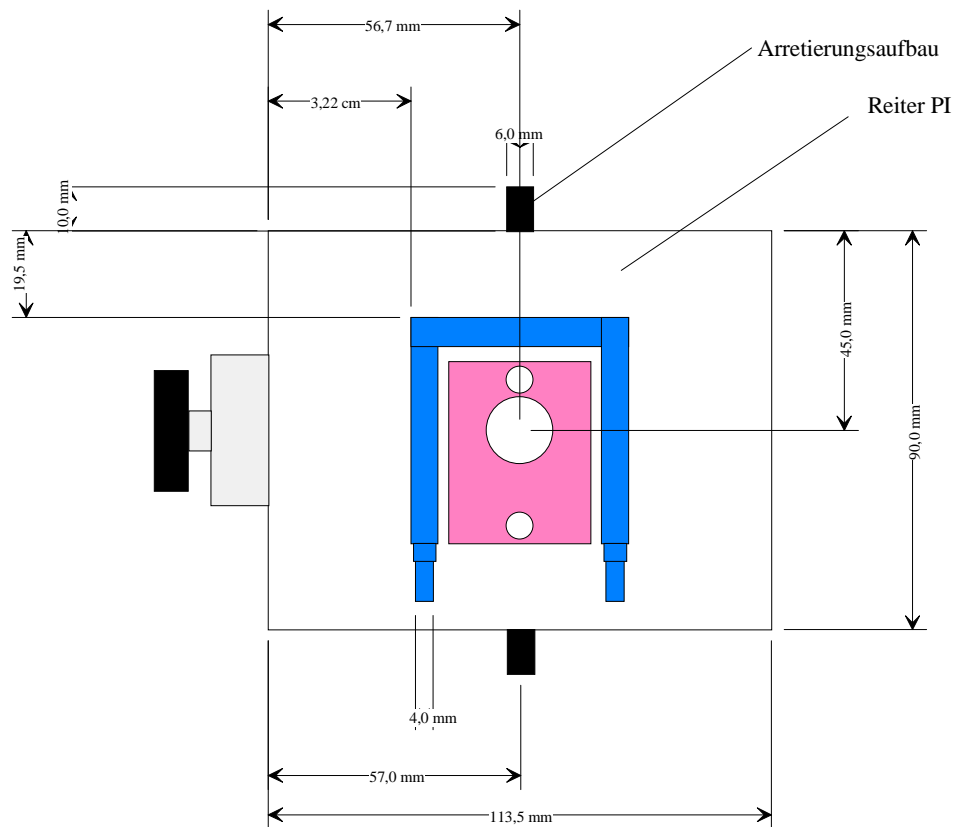


Abb. 134 Meßzellenhalterung (Reiter, Arretierungsbügel und Thermostatisierungseinheit).

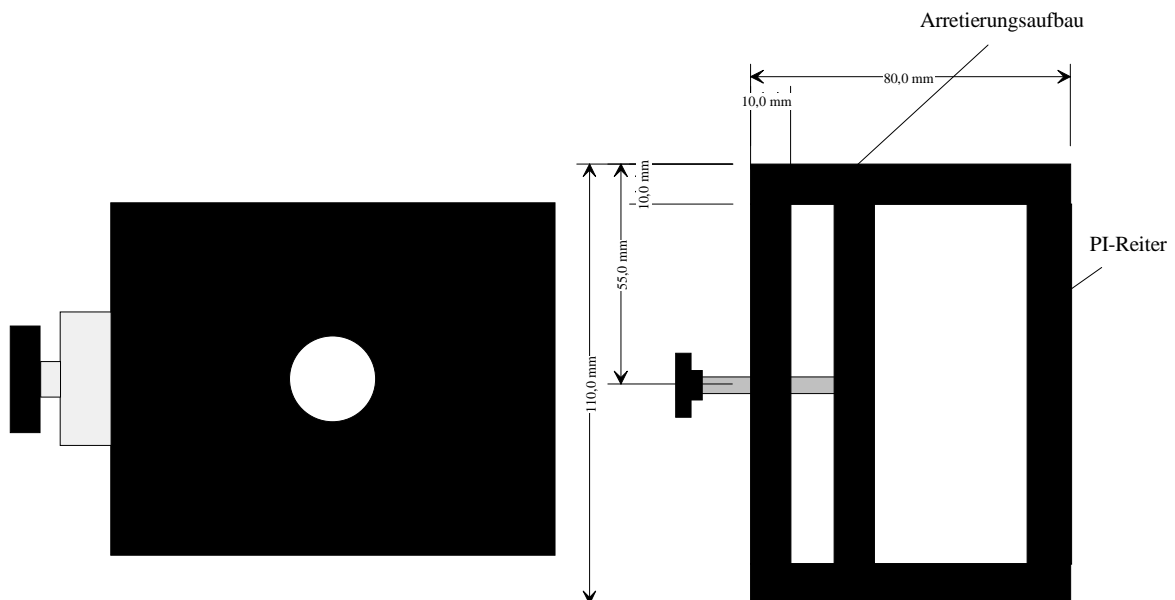


Abb. 135 PI-Reiter (links) und Arretierungsbügel (rechts).

