

Elastizität porenüberspannender Membranen: Eine kraftmikroskopische Studie

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

dem Fachbereich
Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Ingo Patrick Mey
geboren in Mainz

Mainz 2009

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2009

Für den gläubigen Menschen steht Gott am Anfang,
für den Wissenschaftler am Ende aller seiner Überlegungen.

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Lipide und Membranen	5
2.1	Lipide	6
2.2	Der hydrophobe Effekt	7
2.3	Lipidaggregate und Modellsysteme	9
2.3.1	Vesikel	9
2.3.2	Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten	11
2.3.3	Hybride Lipiddoppelschichten - <i>tethered bilayers</i>	11
2.3.4	<i>Black Lipid Membranes</i>	12
2.4	Porenüberspannende Lipiddoppelschichten	13
2.4.1	Hybride porenüberspannende Lipiddoppelschichten	14
2.4.2	Unterstützte porenüberspannende Lipiddoppelschichten	14
2.5	Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten	15
2.6	Sterole	16
2.7	Zellmembranen	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Rasterkraftmikroskop	19
3.1.1	Aufbau	20
3.1.2	Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe	21
3.1.3	Kraftauflösung	22
3.1.4	Bestimmung der Federkonstante	24
3.1.5	Räumliches Auflösungsvermögen	25
3.1.6	Abbildende Modi	25
3.1.7	Kraftabstandskurven	27
3.1.8	<i>Rapid Force Curve Acquisition</i>	30
3.2	Fluoreszenzmikroskopie	31
3.3	Präparation poröser Siliziumsubstrate	31
3.4	Präparation artifizierlicher Membranen	32
3.4.1	Herstellung unilamellarer Riesenvesikel	34

3.4.2	Herstellung hybrider porenüberspannender Membranen	34
3.4.3	Herstellung unterstützter, porenüberspannender Membranen	36
3.5	Präparation porenüberspannender Zellmembranen	36
4	Ergebnisse und Interpretation - Artificielle Systeme	39
4.1	Charakterisierung der Substrate	40
4.1.1	Nano-Siebe der Firma fluXXion	40
4.1.2	Maßgefertigte Substrate	43
4.2	Hybride porenüberspannende Membranen	44
4.2.1	Korrelation zwischen Fluoreszenz und Topographie	45
4.2.2	Elastische Eigenschaften von hybriden porenüberspannenden Systemen	47
4.2.3	Einfluss der Indentationsgeschwindigkeit	53
4.2.4	Einfluss des Porenradius	54
4.2.5	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung	57
4.2.6	Einfluss des Lösungsmittels	60
4.2.7	Einfluss der Membranphase	63
4.3	Unterstützte porenüberspannende Membranen	67
4.3.1	Unterstützte porenüberspannende DPhPC Membranen	67
4.4	Vergleich der artifiziellen porenüberspannenden Membranen	70
5	Ergebnisse und Interpretation - Zellmembranen	73
5.1	Charakterisierung basaler Zellmembranen	74
5.2	Elastische Eigenschaften basolateraler Zellmembranen	77
5.3	Einfluss der Fixierung auf die Elastizität	81
5.4	Einfluss von ECM und Zytoskelett	82
5.5	Diskussion nativer Zellmembranfragmente	85
6	Mechanik porenüberspannender Membranen	89
6.1	Vergleich von Modellen und Experimenten	90
6.1.1	Kontinuumsannahme	90
6.1.2	Deformationen einer Membran	90
6.1.3	Modell der Indentation hybrider porenüberspannender Membranen .	98
6.1.4	Modell der Indentation unterstützter porenüberspannender Membranen	103
6.1.5	Modell der Indentation nativer freitragender Membranen	104
6.2	Elastizität porenüberspannender Membranen	105
7	Zusammenfassung	115
A	Abkürzungen	139
B	Geräte und Materialien	141

INHALTSVERZEICHNIS

iii

C Lebenslauf

143

D Veröffentlichungen

145

Kapitel 1

Einleitung

Membranen spielen eine essentielle Rolle bei vielen wichtigen zellulären Prozessen. Sie ermöglichen die Erzeugung von chemischen Gradienten zwischen dem Zellinnerem und der Umgebung. Die Zellmembran übernimmt wesentliche Aufgaben bei der intra- und extrazellulären Signalweiterleitung und der Adhäsion an Oberflächen. Durch Prozesse wie Endocytose und Exocytose werden Stoffe in oder aus der Zelle transportiert, eingehüllt in Vesikel, welche aus der Zellmembran geformt werden. Zusätzlich bietet sie auch Schutz für das Zellinnere.

Der Hauptbestandteil einer Zellmembran ist die Lipiddoppelschicht, eine zweidimensionale fluide Matrix mit einer heterogenen Zusammensetzung aus unterschiedlichen Lipiden. In dieser Matrix befinden sich weitere Bausteine, wie z.B. Proteine [1]. An der Innenseite der Zelle ist die Membran über Ankerproteine an das Zytoskelett gekoppelt. Dieses Polymernetzwerk erhöht unter anderem die Stabilität, beeinflusst die Form der Zelle und übernimmt Funktionen bei der Zellbewegung [2, 3]. Zellmembranen sind keine homogenen Strukturen, je nach Funktion sind unterschiedliche Lipide und Proteine in mikroskopischen Domänen angereichert [4].

Ein typischer Ansatz in der Naturwissenschaft ist die Verwendung von Modellsystemen, um grundlegende Zusammenhänge zu verstehen und komplexe Sachverhalte auf das wesentliche zu reduzieren. Das einfachste Modellsystem für Zellmembranen ist eine Lipiddoppelschicht, da diese den Hauptbestandteil der Zellmembran bildet. Um die mechanischen Eigenschaften von Zellen oder Lipiddoppelschichten zu verstehen, werden z.B. Methoden wie Optische Mikroskopie [5] oder Aspirationsexperimente mit Mikropipetten [6, 7] angewendet.

Jedoch wird bei den meisten Methoden die hohe Heterogenität und stark lokalisierte Funktionalität einer Zellmembran nicht berücksichtigt. Die Auflösung der optischen Mikroskopie ist zu gering um mechanische Eigenschaften auf einer mikroskopischen Ebene zu bestimmen. Auch Mikropipetten Aspirationsexperimente mitteln über große Bereiche einer Membran.

Rasterkraftmikroskopie bietet andererseits eine entsprechend hohe räumliche Auflösung. Für Rasterkraftmikroskopie wurden meist festkörperunterstützte Membranen oder sogenannte *tethered membranes* verwendet [8–10]. Die geringe Distanz zwischen Substrat und Membran macht hier die Bestimmung von mechanischen Eigenschaften nur schwer möglich. Messungen an ganzen Zellen mittels Rasterkraftmikroskopie, bestimmen nicht nur mechanische Eigenschaften der Membran, sondern sind stark beeinflusst von dem viskoelastischen Inneren der Zelle [11].

Die Entwicklung der porenüberspannenden Membranen [12–14] ermöglicht die Untersuchung von mechanischen Eigenschaften von Membranen im mikro- bis nanoskopischen Bereich mit rasterkraftmikroskopischen Methoden. Hierbei bestimmen Porosität und Porengröße des Substrates die räumliche Auflösung, mit welcher die mechanischen Parameter untersucht werden können. Hennesthal *et al.* [13, 14] und Steltenkamp *et al.* [15] studierten die elastischen Eigenschaften von Lipiddoppelschichten an porösen Aluminaten mit einem Porenradius zwischen 30 nm und 90 nm. Goncalves *et al.* [16] beschäftigten sich mit der Elastizität von Proteinmembranen auf porösen Siliziumsubstraten mit ähnlichen Porendurchmessern. Xu *et al.* und Yao *et al.* untersuchten in rasterkraftmikroskopischen Studien die Elastizität von freistehenden bakteriellen Membranen [12, 17].

Auch die mechanischen Eigenschaften nichtbiologischer Proben wurden anhand von porenüberspannenden Membranen studiert. Lee *et al.* bestimmten die mikromechanischen Eigenschaften von Graphenmonolagen auf ähnlichen Substraten [18]. Die Eigenschaften von künstlichem Lehm wurden ebenfalls mittels porösen Substraten charakterisiert [19, 20]. Diese Beispiele zeigen, dass porenüberspannende Membranen mittlerweile ein häufig verwendetes Modellsystem für die Bestimmung mechanischer Parameter geworden sind.

Diese Arbeit knüpft an die vorangegangenen Experimente von Hennesthal *et al.* [13, 14] und Steltenkamp *et al.* [15] an. Genutzt wurden neuartige poröse Siliziumsubstrate mit Porenradien von 225 nm bis 600 nm und Porositäten bis zu 30%. Die bisherige Literatur beschäftigt sich wenig mit dem Einfluss des Substrates und den Grenzen des Modellsystems der porenüberspannenden Lipiddoppelschichten zur Nachahmung natürlicher Membranen.

Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit adressiert:

- Wird der Einfluss der Substratoberfläche bei der Untersuchung der Membranmechanik vernachlässigbar sein?
- Inwiefern zeigen die mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen eine Abhängigkeit von der Geometrie des porösen Substrates?
- Welche mechanischen Parameter können durch eine geeignete theoretische Modellierung bestimmt werden?
- Können porenüberspannende künstliche Membranen als Modell für biologische Membranen genutzt werden? Wo liegen die Grenzen der Beschreibung von natürlichen Systemen?

- Ist die Kartierung der mechanischen Eigenschaften von natürlichen Membranen mittels eines porösen Substrates möglich?
- Ist ein Vergleich zwischen porenüberspannenden natürlichen und künstlichen Membranen möglich? Kann so ein Rückschluss auf die mechanischen Eigenschaften der Membran einer Zelle gezogen werden?

Um diese Fragen zu beantworten, sollen die mechanischen Eigenschaften unterschiedlicher porenüberspannender Membranen in Abhängigkeit von der Geometrie, Oberfläche des Substrates und Lipidzusammensetzung der Membran, untersucht werden.

Ein Teilziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zur Kartierung der mechanischen Eigenschaften von freitragenden natürlichen Membranen zu entwickeln.

Es soll der Weg zu einer umfassenden theoretischen Modellierung der lokalen Indentationsexperimente aufgezeigt, und die bestimmenden energetischen Beiträge in der Mechanik von porenüberspannenden Membranen aufgedeckt werden. Ziel der theoretischen Modellierung ist eine Parametrisierung der mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen.

Kapitel 2

Lipide und Membranen

Die kleinsten funktionellen Bausteine von Biomembranen sind Lipide, amphiphile Moleküle mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Sie bilden die zweidimensionale Matrix biologischer Membranen [1], die Lipiddoppelschicht. In natürlichen Systemen ist die Zusammensetzung der Membran sehr heterogen und in den letzten Jahren wurde nach den Aufgaben und Funktionen von mikroskopischen Domänen innerhalb natürlicher Membranen, sogenannter *Rafts*, geforscht [4, 21, 22]. Gängige Modellsysteme um Zellmembranen nachzuahmen sind Vesikel, festkörperunterstützte Membranen oder sogenannte *Black Lipid Membranes*. Hierbei können Eigenschaften von Zellmembranen durch die physikalischen Eigenschaften der Lipide des Modellsystems nachgeahmt werden.

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Lipide vorgestellt, und die Bildung von Lipid-Aggregaten, im speziellen von Lipiddoppelschichten, beschrieben. Es werden typische Modellsysteme, welche natürliche Membranen nachahmen vorgestellt und deren Vor- und Nachteile aufgezeigt. Im Besonderen werden verschiedene Modelle freitragender Membranen, welche im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden, beschrieben.

2.1 Lipide

Lipide sind amphiphile Moleküle, bestehend aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil (Abbildung 2.1). Diese Zwitterstruktur ist die Ursache für die Selbstorganisation zu Aggregaten und vor allem zu der zweidimensionalen Matrix innerhalb von biologischen Systemen. Der hydrophobe Teil eines Lipids besteht aus einer oder mehreren aliphatischen, gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffketten. Die vorwiegende Anzahl von natürlich vorkommenden Lipiden haben zwei aliphatische, ungesättigte Reste mit einer Kettenlänge von jeweils 14-26 Kohlenstoffatomen. Diese aliphatischen Reste sind mit den C₁ und C₂ Atomen eines Glycerins verestert, im Falle von Phospholipiden ein Phosphorsäurerest mit dem C₃. Glycerin und Kopfgruppe, in diesem Fall ein Phosphorsäurerest, bilden den hydrophilen Teil des Lipids. Die Benennung eines Lipids setzt sich aus der Kopfgruppe, der/den Ketten sowie der Verbindung zwischen Kopfgruppe und Ketten zusammen. Für das erste Lipid in Abbildung 2.1 folgt für die Kopfgruppe, *phosphocholin*, der Verbindung zwischen Kopfgruppe und den aliphatischen Resten unter Berücksichtigung der Stereochemie, *sn-3-glycero*, und den Ketten, in diesem Fall zwei, *di*, gesättigte C-16 Ketten, *palmitoyl*, und ergibt folglich den Namen: *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin* oder abgekürzt DPPC. Eine Vielzahl von Kombinationen ist hier möglich, und eine Auswahl von Lipiden, die in der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden, ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Es wurden ausschließlich Lipide mit zwei aliphatischen Resten, bestehend aus *phytanoyl*, *palmitoyl*, und *oleoyl* Ketten, in verschiedenen Kombinationen mit Glycerophosphocholin und Phosphothioethanol Kopfgruppen eingesetzt. Durch die verschiedenen Kombinationen von Kopfgruppe und Ketten haben die

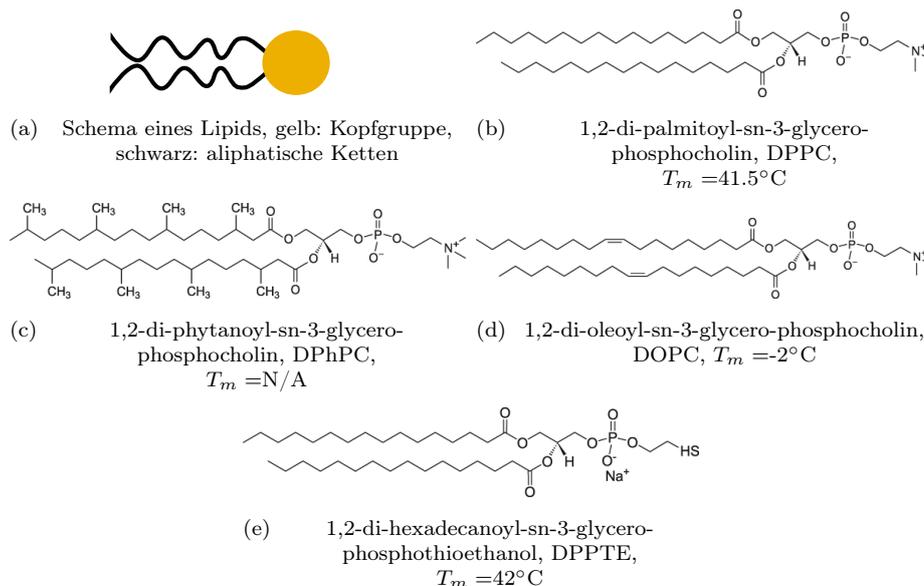


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung und Strukturformeln von verschiedenen Glycerophospho-Lipiden. Die Kopfgruppe ist der hydrophile Teil (gelb) während die Ketten (schwarz) hydrophob sind.

Lipide unterschiedliche Eigenschaften, wie z.B. die Phasenumwandlungstemperatur T_m (s. Abb. 2.1).

Nicht jedes der in Abbildung 2.1 dargestellten, und in dieser Arbeit verwendeten, Lipide ist ein natürlich vorkommendes, DPPC und DPPE werden synthetisch hergestellt. DOPC ist Bestandteil von eukaryotischen Zellmembranen während DPhPC in der Membran von Archae-Bakterien vorkommt. Dem DPhPC wird eine besondere Rolle zugesprochen. Es ist keine Hauptphasenumwandlungstemperatur für dieses Lipid bekannt. Dieser Effekt wird der abweichenden Kettenstruktur mit den seitlichen Methylgruppen zugesprochen.

2.2 Der hydrophobe Effekt

Die treibende Kraft für die Bildung von Aggregaten in wässrigen Lösungen ist der sogenannte *hydrophobe Effekt*. Zusätzliche Effekte wie Van der Waals Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen tragen nur zu einem kleinen Teil bei [23, 24]. Der Ursprung des hydrophoben Effekts ist entropischer Natur. Er ist am einfachsten am Beispiel der Phasenseparation von in Wasser gelösten Kohlenwasserstoffen zu verstehen.

Das Wasser in der Nähe und im Kontakt mit den gelösten Alkanen erfährt eine energetisch ungünstige Umgebung, da es Möglichkeiten verliert Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Das Alkan reduziert die maximal möglichen Wasserstoffbrückenbindungen und damit die Organisation der Wassermoleküle.

Das chemische Potenzial eines Systems von gelösten Kohlenwasserstoffmolekülen in Wasser ist:

$$\mu_w = \mu_w^0 + RT \ln(X_w) + RT \ln(f_w). \quad (2.1)$$

μ_w^0 ist das chemische Potenzial einer unendlichen Verdünnung in Wasser, X_w der Molenbruch des Kohlenwasserstoffs in Wasser und f_w die Aktivität des Alkans im Wasser. In einer einfachen Mischung ist die wässrige Lösung in direktem Kontakt mit dem reinen Alkan. Das chemische Potenzial des Alkans in der wässrigen Phase μ_w^0 ist dann gleich dem chemischen Potenzial des reinen Alkans μ_{HC}^0 . Die Phasenseparation kann dann mit Gleichung 2.2 beschrieben werden

$$\mu_{HC}^0 - \mu_w^0 = RT \ln(X_w) + RT \ln(f_w). \quad (2.2)$$

Experimentelle Daten zeigen, dass die Löslichkeit eines Alkans linear mit der Kettenlänge abnimmt, je zwei Methylgruppen in dem Alkan ändern die Gleichgewichtskonstante um einen Faktor von ca. 10 [23]. Experimentell wurden Energien von 3.9 kJ/mol für Alkane und 6.4 kJ/mol für ω -Alkadiene gefunden. Nimmt man eine halbkugelförmige Kontaktfläche zwischen Alkanen und Wasser an, kann aus diesen Daten eine Grenzflächenspannung γ bestimmt werden, welche bei etwa $\gamma = 3.5 \cdot 10^{-20} \text{ J nm}^{-2}$ liegt und somit vergleichbar mit der Spannung einer Wasser-Öl Grenzfläche, $\gamma_{o/w} = 5 \cdot 10^{-20} \text{ J nm}^{-2}$, ist.

Amphiphile tendieren in Lösung dazu, Aggregate zu bilden, da eine Hydratisierung des hydrophilen Bereichs einen Energiegewinn bringt. Gleichung 2.1 gibt das chemische Potential eines Monomers im Gleichgewicht mit dem Aggregat wieder. Das chemische Potential eines Lipids in einem Aggregat aus m Monomeren ist

$$\mu_{agg,m} = \mu_{agg,m}^0 + \frac{RT}{m} \ln\left(\frac{X_m}{m}\right). \quad (2.3)$$

Nimmt man für die Aggregate $m \rightarrow \infty$ an, erhält man nach [23]

$$\mu_{agg,m}^0 - \mu_w^0 = RT \ln(X_m) + RT \ln(f_w). \quad (2.4)$$

welches identisch mit Gleichung 2.2 für wohl separierte Phasen ist. Die Aggregate von Amphiphilen können also thermodynamisch wie separierte Phasen behandelt werden.

Für amphiphile Moleküle ist eine Trennung in zwei klar separierte Phasen, wie im Falle eines Öls, nicht günstig, da die Hydratisierung des hydrophilen Teils einen Energiegewinn bringt. Es bilden sich in solch einem Fall Aggregate, z.B. Mizellen oder Vesikel, welche die hydrophobe Interaktion zwischen den Amphiphilen beibehalten, aber nach außen durch die hydrophilen Bereiche vom wässrigen Medium abschirmen. Die Aggregatbildung setzt erst ab einer kritischen Konzentration, der sogenannten *critical micelle concentration* (CMC), ein. In Abbildung 2.2 a) ist der Verlauf der Aggregatkonzentration als Funktion der Monomere gezeigt. Die kritische Konzentration kann durch Gleichung 2.4 gefunden werden unter der

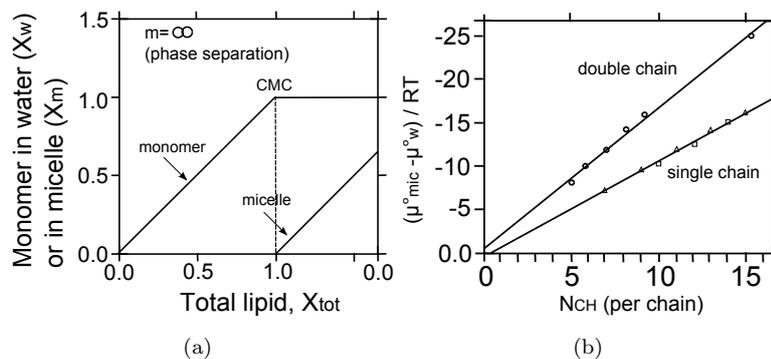


Abbildung 2.2: a) Darstellung der Mizellkonzentration als Funktion der Monomerkonzentration in Lösung. b) Verlauf der freien Energie der Mizellbildung für Phosphocholin-Lipide mit einer bzw. zwei Ketten in Abhängigkeit der Kettenlänge. Die eingezeichneten Geraden sind mit Gl. 2.5 angepasst worden. Quelle: [23].

Annahme großer Aggregate. Die Monomeraktivität wird als Eins angenommen und es folgt

$$\mu_{agg,m}^0 - \mu_w^0 = RT \ln(CMC). \quad (2.5)$$

Abbildung 2.2 b) zeigt, dass das chemische Potenzial der Aggregatbildung eine lineare Funkti-

on der Kettenlänge ist. Die gefundenen Energien für amphiphile Stoffe sind gleich denjenigen für reine Kohlenwasserstoffe gleicher Kettenlänge [23]. Typische Mizellbildungskonzentrationen liegen im Bereich von 10^{-5} mol für Lipide mit einem aliphatischen Rest und 10^{-10} für solche mit zwei Kohlenwasserstoffketten [2].

2.3 Lipidaggregate und Modellsysteme

Die Form des entstehenden Aggregates hängt stark von der Geometrie des Moleküls und damit von molekularen Packungseigenschaften ab.