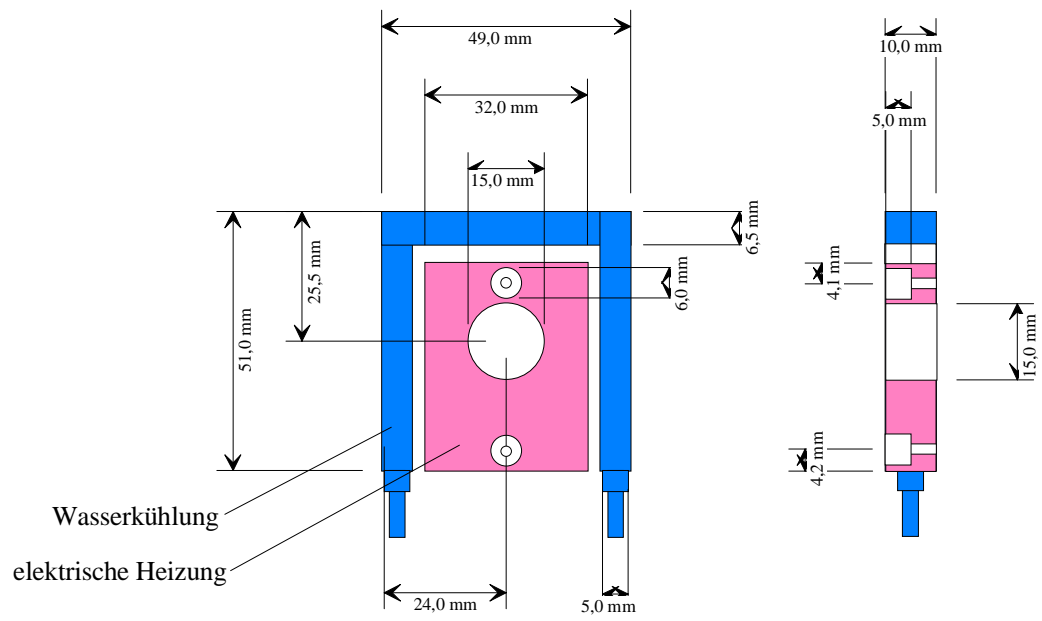


Abb. 136 Abmessungen Temperierungseinheit.

7.2 Korrektur des Oberflächenmolenbruchs nach Cassie

Während in Kapitel 3.5.3 alle Größen in Bezug auf den gesicherten Molenbruch von Dodekanthiol DDT in Lösung aufgetragen sind, finden sich hier die entsprechenden Auftragungen gegen den aus der Cassie-Gleichung ermittelten Molenbruch auf der Oberfläche. Aufgrund der bevorzugten Adsorption des Hydroxythiols HUT verschieben sich die Kurven dabei zu kleineren Molenbrüchen.

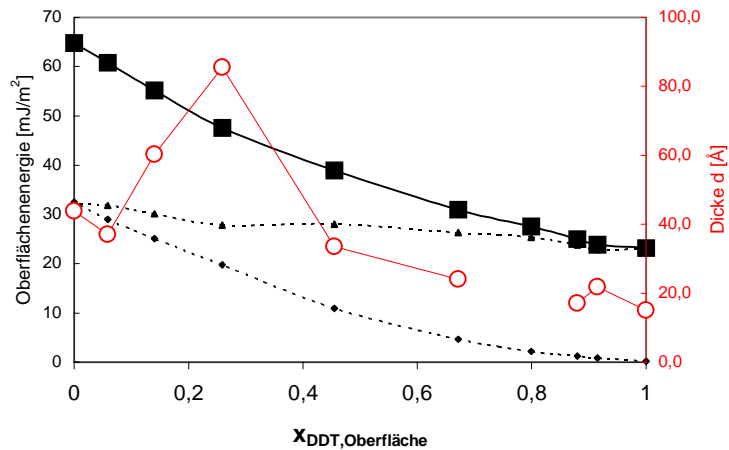


Abb. 137 Abhängigkeit der optischen Schichtdicke ○ vom Molenbruch an Dodekanthiol x_{DDT} im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien ■ (polarer ◆ und disperser ▲ Anteil); vgl. Abb. 93.