Das Verhältnis der Fläche der Kopfgruppe a_0 zu dem Volumen ν_c und der Länge der hydrophoben Kette l_c bestimmt die Form des entstehenden Aggregats. In Tabelle 2.1 sind die Verhältnisse der Faktoren den entstehenden Aggregaten zugeordnet. Die in dieser Arbeit

Struktur	geometr. Bedingungen
sphärische Mizelle	$\frac{\nu_c}{l_c a_0} \leq \frac{1}{3}$
zylindrische Mizelle	$\frac{1}{3} \leq \frac{\nu_c}{l_c a_0} \leq \frac{1}{2}$
Lipiddoppelschicht	$\frac{1}{2} \leq \frac{\nu_c}{l_c a_0} \leq 1$

Tabelle 2.1: Tabelle der geometrischen Faktoren. Fläche der Kopfgruppe a_0 , Volumen ν_c der Ketten und Länge der hydrophoben Kette l_c welche die Geometrie des Aggregates beeinflussen und Beispiele für Lipide, welche die angegebenen Strukturen bilden. [2]

verwendeten Lipide bilden Vesikel (s. Abschnitt 3.4), mit deren Hilfe planare Lipiddoppelschichten hergestellt werden können. Innerhalb einer Lipiddoppelschicht stehen drei Kräfte im Gleichgewicht. Die Abstoßung zwischen den Kopfgruppen aufgrund gleicher Ladungen, eine sterische Abstoßung zwischen den aliphatischen Ketten und attraktive Wechselwirkung zwischen den Lipiden an der hydrophilen/hydrophoben Grenzschicht innerhalb einer Lipiddoppelschicht. Im Gleichgewicht entspricht die Summe der repulsiven Kräfte der attraktiven Kraft, so dass eine Lipiddoppelschicht nach außen stets spannungsfrei ist. Experimentell wurde die Spannung in einer Lipidmembran unter anderem von Evans *et al.* durch Mikropipetten Aspirationsexperimente bestimmt. Die Werte der lateralen Spannung in einer Lipiddoppelschicht liegen im Bereich von ungefähr $\sigma_{lat} = 10^{-7}$ N/m [25–27].

2.3.1 Vesikel

Vesikel sind ein oft benutztes Modellsystem für natürliche Membranen. Sie sind einfach herzustellen, bieten zwei Kompartimente die mit unterschiedlichen Medien gefüllt werden können, und die Doppelschichten sind nicht notwendigerweise symmetrisch. Symmetrisch meint in dieser Beziehung, dass die innere und äußere Lipidmonolage die gleiche Zusammensetzung haben.

Man unterscheidet zwischen unilamellaren und multilamellaren Vesikeln (s. Abbildung 2.3). Unilamellare Vesikel bestehen aus genau einer Lipiddoppelschicht. Multilamellare Vesikel hingegen haben mehrere Lipiddoppelschichten, welche durch einen dünnen Wasserfilm voneinander separiert sind. Weiterhin werden Vesikel grob in drei Größen klassifiziert, *small* für

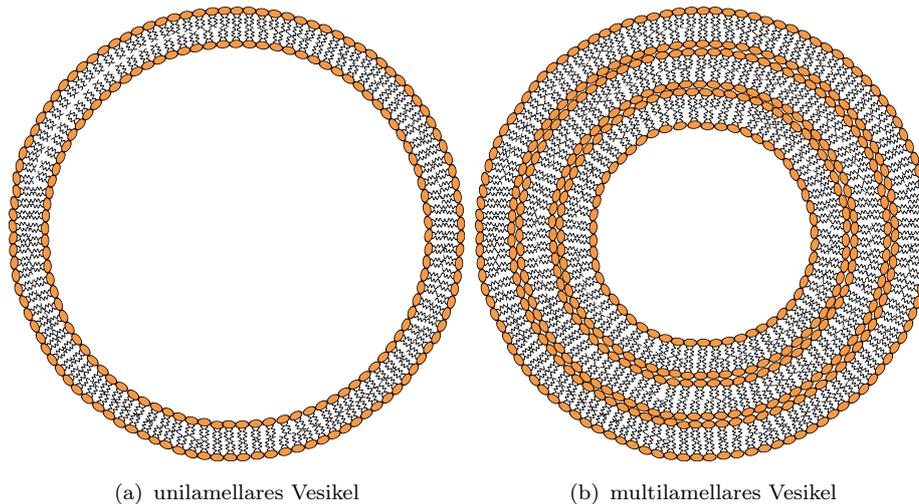


Abbildung 2.3: Gezeigt sind ein unilamellares Vesikel (a) welches genau eine Lipiddoppelschicht enthält, während ein multilamellares Vesikel (b) aus mehreren Doppelschichten aufgebaut ist, die übereinandergestapelt sind.

Vesikel bis zu 50 nm, *large* für Vesikel zwischen 50 nm bis zu wenigen Mikrometern und *giant* für Vesikel mit einem Durchmesser von mehreren Mikrometern. Die Herstellung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs, *large unilamellar vesicles*) und Riesenvesikeln (GUVs, *giant unilamellar vesicles*) wird in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

Mittels Mikropipetten Aspirationsexperimenten an GUVs wurden mechanische Parameter, wie das Biegemodul, das Flächenkompressionsmodul und die Zerreißspannungen für Lipiddoppelschichten, in vielfältigen Zusammensetzungen bestimmt [6, 27–31]. Mit solchen Experimenten wird jedoch über einen großen Bereich der Membran gemittelt.

Um lokale Methoden, wie Rasterkraftmikroskopie, zu benutzen, muss ein Vesikel gut immobilisiert sein. Dies bedeutet, Vesikel werden durch adhäsive Kräfte auf einer Oberfläche lokal fixiert, so dass sie bei Berührung mit der Rastersonde nicht mit bewegt werden. Durch hohe Adhäsionsenergien findet bei Vesikeln auch eine starke Deformationen statt [32], daher ist der Einsatz für lokale Methoden wie Rasterkraftmikroskopie nur bedingt möglich. Ein weiterer Ansatz für Experimente mit einer hohen räumlichen Auflösung sind festkörperunterstützte Membranen.

2.3.2 Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten

Festkörperunterstützte Membranen (*engl.: solid supported membranes, SSM*) sind ein weiteres oft genutztes Modellsystem. Präparativ werden diese häufig durch das „Spreiten“ von Vesikeln erzeugt. Vesikel werden auf planaren Oberflächen adhärirt, aufgrund von hohen Adhäsionskräften kommt es zu sehr starken Krümmungen an den Rändern eines Vesikels, bis das Vesikel zerreißt und eine planare Lipiddoppelschicht bildet. Solche ein festkörperunterstützte Membran ist schematisch in Abbildung 2.4 gezeigt. Als Substrate finden hier-

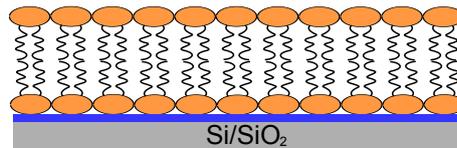


Abbildung 2.4: Schema einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht. Zwischen dem Substrat und der Lipiddoppelschicht befindet sich ein dünner Wasserfilm von etwa 1 nm Dicke.

bei in der Regel möglichst planare, hydrophile Oberflächen mit einer geringen Rauigkeit Anwendung, wie z.B. Si/SiO₂ Wafer oder MICA. Das Modell der festkörperunterstützten Membranen bietet, neben einer hohen Langzeitstabilität, für eine Vielzahl von Methoden, wie z.B. Oberflächensonden- und optische Mikroskopie, ATR-IR Spektroskopie, Quarzmikrowaagetechnik und Impedanzspektroskopie ideale Voraussetzungen [33, 34]. Membran-Protein Wechselwirkungen [35–37] aber auch sehr komplexe Membran-Membran Wechselwirkungen, wie sie z.B. bei Membranfusion [38] vorhanden sind, wurden an festkörperunterstützten Membranen untersucht. Nachteilig an diesem System ist der direkte Kontakt zwischen Membran und Substrat. Wesentliche Eigenschaften wie z.B. die Diffusion der Lipide innerhalb der Lipiddoppelschicht [39–41] oder das Phasenverhalten sind durch den Substrateinfluss stark beeinträchtigt [37]. Studien über transmembrane Proteine sind an festkörperunterstützten Membranen aufgrund der geringen Distanz zwischen Membran und Substrat nicht möglich. Der Einbau von transmembranen Proteinen ist durch die Nähe zu dem Substrat sterisch gehindert.

Sogenannte hybride Lipidmembranen (auch *tethered Membranes* genannt) kombinieren die Möglichkeiten trans-Membrane Proteine in eine Membran einzubringen mit den Vorteilen der festkörperunterstützten Membranen.

2.3.3 Hybride Lipiddoppelschichten - *tethered bilayers*

Hybride Lipiddoppelschichten sind nicht in dem Sinne Lipiddoppelschichten, sondern vielmehr Monoschichten, die auf eine hydrophobe selbstorganisierte Schicht (*engl. Self Assembled Monolayer, SAM*) von sogenannten *Spacern* aufgebracht sind, wie es in Abbildung 2.5 verdeutlicht wird.

Auf dem so modifizierten Substrat wird eine Lipiddoppelschicht präpariert, welche keine

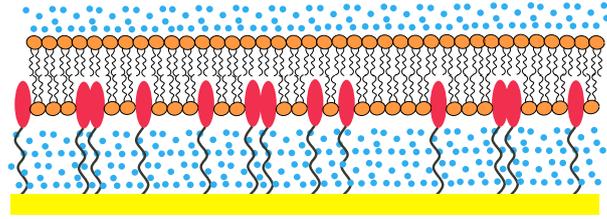


Abbildung 2.5: Eine Lipiddoppelschicht die mittels eines Spacermolekül mit deutlichem Abstand zu dem Substrat hergestellt wird. In unserem Fall kommt Cholesterolpolyethylenoxid (CPEO3) zum Einsatz, welches mittels Thiol/Gold Chemie kovalent auf dem Substrat gebunden wird.

vollständige untere Lipidschicht besitzt. Vielmehr besteht die untere Schicht aus „Lipid-Inseln“ den *Spacerlipiden*, die untere Lipidschicht ist folglich nur rudimentär vorhanden. Die entstehende Lipiddoppelschicht ist aufgrund der langen Polyethylenoxidketten deutlich von dem Substrat abgehoben [9, 10]. Auf diese Weise wird der Einbau von transmembranen Proteinen in eine Lipidmembran ermöglicht. Allerdings bietet auch dieses System keine gute Zugänglichkeit für mechanische Untersuchungen, da der Substrateinfluss immer noch zu groß ist. Der Abstand zwischen Substrat und Membran beträgt nur ein paar Nanometer und die Membran ist durch die *Spacer* an das Substrat gekoppelt. Freitragende Membranen vermeiden ein Substrat gänzlich.

2.3.4 *Black Lipid Membranes*

Das erste System der freitragenden Membranen waren die sogenannten schwarzen Lipidmembranen (*engl. Black Lipid Membrane, BLM*) [42, 43]. Der Name entstammt der Präparationsmethode. Mittels eines feinen Haarpinsels wird in organischen Lösungsmitteln gelöstes Lipid über eine Öffnung gestrichen, welche zwei flüssigkeitsgefüllte Kompartimente voneinander trennt.

Durch Reorganisation der Lipide an der Grenzfläche zwischen organischem Lösungsmittel und wässrigem Medium und durch Ausdünnen des organischen Lösungsmittels wird eine freistehende Lipiddoppelschicht gebildet.

Über der Öffnung findet ein Ausdünnungsprozess statt und das Lösungsmittel zieht sich an den Rand der Apertur zurück. Dabei wird eine freitragende Lipiddoppelschicht gebildet, wie es in Abbildung 2.6 angedeutet ist. Zu Beginn des Ausdünnprozesses erscheint die Lipidschicht bei Beleuchtung mit Weißlicht aufgrund von Reflexion und Interferenzeffekten in allen Farben. Nach dem Ausdünnen tritt bei Beleuchtung destruktive Interferenz an der nur 4-6 nm dicken Lipiddoppelschicht auf, und die Membran erscheint schwarz. *Schwarze Membranen* waren das erste Modell an welchem Transportphänomene und -mechanismen durch eine Lipiddoppelschicht untersucht werden konnten [42, 44–46]. Die Kompartimentierung, sowie der sterisch ungehinderte Einbau von Transmembranproteinen, sind die großen Vorteile dieses Systems. Nachteilig wirkt sich hingegen das verwendete organische Lösungsmittel aus.

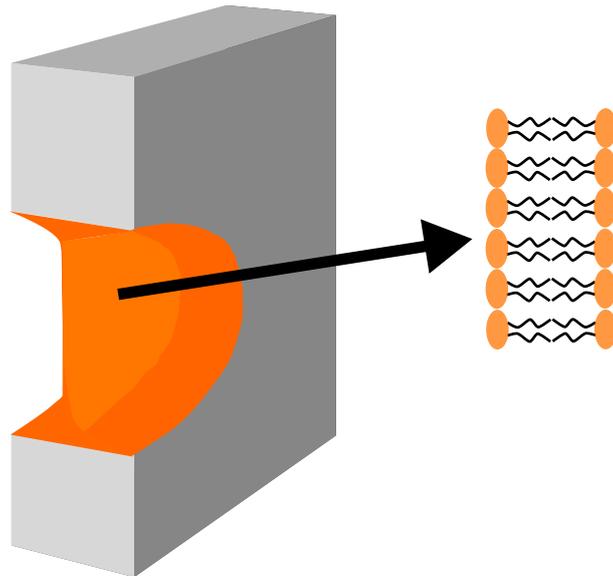


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung einer *Black Lipid Membrane* die, über eine Apertur gespannt, zwei Kompartimente voneinander trennt.

Dieses zieht sich zwar hauptsächlich in die Randbereiche der Membran zurück, jedoch kann ein Einfluss auf die Eigenschaften der freitragenden Membran nicht ausgeschlossen werden. So zeigten Untersuchungen von Hladky *et al.* [47], dass die laterale Spannung von BLMs von dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst wird.

2.4 Porenüberspannende Lipiddoppelschichten

Das Modell der porenüberspannenden Lipiddoppelschichten wurde erstmals von Hennesthal *et al.* in einer rasterkraftmikroskopischen Studie vorgestellt [13]. Für die Studien in dieser Arbeit kombiniert dieses Modell eine hohe Langzeitstabilität mit der Möglichkeit oberflächensensitive Methoden zur Untersuchung von lokalen mechanischen Eigenschaften von freitragenden Membran auf einer submikroskopischen Ebene durchzuführen. Im Allgemeinen nennt man freistehende Membranen auf porösen Substraten nano-BLMs, aufgrund der Ähnlichkeit zu „normalen“ BLMs wobei das Präfix nano (oder auch mikro) die Porengröße bezeichnet. Typischerweise sind mit nano-BLMs freitragende Membranen auf Substraten mit einer regelmäßigen Anordnung von Poren gemeint.

Die freistehende Membran wird hierbei über ein poröses Substrat gespannt, wobei der Porendurchmesser wesentlich geringer ist, als im Falle von BLMs. Außerdem werden zumeist Substrate mit einer regelmäßigen porösen Struktur genutzt. Bisherige Untersuchungen wurden an Poren mit Radien zwischen 30 nm und 15 μm [15, 48] durchgeführt, wobei verschiedenste Materialien, wie z.B. geätzte Aluminium Substrate, Teflon oder auch Silizium Substrate genutzt wurden. Ebenso ist die Geometrie der Aperturen nicht festgelegt, so sind zylindrische Öffnungen, geschlossen [15] oder offen [48–50], aber auch quadratische

Öffnungen möglich [51]. Eine Vielfalt von Untersuchungen wurde und wird an dem System der porenüberspannenden Membranen durchgeführt, sowohl mechanische [16, 52–55] als auch elektrochemische [50, 56, 57]. Hierbei wurden nicht nur biologische Membranen, sondern z.B. auch Membranen aus Graphit [18] und künstlichem Lehm [19] untersucht.

2.4.1 Hybride porenüberspannende Lipiddoppelschichten

Der Aufbau einer freistehenden, hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschicht wird in Abbildung 2.7 dargestellt [53, 58]. Die Substratoberfläche wird durch Aufdampfen einer ultradünnen Schicht Chrom (ca. 2 nm) als Haftvermittler und einer dünnen Schicht Gold (ca. 60 nm) modifiziert. Anschließend werden Oberflächenfunktionalisierungen mittels eines Thiolrestes auf der Goldoberfläche chemisorbiert. Nur innerhalb der Pore ist eine

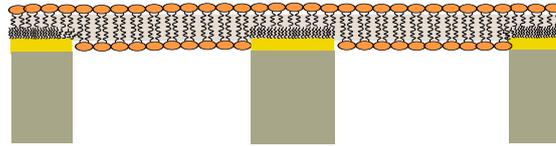


Abbildung 2.7: Schema einer hybriden, porenüberspannenden Membran. Die Funktionalisierung reicht in die Pore entlang der Goldschicht hinein. Die freitragende Lipiddoppelschicht wird erst unterhalb des Porenrandes am Übergang der Goldschicht zu der Chrom/Siliziumdioxidgrenze gebildet.

symmetrische Lipiddoppelschicht vorhanden, auf den Rändern ist die untere Schicht durch die hydrophobe Funktionalisierung modifiziert. *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) Experimente zeigen, dass die obere Lipidmonoschicht mobil und frei auf der Funktionalisierung, sowie in eine Pore hinein und heraus diffundieren kann [39, 51]. Die untere Lipidmonoschicht der überspannenden Membran hingegen hat kein Reservoir an Lipiden auf dem Rand und kann daher nur innerhalb der Pore diffundieren. Dies wurde durch Bleichexperimente und das Löschen der Fluoreszenz der unteren Lipidmonoschicht durch CoCl_2 gezeigt. Die gefundenen Diffusionskoeffizienten von ungefähr $9.5 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ sind etwas höher verglichen mit festkörperunterstützten Membranen ($0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bis $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$) [40, 41, 59].

2.4.2 Unterstützte porenüberspannende Lipiddoppelschichten

Unterstützte, porenüberspannende Membranen zeichnen sich im Gegensatz zu hybriden, porenüberspannenden Membranen durch eine symmetrische Lipiddoppelschicht sowohl innerhalb einer Pore, als auch am Porenrand aus. Die Lipide haben somit die Möglichkeit, uneingeschränkt auf dem Substrat zu diffundieren. Abbildung 2.8 zeigt das Schema einer solchen freitragenden Membran, präpariert auf einem porösen Substrat aus Silizium mit einer dünnen, hydrophilen Schicht aus Siliziumdioxid (ca. 2 nm). Mittels FRAP Experimenten

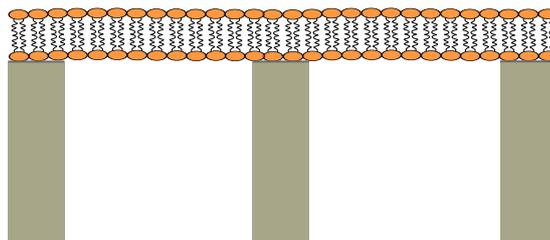


Abbildung 2.8: Eine festkörperunterstützte, porenüberspannende Membran. Eine ununterbrochene Lipiddoppelschicht überspannt sowohl den Porenrand, als auch die Poren. Die Lipide können sich frei über das gesamte Substrat bewegen.

konnte gezeigt werden, dass die Lipide auf dem Substrat diffundieren [39]. Diffusionskoeffizienten von ungefähr $5 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurden für unterstützte, porenüberspannende Membranen bestimmt, diese sind vergleichbar mit denen von festkörperunterstützten Membranen [40, 41, 59].

2.5 Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten

Lipiddoppelschichten weisen einen „thermotropen Polymorphismus“ auf, d.h. in Abhängigkeit der Temperatur verändert sich die Struktur. Die genauen Temperaturen sind von der jeweiligen Lipidzusammensetzung abhängig, und können stark voneinander abweichen. Vier typische Phasen für Lipiddoppelschichten sind in Abbildung 2.9 gezeigt. In niedrigen

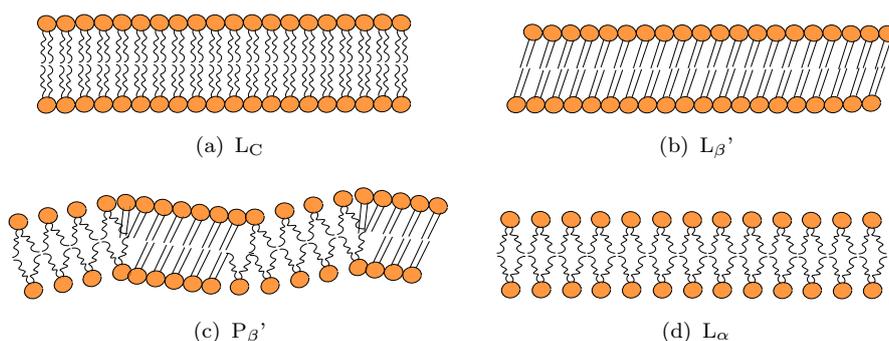


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung vier verschiedener Phasen einer Lipiddoppelschicht: L_C , die lamellar-kristalline Phase, $L_{\beta'}$, die lamellare Gel Phase, $P_{\beta'}$ die *rippled-gel* Phase und L_{α} , die flüssig-kristalline Phase.

Temperaturbereichen liegt eine Lipiddoppelschicht in der „lamellar-kristallinen“ Phase, L_C vor. Die Ketten befinden sich in der all-trans Konformation, sind hoch geordnet und in der Ebene der Lipiddoppelschicht sehr dicht gepackt. Die Orientierung der Ketten ist genau entlang der Normalen der Lipiddoppelschicht. Wird die Temperatur erhöht, gehen die Lipide in die $L_{\beta'}$ Phase über. Hier neigen sich die Ketten gegen die Normale der Membran. Die

Ordnung innerhalb der Doppelschicht, sowie die Dichte der Packung nehmen ab, und der Hydratisierungsgrad der Lipide steigt. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur geht die Lipiddoppelschicht in die P_{β}' Phase über. In dieser Phase gibt es alternierende Bereiche mit hoher und niedriger Ordnung, Packungsdichte und Hydratisierung. Die P_{β}' Phase wird als Vorphasenübergang bezeichnet und tritt nur bei Lipiden mit einer großen Kopfgruppe wie beispielsweise Phosphocholin auf. Übersteigt die Länge der aliphatischen Ketten 24 Kohlenstoffatome, so wird der Vorphasenübergang nicht mehr beobachtet, und es findet ein direkter Übergang in die flüssig-kristalline Phase L_{α} statt. Der Übergang in die L_{α} Phase wird als Hauptphasenübergang bezeichnet. Der Prozess verläuft endotherm und führt zu einer strukturellen Veränderung der Lipide, die Ketten liegen nicht mehr in all-trans Konformation vor, sondern es entstehen gauche-Konformere. Der Platzbedarf der Ketten ist deutlich erhöht, die Packungsdichte der Lipiddoppelschicht daher deutlich geringer und die Ordnung stark reduziert. Die Hydratisierung hat in dieser Phase nochmals zugenommen. Die beiden wichtigsten Phasen sind die lamellare Gel Phase L_{β}' und die flüssig-kristalline Phase L_{α} , welche auch trivialer als Gel- und fluide Phase bezeichnet werden [23].