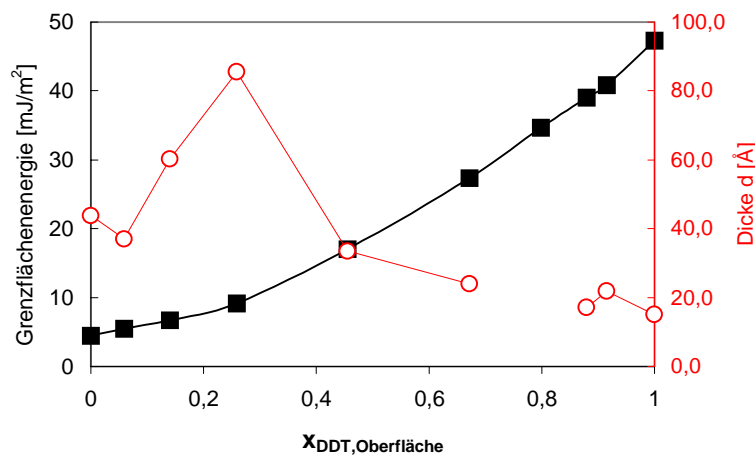


Abb. 138 Grenzflächenenergie ■ zwischen Wasser und den binären Monolayern und optische Schichtdicke ○; vgl. Abb. 89.

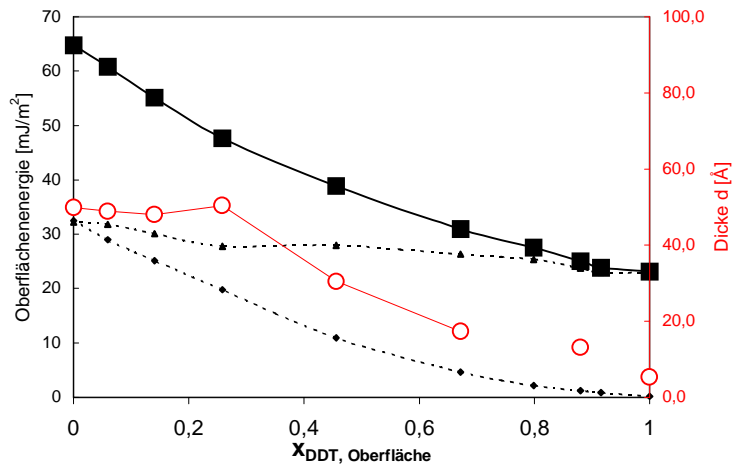


Abb. 139 Optische Schichtdicken d (○) nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} und im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien (total γ_s (■), polar γ_s^p (◆), dispers γ_s^d (▲)); vgl. Abb. 96.