2.6 Sterole

Sterole sind eine Entwicklung der jüngeren Evolutionsgeschichte, so nimmt man zumindest an, da prokaryotische Zellen keine Spuren von Sterolen zeigen [60]. Das für tierische Zellen wichtigste Sterol ist das Cholesterol (Abbildung 2.10). Sterole sind wie Lipide amphiphil

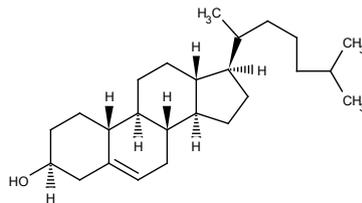


Abbildung 2.10: Die chemische Struktur von Cholesterol. Die Hydroxylgruppe ist der polare Teil, während das Gonangerüst den unpolaren Teil darstellt. Cholesterol hat einen amphiphilen Charakter.

aufgebaut, allerdings liegt einem Sterol als Grundgerüst ein polyzyklischer Kohlenwasserstoff, das Gonan, zu Grunde. Allein bilden sie keine Doppelschichten, fügen sich jedoch, aufgrund ihrer amphiphilen Struktur, gut in bestehende Lipiddoppelschichten ein. Sie wechselwirken dabei sowohl mit dem hydrophilen als auch mit dem hydrophoben Teil. Untersuchungen zeigen den Einfluss des Cholesterols auf das Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten und deren Eigenschaften [28, 61, 62]. Cholesterol lagert sich im Wesentlichen zwischen den hydrophoben Lipidketten an und führt hier zu einer sterischen Hinderung der Lipidketten. Dabei ist bekannt, dass Cholesterol eine sogenannte flüssig-geordnete Phase bildet [63]. Die

flüssig-geordnete Phase zeigt eine geringe laterale Fernordnung und eine hohe Diffusivität, zur gleichen Zeit aber auch einen hohen Grad an Ordnung in den Lipidketten. Diese Phase ist nur in Zusammenhang mit Sterolen bekannt. Sie hat mechanische Eigenschaften einer Gel Phasen Membran bezüglich der Dicke, zeigt aber laterale Diffusionskoeffizienten die vergleichbar mit einer fluiden Membran sind [63, 64].

2.7 Zellmembranen

Modellsysteme, wie die porenüberspannenden Membranen, ahmen Zellmembranen in definierter Umgebung und Zusammensetzung nach. Zellen sind hoch komplexe Systeme und es ist oft nicht möglich Untersuchungen an einzelnen Komponenten durchzuführen.

Lipiddoppelschichten sind ein Hauptbestandteil der Zellmembranen und bilden eine zweidimensionale Matrix, in die weitere Bausteine, wie Proteine oder Sterole eingesetzt werden. Zellmembranen erfüllen eine Vielzahl von Funktionen, wie den Austausch von Stoffen zwischen Zelläußerem und Zellinnerem, Weiterleitung von Signalen und nicht zuletzt den Schutz des Zellinneren. Die mechanischen Eigenschaften von Zellmembranen müssen daher sehr vielfältig sein. Flexibilität ist z.B. für Zellteilung und Endozytose unerlässlich, während die Schutzfunktion eine hohe Stabilität erfordert. Zellmembranen sind sehr heterogene Systeme. Schon allein die Zusammensetzung der Lipide einer Zellmembran kann von Zelltyp zu Zelltyp um bis zu 60% variieren [65]. Abbildung 2.11 verdeutlicht schematisch eine Zellmembran. Dargestellt sind die zweidimensionale Matrix der Lipiddoppelschicht und einige zusätzliche Elemente innerhalb der Zellmembran, wie Proteine und Sterole. 1972

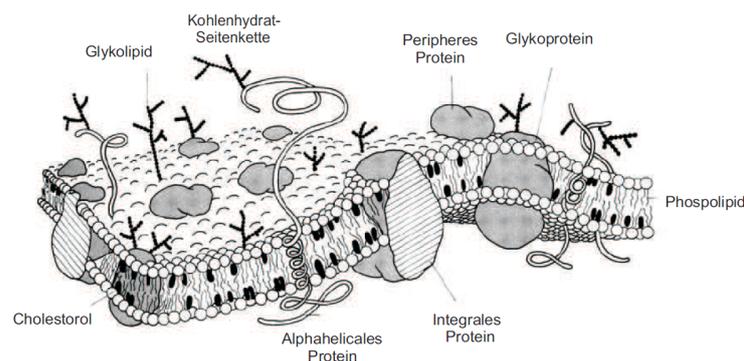


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung einer Zellmembran entsprechend dem fluid Mosaic Modell von Singer und Nicolson. Innerhalb einer fluiden zweidimensionalen Matrix befinden sich Proteine und weitere Bestandteile. Die fluide Matrix ermöglicht dabei eine hohe Beweglichkeit der einzelnen Komponenten. Quelle: [66]

postulierten Singer und Nicolson ein sogenanntes *fluid mosaic* Modell für die Zellmembran [1]. Die Lipiddoppelschicht bildet innerhalb dieses Modells eine Matrix, die es Proteinen und sonstigen weiteren Bausteinen der Zellmembran ermöglicht, sich innerhalb der Membran

frei zu bewegen. Das Modell verdeutlicht sehr gut die Mobilität einzelner Komponenten innerhalb der Zellmembran. Heutzutage weiß man, dass selbst die Lipide innerhalb der Zellmembran keine homogene Mischung bilden, sondern Domänen formen.

Diese heterogene Struktur aus Domänen unterschiedlicher Lipide ist eine Hypothese der sogenannten *Raft*-Theorie [4, 22]. An Modellsystemen wie Vesikeln wurden Mischungen aus Sphingolipiden und Glycerophospholipiden bei der Domänenbildung untersucht. Die eindeutige Zuordnung von Funktionen für solche *Rafts* ist bis heute noch nicht gelungen. Jedoch gibt es durch Anhäufung von bestimmten Rezeptoren in diesen Mikrodomänen [67] zahlreiche Hinweise. Es wird daher schon die Nutzung solcher Rafts in der Krebstherapie untersucht.

Im weiteren Sinne besteht die Zellmembran aus mehr als der Lipiddoppelschicht und den eingebauten Bestandteilen. An der Zellinnenseite ist ein Zytoskelett aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten an Proteinen in der Zellmembran verankert [2]. Dieses Skelett erhöht die Stabilität der Membran wesentlich [2, 7]. Die in dieser Arbeit verwendeten MDCK II Zellen (*Madin Darby Canine Kidney*), bilden zusätzlich zwischen Substrat und Zellmembran eine sogenannte extrazelluläre Matrix. Auf dieser Matrix adhärirt die Zelle. Über sogenannte Integrine wird eine Verbindung zwischen Zellmembran und extrazellulärer Matrix, einem Netzwerk aus Biopolymeren, hergestellt. Hauptsächlich sind an der Bildung der extrazellulären Matrix Kollagen, Fibronectin, Polysaccharide und Laminin beteiligt.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studien wird versucht, durch Analyse der mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden künstlichen und natürlichen Membranen, die mechanischen Eigenschaften beider Systeme zu bestimmen und zu vergleichen. Es wird eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht den Einfluss der Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett auf die mechanischen Eigenschaften der Zellmembran zu beschreiben. Hierzu werden die Modellsysteme für künstliche Membranen, hybride und unterstützte, porenüberspannende Lipiddoppelschichten, genau charakterisiert. Anschließend werden Experimente an porenüberspannenden Zellmembranfragmenten gezeigt und im Kontext mit den Erkenntnissen der artifiziellen Membranen diskutiert. So wird beurteilt in welchen Grenzen nano-BLMs zur Beschreibung der mechanischen Eigenschaften von Zellmembranen geeignet sind.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Rasterkraftmikroskop

Die Entwicklung von Oberflächenrastermethoden begann mit dem Rastertunnelmikroskop, welches 1979 von Binning und Rohrer patentiert, und 1986 mit dem Nobelpreis honoriert wurde. Während der Entwicklung der Rastertunnelmikroskopie entdeckten Binning und Rohrer Kräfte, die auf sehr kurzen Distanzen wirkten. Auf der Suche nach der Nutzbarkeit dieser Kräfte wurde im Jahre 1986 erstmals das Rasterkraftmikroskop (*engl. Atomic Force Microscope, AFM*) von Binning und Quate vorgestellt [68]. Mit dieser Methode blieb die Rastersondenmikroskopie nicht auf leitfähige Proben beschränkt. Das Rasterkraftmikroskop wird bei der Analyse von Kristallgittern und Kristallstrukturen im Ultrahochvakuum, bis hin zu biologischen Systemen, wie z.B. Zellen oder Zellmembranen in in vivo Konditionen [69–75] eingesetzt. Es ist dabei in der Lage, Auflösungen von unter einem Ångström zu erreichen, wobei sich ebenfalls Ausschnitte von mehreren Mikrometern abbilden lassen.

Ferner ermöglicht der Einsatz von kraftspektroskopischen Methoden mechanische Untersuchungen auf nanoskopischen Skalen durchzuführen. Auf diese Weise wurden Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen [76] und Entfaltungsereignisse von Proteinen [34, 77] untersucht. Es wurden auch mechanische Untersuchungen an Zellen und Zellmembranen durch Kraftspektroskopie durchgeführt [11, 12]. Rasterkraftmikroskopie wurde im Lauf der Jahre durch eine Vielzahl von Methoden ergänzt. Es wurden spektroskopische Verfahren zur mechanischen Charakterisierung von Oberflächen entwickelt [78], Methoden zum Erfassen von elektrischen [79–81] und/oder magnetischen [82–85] Eigenschaften mittels des Rasterkraftmikroskops.

In dieser Arbeit wird Rasterkraftmikroskopie eingesetzt, um Oberflächentopographien zu erfassen, und elastische Eigenschaften von freistehenden Membranen zu bestimmen. Hierzu werden abbildende, charakterisierende und eine Kombination beider Verfahren angewendet.

3.1.1 Aufbau

Durch eine Rastersonde, dem *Cantilever*, wird die Topographie einer Oberfläche zeilenweise erfasst. Der *Cantilever* setzt sich zusammen aus der Spitze, welche typischerweise

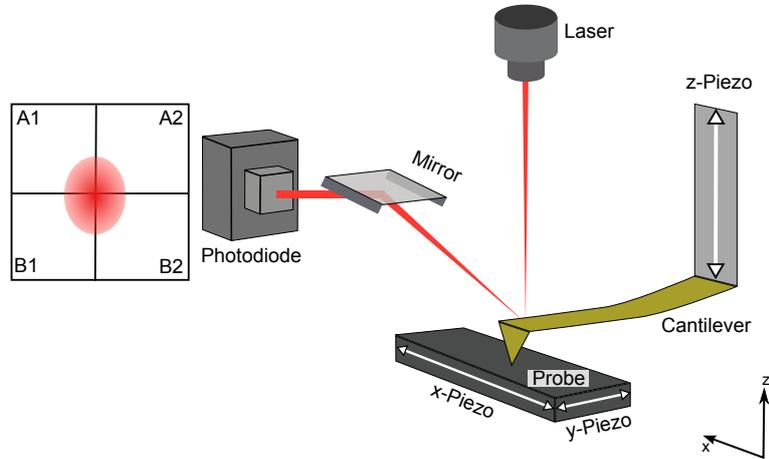


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Die Probe wird von x,y-Piezos relativ zu dem *Cantilever* bewegt. Der Cantilever kann in der z-Achse ebenfalls durch einen Piezo bewegt werden. Die Auslenkung des Cantilevers wird mittels eines Licht-Zeiger-Systems detektiert. Ein Laserstrahl wird auf den Cantilever fokussiert, von diesem reflektiert und auf einer vier-Quadranten Photodiode ausgelesen.

einen Radius zwischen 1 nm und 100 nm hat, und einer Blattfeder, an welcher die SONDENSPIITZE befestigt ist. Die Positionierung der Sonde relativ zu der Probe wird mittels Piezokeramiken in x,y und z-Richtung realisiert. In dem (in dieser Arbeit verwendeten) Rasterkraftmikroskop MFP-3D der Firma Asylum Research wird die Messsonde durch einen Piezo in z-Richtung und die Probe durch x,y-Piezos relativ zur Messsonde bewegt, (s. Abbildung 3.1). Durch Veränderungen der Position des *Cantilevers* auf der Probe erfährt dieser je nach Oberflächenbeschaffenheit unterschiedliche Auslenkungen, welche mit Hilfe eines Licht-Zeiger-Detektionssystems erfasst werden [86, 87], wie es in Abbildung 3.1 gezeigt ist. Ein Laser strahlt auf den Federbalken, wird reflektiert und mittels einer Vier-Quadranten-Photodiode detektiert. Die Photodiode ist in der Lage torsionale und vertikale Auslenkungen des *Cantilevers* zu bestimmen. Die vertikale Auslenkung gibt die topographischen Eigenschaften der Oberfläche wieder, während torsionale Verbiegungen als Reibungs-kontrast bezeichnet werden. Mehr Informationen zu den Messmodi des Rasterkraftmikroskops werden in Abschnitt 3.1.6 präsentiert.

Das Licht-Zeiger-Detektionssystem detektiert die Tangentialsteigung des *Cantilevers* an dem Punkt der Reflexion. Die Blattfeder gehorcht dem Hookschen Gesetz und somit ist die Tangentialsteigung proportional der Kraft, welche auf den Federbalken wirkt. Der Laserpunkt bestrahlt einen Bereich der Photodiode, wie in Abbildung 3.1 gezeigt ist. Es wird auf der Photodiode der Schwerpunkt des Laserpunktes bestimmt, indem die Intensitätsdifferenz

der beiden Photodiodenhälften $I(A)$, $I(B)$ mit der gemessenen Gesamtintensität verglichen wird $\frac{I(A_1+A_2)-I(B_1+B_2)}{I(A_1+A_2)+I(B_1+B_2)}$ [88]. Die Auslenkung des *Cantilevers* wird über einen endlich großen Bereich, der den Laser reflektiert, gemittelt. Aus Untersuchungen ist hervorgegangen, dass die Detektionsgenauigkeit stark an die Größe des laserbestrahlten Bereichs des Federbalkens gebunden ist. Es ist nicht, wie man naiv annehmen würde, günstig einen sehr kleinen Bereich zu bestrahlen, vielmehr ist es wichtig, einen möglichst großen Bereich mit dem Laser zu erfassen, wie Schaeffer *et al.* zeigen [89].

Piezos zeigen bei Veränderung der anliegenden Spannung kein lineares Verhalten. Wird eine Dreiecksspannung an ein Piezomaterial angelegt, so ist die Streckung bei der positiven Spannungsrampe nicht gleich der Kompression auf der absteigenden Flanke. Je größer die Spannungsänderung, d.h. je weiter die Ausdehnung bzw. Kompression des Piezomaterials ist, desto größer wird die Hysterese und die Positionierungsgenauigkeit des Rasterkraftmikroskops sinkt. [90]. Um Einflüsse dieser Hysterese auf die Bildgebung zu vermeiden und eine konstante laterale Geschwindigkeit der Rastersonde zu gewährleisten, finden zwei Systeme Anwendungen. Einerseits wird der Piezo entlang der schnell bewegten Achse nicht exakt mit der gewünschten Bildbreite angesteuert. Es wird ein sogenannter *Overscan* erzeugt, indem der Piezo etwa 10-20% zu weit gefahren wird. Dies hat zur Folge, dass die Nichtlinearitäten beim "Anfahren" des Piezos außerhalb des Bildbereichs stattfinden. Für die langsame Achse eines AFM-Bildes ist keine Korrektur notwendig, da die Abweichung von dem idealen linearen Verhalten, wie bereits oben erwähnt, bei kleinen Abständen vernachlässigbar ist. Das Bild wird mit konstanter Geschwindigkeit aufgenommen. Desweiteren finden sogenannte LVDTs oder Dehnungsmessstreifen ihren Einsatz an den Piezos. Dies sind induktive bzw. kapazitive Sensoren, über welche die Ausdehnung des Piezos bestimmt werden kann [91]. Im Fall von Hysteresen wird der angelegte Strom im Bedarfsfall korrigiert um eine lineare Bewegung des Piezos zu gewährleisten. Solche kompensierende Systeme haben jedoch eine beschränkte Genauigkeit von ca. 0.4 nm.

3.1.2 Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe

Die Kräfte zwischen Spitze und Probe sind sehr kurzreichweitig und vielfältig. Sie setzen sich aus repulsiven Kräften und attraktiven Kräften zusammen. Das wirkliche Wechselwirkungspotenzial ist sehr kompliziert und wurde durch viele Näherungen beschrieben, wie z.B. dem Lennard-Jones-Potenzial oder der Derjaguin Näherung [88].

Das Lennard-Jones-Potenzial für die Wechselwirkung zweier Punkte kann durch Gleichung 3.1 für attraktive und repulsive Kräfte beschrieben werden.

$$V(r) = \frac{\lambda_{2,AB}}{r^{12}} - \frac{\lambda_{AB}}{r^6} \quad (3.1)$$

Die Abstandsabhängigkeiten für die repulsiven Pauli-Wechselwirkungen sind mit r^{-12} und

für attraktive Van der Waals Wechselwirkungen mit r^{-6} beschrieben. Im realen Fall werden Abstandsabhängigkeiten, welche deutlich größer als die in Gleichung 3.1 gezeigten sind, gefunden. Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe wird nur unzureichend durch zwei Punkte beschrieben. Am Beispiel von attraktiven Van der Waals Wechselwirkungen ist dies einfach zu verdeutlichen.

Ausgehend von dem Van der Waals Potenzial zwischen zwei Punkten (Gleichung 3.2)

$$V_{VdW,PP}(r) = -\frac{\lambda_{AB}}{r^6} \quad (3.2)$$

kann durch Integration die Wechselwirkung zweier ausgedehnter Körper mit den Atomdichten ρ_A und ρ_B beschrieben werden.

$$V_{VdW}(r) = \int_{V_A} dV_A \int_{V_B} dV_B \frac{\rho_A \rho_B \lambda_{AB}}{r^6} \quad (3.3)$$

Eine einfache Betrachtung des Potenzials zwischen einem einzelnen Atom und einem unendlichen Halbraum von Atomen führt von Gleichung 3.3 zu Gleichung 3.4

$$V_{VdW}(r) = \lambda_{AB} \int_{V_B} dV_B \frac{\rho_B}{r^6} = \frac{\pi \lambda_{AB} \rho_B}{6r^3}. \quad (3.4)$$

Die Abstandsabhängigkeit hat sich in diesem Fall von r^{-6} auf r^{-3} reduziert. Modelliert man den Sachverhalt durch zwei Kugeln mit den Radien R_1 und R_2 und nimmt ferner an, dass $R_2 \rightarrow \infty$ geht, so findet man Gleichung 3.5

$$V_{VdW}(r) = -\frac{A_H R_1}{6r} \quad (3.5)$$

für die Wechselwirkung zwischen einer Kugel und einer Ebene. $A_H = \pi^2 \lambda_{AB} \rho_A \rho_B$ ist die Hamaker Konstante. Die in Wirklichkeit gefundenen Wechselwirkungen haben folglich wesentlich höhere Reichweiten, als es das einfache Lennard-Jones-Potenzial aus Gleichung 3.1 vermuten lässt.

3.1.3 Kraftauflösung

Die Auslenkung als Funktion der zwischen *Cantilever* und Probe wirkenden Kraft hängt stark von dem geometrischen Aufbau des *Cantilevers* und den verwendeten Materialien ab. Erfährt ein Federbalken eine Kraft, welche ihn vertikal auslenkt (Abb. 3.1), z.B. durch Veränderung der Proben topographie so kann die Auslenkung des *Cantilevers* durch Gleichung 3.6 beschrieben werden [88].

$$Z_c = \frac{4FL^3}{Ewd_c^3} \quad (3.6)$$

F ist die Kraft, die auf das Ende des Balkens entlang der Normalen ausgeübt wird, E ist das Elastizitäts-Modul (Young-Modul) des *Cantilevers*, w die Breite, L die Länge und d_c die Dicke des Balkens. Gleichung 3.6 zeigt, dass die Auslenkung Z_c des Balkens entsprechend dem Hookschen Gesetz proportional der Kraft ist. Sie ist unter Gleichgewichtsbedingungen gültig, d.h. die Bewegungen des *Cantilevers* finden bei Frequenzen deutlich unterhalb der Resonanzfrequenz statt. Typische Resonanzfrequenzen für *Cantilever* mit sehr niedrigen Federkonstanten (z.B. 0.01 N/m) liegen an Luft bei 30 kHz und in Wasser bei 6 kHz. Die Federkonstante k_c eines *Cantilevers* kann aus dessen Geometrie und den verwendeten Materialien errechnet werden. Für einen rechteckigen *Cantilever* erhält man

$$k_c = \frac{F}{Z_c} = \frac{Ewd_c^3}{4L^3}. \quad (3.7)$$

Gleichung 3.7 verdeutlicht, dass ein *Cantilever* lang und dünn sein sollte, um eine niedrige Federkonstante zu gewährleisten. Der Vorteil niedriger Federkonstanten ist eine große Auslenkungen bei kleinen Kräften [88] und folglich eine hohe Kraftauflösung. Idealerweise liegt die Federkonstante des *Cantilevers* in der gleichen Größenordnung wie der zu messenden Probe um die beste Auflösung zu gewährleisten. Je länger ein *Cantilever* jedoch ist, desto mehr Auswirkungen haben viskoelastische Dämpfungen [92].

Die Kraftauflösung eines AFM kann sehr gut durch das Signal-zu-Rauschverhältnis verstanden werden. Es existieren zwei mögliche Ursachen für Rauschen in einem Rasterkraftmikroskop. Das Detektorrauschen und das thermische Rauschen des *Cantilevers*. Detektorrauschen hat nur Auswirkungen bei geringem thermischen Rauschen des *Cantilevers* und folglich bei hohen Federkonstanten bzw. kleinen Dimensionen des Federbalkens [93]. Nach [94] kann das Signal-zu-Rausch Verhältnis für eine AFM Messung in Flüssigkeiten durch

$$SNR = \frac{\frac{F(\nu)}{k}G(\nu)}{\sqrt{\frac{4k_B TRB}{k^2}G^2(\nu) + (Detector\ Noise)^2}} \quad (3.8)$$

beschrieben werden. k_B ist die Boltzmannkonstante, B die Bandbreite, T die Temperatur, $F(\nu)$ die Amplitude einer oszillierenden Kraft bei der Frequenz ν , R eine Dämpfungskonstante für das Medium und $G(\nu) = \nu_0^2 / (\sqrt{\nu_0^2 - \nu^2} + \nu_0^2 \nu^2 / Q^2)$, wobei ν_0^2 die Resonanzfrequenz des *Cantilevers* ist. Generell ist das Detektorrauschen unabhängig von den Eigenschaften des *Cantilevers*, und für kleine Federkonstanten dominiert das thermische Rauschen des *Cantilevers* deutlich das Detektorrauschen. Nimmt man für Gleichung 3.8 $SNR=1$ und kleine k_c an, findet man das Nyquist Kriterium für die kleinste detektierbare Kraft

$$F_{min} = \sqrt{4k_b TRB}. \quad (3.9)$$

Die kleinste detektierbare Kraft wird demnach von der Temperatur T und der viskosen

Dämpfung R bestimmt. Der Einfluss der Dämpfung hängt direkt mit den Dimensionen des *Cantilevers* zusammen, je kleiner der Cantilever, desto niedriger der Einfluss der Dämpfung. Gleichung 3.9 zeigt, dass bei gleicher Federkonstante und konstanter Temperatur der Messung durch kleinere Dimensionen des *Cantilevers* eine höhere Kraftauflösung erreicht wird. Gleichzeitig bedeuten kleinere Dimensionen bei gleicher Federkonstante auch eine höhere Bandbreite bzw. eine höhere Resonanzfrequenz. Folglich wäre, wie schon zu erwarten, der ideale *Cantilever* sehr kurz und hätte trotzdem eine niedrige Federkonstante. Die Auswahl an Materialien für die Fertigung von *Cantilevern* lässt jedoch zurzeit keine Vereinigung von kurzen Balken und niedrigen Federkonstanten zu.

3.1.4 Bestimmung der Federkonstante

Obwohl die Fertigung von *Cantilevern* schon industriell möglich ist, zeigen minimale strukturelle Variationen z.B. in der Dicke oder der Länge des *Cantilevers*, einen großen Einfluss auf die Federkonstante [95, 96]. Es wurden verschiedenste Methoden entwickelt, um die Federkonstante zu messen. So können definierte Massen mit der Spitze aufgenommen werden und die resultierende Auslenkung bestimmt, oder mit Hilfe eines geeichten *Cantilevers* ein ungeeichter vermessen werden. Alle solche Methoden sind jedoch recht aufwändig in der Durchführung und führen schnell zu einer Kontaminierung der Spitze.

Eine heutzutage sehr häufig genutzte Methode ist die Bestimmung der Federkonstante mittels eines thermischen Rauschspektrums, wie von Hutter und Bercherhofer vorgeschlagen. Der *Cantilever* wird hierbei als harmonischer Oszillator angenommen, und die mittlere quadratische Auslenkung wird durch

$$\frac{1}{2}k_c \langle \Delta Z_c^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (3.10)$$

beschrieben [88]. Die Federkonstante des *Cantilevers* wird bestimmt durch:

$$k_c = \frac{k_B T}{\langle \Delta Z_c^2 \rangle} \quad (3.11)$$

Aus der Kenntnis der Resonanzfrequenz, des Q-Faktors und der Geometrie kann nach Sader *et al.* [97] die Federkonstante berechnet werden:

$$k_C = 0.1906 \rho_f w^2 L Q \Gamma_i (Re) \omega_0^2. \quad (3.12)$$

Dabei ist ρ_f die Dichte des umgebenden fluiden Mediums, Γ_i der Imaginärteil der "hydrodynamischen Funktion" (vgl. [97]), ω_0 die Resonanzfrequenz, w die Breite und L die Länge des *Cantilevers*.

3.1.5 Räumliches Auflösungsvermögen

Ein weiterer wichtiger Punkt, neben dem Kraft- und Zeitaufhebungsvermögen, ist das räumliche Auflösungsvermögen eines Rasterkraftmikroskops. Dieses wird entscheidend durch den Spitzenradius bestimmt. Wird die Rastersonde über die Oberfläche geführt und durch die Topographie der Oberfläche ausgelenkt, so wird nicht die tatsächliche Oberflächentopographie dargestellt. Abbildung 3.2 verdeutlicht, dass eine Kombination aus Spitzen- und Proben-topographie dargestellt wird.

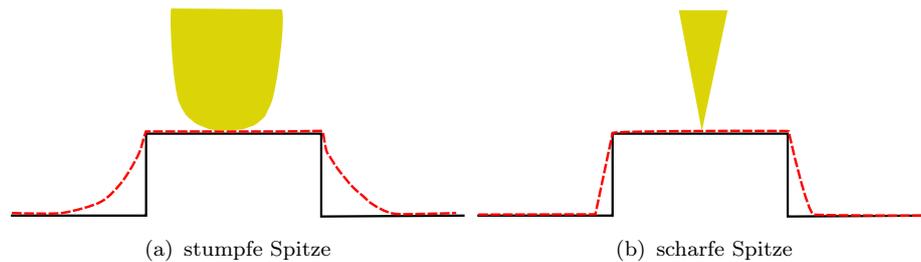


Abbildung 3.2: Schematisch ist der Einfluss der Spitzengeometrie auf das resultierende topographische Bild dargestellt. Die schwarze Linie ist die wirkliche Geometrie der Oberfläche während rot die gemessene Topographie eines Rasterkraftmikroskops zeigt. In a) wurde der Einfluss einer sehr stumpfen AFM-Spitze und in b) der Einfluss einer sehr scharfen Sonde dargestellt.

Sind die zu messenden Strukturen in derselben Größenordnung wie die Sonde, so trägt die Sondengeometrie maßgeblich zu dem Bild und der maximal zu erreichenden Auflösung bei. Dennoch erfordern gerade empfindliche, biologische Proben keine allzu scharfen Spitzen, da der ausgeübte Druck sonst zu einer Zerstörung des Probe führen kann.

3.1.6 Abbildende Modi

Rasterkraftmikroskope haben heutzutage eine Vielfalt von Messmethoden zur Verfügung um Oberflächentopographien und -eigenschaften zu erfassen und bildlich darzustellen. Neben den Möglichkeiten elektrische und magnetische Eigenschaften abzubilden sind für die Erfassung der Topographie zwei Methoden am gebräuchlichsten, der Kontakt Modus und der *intermittent contact* Modus.

Kontakt Modus

Im Kontakt Modus steht die Spitze in ständigem Kontakt mit der Probe. Die Auslenkung wird konstant gehalten durch die Bewegung des z-Piezos. Da nach dem Hookschen Gesetz die Auslenkung direkt proportional der Kraft ist, wird auch von dem *constant force* Betrieb gesprochen. Die Höheninformation wird aus den für eine konstante Auslenkung des *Cantilevers* nötigen Höhenänderungen des z-Piezos gewonnen. Für biologische Proben sind allerdings nicht nur die Kräfte entlang der Normalen der abgerasterten Probe relevant, sondern

ebenfalls die lateral wirkenden Kräfte. Die lateralen Kräfte sind von den Normalkräften entkoppelt und können diese um eine Größenordnung überschreiten [98]. Da im Kontaktmodus Spitze und Probe in dauerndem Kontakt stehen, kann eine Beschädigung der Probe erfolgen. Besonders biologische und weiche Proben sind empfindlich gegenüber lateralen Kräften. So kann es z.B. beim Abbilden von Lipidfilmen bei zu hohen lateralen Kräften zu einem von Gaub et. al. beschrieben „Wasserski“-Effekt [99] kommen. Um die größtmögliche Auflösung zu erreichen ohne die Probe zu beschädigen, ist es nötig, *Cantilever* zu benutzen, deren Federkonstante der des zu vermessenden Systems ähnlich ist [100].

Neben rein topographischen Informationen können aus der torsionalen Verbiegung des *Cantilevers* Informationen über die Reibung zwischen Rastersonde und Probe gewonnen werden, man bezeichnet dies auch als Reibungscontrast.

***Intermittent contact* Modus**

Um laterale Wechselwirkungen zu reduzieren wurden sogenannte dynamische Messmodi entwickelt. Der wohl gebräuchlichste Messmodus eines Rasterkraftmikroskops ist der sogenannte *intermittent contact* Modus. Der *Cantilever* wird mit seiner Resonanzfrequenz angeregt und in eine Schwingung mit konstanter Amplitude versetzt. Anders als im Kontaktmodus wird nicht die Kraft sondern die Amplitude konstant gehalten. Hierzu wird der schwingende *Cantilever* der Probe angenähert und die Amplitude um einen Soll-Betrag, den *setpoint*, gedämpft. Die Regelung des Rasterkraftmikroskops versucht während das Abbildens die Dämpfung der Amplitude konstant zu halten. Der *Cantilever* verlässt während einer Periode die Oberfläche vollkommen und nähert sich ihr wieder an. Er durchläuft dabei weite Bereiche des Wechselwirkungspotenzials zwischen Spitze und Probe.

Der Vorteil dieses Verfahrens ist die geringe Kontaktzeit zwischen Spitze und Probe. Dies reduziert die lateralen Kräfte und vermindert das Risiko der Beschädigung. Neben der Höheninformation kann aus der Phasendifferenz der angeregten und der resultierenden Schwingung eine Information über die Energiedissipation des *Cantilevers* auf der Oberfläche gewonnen werden. Eine genauere Beschreibung dieser Kontaktmechanismen findet sich unter [101–103].

Regelkreise

Im Rahmen von bildgebenden Verfahren muss zwischen „geregelten“ und „ungeregelten“ Modi unterschieden werden. Der Unterschied besteht in der Art, wie topographische Informationen gewonnen werden. In einem geregelten Modus wird ein Parameter, im Kontaktmodus die Auslenkung des *Cantilevers* bzw. Kraft auf die Oberfläche, im *Intermittent contact* Modus die Amplitude des schwingenden *Cantilevers*, über einen Regelkreis konstant gehalten. Dies geschieht indem der Abstand zwischen Rastersonde und Probe, durch Veränderungen der Auslenkung des z-Piezos verändert wird. So folgt die Rastersonde der Topographie und aus den notwendigen Spannungsänderungen des z-Piezos wird die Höheninformation ermittelt.

Regelungen haben endliche Antwortzeiten, wodurch geringe Abweichung in dem zu regelnden Parameter entstehen. Diese Information wird als Fehlerbild dargestellt, Im Kontaktmodus das sogenannte *Deflection* Bild und im *intermitten contact* Modus das Amplituden Bild. In diesen Bildern werden Kanten besonders stark hervorgehoben, sie enthalten daher auch Informationen.

In unregulierten Modi wird die Auslenkung des *Cantilevers* direkt in eine Höheninformation umgesetzt und die Position des z-Piezos konstant gehalten, die Oberfläche wird also nicht mit einer konstanten Kraft abgerastert. In der vorliegenden Arbeit werden nur „geregelte“ Messmethoden angewendet.

Üblicherweise werden in einem Rasterkraftmikroskop drei Regelungen eingesetzt, der Integralregler, der Proportionalregler und der Differentialregler oder zusammengefasst der PID-Regler. Den Reglern wird ein Soll-Wert vorgegeben, der sogenannte *setpoint*. Dieser ist im Kontaktmodus die Auslenkung bzw. Kraft und im *intermitten contact* Modus die Amplitude mit der die Oberfläche abgerastert werden soll. Die Regelelektronik versucht den tatsächlichen Wert des Soll-Wertes über eine Stellgröße, der Spannung an dem z-Piezo und so dem Abstand zwischen Rastersonde und Probe, dem Soll-Wert anzugleichen. Die Kombination aus drei unterschiedlichen Regelungen ermöglicht sowohl eine schnelle, als auch exakte Korrektur des Ist-Wertes.

3.1.7 Kraftabstandskurven

Neben den Möglichkeiten topographische Informationen und einige Materialeigenschaften aus den abbildenden Modi zu erhalten, bieten Kraftabstandskurven Möglichkeiten die mechanischen Eigenschaften einer Probe detailliert zu untersuchen [34, 104]. So können z.B. Elastizitäts-Module von Zellen [11], Prozesse bei der Entfaltung von Polymeren [105] oder Bio-Polymeren [106] gemessen werden.

Um eine Kraftabstandskurve zu messen wird die x,y-Position konstant gehalten und nur der *Cantilever* in z-Richtung durch Anlegen einer Dreiecksspannung bewegt. Detektiert wird dabei das Signal der Photodiode als Funktion der z-Piezobewegung. In Abbildung 3.3 a) ist eine solche Messkurve des Photodiodensignals gegen die z-Piezobewegung gezeigt und in den Abbildungen 3.3 b)-e) verdeutlicht, wie man schrittweise aus diesen Daten eine Kraft-Abstands-Kurve gewinnt. Bei Annäherung der Messspitze an die Oberfläche (blau) erfährt der *Cantilever* zunächst keine Kraft, und die Photodiode liefert ein konstantes Signal (I). Nah an der Oberfläche kommt es zu einer Instabilität, dem sogenannten *snap-on* (II), und die Rastersonde springt in Kontakt mit der Probe (III). Ist der *Cantilever* in Kontakt mit der Probe, steigt das Signal der Photodiode linear mit der Piezoausdehnung an (III). Wird der Piezo zurückgezogen (rot), zeigt sich auf dem Rückweg (IV) das gleiche Verhalten wie auf dem Hinweg (III). Durch adhäsive Kräfte bleibt die Rastersonde auf der Oberfläche haften, wodurch der sogenannte *snap-off* (V) entsteht. Nach der Instabilität

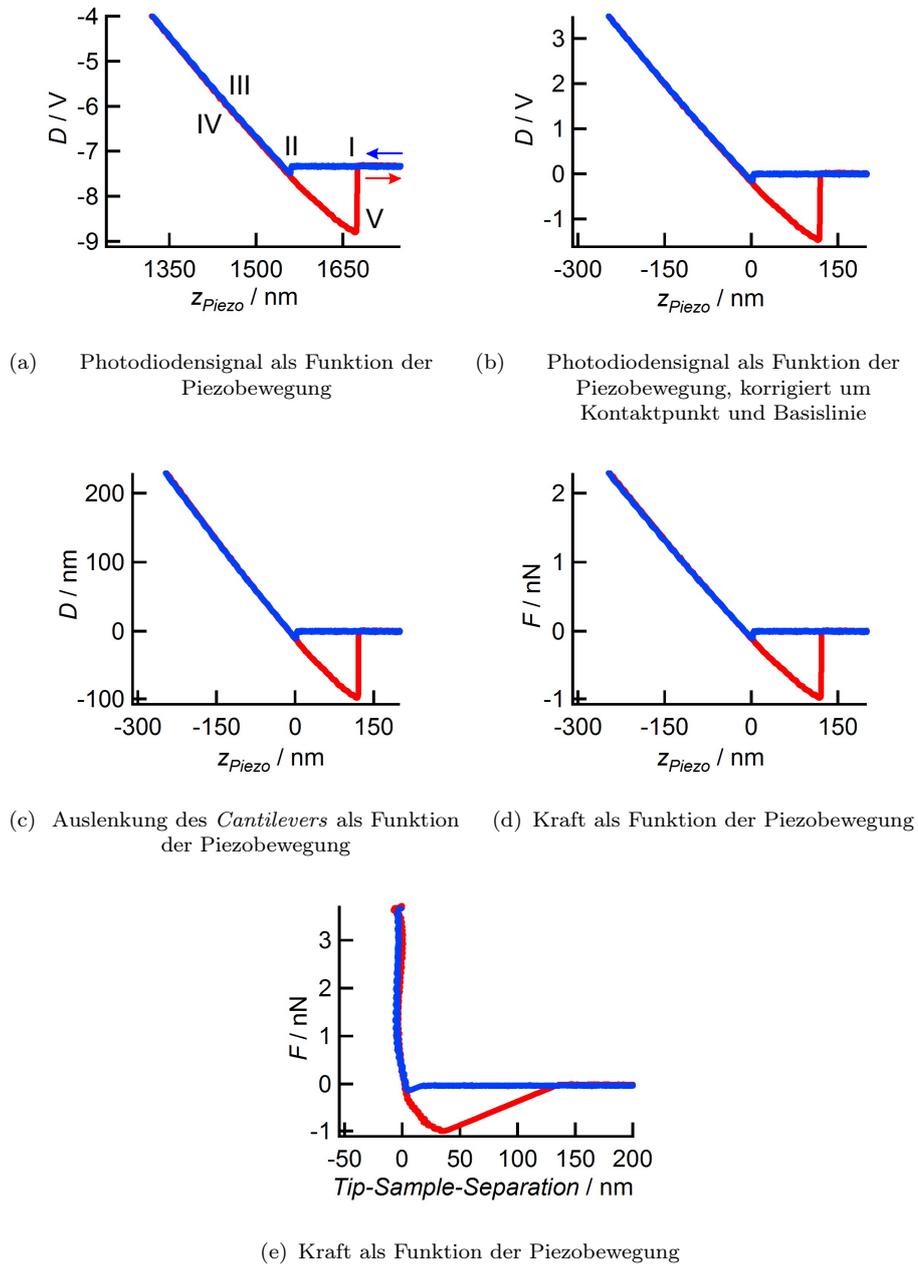


Abbildung 3.3: Von a) nach e) wird die Umrechnung der Messsignale in eine Kraft-Abstands-Kurve dargestellt (Details s. Text).

zeigt die Photodiode wiederum ein konstantes Signal an.

In Abb. 3.3 b) wurde der konstante Strom in den Bereichen I und VI in Abbildung 3.3 a) als Basislinie angenommen. Weiterhin wurde der Kontaktpunkt zwischen Spitze und Oberfläche ebenfalls auf 0 gesetzt, so dass im Kontaktbereich die z-Piezobewegung negative Werte annimmt. Durch Bestimmung der Steigung in a) wird die sogenannten INVOLS oder auch Sensitivität S bestimmt. Die Einheit der Sensitivität wird üblicherweise in $[S] = \text{nm/V}$ angegeben. Sie verbindet die Auslenkung des *Cantilevers* mit den gemessenen Spannungsdifferenzen an der Photodiode. Die entsprechend bearbeiteten Daten sind in Abb. 3.3 c) dargestellt. Die Steigung der Kurve in c) ist -1, da der *Cantilever* auf einem harten Substrat genau um den Weg des z-Piezos ausgelenkt werden muss. Über das Hooksche Gesetz $F = -k_c \cdot z_{\text{Piezo}}$ kann die Auslenkung in eine Kraft umgerechnet werden, sofern die Federkonstante des *Cantilevers* bekannt ist.

Das Problem an dieser Darstellung ist die Kombination der Bewegungen des z-Piezos und der Verbiegung/Bewegung des *Cantilevers*. Einfacher sind solche Kurven zu interpretieren, wenn die Kraft als Funktion des Abstandes zwischen Spitze und Probe dargestellt wird. Hierzu muss die Bewegung des Federbalkens aus den Kurven „herausgerechnet“ werden. Aus einfachen geometrischen Überlegungen kann die Auslenkung des z-Piezos über Gleichung 3.13 mit dem Abstand zwischen Spitze und Probe z und der Auslenkung des *Cantilevers* z_F beschrieben werden.

$$\Delta z_{\text{Piezo}} = \Delta z - \Delta z_F. \quad (3.13)$$

Einsetzen von Gleichung 3.13 in das Hooksche Gesetz führt zu der Beschreibung des auf den *Cantilever* wirkenden Kraftgradienten.

$$\frac{\Delta z_F}{\Delta z_{\text{Piezo}}} = \frac{1}{\frac{k_c}{\frac{\Delta}{\Delta z} F(z)} - 1} \quad (3.14)$$

Annäherungs- und Retraktionskurve zeigen zwei Instabilitäten, den *snap-on* (II) und den *snap-off* (V). Der *Cantilever* durchläuft das Potenzial zwischen Spitze und Probe, dabei wirkt der Kraftgradient $k = \frac{\partial F(z)}{\partial z}$ auf den *Cantilever*. Wird dieser Gradient größer als die Federkonstante des *Cantilevers*, überspringt dieser Teile des Potenzials, wie es auch in Gleichung 3.14 verdeutlicht ist. Durch die Verwendung von hohen Federkonstanten werden die Bereiche, die übersprungen werden, verkleinert - allerdings wird auch die Kraftauflösung verringert.

Für harte Oberflächen gilt, dass die Federkonstante des *Cantilevers* sehr viel kleiner ist als die der Oberfläche, d.h. in Kontakt mit der harten Oberfläche kann die Spitze in diese nicht eindringen, und die Auslenkung des *Cantilevers* folgt ganz dem Hookschen Gesetz $F(d) = k_c \cdot d$. Durch eine lineare Anpassung an den Kontaktbereich, also den Bereich der in Abbildung 3.3 b) kleiner als 0 bezeichnet ist, und den Abzug dieser Gerade von der Kurve,

wird Abbildung 3.3 e) erhalten. Die x-Achse zeigt nun nicht mehr die Bewegung des Piezos, sondern den Abstand zwischen Spitze und Probe. Bei Kontakt zwischen Spitze und Probe ist der Abstand minimal und kann nicht mehr verkleinert werden, folglich muss die Steigung hier unendlich hoch sein.

3.1.8 *Rapid Force Curve Acquisition*

Messmethoden, die Oberflächen charakterisieren und zugleich Topographien wiedergeben sind eine der interessantesten Neuerungen heutiger AFM-Methoden. In dynamischen Messmethoden erhält man Informationen über die Steifigkeiten der Oberfläche durch Auswertung des Phasenbildes, jedoch sind diese Informationen nur in Relation zu den Messungen mit genau dieser Amplitude, Frequenz und Messspitze aussagekräftig. Absolute Werte lassen sich durch den *intermittent contact mode* nur schwer gewinnen.

Punktuelle Messungen in Form von Kraft-Abstands-Kurven geben jedoch sehr genaue und absolute Informationen über die Materialeigenschaften. Es ist daher wünschenswert, die lokale Kraftspektroskopie mit einer topographisch abbildenden Methode zu kombinieren.

Force Volume Modus

Eine sogenannte *Force Map* ist nichts anderes als eine Kartierung der Oberfläche durch ein Raster von Kraft-Abstands-Kurven [107–113]. Eine Kraftabstandskurve wird gemessen, anschließend wird der x,y- Piezo um einen bestimmten Wert bewegt und es wird wieder eine Kraftabstandskurve gemessen. So wird ein vollständiges Raster von Kraftabstandskurven über einen Bereich der Probe erstellt. Aus dem Raster können dann durch Auswertung charakteristischer Eigenschaften der Kraft-Abstands-Kurven Bilder der jeweiligen Information erstellt werden. Exemplarisch ist in Abbildung 3.4 eine topographische Darstellung aus *Force Volume* Messungen im Vergleich mit dem entsprechenden Kontaktmodus Bild gezeigt. Das Raster von Kraft-Abstands-Kurven ermöglicht die Umsetzung einer Vielfalt von Informationen in ein Bild. Steifigkeiten der Oberflächen, Adhäsionskräfte, Ortsaufgelöste Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen, um nur ein paar Beispiele zu nennen, können so bildlich dargestellt und mit absoluten Werten belegt werden. Mehr hierzu findet sich unter [107, 114–116]. Der größte Nachteil des *Force Mappings* sind die sehr langen Zeiten, bis ein Bild aufgenommen wurde. Für ein schlecht aufgelöstes AFM Bild von 64*64 Pixeln mit einer Scanrate für die Kraftkurven von 0.33 Hz (was bei 3 μm z-Hub einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m}/\text{s}$ entspricht und damit in Flüssigkeiten kaum Einfluss durch hydrodynamische Effekte hat) dauert eine Messung ca. 1.5 h. Ein Vorteil liegt in der sehr geringen Kraft, die für die Erzeugung einer Abbildung notwendig ist. Im Gegensatz zu herkömmlichen abbildenden Modi, in denen einige hundert pN für die Erfassung der Topographie notwendig sind, kann aus *Force Volume* Messungen die Topographie bei äußerst geringen Kräften von wenigen Piconewton

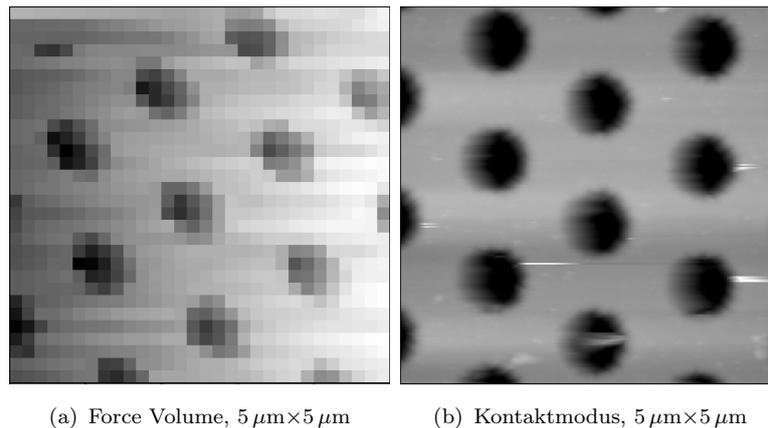


Abbildung 3.4: Der Vergleich topographischer Bilder aufgenommen a) im *Force Volume* Verfahren und b) im Kontaktmodus. Deutlich ist, dass *Force Volume* Messungen ein geringeres Auflösungsvermögen haben, jedoch zu jedem Punkt eine Kraft-Abstands-Kurve abspeichern. Somit können wesentlich mehr Informationen als nur die Topographie der Oberfläche ausgewertet werden.

erfasst werden. Schaeffer *et al.* haben dies anhand der Abbildung von Chromosomen mit unterschiedlichen Messmethoden eines Rasterkraftmikroskops verdeutlicht [117].