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1 Schematisches Modell einer Zellmembran (aus [Win 90]). | 1 |
| Abb. 2 Typische Modellmembranen (aus [Ahl 90]). | 2 |
| Abb. 3 Das Glycerophospholipidgrundgerüst. | 3 |
| Abb. 4 Phasendiagramm für DMPC (aus [Cev 87]). | 4 |
| Abb. 5 Strukturformeln der verwendeten „Anker-Lipide“. | 5 |
| Abb. 6 Struktur der verwendeten „Füll-Lipide“. | 6 |
| Abb. 7 Modell zur Bindung und Porenbildung von Annexin V [Dem 94]. | 9 |
| Abb. 8 Porin aus <i>Rhodopseudomonas blasticus</i> . | 10 |
| Abb. 9 Schematischer Aufbau der H ⁺ -ATPase (aus [Roy 97]). | 11 |
| Abb. 10 Modell des Erythrocytenmembranskeletts (aus [Voe 92]). | 11 |
| Abb. 11 Totalreflektion an der Luft-Glas-Grenzfläche. | 12 |
| Abb. 12 Reflektivität für p- und s- Mode in Abhängigkeit vom äußeren Einfallswinkel Θ_a für die Reflektion an der Grenzfläche Prisma($n=1.845$)/Luft. | 12 |
| Abb. 13 Intensitäts- (·····) und Feld- (—) verlauf der evaneszenten Welle an der Glas/Luft-Grenzfläche. | 13 |
| Abb. 14 Abfall der Feldintensität in Metall und Dielektrikum. | 14 |
| Abb. 15 Dispersion von Licht in Luft und Glas sowie des PSP an der Grenzfläche Metall/Luft. | 14 |
| Abb. 16 Prismenkopplung auf Gold und zugehörige Reflektivitätskurve. | 15 |
| Abb. 17 Strahlengang vor und nach Adsorption eines Dielektrikums auf Gold. | 16 |
| Abb. 18 Resonanzkurve vor (—) und nach (—) Adsorption einer dielektrischen Schicht ($n=1.5$, $d=40 \text{ \AA}$) auf Gold, sowie zeitliche Reflektivitätsänderung (Kinetik) bei festem Winkel. | 16 |
| Abb. 19 Schematische Darstellung einer elektrischen Doppelschicht (oben) und Potentialverlauf nach dem Modell von Stern (unten) (aus [Gla 96]). | 18 |
| Abb. 20 Einfluß des Bedeckungsgrades auf die Gesamtkapazität. | 19 |
| Abb. 21 2- und 3-Elektroden-Anordnung. | 20 |
| Abb. 22 Spannungsrampen und Zyklovoltammogramm mit wichtigsten Kenngrößen. | 21 |
| Abb. 23 Schema zur reduktiven Desorption von Alkanthiolen. | 24 |
| Abb. 24 E-t-Diagramm und Kreisfrequenz. | 26 |
| Abb. 25 I-t-Diagramm und Kreisfrequenz. | 26 |
| Abb. 26 Strom und Spannung für Winkelfrequenz ω und Kreisdiagramm. | 27 |
| Abb. 27 Schaltbild Widerstand –R-. | 28 |
| Abb. 28 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für einen rein ohmschen Widerstand von $R=1 \text{ M}\Omega$. | 28 |
| Abb. 29 Schaltbild Kondensator –C-. | 28 |
| Abb. 30 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für einen Kondensator mit einer Kapazität von $C=1 \text{ }\mu\text{F}$. | 28 |
| Abb. 31 Schaltbild Serienschaltung -R-C-. | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Abb. 32 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Serienschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem Kondensator mit $C=1\mu\text{F}$. | 29 |
| Abb. 33 Schaltbild Parallelschaltung $-RC-$. | 29 |
| Abb. 34 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem Kondensator mit $C=1\mu\text{F}$. | 29 |
| Abb. 35 Schaltbild Parallelschaltung $-R(CPE)-$. | 30 |
| Abb. 36 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem CPE (mit $C=1\mu\text{F}$ und $\alpha=1$ ■, 0.9 □ und 0.8 ●). | 30 |
| Abb. 37 Schaltbild $-R-R(CPE)-$. | 31 |
| Abb. 38 Ortskurve, frequenzreduzierte Admittanz und Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus einem Widerstand von $R=1\text{ M}\Omega$ und einem CPE (mit $C=1\mu\text{F}$ und $\alpha=1$ ■, 0.9 □ und 0.8 ●) sowie einem Vorwiderstand von $R_a=100\ \Omega$. | 31 |
| Abb. 39 Schaltbild $-R-RC-$. | 32 |
| Abb. 40 Argand-Diagramm 2-D und 3-D. | 32 |
| Abb. 41 Komplexer frequenzreduzierter Admittanz-Plot. | 33 |
| Abb. 42 Bode-Plot. | 33 |
| Abb. 43 Diagramm zur Definition der Grenzflächenenergie | 35 |
| Abb. 44 Vektordiagramm zur Young'schen Gleichung. | 36 |
| Abb. 45 Schematische Isotherme mit Phasen und Phasenübergängen für ein langkettiges Amphiphil. | 39 |
| Abb. 46 Kombimeßzelle (Draufsicht und Schnitt). | 42 |
| Abb. 47 Schema zum Aufbau von HBMs. | 43 |
| Abb. 48 Ersatzschaltkreis für DPPTE-Monolayer und DPPTE-DMPC-Hybrid-Bilayer | 44 |
| Abb. 49 Frequenzreduzierte Admittanzen für DPPTE-Monolayer (—) und DPPTE-DMPC-Hybrid-Bilayer (---) sowie Fits anhand Ersatzschaltbild (Abb. 39). | 44 |
| Abb. 50 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DPPTE/(Eigelb-PC/NBD-PE 1%)-Bilayers | 45 |
| Abb. 51 DSC-Spektren für DMPC- (—) und DPPTE- (-----) Vesikeldispersionen sowie temperaturabhängige Filmkapazitäten ■ der HBM. | 46 |
| Abb. 52 Isothermen für $x=1$. | 47 |
| Abb. 53 Filmkapazitäten der DPPTE-Monolayer ■ durch LB-Transfer bei verschiedenen Filmdrucken gefolgt von DMPC-Vesikelfusion □. Inset: Isotherme für DPPTE bei $T=25\text{ }^\circ\text{C}$. | 48 |
| Abb. 54 Zeitlicher Verlauf von Membran-Widerstand und $-$ Kapazität für die DMPC-Vesikelfusion ($T=30^\circ\text{C}$) auf DPPTE-Monolayer mit unterschiedlichen Lateraldrucken. | 49 |
| Abb. 55 Druck-Flächenisothermen für verschiedene Molenbrüche x_{DPPTE} bei $T=25\text{ }^\circ\text{C}$. | 50 |
| Abb. 56 Mittlerer Flächenbedarf pro Molekül in Abhängigkeit vom Molenbruch für $\pi=10\ \text{O}$ und $40\ \text{■}$ [mN/m]. | 50 |
| Abb. 57 Isothermen für $x=0.7$. | 51 |
| Abb. 58 Isothermen für $x=0.3$. | 51 |
| Abb. 59 Schema zum Aufbau von MBMs. | 54 |
| Abb. 60 Ersatzschaltkreis für Filme aus gemischter Vesikelfusion. | 55 |
| Abb. 61 Impedanzspektren während Fusion ■ und nach Spülen ○. | 56 |