3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bedient sich der fluoreszierenden Eigenschaften bestimmter Moleküle, welche in Proben als Markierung eingesetzt werden können. Diese Farbstoffe werden bei einer bestimmten Wellenlänge, λ_{ex} angeregt und emittieren dann Licht einer anderen, kleineren Wellenlänge, λ_{em} .

Der schematische Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Als Lichtquelle werden üblicherweise Neon-Xenon-Lampen verwendet, welche ein breites Spektrum vom UV-Bereich bis in den sichtbaren Bereich emittieren. Über einen Filter werden alle Wellenlängen bis auf die Anregungswellenlänge des Fluorophors herausgefiltert. Die Probe wird bestrahlt und das Licht von der Probe wiederum durch einen Filter gelenkt, welcher nur die emittierte Wellenlänge des Fluorophors durchlässt. Dies ergibt dann ein optisches Bild des Fluoreszenzfarbstoffes in der Probe ohne störende Reflexionen des eingestrahlt Lichtes.

3.3 Präparation poröser Siliziumsubstrate

Vor der Verwendung wurden die Silizium/Siliziumdioxidsubstrate gereinigt und hydrophiliert. Die Substrate wurden hierzu 15 min in 1% Flusssäure-Lösung gereinigt. Hierbei wird die Siliziumdioxidschicht auf den Substraten entfernt. Anschließend wurden die Substrate

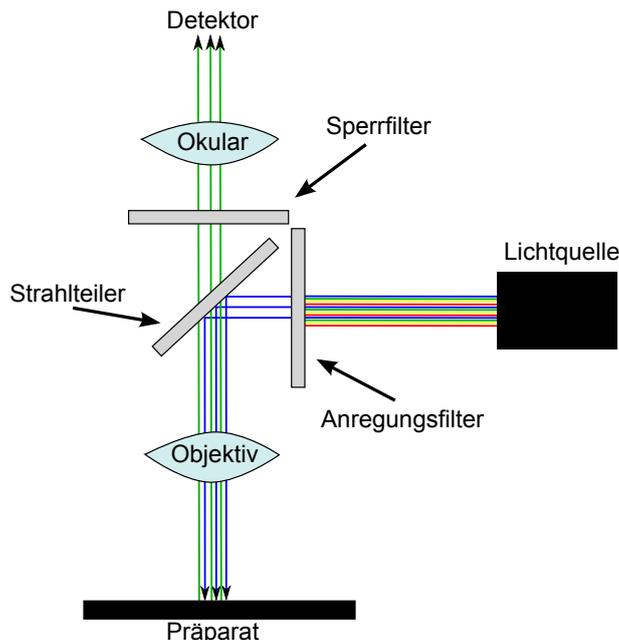


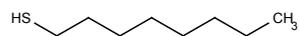
Abbildung 3.5: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

15 min bei 70 °C in einer Mischung von Wasser/33% Ammoniaklösung/Wasserstoffperoxid ($\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3,\text{aq}/\text{H}_2\text{O}_2(5/1/1)$) oxidiert. So entsteht eine neue Siliziumdioxidschicht mit einer Dicke von ungefähr 1-2 nm. Die so hydrophilisierten Substrate wurden entweder direkt benutzt, oder bis zu einer Woche in MilliQ Wasser aufbewahrt. Fanden Sie nicht binnen 12 h nach der Hydrophilisierung Gebrauch, wurden sie vor der Verwendung durch 1 min Sauerstoff-Plasma reaktiviert.

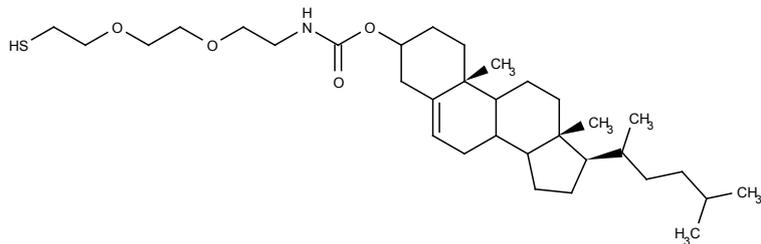
Für die Untersuchung der Eigenschaften sogenannter Hybrid-Systeme wurden die Oberflächen modifiziert. Auf die frisch gereinigten Substrate wurden 3 nm Chrom aufgedampft und 60 nm Gold. Die gereinigten, Gold bedampften Substrate werden durch Thiol-Gold Chemie mit einer Oberflächenfunktionalisierung versehen. Dies ist notwendig für die Präparation der sogenannten „*hybrid pore-spanning membranes*“. Als Oberflächenfunktionalisierung finden in dieser Arbeit Oktanthiol und Cholesterolpholyethylenoxid Verwendung. Die verwendeten Chemikalien sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

3.4 Präparation artifizierlicher Membranen

In dieser Arbeit wurden Modellmembranen einerseits durch das Spreiten von Vesikeln, andererseits durch sogenanntes *Lipid-Painting* hergestellt. Es wurden GUVs mittels *electroformation* hergestellt und auf den verschiedenen Substraten gespreitet. Hybride porenüberspannende Membranen wurden auch durch Auftragen einer geringen Menge von Lipiden, gelöst in einem organischen Lösungsmittel und anschließendem Ausdünnen hergestellt.



(a) Oktanthiol (OT)



(b) Cholesterol-polyethylen-oxid (CPEO3)

Abbildung 3.6: Strukturformeln der verwendeten Chemikalien für die Funktionalisierung von Goldoberflächen mittels Thiol-Gold Wechselwirkung. Oktanthiol (OT) bildet eine dichteste Packung auf einer Goldoberfläche, während das Cholesterol-polyethylen-oxid sehr groß ist und keine dichteste Packung bildet. CPEO3 ist jedoch erheblich länger und wird für sogenannte *tethered Lipidmembranes* (Abschnitt 2.3.3) genutzt.

3.4.1 Herstellung unilamellarer Riesenvesikel

Unilamellare Riesenvesikel wurden mittels *electroforming* präpariert [118]. Aus Lipidmischungen gelöst in Chloroform mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurden Lipidfilme auf ITO-beschichteten Objektträgern präpariert. Den Lipidfilmen wurden fluoreszenzmarkierte Lipide (Bodipy-PC oder Texas-Red-DOPE) in einer Konzentration von 1 mol% zugegeben. Hierzu wurden 25 μ l der Lipidlösung auf die ITO-Plättchen homogen aufgebracht. Die Filme wurden im Vakuum oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der verwendeten Lipide über Nacht getrocknet.

Die ITO-Gläser wurden mittels eines Kupferklebebandes kontaktiert, mit der Dichtungsmasse Hämatokrit wurde ein Kompartiment hergestellt, welches mit MilliQ-Wasser gefüllt wurde. Die so aufgebaute Elektroformationszelle wurde an einen Frequenzgenerator angeschlossen. Zwei Protokolle wurden für die Herstellung der GUVs benutzt:

1. Bei einer Frequenz von 10 Hz wurde eine sinusförmige Spannung von 50 mV auf 1.6 V gesteigert. Hierzu wurde jede Minute die Spannung um 10 mV bis zu einem Wert von 400 mV erhöht. Anschließend wurde bis 1.6 V die Spannung jede Minute um 50 mV erhöht. Nach Erreichen der maximalen Spannung wurde 1.5 h gewartet. Zum Abschluss wurde die Frequenz auf 12 Hz gesteigert und für 10 min eine Rechtecksspannung bei 1.6 V angelegt. Anschließend kann die GUV-Lösung entnommen werden.
2. Bei einer Frequenz von 10 Hz wurde eine Amplitude von 5 V angelegt. Nach 90 min wurde die GUV-Lösung entnommen.

Es konnte zwischen den beiden Protokollen im Rahmen dieser Arbeit kein Unterschied festgestellt werden.

3.4.2 Herstellung hybrider porenüberspannender Membranen

Eine mittlerweile weit verbreitete Klasse von Modelmembranen sind die sogenannten hybriden porenüberspannenden Membranen. Durch den Präfix *hybrid* wird an dieser Stelle angedeutet, dass es sich nicht um „reine“ Lipidmembranen handelt. Zwei Methoden können zur Herstellung dieses Modellsystems verwendet werden: *Lipid-Painting* und Vesikel spreiten.

Lipid Painting

In Anlehnung an die Präparation von BLMs können ebenfalls hybride porenüberspannende Membranen präpariert werden. Das Substrat wird hierfür in 2 ml einer 1:1 Mischung MilliQ-Wasser/Ethanol gegeben. Das Ethanol reduziert die Oberflächenspannung des Wassers und stellt so sicher, dass in den hydrophoben Poren keine Luft eingeschlossen wird. Das Gemisch wird sorgfältig gegen MilliQ-Wasser getauscht, hierbei werden insgesamt 100 ml MilliQ-Wasser gebraucht. Anschließend wird das gewünschte Lipid in einem organischen Lö-

sungsmittel gelöst und mit einem Pinsel ein wenig auf das Substrat gegeben. Durch einen Ausdünnprozess, der in Abbildung 3.7 schematisch gezeigt ist, formt sich eine porenüberspannende Lipiddoppelschicht. Die hierbei verwendeten Lipide sind DPhPC und DPPC.

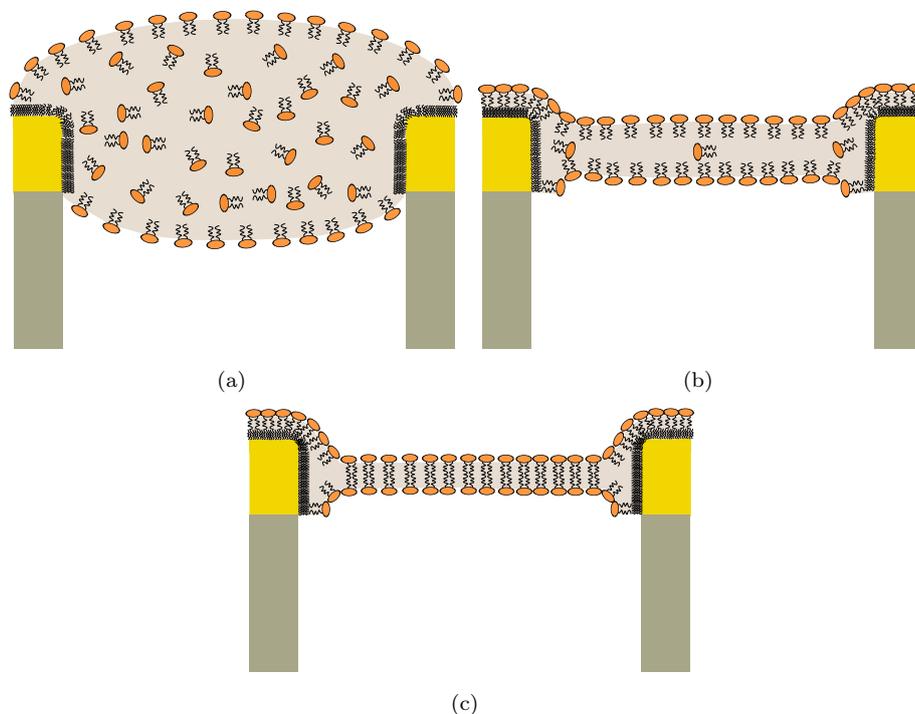


Abbildung 3.7: In a)-c) ist schematisch der Präparation von nano-BLMs mittels *Lipid-Painting* dargestellt. Lipid gelöst in einem organischen Lösungsmittel wird auf das Substrat gegeben (a). Die Lipide orientieren sich an der hydrophil/hydrophoben Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und wässrigem Medium. Das Lösungsmittel dünnt langsam aus (b), bis schließlich eine porenüberspannende Lipiddoppelschicht zurück bleibt (c). Restliches Lösungsmittel bleibt ebenfalls in der Membran zurück.

DPhPC wird mit einer Konzentration von 4 mg/ml in n-Dekan gelöst. Während DPPC mit einer Konzentration von 0.1 mg/ml in einer 2:3 Mischung von Oktan/Dodekan gelöst wird. Den Lipidlösungen wurde ein fluoreszenzmarkiertes Lipid, entweder Bodipy-PC oder Texas-Red-DOPE, mit einer Konzentration von 0.1-1 mol% zugegeben.

Vesikel Spreiten

Eine andere Möglichkeit hybride porenüberspannende Membranen zu erzeugen ist es, Vesikel auf die hydrophobisierte Oberfläche zu geben. Etwa 200 μl einer GU Lösung des gewünschten Lipids wird auf das Substrat gegeben. Die Temperatur wird über die Hauptphasenumwandlungstemperatur des Lipids erhöht. Nach etwa 1 h sind die Vesikel gespreitet und nano-BLMs haben sich geformt.

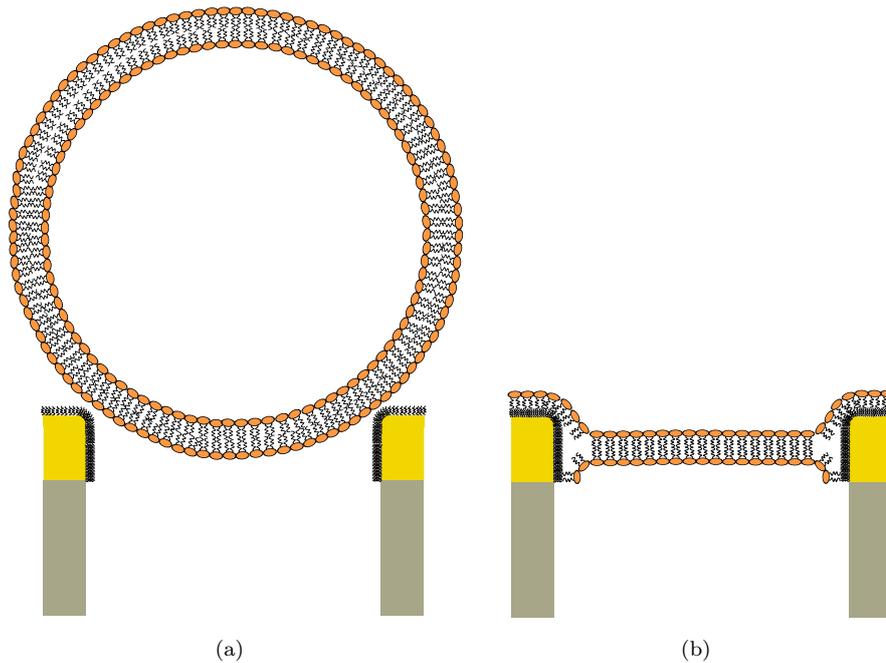


Abbildung 3.8: Hybride porenüberspannende Membranen können ebenfalls durch Spreiten von Vesikeln auf der hydrophoben Oberfläche erzeugt werden. Diese Membranen enthalten keine Lösungsmittelreste, wie es durch *Lipid-Painting* (Abb. 3.7) passiert.

3.4.3 Herstellung unterstützter, porenüberspannender Membranen

Ein Milliliter GUV-Lösung wurde mit einem Milliliter 0.2 M CaCl_2 , 0.2 M NaCl versetzt und auf die hydrophilisierten Substrate gegeben. Die Präparation wurde einige Stunden (mindestens 2) ruhen gelassen, um eine Adhäsion der Vesikel auf der Oberfläche zu bewirken. Anschließend wurde - falls nötig - die Temperatur über die Phasenumwandlungstemperatur des Lipids erhöht, um ein Spreiten zu induzieren. Der Spreitprozess ist nach max. 2 Stunden abgeschlossen. Überschüssige Vesikel in der Lösung und auf der Oberfläche wurden durch vorsichtiges Spülen mit 0.1 M NaCl Lösung entfernt.

3.5 Präparation porenüberspannender Zellmembranen

Basolaterale Zellmembranen wurden auf Substraten der Firma fluXXion mit einem Porenradius von 600 nm präpariert. Die porösen Substrate wurden entweder mit einer 60 nm dicken Goldschicht versehen, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, oder mit einem Film von Poly-D-Lysine beschichtet. Die Zellen wurden auf den porösen Substraten, in Minimal Medium ergänzt mit 10% (v/v) *fetal calf serum* und 2 mM L-Glutamine bei 37°C und 95%Luft und 5% CO_2 gezüchtet. Nach etwa 3 Tagen bedeckt eine konfluente Schicht von Zellen die Oberfläche.

Die Präparation der basolateralen Zellmembran erfolgt nach dem *Lysis-Squirting-Protokoll*

[119] und ist schematisch in Grafik 3.9 gezeigt. Die Zellen werden durch hypotonischen Puffer osmotischem Stress ausgesetzt, welcher zu einem Anschwellen der Zellen führt. Mittels einer Spritze werden, durch Überspülen der Probe in einem 45° Winkel, die geschwollenen Zellen Scherkräften ausgesetzt. Durch diese wird der obere Teil der Zellen abgetrennt und die basolaterale Zellmembran verbleibt auf dem porösen Substrat.

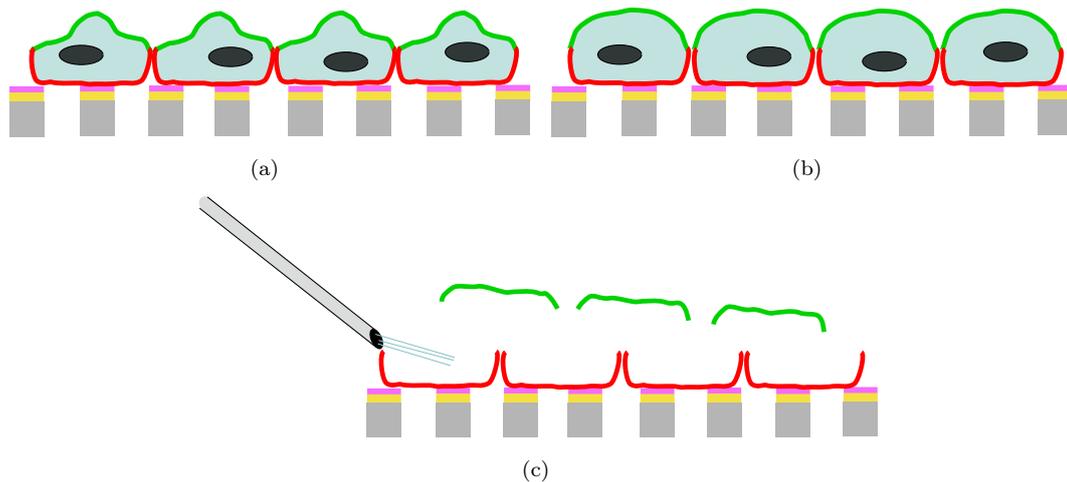


Abbildung 3.9: Präparation basolateraler Zellmembran. Die Zellen werden auf dem porösen Substrat gezüchtet (a). Durch osmotischen Stress schwellen die Zellen an (b). Überspülen der geschwollenen Zellen führt zu Scherkräften, welche den apikalen Teil der Zelle (grün) abtrennen. Basolaterale Membran (rot) verbleibt auf dem Substrat.

Experimente wurden auch an fixierten Zellmembranen durchgeführt. Die Fixierung erfolgt durch 40 minütige Inkubation der Zellmembran mit Paraformaldehyd (4% PFA in Phosphatpuffer). Anschließend wurde die Probe gut mit PBS-Puffer gespült.

Kapitel 4

Ergebnisse und Interpretation - Artifizielle Systeme

In dieser Arbeit werden die mechanischen Eigenschaften verschiedener freistehender Membranen mittels einer Kombination aus rasterkraftmikroskopischen und optischen Methoden untersucht. In dem vorliegenden Kapitel werden die Substrate charakterisiert, die Ergebnisse zu den Elastizitätsmessungen von hybriden, porenüberspannenden Membranen und unterstützten, porenüberspannenden Membranen vorgestellt und diskutiert. An allen Systemen wurden mechanische Untersuchungen durch Indentation in der Mitte einer porenüberspannenden Membran durchgeführt, um die mechanische Antwort der Membran zu messen und mittels einer sogenannten apparenten Federkonstante zu charakterisieren. Der Einfluss der Membranphase, der Substratoberfläche, der Geometrie und des Lösungsmittelgehaltes auf die elastischen Eigenschaften der Membran wird durch die Bestimmung der apparenten Federkonstante quantifiziert, und die Messungen mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Es wird diskutiert, welche Beiträge die elastische Antwort der Membran bei der Indentation beeinflussen.

4.1 Charakterisierung der Substrate

Für die Präparation der beiden Modellsysteme wurden unterschiedliche Substrate genutzt. Je nach Anwendung war eine Modifikation und/oder Funktionalisierung der Oberfläche notwendig, wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit werden Filter der Firma fluXXion als poröse Substrate für porenüberspannende Membranen genutzt. Diese wurden mit einer 60 nm dicken Schicht Gold bedampft und mittels Thiol-Gold Chemie hydrophobisiert (s. Abschnitt 3.3). Unterstützte porenüberspannende Membranen wurden auf speziell mittels Lithographie angefertigten Substraten präpariert, die aus Silizium bestehen. Diese Substrate wurden durch Oxidation der Oberfläche hydrophilisiert (s. Abschnitt 3.3). Die unterschiedlichen Substrate werden mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektronenmikroskopie charakterisiert.

4.1.1 Nano-Siebe der Firma fluXXion

Die Firma fluXXion stellt Siebe für den Braubedarf mit einem Porenradius R_{Pore} von 225 nm, 400 nm, 600 nm und 1000 nm her. Abbildung 4.1 zeigt ein Schema und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Struktur der verwendeten Substrate. Das Substrat ist etwa 1 mm dick und 5 mm × 5 mm breit. Die porösen Bereiche des Substrates, in der Schemazeichnung schwarz dargestellt, sind in 14 etwa 100 μm breite und 10 ca. 300 μm lange Bereiche unterteilt und haben im Gegensatz zum restlichen Chip nur eine Dicke von ca. 1 μm . Deutlich zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen die sehr geringe Substratdicke von ungefähr 1 μm im Bereich der Poren und deren sehr regelmäßige Struktur. Die Porosität der Substrate liegt bei ca. 30% für Poren mit einem Radius von 600 nm bzw. 12% für einen Porenradius von 225 nm, die Oberflächenrauigkeit beträgt etwa ± 1 nm (RMS).

Für die Herstellung hybrider, porenüberspannender Membranen (s. Abbildung 2.7) wurden die porösen Siliziumsubstrate mit einer etwa 60 nm dicken Goldschicht bedampft (s. Abschnitt 3.3). Die Goldschicht hat keinen Einfluss auf die Struktur und im speziellen auf die Porengröße der Substrate, wie durch einen Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen in 4.1 c und d ersichtlich ist.

Die Abgrenzungen der einzelnen porösen Bereiche (s. Abbildung 4.1 a)) ist mittels einer Kamera am AFM deutlich sichtbar und erlaubt die Positionierung der AFM Spitze in einem Bereich mit etwa 10 μm Genauigkeit und damit die Korrelation von AFM Messungen zu Aufsicht Fluoreszenzmikroskopie durch Bestimmung der Positionen anhand der strukturierten Oberfläche des Substrates.

Ein rasterkraftmikroskopisches Bild (4.2 a)) und das Höhenprofil entlang der Linie (4.2 b)) durch eine leere Pore mit einem Radius von 225 nm, aufgenommen im Kontaktmodus bei einer Ladekraft von etwa 2 nN, zeigen im Gegensatz zu den REM Bildern eine endliche Eindringtiefe, sowie eine kegelförmige Struktur der Poren (Abbildung 4.2). Die kegelförmige Struktur einer Pore in einer rasterkraftmikroskopischen Abbildung kommt durch den Einfluss

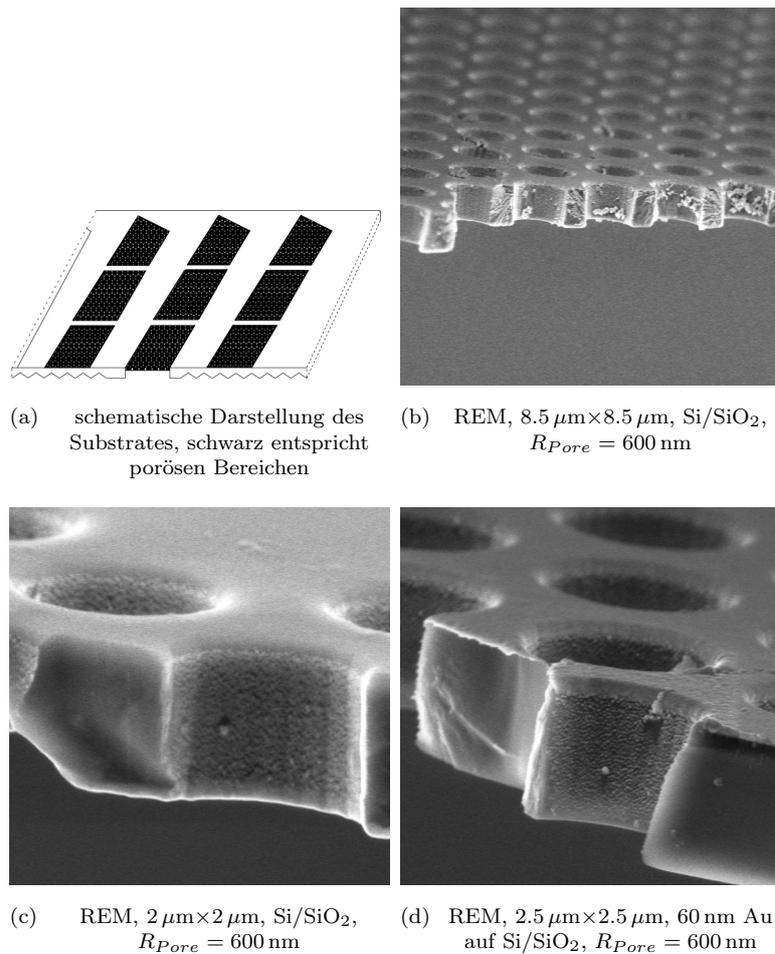


Abbildung 4.1: a) zeigt die schematische Darstellung der verwendeten porösen Substrate. Ein Gitter ergibt sich durch die vertikale und horizontale Unterteilung des Substrates in poröse (schwarze) und nichtporöse Bereiche. b) und c) zeigen REM Aufnahmen der regelmäßigen porösen Struktur des Substrates. Die Poren sind durchgehend auf beiden Seiten geöffnet und haben eine Tiefe von etwa $1 \mu\text{m}$. In d) ist die REM Aufnahme eines porösen Substrates mit einer 60 nm dicken Schicht Gold auf der Oberfläche gezeigt. Das Gold zeigt in der REM Aufnahme einen helleren Materialkontrast.

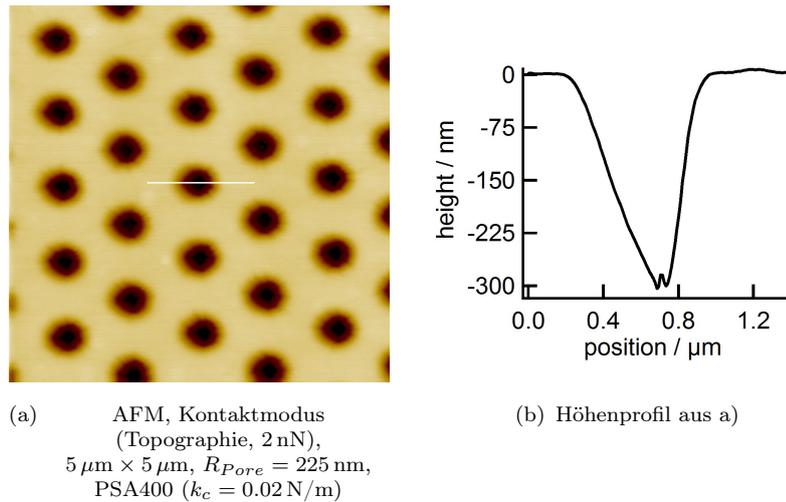


Abbildung 4.2: Gezeigt sind ein topographisches Bild und ein Höhenprofil entlang einer unbedeckten Pore. Deutlich zu sehen ist, dass die Porenwände kegelförmig zusammenlaufen, was im Widerspruch zu Abbildung 4.1 steht. In einem rasterkraftmikroskopischen Bild wird an diesen sprunghaften Höhenveränderungen die Spitzengeometrie der Rastersonde abgebildet.

der Spitzengeometrie zustande, da an einer sprunghaften Änderung der Oberflächentopographie die Spitzengeometrie der Rastersonde, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, abgebildet wird. Durch diese Kombination aus Spitzengeometrie und Probengeometrie wird deutlich, dass die maximale Eindringtiefe der Rastersonde in die Pore mit steigendem Porenradius wächst. Bei den hier verwendeten *Cantilevern* der Firma Veeco (MSCT und DNP-S) ist die Spitzengeometrie, unabhängig von der Biegesteifigkeit des Federbalkens, auf dem die Spitze aufgebracht ist, gleich. In Abbildung 4.3 a) ist eine REM Aufnahme der verwendeten Spitzen mit einem Spitzenradius von etwa 15 nm gezeigt. In Poren mit Radien von 225 nm, 400 nm bzw. 600 nm wurden Eindringtiefen von ca. 400 nm, 500 nm bzw. 650 nm gemessen. Als Geometrie für die Rastersonde kann ein Paraboloid nur bedingt angenommen werden, um die beobachteten Eindringtiefen zu beschreiben [15, 120]. Für den Kontakt zwischen Spitze und Probe ist aufgrund der geringen Kontaktfläche die paraboloidale Spitze eine gerechtfertigte Annahme. Für hohe Eindringtiefen dominiert der Einfluss der pyramidalen Basis die maximale Eindringtiefe in eine leere Pore. Die Seiten der pyramidalen Basis kommen in Kontakt mit den Porenrändern und begrenzen auf diese Weise die Eindringtiefe. Die Schemazeichnung 4.3 b) verdeutlicht den Einfluss der pyramidalen Basis auf die Indentationstiefe. Messungen der maximalen Eindringtiefe ergeben einen Fehler von bis zu $\pm 100 \text{ nm}$ bei *Cantilevern* des gleichen Typs. Dieser Unterschied ist durch kleinste Veränderungen der Spitzengeometrie zu erklären. Fertigungsprozesse für mikroskopisch kleine Systeme zeigen nicht immer die gleiche Qualität.

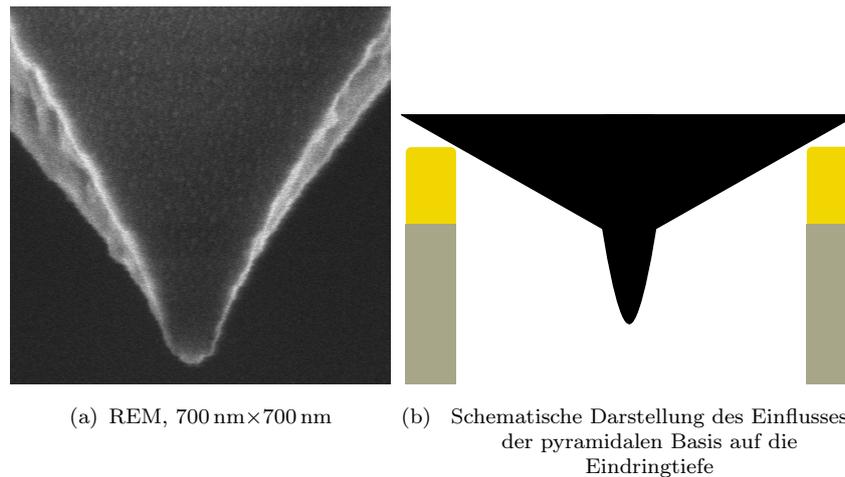


Abbildung 4.3: a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der *Cantilever* Spitze (Veeco, MSCT-C) mit einem Spitzenradius von etwa 15 nm. Die Spitze ist nur über eine Länge von etwa 50 nm paraboloid, im Anschluss dominiert die quadratisch pyramidale Grundfläche. b) Schematische Zeichnung des Einflusses der pyramidalen Basis auf die maximale Eindringtiefe.

4.1.2 Maßgefertigte Substrate

Neben den bereits vorgestellten fluXXion Substraten (Abschnitt 4.1.1) wurden für die Messungen von unterstützten, porenüberspannenden Membranen (s. Abbildung 2.8) spezielle, mittels lithographischer Methoden gefertigte, poröse Substrate genutzt. Diese speziell hergestellten Substrate haben einen Porenradius von 500 nm, sind ebenfalls offen zu beiden Seiten und haben eine wesentlich geringere Porosität von nur 2%. Die geringere Porosität bedeutet bei der Präparation durch Vesikelspreiten (s. Abschnitt 3.4.3) eine größere Adhäsionsfläche und somit eine bessere Bedeckung der Poren. Ein rasterkraftmikroskopisches Bild dieser Substrate ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Unterstützte, porenüberspannende Membranen wurden nicht mit den *Cantilevern* der Firma Veeco vermessen, sondern mit dem Biolever der Firma Olympus, da dieser *Cantilever* sich durch seine extrem niedrige Federkonstante von $k_c = 0.006 \text{ N/m}$ auszeichnet. Diese ist einen Faktor 2 geringer als die MSCT *Cantilever* der Firma Veeco, und nur mit diesen waren Messungen an den empfindlichen unterstützten, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten möglich. Die veränderte Spitzengeometrie (eine Biolever Spitze ist in Abbildung 4.4 c) in einer REM Aufnahme gezeigt) hat Auswirkungen auf die maximale Eindringtiefe. An den Porenrändern sind Abbildungsartefakte zu erkennen, welche durch torsionale Verformung des *Cantilevers* aufgrund lateraler Wechselwirkung der Spitzengeometrie an den Porenrändern verursacht werden. Diese Artefakte sind eine Eigenschaft, die auf die unsymmetrische Spitzengeometrie zurückgeht und ließen sich während der Abbildung nie zur Gänze beseitigen. Aufgrund dieser Artefakte war es nicht möglich die Oberflächen mit hoher Kraft und schnellen Regelungen abzubilden. Daher wird erwartet, dass die Messsonde bei der Abbildung der Topographie nicht die maximale Eindringtiefe in eine Pore erreicht.

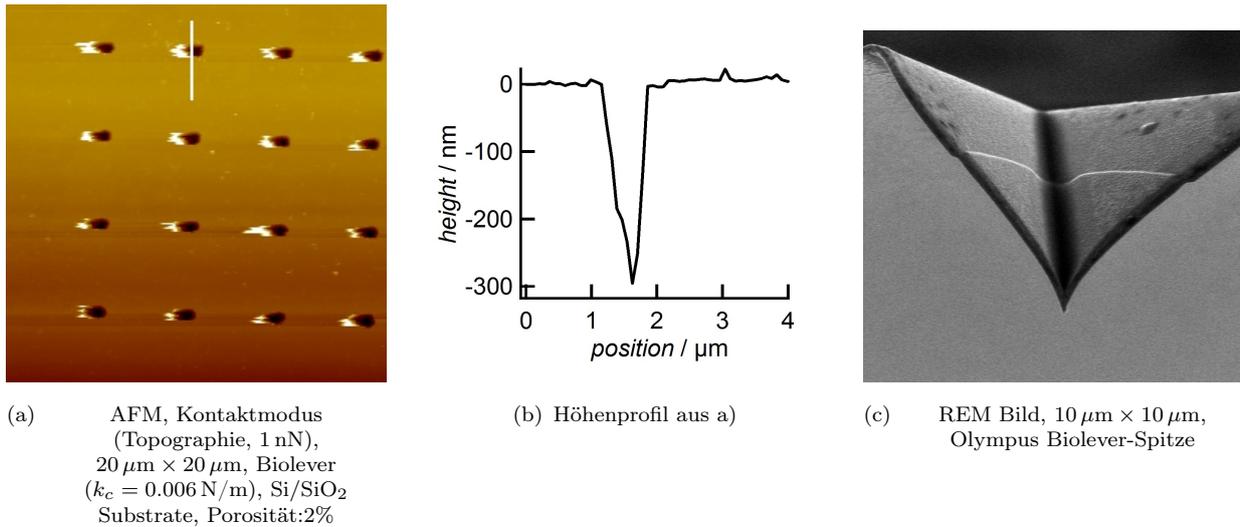


Abbildung 4.4: Charakterisierung der Siliziumsubstrate durch Rasterkraftmikroskopie. Der Durchmesser einer Pore beträgt 500 nm, die Porosität liegt bei nur 2%. Die maximale Eindringtiefe der Spitze eines Biolever beträgt hier ca. 300 nm. Deutlich sind Artefakte während des Abbildens zu erkennen welche durch die unsymmetrische Spitzengeometrie des Biolevers (c) zu erklären ist.

4.2 Hybride porenüberspannende Membranen

Die elastische Antwort von porenüberspannenden Membranen wurde durch Kraft-Indentations-Versuche in der Mitte einer Pore bestimmt. Aus einem Vergleich von verschiedenen Systemen werden die dominierenden Beiträge zu der Elastizität von nano-BLMs bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit werden geometrische (Porenradius, Spitzenradius) und systemische Einflüsse (Lipidzusammensetzung, Phasenverhalten, Oberflächenfunktionalisierung, Lösungsmittelgehalt in der Membran) auf die Biegesteifigkeit von hybriden, porenüberspannenden Membranen quantifiziert. Es wurde mit drei Porenradien gearbeitet, 225 nm, 400 nm und 600 nm, um geometrische Einflüsse auf die Biegesteifigkeit zu beschreiben. Die Geometrie des Indenters wurde in den durch den Herstellungsprozess gesetzten Grenzen durch die Verwendung von Sonden mit gleicher Spitzengeometrie konstant gehalten. Unter systemischen Parametern sind die Eigenschaften der Substratfunktionalisierung sowie der Lipiddoppelschicht zusammengefasst. Um diese Einflüsse zu verstehen, wurde mit Lipiddoppelschichten in verschiedenen Phasen, Mischungen von Lipiden mit Cholesterol und mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen gearbeitet. Zusätzlich wurde der Einfluss des Lösungsmittels, welches in Membranen, die mittels der *Lipid-Painting* Technik hergestellt werden, immer in geringen Mengen vorhanden ist (s. Abschnitt 3.4.2), durch einen Vergleich mit lösungsmittelfreien Membranen beschrieben. Für die Durchführung der Experimente wurden die Präparationen zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft, um Bereiche mit porenüberspannenden Lipiddoppelschichten zu lokalisieren und fluoreszenzmikroskopische Befunde mit rasterkraftmikroskopischen Ergebnissen zu vergleichen.

4.2.1 Korrelation zwischen Fluoreszenz und Topographie

Die Mikrostrukturierung der porösen Substrate der Firma fluXXion, wie sie in Abbildung 4.1 gezeigt ist, eröffnet die Möglichkeit, Rasterkraftmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie an nicht transparenten Substraten miteinander zu kombinieren. Durch die klare Strukturierung der Substrate wurde die Position in der optischen Mikroskopie bestimmt und die Rasterkraftsonde über eine angeschlossene Top-View-Optik an derselben Stelle positioniert. Die Positionierungsgenauigkeit liegt hierbei bei ca. $\pm 10 \mu\text{m}$. Ein solches kombiniertes Experiment ist in Abbildung 4.5 gezeigt. Mittels der *Lipid-Painting* Technik wurde eine porenüberspannende DPhPC Membran, mit 1 mol% BodipyPC fluoreszenzmarkiertem Lipid, auf einem Oktanthiol funktionalisierten Substrat mit einem Porenradius von 400 nm präpariert und durch Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nano-BLMs zeigen, wie in Abbildung 4.5 a) deutlich zu sehen ist, eine starke Fluoreszenz. Die Porenränder hingegen erscheinen schwarz. Dieser Effekt wurde schon von Weiskopf *et al.* [51] schon beschrieben. Bis zu einem Abstand von ca. 12 nm löscht Gold Fluoreszenz, dementsprechend sind die Stege, trotz der fluoreszenzmarkierten Lipidschichten, dunkel.

Ein porenüberspannender, fluoreszenter Bereich wurde ausgewählt (Abbildung 4.5 a)) und innerhalb dieses Bereiches ein rasterkraftmikroskopisches Bild im Kontaktmodus aufgenommen (Abb. 4.5 b)). Während des Abbildens (von oben nach unten) reißen einige Poren, sobald die Rastersonde die Mitte der Pore erreicht. Dies zeigt, dass die Abbildung mittels Rasterkraftmikroskopie durch die benötigte Ladekraft (hier etwa 0.3 nN) während des Abbildens einen Einfluss auf die freistehende Membran hat und diese sogar verformt oder, wie in einigen Poren zu sehen ist, zerstört. Ein weiteres topographisches Bild zeigt charakteristische Muster aus bedeckten und unbedeckten Poren (Abb. 4.5 c)), wobei nicht jede unbedeckte Pore durch Krafteinwirkung der Rastersonde zerstört wurde. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass hybride, porenüberspannende Lipiddoppelschichten, eine endliche Lebensdauer haben und ohne Krafteinwirkung zerreißen [51].

Der Querschnitt (Abb. 4.5 d)) durch eine geöffnete und eine bedeckte Pore in Abb. 4.5 c) verdeutlicht den Unterschied zwischen bedeckten und unbedeckten Poren. Eine bedeckte Pore wird bei einer Ladekraft von ca. 0.3 nN etwa 65 nm indentiert während in einer unbedeckten Pore eine maximale Indentationstiefe von über 450 nm erreicht wird, wie es bei einem Porenradius von 400 nm zu erwarten ist. Die abgebildeten freitragenden Membranen haben ohne Krafteinwirkung nicht die in dem Höhenprofil angedeutete Form. Da das Rasterkraftmikroskop bei der Abbildung der Topographie eine Kraft auf die Oberfläche ausübt, ist vielmehr die Indentation jedes Abschnitts der Membran bei einer Kraft von 0.3 nN abgebildet. Die Indentation ist in der Mitte am leichtesten und bei konstanter Kraft dementsprechend am tiefsten, während zu den Rändern hin die Eindringtiefe bei gleicher Ladekraft sinkt, dies wurde für andere freistehende Lipidsysteme bereits beschrieben [15, 18]. Die Position der Membran relativ zu den Porenstegen kann daher aus rasterkraftmikroskopischen Aufnah-

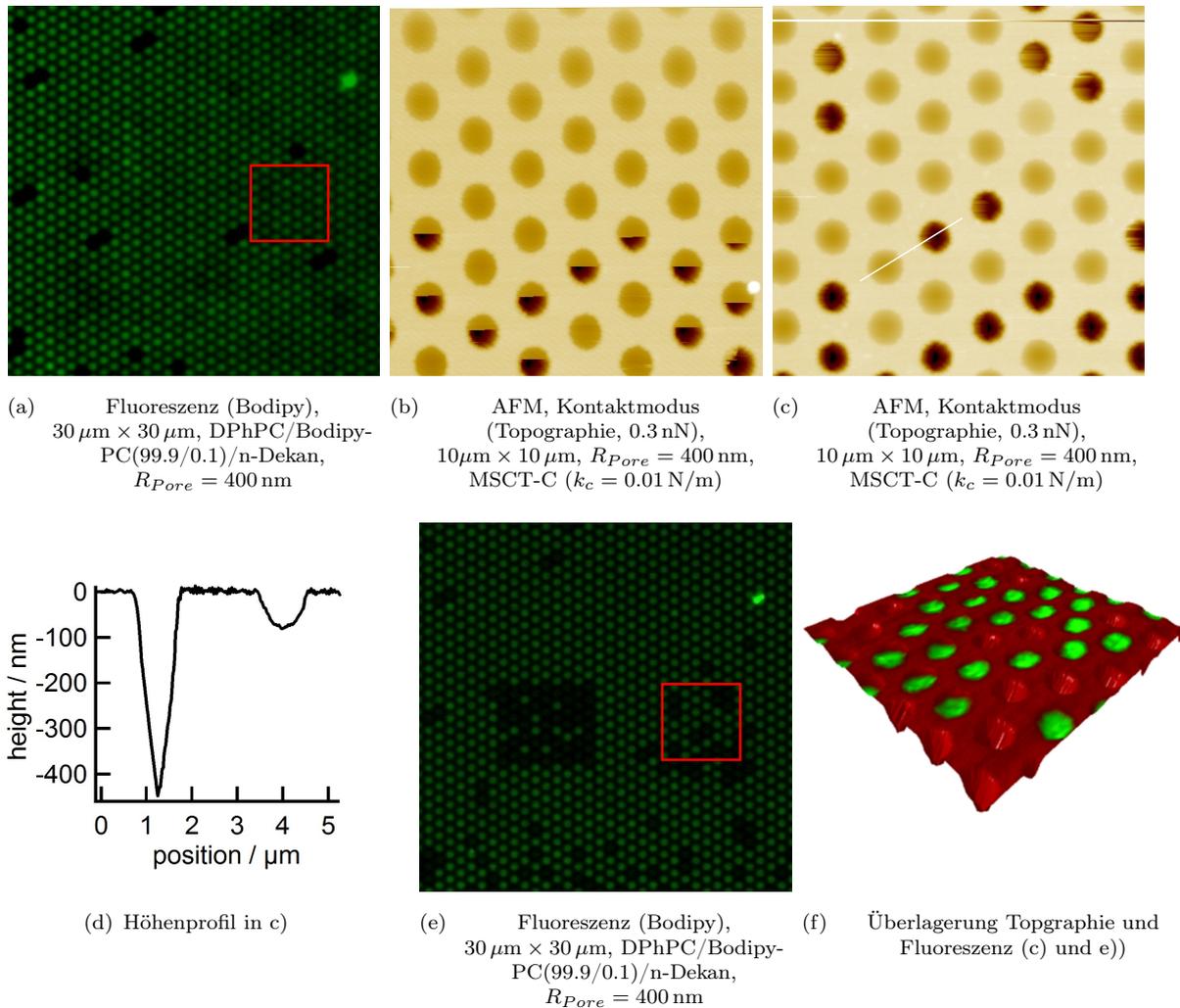


Abbildung 4.5: Darstellung der Korrelation von AFM und Fluoreszenzexperimenten. a) zeigt ein Fluoreszenzbild, vor der Durchführung rasterkraftmikroskopischer Studien in dem markierten Bereich. In b) ist die erste AFM Aufnahme innerhalb des in a) dargestellten Bereichs gezeigt, einige porenüberspannende Membranen reißen durch den Einfluss der AFM-Spitze. c) topographisches Bild nach AFM Studien in diesem Bereich, es sind sowohl geöffnete als auch geschlossene Poren vorhanden. d) zeigt in einem Höhenprofil den Unterschied der Eindringtiefe in eine belegte und eine un belegte Pore. Die porenüberspannende Membran wird nur ca. 65 nm tief eingedrückt. e) eine Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs zeigt eine Übereinstimmung zwischen fluoreszenten/bedeckten und nicht fluoreszenten/unbedeckten Poren. Verdeutlicht wird dies in der Überlagerung beider Bilder in f).

men nicht genau bestimmt werden. Untersuchungen mit einem *Scanning Ion Conductance Microscope* (SICM), welches die Topographie berührungsfrei und mit einer etwas geringeren Auflösung erfassen kann, zeigen ebenfalls, dass nano-BLMs nicht planar zu dem Porenrand gebildet werden, sondern sich unterhalb der Stege formen [58]. Für Abbildungen wurde meist der Kontaktmodus gewählt, zwar sind in diesem Messmodus die lateralen Kräfte höher, doch die Kraft entlang der Normalen ist üblicherweise geringer als im Tapping Modus.