| | |
|---|-----------|
| Abb. 62 Molenbruchabhängigkeit von Filmkapazität ■ und Widerstand ○ für 4-5 h Fusion (aus [Lin 99]). | 57 |
| Abb. 63 Molenbruchabhängigkeit der Filmkapazität für 15-20 h Fusion. | 57 |
| Abb. 64 DSC-Spektren für DMPC, DPPTE und DMPC/DPPTE (7:3)-Vesikel. | 58 |
| Abb. 65 Dünnschichtchromatogramm für gemischte DPPTE/DMPC-Vesikeldispersionen ($x=0.3$) bei pH 2.6 und 4.0 aus Inkubationslösung (Mitte). DMPC und Myristinsäure (links) sowie Palmitinsäure und DPPTE (rechts) wurden als Referenzen mitlaufen lassen. Laufmittel war $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ (13:5:1), Detektion erfolgte durch schwefelsaures Ammoniummolybdat und anschließendes Veraschen. | 60 |
| Abb. 66 Konzentrationsabhängigkeit der gemischten Vesikelfusion ($x=0.3$, $T=50^\circ\text{C}$, pH 5.5). Spülschritte sind nicht gezeigt. | 61 |
| Abb. 67 Mögliche Produkte aus der alkalischen Hydrolyse von DPPTE. | 64 |
| Abb. 68 Erster reduktiver Scan ($v=0.02$ V/s) für einen DPPTE-SAM auf Au(111) in 0.5 M KOH. | 64 |
| Abb. 69 Erster, zweiter und vierter Scan-Zyklus bei der reduktiven Desorption eines selbstorganisierten DPPTE-Monolayers auf Au(111) in 0.5 M KOH. | 66 |
| Abb. 70 Reduktive Desorption von DPPTE während gemischter Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$; $c=0.1$ mM). | 67 |
| Abb. 71 Reduktive Desorption von DPPTE während gemischter Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$; $c=1.0$ mM). | 68 |
| Abb. 72 Filmdicke, Flächenbelegung und Wasser-Kontaktwinkel für gemischte Vesikelfusion ($x_{\text{DPPTE}}=0.3$) bei zwei verschiedenen Lipidkonzentrationen ($c=0.1$ mM ■ und 1 mM ○). Oberflächenbelegungen sind auf die reduktive Desorption eines DPPTE-SAM (=100%) auf derselben Goldcharge normiert. | 69 |
| Abb. 73 Mögliche Prozesse zur Akkumulation von Thiolipid auf der Oberfläche | 70 |
| Abb. 74 Kalottenmodell der Thiolipide und DMPC. | 71 |
| Abb. 75 Möglicher Ersatzschaltkreis für Bilayer aus Spacer-Lipiden | 72 |
| Abb. 76 Impedanzspektren für Spacer JM370 ■, JM335/EigelbPC-Bilayer auf großer Elektrode mit Defekten ○ und defektfrei auf Mikroelektrode ● sowie zugehörige Fits (—). | 72 |
| Abb. 77 Isothermen für die einkettigen Thiolipide bei $T=25^\circ\text{C}$. | 76 |
| Abb. 78 Isothermen für die zweikettigen Thiolipide JM386 (·····) und JM387 (—) bei $T=25^\circ\text{C}$. | 77 |
| Abb. 79 Au-Minielektroden ($\varnothing = 2000, 1000$ und $500\ \mu\text{m}$) | 79 |
| Abb. 80 Verkapseltes Mikroelektroden-Array (links) und Zoom auf das Array (rechts). | 79 |
| Abb. 81 Impedanzspektren für SAMs (■/●) und zugehörige Eigelb-PC-Bilayer (□/○) für DPPTE (links) und JM335 (rechts) auf Makro- ■□/ bzw. Mikro- ●○ Elektroden. | 80 |
| Abb. 82 Vorgeschlagener Mechanismus zur Vesikelfusion auf hydrophobe Monolayer (aus [Kal 92; Lin 97]) | 81 |
| Abb. 83 Fluoreszenzmikroskopie an einem JM335/(Eigelb-PC/NBD-PE 1%)-Bilayer mit Bleichfleck. | 82 |
| Abb. 84 Schema zu binären DDT/HUT-Monolayern. | 83 |
| Abb. 85 Wasser- ■ und Methylidid- ○ Kontaktwinkel in Abhängigkeit vom Molenbruch an Dodekanthiol in Lösung $x_{\text{DDT, Lsg.}}$. Gestrichelte Linien (----) entsprechen der Cassie-Gleichung für das jeweilige Lösungsmittel. | 85 |
| Abb. 86 Aus Cassie-Gleichung ermittelte Abweichungen des Molenbruchs auf der Oberfläche von der Inkubationslösung (ermittelt über Wasser ■ und Methylidid ○). | 86 |