Das Fluoreszenzbild des Bereiches nach den Rasterkraftexperimenten (4.5 e)) weist nun einige Veränderungen verglichen mit den Aufnahmen vor den Experimenten aus Abbildung 4.5 a) auf. Es zeigt sich ein quadratischer Bereich der viele nicht fluoreszente Poren aufweist. Dieser Bereich wurde durch hohe Ladekräfte mit dem AFM freigekratzt um die Orientierung auf dem Substrat zu erleichtern. Neben dem freigekratzen Bereich ist ein weiterer Bereich mit einer Struktur aus nicht fluoreszenten Poren sichtbar (rot markierter Bereich in Abbildung 4.5 e)). Die kombinierte Darstellung von Topographie und Fluoreszenz in Abb. 4.5 f) verdeutlicht das gleiche Muster aus fluoreszenten, bedeckten Poren im Fluoreszenz- bzw. Topographiebild. Porenüberspannende Membranen können demzufolge mittels rasterkraftmikroskopischen Methoden abgebildet werden.

Einige porenüberspannende Membranen reißen, sobald die Rastersonde die Mitte der freistehenden Membran erreicht. Anders als viele Polymere (z.B. Kautschuk) zeigen biologische Membranen wie Lipiddoppelschichten nur eine geringe Toleranz für Flächenvergrößerungen bevor es zu Defekten kommt. Untersuchungen von Needham *et al.* mittels Micropipetten Aspiration an Riesenvesikeln zeigen, dass nur Flächenvergrößerungen von bis zu max. 5% toleriert werden. Oberhalb der kritischen Flächenvergrößerung kommt es zu einer Zerstörung der Lipiddoppelschicht.

4.2.2 Elastische Eigenschaften von hybriden porenüberspannenden Systemen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die elastische Antwort von freitragenden Membranen mittels rasterkraftmikroskopischen Experimenten zu bestimmen. Hierzu wurden Kraftkurven in der Mitte einer Pore aufgenommen und die auf den *Cantilever* wirkende Kraft als Funktion der Eindringtiefe gemessen.

Innerhalb des Höhenbildes (Abbildung 4.6 a)) wurde die AFM-Spitze in der Mitte einer Pore positioniert und Kraft-Abstands-Kurven in einer überspannten Pore und am benachbarten Porenrand (Abb. 4.6b)) aufgenommen. Die Kurve auf dem Porenrand (rot) zeigt das typische Verhalten für harte Substrate wie es bei einer Kraft-Abstands-Kurve auf dem Randbereich zu erwarten ist, die Informationen über die Sensitivität und Kontaktpunkt wurden als Referenz für die Indentationskurve der porenüberspannenden Membran genutzt. Die schwarze Kurve zeigt die elastische Antwort der freistehenden DPhPC Membran

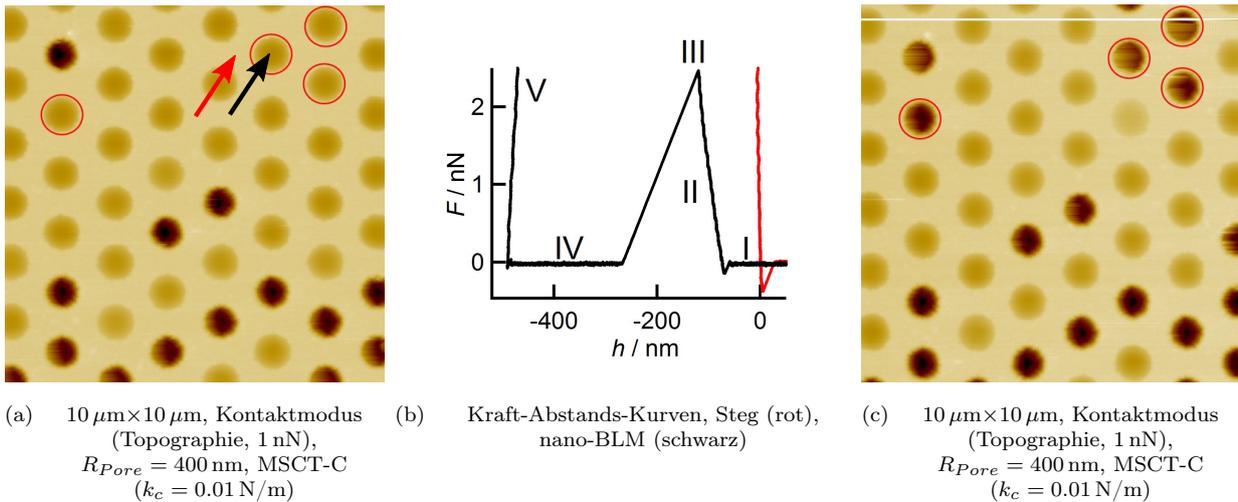


Abbildung 4.6: a) Ein topographisches Bild in dem die *Cantilever*-Spitze in den Mitten der markierten Poren positioniert wurde, um Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen. In (b) ist exemplarisch der Vergleich zwischen einer Kraft-Abstands-Kurve auf dem Porenrand (rot) und der typischen elastischen Antwort einer porenüberspannenden Lipiddoppelschicht (schwarz) gezeigt. Die Spitze kommt erst 60 nm unterhalb des Porenrandes in Kontakt mit der Membran (I), erfährt dann eine mit der Eindringtiefe linear steigende Kraft (II), bis die Membran schließlich reißt (III) und der *Cantilever* keine Kraft mehr erfährt (IV). 470 nm unterhalb des Porenrandes trifft der *Cantilever* auf ein hartes Substrat (V). Als Konsequenz ist in einer anschließenden Abbildung c) die Pore geöffnet.

während der Indentation durch die *Cantilever*-Spitze. Die *Cantilever*-Spitze kommt erst 60 nm unterhalb des Porenrandes in Kontakt mit der Membran (I) wie durch einen Vergleich der roten Kraft-Abstands-Kurve auf dem benachbarten Porenrand mit der schwarzen Kraft-Abstands-Kurve innerhalb der Pore zu ersehen ist. Die Spitze erfährt einen kurzen Bereich mit adhäsiver Wechselwirkung und anschließend wird die Membran in die Pore gedrückt. Hierbei steigt die wirkende Kraft linear mit der Eindringtiefe an (II) bis die Membran reißt (III). Es wirkt keine Kraft mehr auf den *Cantilever* sobald die Membran zerstört ist (IV) und der *Cantilever* die maximale Eindringtiefe von 470 nm erreicht (V). Ein nachfolgendes Höhenbild zeigt, dass die markierte Pore jetzt geöffnet ist, wie es durch das Rissereignis während der Indentation zu erwarten ist.

Der Porenrand wurde für Kraft-Abstands-Kurven als Referenz für den Kontaktpunkt während der Indentation einer freistehenden Membran genutzt. Die topographischen Aufnahmen und die Informationen von SICM Messungen haben schon vermuten lassen, dass die Membran nicht planar über die Poren gespannt ist. Jedoch ist der Vergleich der Kontaktpunkte der Kraft-Abstands-Kurven auf dem Rand und in der Pore eine bessere Methode, da wesentlich geringere Kräfte (ungefähr 5 pN) detektiert werden können. Dies führt zu einer wesentlich höheren Auflösung der Höheninformation, da die Oberfläche weniger deformiert wird. In abbildenden Modi werden mit dem AFM Kräfte von mehreren

hundert Pikonewton benötigt, was bei biologischen Proben zu einer Deformation und somit zu einer verfälschten Topographie führt [78].

Der Kontakt zwischen Spitze und Probe entspricht innerhalb einer Pore nicht dem typischen Verhalten für den Kontakt mit einem sehr harten Substrat. Vergleicht man die Steigungen der Kraftkurve auf dem Rand (rot) mit der Steigung der Kurve in der Pore, wenn der *Cantilever* in Kontakt mit dem Substrat ist (schwarz, V), so stellt man fest, dass in der Pore eine positive Steigung vorhanden ist. Folglich müsste das Substrat an dieser Stelle härter sein als auf den Stegen, obwohl in beiden Fällen die aufgedampfte Goldschicht berührt wird. Die Ursache für dieses Phänomen ist in der Schemazeichnung 4.3 verdeutlicht.

Der *Cantilever* kommt nicht mit der Spitze, sondern mit den Seiten der pyramidalen Spitze in Kontakt mit dem Substrat. Hierdurch wird die gemessene Kurve im Kontaktbereich nicht vorhersagbar. Zwei mögliche Annahmen die für die Deformation des Federbalkens gemacht werden können sind:

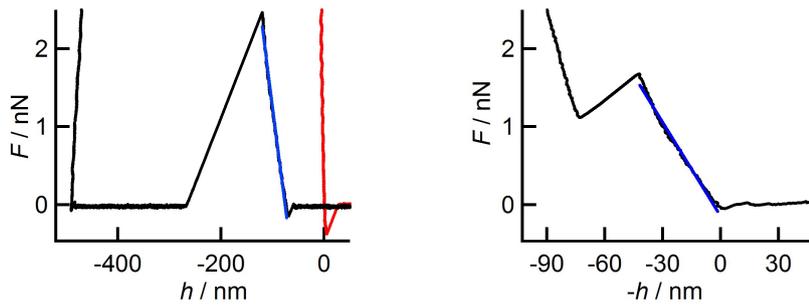
1. Durch den seitlichen Kontakt zwischen pyramidaler Basis und Probe, kann die effektive Länge des *Cantilevers* verlängert oder verkürzt werden. Die Federkonstante eines *Cantilevers* ist antiproportional der Länge des Balkens in der dritten Potenz (Gleichung 3.6), $k_c \propto \frac{1}{l_{c,eff}^3}$. Ist $l_{c,eff} < l_c$ wird die effektive Federkonstante größer $k_{c,eff} > k_c$, während bei $l_{c,eff} > l_c$ die effektive Federkonstante sinkt $k_{c,eff} < k_c$.
2. Durch den seitlichen Kontakt kann es zu einem buckeln, einer bogenförmigen Deformation des Federbalkens kommen. Dies kann mittels der Detektionstechnik des Rasterkraftmikroskops nicht richtig erfasst werden und die Daten nach dem Kontakt zwischen *Cantilever* und Porenrand sind aussagegelos.

Kraft-Abstands-Kurven auf den Porenrändern müssen aus diesen Gründen als Referenz für die Sensitivität genutzt werden. So ist es möglich die Messdaten der Indentation einer porenüberspannenden Membran korrekt in eine Kraft-Abstands-Kurve zu überführen (s. Kapitel 3.1.7). Weiterhin kann, durch einen Vergleich der Kontaktpunkt auf dem Rand und der porenüberspannenden Membran, eine zusätzliche topographische Information gewonnen werden.

Um die Elastizität von freistehenden Membranen zu quantifizieren, wird die Steigung

$$k_{app} = \frac{\Delta F}{\Delta h} \quad (4.1)$$

im Bereich der Membran-Indentation bestimmt. Eine entsprechende lineare Anpassung an Messkurven ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Diese Steigung wird im Folgenden nach Gleichung 4.1 als apparente Federkonstante bezeichnet. Wie die lineare Funktion (blau) im Vergleich



(a) DPhPC/Bodipy-PC(99.9/0.1)/n-Dekan, OT, $R_{Pore} = 400$ nm, Steg (rot), nano-BLM (schwarz), $k_{app} = 42$ mN/m (blau), MSCT-C ($k_c = 0.01$ N/m)

(b) DPhPC/Bodipy-PC(99.9/0.1)/n-Dekan, CPEO3, $R_{Pore} = 400$ nm, $k_{app} = 38$ mN/m (blau), MSCT-C ($k_c = 0.01$ N/m)

Abbildung 4.7: Bestimmung der apparenten Federkonstante aus den Steigungen der Kraftkurven. a) zeigt die Kraft-Abstands-Kurve im Vergleich zum Porenrand, die Bestimmung der apparenten Federkonstante kann über den gesamten Indentationsbereich erfolgen. b) zeigt eine Indentations-Kurve, es ist kein Vergleich zum Rand gegeben und der Kontakt zwischen Membran und *Cantilever*-Spitze wurde als Nullpunkt gesetzt. Die apparente Federkonstante kann in dieser Kurve nicht über den gesamten Bereich erfolgen, da nach etwa 40 nm eine Instabilität zu sehen ist, welche die Membran allerdings nicht zerstört.

mit der Messkurve (schwarz) zeigt, ist deutlich zu erkennen, dass mit der Eindringtiefe die Kraft linear wächst. In Abbildung 4.7 a) ist eine Kraftkurve auf einer porenüberspannenden Membran im Vergleich zum Porenrand gezeigt. Hier wurde über den gesamten Indentationsbereich die apparente Federkonstante bestimmt. In b) ist nur das Indentationsereignis in einer Kraft-Indentations-Kurve dargestellt. In diesem Fall wurde als Nullpunkt der Kontakt zwischen Spitze und Lipiddoppelschicht gewählt. Für die Umrechnung der Messdaten in Kraft und Abstand zwischen Spitze und Probe wurde dennoch eine Kurve vom Porenrand als Vergleich genutzt. In der Kraft-Indentations-Kurve in b) ist bei einer Indentation von etwa 40 nm eine Instabilität zu erkennen. Die Kraft auf den *Cantilever* wird plötzlich geringer und erst nach einigen Nanometern Eindringtiefe steigt sie wieder an. In diesem Fall wird die Membran nicht zerstört, da später ein weiterer Anstieg detektiert wird und noch nicht die maximale Eindringtiefe der *Cantilever*-Spitze in die Pore erreicht ist. Die Spitze bricht also nur zu Teilen durch die Membran. Die Bestimmung der apparenten Federkonstante ist jedoch nur bis zu der ersten Instabilität möglich, da die Indentergeometrie nach dem Durchbruchereignis stark verändert ist und durch den partiellen Durchbruch der Spitze zusätzliche oder ganz andere Beiträge zu den Rückstellkräften zustande kommen könnten. Mögliche Ereignisse während des Indentationsvorgangs sind in Grafik 4.8 noch einmal schematisch dargestellt. Abbildung 4.8 a) zeigt eine nano-BLM, etwas unterhalb des Porenrandes, wie bereits aus topographischen Informationen geschlossen wurde. Die Rastersonden-Spitze nähert sich der freitragenden Membran, indentiert diese (b)) bis es schließlich zu einem Riss der Membran (c,d)) oder einem teilweisen Durchbruch der

Rastersonde (e, f)) kommt. Die vollkommene Zerstörung einer Lipiddoppelschicht ist z.B.

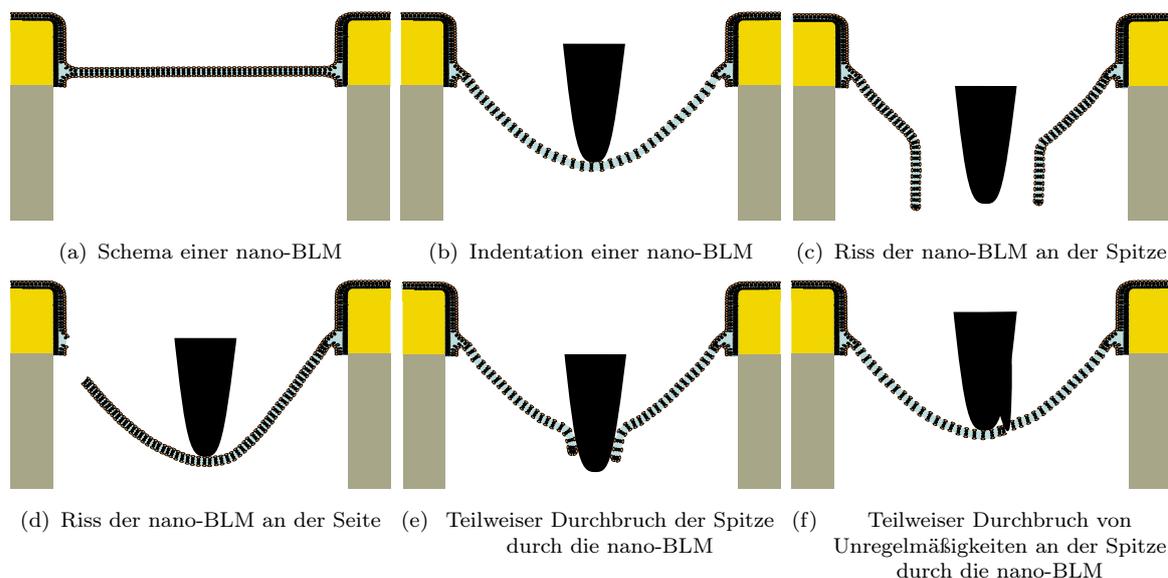


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung von hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, dem Indentationsvorgang und der möglichen Interpretation von Rissereignissen in Kraft-Indentations-Experimenten. Gezeigt sind: (a) nano-BLM ohne Einwirkung des Indenters, die Indentation (b) und verschiedene mögliche Szenarien die zur Zerstörung (c) und d)) oder teilweisen Zerstörung (e) und f)) führen.

in Abbildung 4.6 b) gezeigt, während 4.7 b) nur einen partiellen Durchbruch der Spitze ohne Zerstörung der Membran zeigt. Dennoch kann durch die Kraftkurve nicht genau bestimmt werden, ob die Membran an der Spitze zerstört wird oder am Rand reißt. Ferner kann auch nicht unterschieden werden, ob sogenannte Doppelspitzen, Unregelmäßigkeiten auf der *Cantilever*-Spitze, zu partiellen Durchbrüchen führen. Dementsprechend ist keine Unterscheidung zwischen b) und c) bzw. d) und e) möglich.

Betrachtet man die schematische Darstellung der hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten (Abbildung 4.8) so wird deutlich, dass die porenüberspannende Membran zwar symmetrisch ist, jedoch nicht beide Lipidschichten die gleichen Bedingungen an den Porenrändern haben. Während die obere Lipidschicht ununterbrochen über Poren und Stege gespannt ist, schließt die untere Lipidschicht mit der Oberflächenfunktionalisierung ab. Der untere Teil der Lipiddoppelschicht ist nur innerhalb einer Pore existent und wird auf den Stegen durch die Funktionalisierung ersetzt.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mittels Bleichexperimenten zur Mobilität von nano-BLMs [39] zeigen, dass nur die obere Lipidschicht auf dem Substrat beweglich ist, während für die untere Lipiddoppelschicht nur innerhalb der Pore eine Mobilität existiert. Folglich ist die untere Lipiddoppelschicht anfällig für Flächenvergrößerungen, da sie keinen Zugriff auf ein Membranreservoir hat, im Gegensatz zu der oberen Schicht. Needham *et al.* [28] fanden durch Mikropipetten Aspirationsexperimente an GUVs heraus, dass es eine

kritische Flächenvergrößerung (typischerweise zwischen 1% bis 5%) gibt, oberhalb derer die Lipiddoppelschicht zerreißt. Die Instabilitäten der Kraft-Indentations-Experimente deuten auf ein ähnliches Reißverhalten der Membran hin, wobei anzunehmen ist, dass die untere Lipiddoppelschicht aufgrund der Flächenvergrößerung zerstört wird, die obere Schicht kann durch das Reservoir auf den Stegen, wie es auch durch die Bleichexperimente gezeigt wurde, die Flächenvergrößerung kompensieren. In Experimenten von Steltenkamp *et al.* [15] wurden freitragende Membranen indentiert, jedoch keine Durchbruchereignisse detektiert. Dies wurde auf den Einfluss der Lipidreservoirs auf den Porenstegen zurückgeführt. Der einzige mögliche Prozess um die Flächenvergrößerung in der unteren Lipiddoppelschicht zu kompensieren wäre ein *Flip-Flop*-Ereignis, d.h. der Wechsel eines Lipids von der oberen Schicht in die untere. Diese Ereignisse finden auf einer langsamen Zeitskala im Vergleich zu den durchgeführten AFM Experimenten statt [121]. In Abbildung 4.8 werden die Vorgänge während der Indentation nochmal durch die Abstände zwischen den Lipiden verdeutlicht. Der Lipidabstand wird vergrößert, bis es schließlich zu dem Durchbruchs- oder Rissereignis kommt und die Spannung der Membran abgebaut wird.

Das spontane Zerreißen [51], kann durch eine Vorspannung in der Membran erklärt werden. Eine ständig auf die Membran wirkende Kraft an den Porenrändern setzt diese einer Spannung aus und führt daher zu Defektbildungen in der Lipiddoppelschicht, welche eine endliche Lebenszeit der Membran bedeuten. Erklärt werden kann diese Vorspannung durch ein einfaches Gedankenexperiment:

Eine Lipidmembran auf einer nicht porösen Oberfläche erhält die Adhäsionsenergie zwischen Membran und Substrat. Wird ein Stück des Substrates nun entfernt, so ist die freie Energie des freistehenden Membranbereichs größer, als die des auf dem Substrat adhärenierten Teils. Daraus resultiert ein Bestreben der Lipide zu den Porenrändern, was eine Spannung in dem freistehenden Teil der Membran bedeutet. Dieser Effekt wird im folgenden als Vorspannung bezeichnet.

Folgende Annahmen lassen sich für hybride, porenüberspannende Membranen machen:

- Die porenüberspannende Membran ist nicht auf gleicher Höhe mit den Stegen, sondern formt sich am Ende der Funktionalisierung innerhalb einer Pore.
- Das Reißen der Membranen bei geringen Abbildungskräften deutet auf eine Dehnung der Lipiddoppelschicht bis zu einer kritischen Flächenvergrößerung hin.
- Die untere Lipidmonolage einer hybriden, porenüberspannenden Membran hat kein Reservoir und wird während der Indentation gestreckt. Sowohl partielle Durchbrüche der Spitze durch die Lipiddoppelschicht, als auch ein vollständiges Zerreißen der Membran wird beobachtet.
- Das spontane Reißen von hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, kann

durch eine laterale Vorspannung der Membran verursacht werden.

Für die Interpretierbarkeit der Kraft-Indentations-Kurven und dem Verständnis der energetischen Beiträge zu der elastischen Antwort ist es notwendig Abhängigkeiten von Parametern, wie der Geometrie des Systems, den Eigenschaften der Lipidmembranen und Messparametern wie der Indentationsgeschwindigkeit zu kennen.