- Abb. 87** Owens- und Wendt-Auftragung zur Ermittlung der freien Oberflächenenergien für verschiedene Molenbrüche an Dodekanthiol x_{DDT} . Der Achsenabschnitt ergibt sich zu $\sqrt{\gamma_s^d}$, während die Steigung durch $\sqrt{\gamma_s^p}$ gegeben ist. **87**
- Abb. 88** Polarer \blacklozenge und disperser \blacktriangle Anteil an der freien Oberflächenenergie sowie gesamte freie Oberflächenenergie \blacksquare als Summe der beiden. **88**
- Abb. 89** Grenzflächenspannung zwischen Wasser und den binären Monolayern. **89**
- Abb. 90** Zisman-Auftragung der Kontaktwinkel gegen die Oberflächenenergien der Lösungsmittel Wasser und Benzylalkohol. **89**
- Abb. 91** Kritische Oberflächenenergien γ_c \bullet (nach Zisman), sowie polarer \blacklozenge und disperser \blacktriangle Anteil an der freien Oberflächenenergie und gesamte freie Oberflächenenergie \blacksquare als Summe der beiden (nach Owens & Wendt) hier ermittelt mit Wasser und Benzylalkohol. **90**
- Abb. 92** Reduktive Desorption der DDT/HUT-Monolayer ($x_{\text{DDT}}=0, 0.5, 1$). Inset: Zoom auf die Peakminima **91**
- Abb. 93** Abhängigkeit der optischen Schichtdicke \circ vom Molenbruch an Dodekanthiol x_{DDT} im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien \blacksquare (polarer \blacklozenge und disperser \blacktriangle Anteil). **92**
- Abb. 94** SPR-Fusionskinetiken für POPC-Vesikel auf binären DDT/HUT-Monolayern (0-250 min.) **93**
- Abb. 95** SPR-Fusionskinetiken für POPC-Vesikel auf binären DDT/HUT-Monolayern (0-10 min.) **94**
- Abb. 96** Optische Schichtdicken d \circ nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} und im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien (total γ_s \blacksquare , polar γ_s^p \blacklozenge , dispers γ_s^d \blacktriangle). **94**
- Abb. 97** Diffusionskoeffizienten D \blacksquare und Schichtdicke d \circ nach 3-minütiger Fusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} . **95**
- Abb. 98** Diffusionskoeffizient D \circ , sowie Schichtdicken nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion \square und finale Schichtdicke \blacksquare in Abhängigkeit von der Grenzflächenenergie zwischen den binären Monolayern und Wasser. **96**
- Abb. 99** Frequenzreduzierte Admittanzspektren der binären Monolayer. **97**
- Abb. 100** Monolayer-Kapazitäten \blacksquare und Kontaktwinkel \bullet über dem Molenbruch x_{DDT} . **97**
- Abb. 101** Zeitlicher Verlauf der Filmkapazitäten während der Vesikelfusion. **98**
- Abb. 102** Vergleich der Schichtdickenzunahme aus SPR --- und IS \blacksquare . **99**
- Abb. 103** AFM-Aufnahmen vor (links) und nach (rechts) POPC-Vesikelfusion auf einen DDT-Monolayer. **100**
- Abb. 104** AFM-Aufnahmen während der POPC-Vesikelfusion auf einem gemischten HUT-DDT-Monolayer ($x=0.5$). **101**
- Abb. 105** AFM-Aufnahmen während der POPC-Vesikelfusion auf einen HUT-Monolayer. **102**
- Abb. 106** Frequenzreduzierte Admittanzspektren der MBM vor (\blacksquare/\bullet) und nach Inkubation mit Triton-X/Porin \square bzw. nur mit Triton X \circ . **105**
- Abb. 107** Zyklische Voltammogramme ($v=100$ mV/s) für $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($c=1\text{mM}$). Die Kurven ergeben sich als Differenz aus Voltammogrammen vor und nach Inkubation. **105**
- Abb. 108** Schema zur Funktionsweise der ATPase in festkörperunterstützten Membranen. **106**
- Abb. 109** Titration der Admittanz mittels ATP ($f=20$ Hz, Bias=0 mV, $U_{\sim}=10$ mV). Angegeben sind die jeweiligen ATP-Konzentrationen nach jeder Zugabe. **108**

| | |
|--|------------|
| Abb. 110 Impedanzspektren (Bode-Plot und frequenzreduzierte Admittanz) für gemischte Membran ■, DPPT-Submonolayer □, Membran mit inaktiver ● und aktiver ○ ATPase. | 108 |
| Abb. 111 Frequenzreduzierte Admittanzplots zum Verhalten der Membrankapazitäten während der Aktivitätstests. Bilayer mit rekonstituierter ATPase (links) und Referenz-Bilayer ohne ATPase (rechts). | 109 |
| Abb. 112 Tapping-Mode-AFM-Aufnahme von H ⁺ -ATPase in festkörperunterstützter Membran (links) und schematische Größenverhältnisse (rechts; aus [Voe 92]). | 110 |
| Abb. 113 Schema zur Modifizierung einer festkörperunterstützten Hybridmembran in den optischen Experimenten. | 115 |
| Abb. 114 Schichtdickenänderungen nach Annexin V-Zugabe und Ablösung mittels EDTA. | 116 |
| Abb. 115 Adsorption und Ablösung der Streptavidinmutante aufgrund des Verteilungsgleichgewichts. | 116 |
| Abb. 116 Schichtdickenänderungen nach Zugabe von Annexin V, Streptavidin-Mutante, Desthiobiotin und EDTA. | 117 |
| Abb. 117 Schema zur Modifizierung einer festkörperunterstützten Hybridmembran in den elektrochemischen Experimenten. | 118 |
| Abb. 118 Impedanzspektren im Bode-Plot während den Modifikationsschritten (Bias = 0 mV) | 118 |
| Abb. 119 Biasabhängigkeit der Impedanzspektren für löchrigen (links) und intakten (rechts) Bilayer | 119 |
| Abb. 120 Tapping-Mode AFM Aufnahmen während den Modifikationsschritten; A: HBM in NaCl; B: HBM in Ca-Puffer; C: HBM mit Annexin V; D: HBM mit Annexin V und Streptavidin-Mutante; E: Schnitt durch C; F: Schnitt durch D. | 120 |
| Abb. 121 Schema zur Fusion von RBC-Ghosts auf Dekanthiolmonolayer bzw. DPPT-Submonolayer. | 121 |
| Abb. 122 Cyclovoltammogramme an Dekanthiol-RBC-Hybridmembranen vor und nach Inhibierung mit DIDS. | 122 |
| Abb. 123 Cyclovoltammogramme für DPPT/DMPC-Bilayer nach gemischter Vesikelfusion und DPPT-sub-Monolayer nach Herauslösen von DMPC mit Ethanol. | 123 |
| Abb. 124 Cyclovoltammogramme an DPPT-Submonolayer-RBC-Hybridmembranen vor und nach Inhibierung mit DIDS. | 123 |
| Abb. 125 Differenzvoltammogramme resultierend aus Subtraktion der CV's vor und nach Inhibierung mit DIDS. | 124 |
| Abb. 126 Experimentelles Setup. | 127 |
| Abb. 127 Meßzelle mit Halterung in Bild und Schema. | 149 |
| Abb. 128 Alle Ansichten der Meßzelle. | 149 |
| Abb. 129 Abmessungen der Teflon-Meßzelle. | 150 |
| Abb. 130 Aufgedampfte Au-Arbeitslektrode auf Glas (links) und Blindstopfen für Referenzelektrode Re-5 (rechts). | 150 |
| Abb. 131 Pt-Gegenelektrode in Teflonfassung (links) und Blindstopfen (rechts). | 151 |
| Abb. 132 Teflonfassung für Pt100-Temperaturfühler (links) und entsprechender Blindstopfen (rechts). | 151 |
| Abb. 133 OMNIFIT-Schraube (1/4", 28 Gg) für Spül-Zu- und Ableitung. | 151 |
| Abb. 134 Meßzellenhalterung (Reiter, Arretierungsbügel und Thermostatisierungseinheit). | 152 |
| Abb. 135 PI-Reiter (links) und Arretierungsbügel (rechts). | 152 |
| Abb. 136 Abmessungen Temperierungseinheit. | 153 |

-
- Abb. 137** Abhängigkeit der optischen Schichtdicke \circ vom Molenbruch an Dodekanthiol x_{DDT} im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien \blacksquare (polarer \blacklozenge und disperser \blacktriangle Anteil); vgl. Abb. 93. **154**
- Abb. 138** Grenzflächenspannung \blacksquare zwischen Wasser und den binären Monolayern und optische Schichtdicke \circ ; vgl. Abb. 89. **154**
- Abb. 139** Optische Schichtdicken d \circ nach 3-minütiger POPC-Vesikelfusion in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DDT} und im Vergleich zu den freien Oberflächenenergien (total γ_s \blacksquare , polar γ_s^p \blacklozenge , dispers γ_s^d \blacktriangle); vgl. Abb. 96. **155**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. W. Knoll für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit, diese Arbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz anfertigen zu können.

Dr. A. Offenhäusser für die sehr gute Betreuung und Unterstützung sowie für die mir gewährte Forschungsfreiheit.

Dr. A. Plant für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der RBC-Membranen und für die Gewährung eines zweimonatigen Forschungsprojekts zur Untersuchung des Einflusses der freien Oberflächenenergie auf Vesikelfusionen am NIST, Gaithersburg, USA.

Prof. Dr. P. Gräber für die Bereitstellung der F_1F_0 -ATPasen und des Know-Hows zur Proteinrekonstitution.

Prof. Dr. A. Skerra für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Annexine.

Dr. K. Braig und Prof. Dr. P. Schulz für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Porine.

Dr. J. Mack für die Synthese und Bereitstellung der Spacer-Lipide.

Dr. V. Silin für die gute Zusammenarbeit am NIST.

Dr. J. Woodward für die AFM-Experimente am NIST.

V. Scheumann für die AFM-Experimente am MPIP.

M. Krause für die Bereitstellung der Au-Mikroelektroden

Danksagung

A. Kerth für die DSC-Messungen.

Frau Dr. R. Naumann für die vielen Diskussionen im Labor.

Den technischen Assistentinnen am MPIP, insbesondere A. Sommerfeld.

Den Service-Gruppen des MPIP und im besonderen A. Scheller.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des AK Knoll für die gute und freundschaftliche Atmosphäre.

Allen hier Vergessenen, die sich durch Nichtnennung auf den Schlips getreten fühlen.

(☺ Sorry!!!)

Meinen Eltern für die ideelle und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Herbert Wieder
Essenheimer Str. 65
55128 Mainz

geb. am 06. Mai 1971 in Worms am Rhein

Ausbildungsdaten:

| | |
|---------------|---|
| 1977-1981 | Diesterweg-Grundschule, Worms Hochheim |
| 1981-1990 | Gauß-Gymnasium, Worms (ABITUR 25.05.1990) |
| 07/90 - 06/91 | Wehrdienst, Kassel und Fritzlar |
| 10/91 - 10/93 | Grundstudium Chemie, Universität Kaiserslautern |
| 10/93 - 04/96 | Hauptstudium Chemie, Universität Kaiserslautern |
| 04/95 - 08/95 | Forschungsprojekt in Bioorganischer Chemie im Rahmen des ERASMUS-Programms der EG, University of Edinburgh, GB |
| 06/96 - 03/97 | Diplomarbeit in Physikalischer Chemie zum Thema "Untersuchungen zur Kinetik von Phasenumwandlungen in Phospholipidmembranen", Prof. Dr. A. Blume, Universität Kaiserslautern |
| 24.03.1997 | DIPLOM-CHEMIKER |
| seit 06/97 | Promotion in Physikalischer Chemie zum Thema "Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen auf Gold zur Rekonstitution von Membranproteinen" Prof. Dr. W. Knoll/ Prof. Dr. H.J. Butt Max-Planck-Institut für Polymerforschung/Universität Mainz |
| 09/99 - 10/99 | Forschungsprojekt zum Thema "Einfluß der Oberflächenenergie von Alkanthiolmonolagen auf die Fusion von Lipidvesikeln" in der Abteilung für Biomaterialien (Dr. A. Plant) am NIST, Gaithersburg, MD, USA |