4.2.3 Einfluss der Indentationsgeschwindigkeit

Als erster Parameter wird der Einfluss der Indentationsgeschwindigkeit diskutiert. Viskoelastische Materialien, wie z.B. Zellen zeigen ein zeitabhängiges Verhalten der Rückstellkräfte bei Indentation durch eine Rastersondenspitze [122, 123]. Elastische Proben hingegen zeigen unabhängig von der Dauer des Experiments die gleiche Antwort auf eine Indentation. Daher ist der Einfluss der Indentationsgeschwindigkeit ein Kriterium um zu beurteilen ob die Antwort der porenüberspannenden Lipiddoppelschichten elastisch ist. Hierzu wurden DPhPC nano-BLMs (sowohl mittels *Lipid-Painting* als auch Vesikel spreiten) auf OT funktionalisierten porösen Substraten mit einem Radius von 400 nm und 600 nm präpariert, und der Einfluss der Indentationsgeschwindigkeit auf die Antwort der Membran bestimmt. In rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen ist nicht nur die vertikale Geschwindigkeit des *Cantilevers* von Bedeutung sondern die Kombination aus dieser mit der Federkonstante. Daher wird die Laderate definiert als das Produkt aus Federkonstante und vertikaler Geschwindigkeit der Rastersonde $Z = k_c \cdot v_c$. Sie hat die Einheit $[Z] = \text{N/s}$. Die Experimente wurden mit *Cantilevern* der Firma Veeco (MSCT, C-Balken, $k_c = 0.01 \text{ N/m}$) durchgeführt, die Geschwindigkeit der Indentation zwischen $0.1 \mu\text{m/s}$ und $100 \mu\text{m/s}$ variiert, was Laderaten von 1 nN/s bis 1000 nN/s entspricht. Eine Auswahl solcher Kurven ist in Abbildung 4.9 a) und b) gezeigt. Abbildung c) verdeutlicht, dass die apparenten Federkonstanten, unabhängig von der Laderate und dem Porenradius, innerhalb eines Experimentes konstant ist. Auch die für hybride, porenüberspannende Lipiddoppelschichten typischen Durchbruchereignisse sind bei allen Laderaten vorhanden, es konnte ferner keine Abhängigkeit der Durchbruchkraft von der Laderate gefunden werden. Für die folgenden Experimente wurde eine Geschwindigkeit von $2 \mu\text{m/s}$ gewählt.

Wir erweitern die Annahmen über die ursächlichen Beiträge zu der elastischen Antwort:

- Die Indentation einer hybriden, porenüberspannenden Membran ist voll elastisch und unabhängig von der Indentationsgeschwindigkeit.

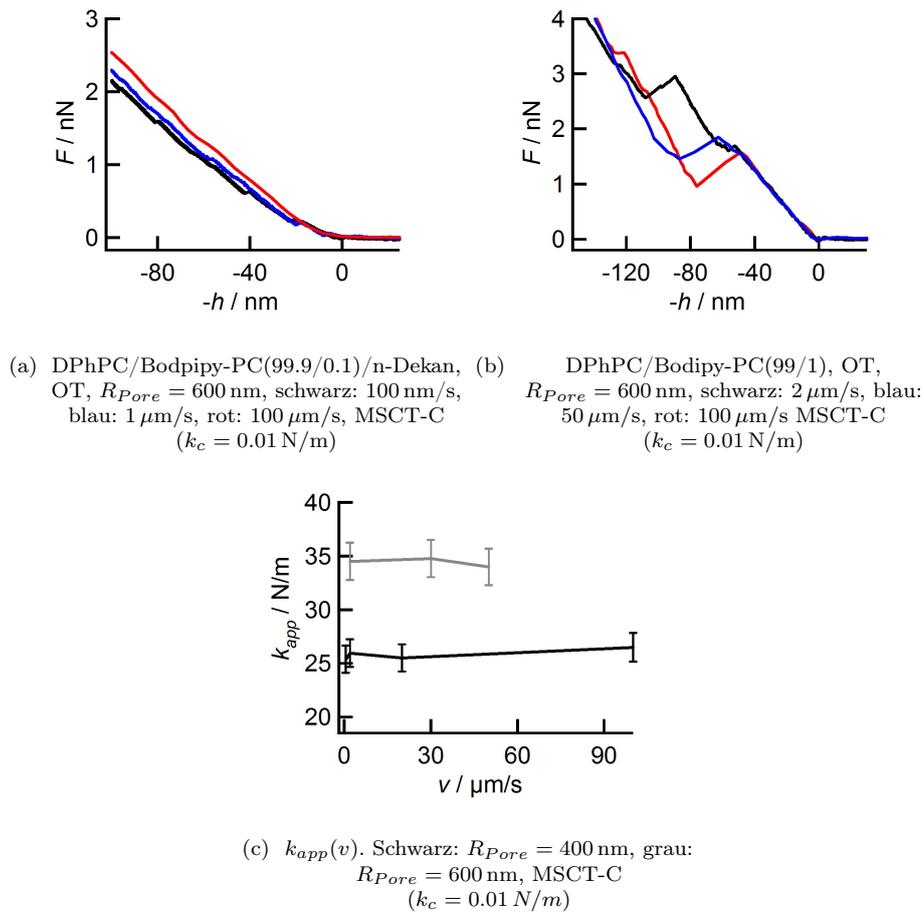


Abbildung 4.9: a) und b) zeigen Kraft-Indentations-Kurven von DPhPC nano-BLMs (mit und ohne Lösungsmittel präpariert). Deutlich wird, dass die Indentationsgeschwindigkeit keinen Einfluss auf apparente Federkonstante hat. c) zeigt weitere Experimente in einer Darstellung $k_{app}(v)$ für verschiedene Porenradien. Auch unabhängig von der Geometrie des Systems hat die Indentationsgeschwindigkeit keinen Einfluss auf die elastische Antwort der Membran.

4.2.4 Einfluss des Porenradius

Der Einfluss des Porenradius als geometrischer Parameter wird anhand von porenüberspannenden DPhPC Lipiddoppelschichten quantifiziert. Die porenüberspannende Lipidmembran wurde mittels der *Lipid-Painting* Technik auf Oktanthiol funktionalisierten Substraten mit Porenradien von 225 nm, 400 nm und 600 nm präpariert. In Abbildung 4.10 sind Fluoreszenzaufnahmen und topographische Bilder der einzelnen Systeme gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, wie der Porenradius zunimmt und der Stegbereich zwischen zwei Poren abnimmt. Die Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass auf allen Substraten porenüberspannende DPhPC Membranen präpariert werden konnten.

Die apparenten Federkonstanten der freitragenden Membranen auf verschiedenen Porengrößen werden miteinander verglichen. Aufgrund einfacher, naiver physikalischer Überlegungen, über die Verbiegung eines eindimensionalen Balkens wird erwartet, entsprechend dem

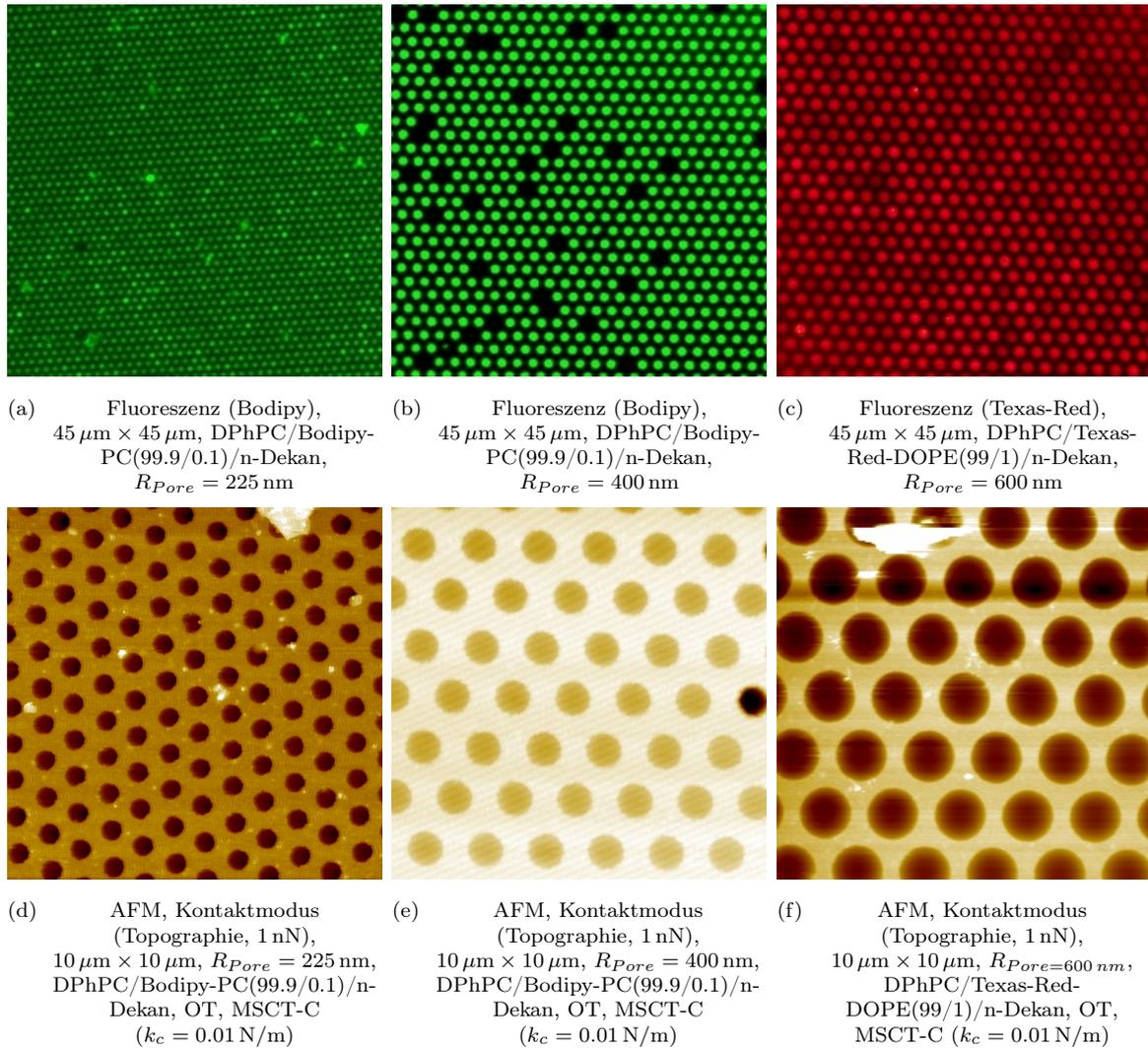


Abbildung 4.10: Fluoreszenz (a-c)) und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (d-e)) von freitragenden, hybriden DPhPC Lipiddoppelschichten auf Oktanthiol funktionalisierten Substraten mit unterschiedlichem Porenradius. Es wird stets eine gute Bedeckung erreicht, selten ist eine unbedeckte Pore zu sehen.

Hook'schen Gesetz, dass die apparente Federkonstante sinkt je größer der Porenradius ist. Diese einfache Überlegung ist möglich, da durch die runde Porengeometrie und die zentrale Indentation ein zentrosymmetrisches System vorliegt, das in erster Näherung durch einen Balken beschrieben werden kann. Ein Vergleich von DPhPC nano-BLMs mit unterschiedlichen Porenradien zeigt das erwartete Verhalten, wie in Abbildung 4.11 verdeutlicht ist. Dargestellt sind Kraft-Indentations-Kurven von freitragenden Membranen auf Substraten mit unterschiedlich großem Porenradius. Wie erwartet wird nimmt die elastische Antwort mit steigendem Porenradius (rot: 225 nm, blau: 400 nm, grün: 600 nm) ab ($k_{\text{app}}(225 \text{ nm}) > k_{\text{app}}(400 \text{ nm}) > k_{\text{app}}(600 \text{ nm})$). In Tabelle 4.1 sind die Mittelwerte der apparenten Federkonstante über mindestens 30 analysierte Kraftkurven gezeigt. Unabhängig von der Porengröße zeigen alle Kraft-Indentations-Kurven Durchbrüche der *Cantilever*-Spitze

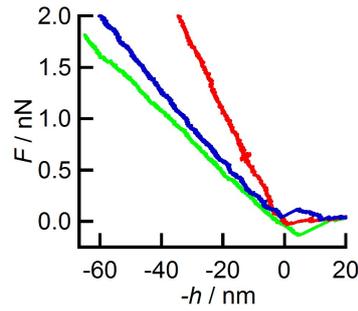


Abbildung 4.11: Kraft-Indentations-Kurven aufgenommen in der Mitte einer porenüberspannenden DPhPC/Bodipy-PC (99.9/0.1/n-Dekan) Membran aufgenommen (MSCT-C, $k_c = 0.01 \text{ N/m}$). Die Experimente wurden auf Substraten mit verschiedenen Porenradien durchgeführt: 600 nm (grün), 400 nm (blau) und 225 nm (rot). Die Geometrie des Messsystems zeigt einen Einfluss auf die elastische Antwort, je größer der Porenradius, desto niedriger ist die apparente Federkonstante der porenüberspannenden Membran. Unabhängig von der Porengröße werden Durchbruchs- und Rissereignisse während der Indentation beobachtet.

$R_{\text{Pore}} / \text{nm}$	$k_{\text{app,avg}} / \text{mN/m}$
225	48 ± 15
400	36 ± 8
600	25 ± 6

Tabelle 4.1: Mittelwerte der gemessenen apparenten Federkonstanten (k_{app}) von DPhPC Lipiddoppelschichten die mittels der *Lipid-Painting* Technik auf Oktanthiol funktionalisierten Substraten mit unterschiedlicher Porengröße (R_{Pore}) präpariert wurden.

durch die freistehende Lipiddoppelschicht, wie sie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurden. Die in Abbildung 4.12 gezeigten Histogramme stellen die Eindringtiefe des ersten Durchbruchereignisses in Abhängigkeit des Porenradius dar. Generell lässt sich sagen, dass je größer die Pore, desto häufiger treten Rissereignisse bei höheren Eindringtiefen auf. Die Membranfläche kann durch Annahme einer Kegelgeometrie abgeschätzt werden, da die sehr großen Poren und das Verhältnis von Porengröße zu Indentergröße $\frac{R_{\text{Pore}}}{R_{\text{Tip}}}$ die Annahme von großen Krümmungsradien und einer punktuell in der Mitte der Membran applizierten Kraft rechtfertigen. Die Kegelform ist eine obere Abschätzungsgrenze für die Flächenvergrößerung und wird den tatsächlichen Wert übertreffen. Als Orientierung sind in Tabelle 4.2 die Eindringtiefen für eine Flächenvergrößerung von 5% angegeben. 5% wurden gewählt da sie in der Literatur einen Maximalwert für Lipiddoppelschichten darstellen [28]. Es ist ersichtlich, dass während der Indentation einer nano-BLM 5% maximale Flächenausdehnung nicht erreicht werden und das erste Rissereignis deutlich vorher eintritt. Für die einzelnen Systeme wurden maximale Flächenausdehnungen von 1-2% gefunden. Die Histogramme zeigen alle Ereignisse nahe der 0 nm Eindringtiefe, was auf ein spontanes Zerreißen der hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten hindeutet wie es schon beschrieben wurde und von Weiskopf *et al.* dokumentiert wurde [51]. Die bereits angestellten Vermutungen über

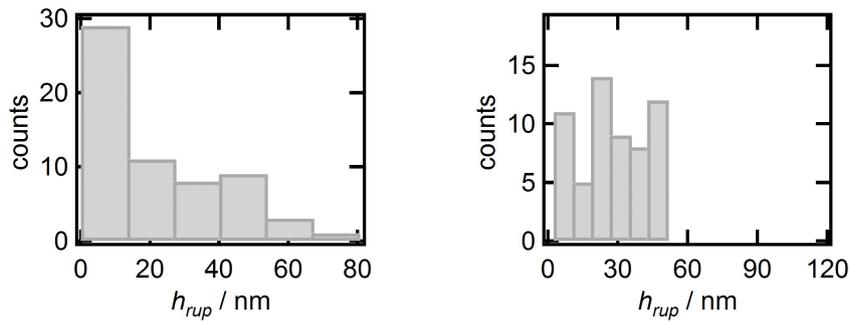
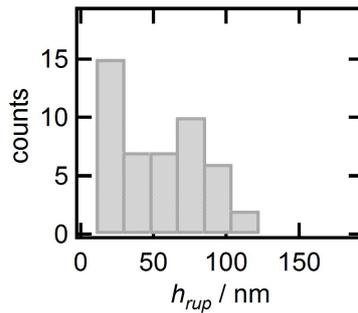
(a) DPhPC/n-Dekan, OT, $R_{Pore} = 225$ nm (b) DPhPC/n-Dekan, OT, $R_{Pore} = 400$ nm(c) DPhPC/n-Dekan, OT, $R_{Pore} = 600$ nm

Abbildung 4.12: Die Histogramme zeigen die Eindringtiefe der *Cantilever*-Spitze in eine nano-BLM bis zum ersten Rissereignis der Membran auf verschiedenen großen Poren. Die Skalierung der x-Achse geht jeweils bis zu der abgeschätzten kritischen Flächenvergrößerung von 5%.

R_{Pore}	$h_{max,Kegel}$
225 nm	72 nm
400 nm	128 nm
600 nm	192 nm

Tabelle 4.2: Anhand einer kegelförmigen Membran berechnete kritische Eindringtiefen, die eine Flächenvergrößerung von 5% bedeuten.

die Eigenschaften der hybriden, porenüberspannenden Membranen können nun wiederum erweitert werden:

- Die apparente Federkonstante wird durch die Geometrie des Systems beeinflusst.

4.2.5 Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung

Aus Untersuchungen der Diffusionskoeffizienten von hybriden Lipiddoppelschichten ist ersichtlich, dass die Beweglichkeit von der Oberflächenfunktionalisierung abhängt [39]. Hybride, porenüberspannende Lipiddoppelschichten auf CPEO3 funktionalisierten Substraten

zeigen eine höhere Beweglichkeit im Vergleich zu DPPTE funktionalisierten Oberflächen. Weiterhin entsteht die postulierte Vorspannung in der Membran aus der Wechselwirkungsenergie zwischen Membran und Porenrand bzw. mit der Funktionalisierung auf dem Porenrand. Daher ist zu erwarten, dass unterschiedliche Funktionalisierungen auch unterschiedliche Vorspannungen bedeuten. Beide Effekte, sowohl eine Veränderte Vorspannung, als auch eine höhere Mobilität der Lipid innerhalb der Membran, können einen Einfluss auf die apparente Federkonstante haben.

Als Funktionalisierungen wurden Monoschichten von Oktanthiol, welches eine sehr dicht gepackte Oberfläche bildet, verglichen mit Monolagen von CPEO3 (vgl. Abb. 3.6), ein sehr langes, sperriges Molekül mit einem "fluideren" Charakter als Oktanthiol verwendet. Untersuchungen zu der Beweglichkeit der oberen Lipidschicht mittels Bleichexperimenten zeigen einen erhöhten Diffusionskoeffizienten auf CPEO3 funktionalisierten Substraten verglichen mit DPPTE, welches ein Thio-Lipid ist, das eine sehr dichte Packung bildet und bei den Messungen in der Gel Phase vorlag. Dementsprechend ist DPPTE daher gut vergleichbar mit der hochgeordneten OT Schicht. CPEO3 ist bekannt als Spacerlipid [124] und es bildet keine dichtest gepackten Schichten, vielmehr ermöglicht es die Bildung einer rudimentären unteren Lipidschicht, die sich zwischen den CPEO3 Molekülen bildet. Der Unterschied der beiden Funktionalisierungen ist in Abbildung 4.13 a) schematisch dargestellt.

Substrate mit einem Porenradius von 400 nm wurden entweder mit Oktanthiol oder CPEO3 funktionalisiert und porenüberspannende Lipiddoppelschichten mittels der *Lipid-Painting* Technik präpariert. In Abbildung 4.13 b) sind Kraftkurven auf beiden Oberflächenfunktionalisierungen im Vergleich gezeigt. Wie in dem Vergleich deutlich zu sehen ist, zeigen hybride, porenüberspannende Membranen auf CPEO3 eine niedrigere apparente Federkonstante als auf OT präparierte freitragende Lipiddoppelschichten (s. Tabelle 4.3). Nano-BLMs aus

Funktionalisierung	$k_{app,avg}$ / mN/m
CPEO3	26 ± 5
OT	36 ± 8

Tabelle 4.3: Mittelwerte der gemessenen apparenten Federkonstanten (k_{app}) von DPhPC Lipiddoppelschichten die mittels der *Lipid-Painting* Technik auf OT und CPEO3 funktionalisierten Substraten präpariert wurden.

DPhPC auf CPEO3 funktionalisierten Substraten zeigen mit (26 ± 5) mN/m eine ca. 25% geringere apparente Federkonstante verglichen mit den nano-BLMs auf Oktanthiol mit (36 ± 8) mN/m. Dennoch zeigen beide Oberflächenfunktionalisierungen typische Durchbrüche der AFM-Spitze durch die Membran wie es bereits in Abbildung 4.8 gezeigt und für OT funktionalisierte Oberflächen in Abschnitt 4.2.2 diskutiert wurde. Eine Analyse des ersten Durchbruchereignisses in Kraft-Indentations-Kurven ist für beide Oberflächenfunktionalisierungen in Abbildung 4.14 gezeigt. Auf CPEO3 gibt es eine breitere Verteilung der

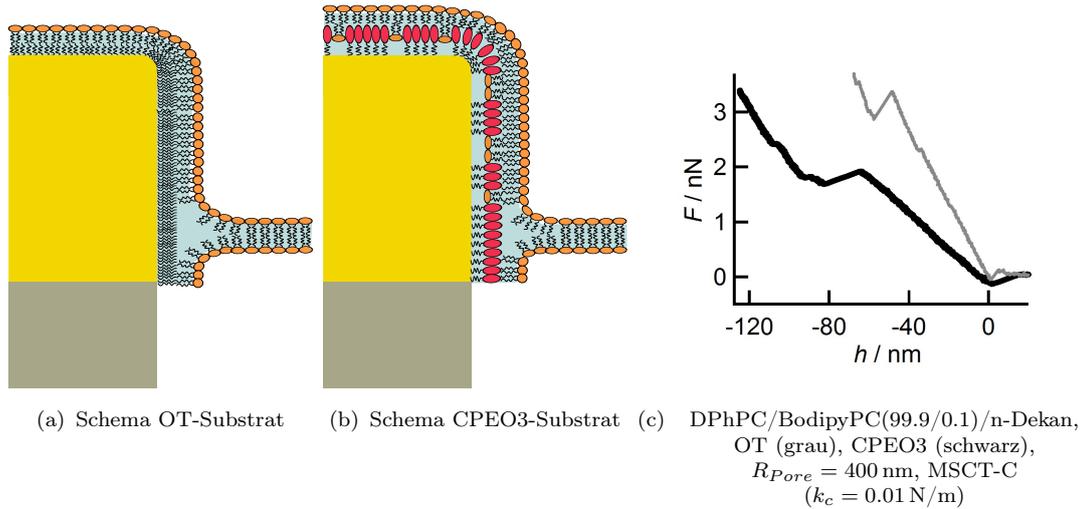


Abbildung 4.13: a) Schematische Darstellung von nano-BLMs auf OT bzw. b) CPEO3. Auf CPEO3 ist eine rudimentäre untere Lipiddoppelschicht ausgebildet. c) zeigt Kraft-Indentations-Kurven von nano-BLMs auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen. Die schwarze Kurve wurde auf einem CPEO3 und die graue auf einem OT funktionalisierten Substrat gemessen. Nano-BLMs auf CPEO3 funktionalisierten Oberflächen zeigen eine niedrigere apparente Federkonstante.

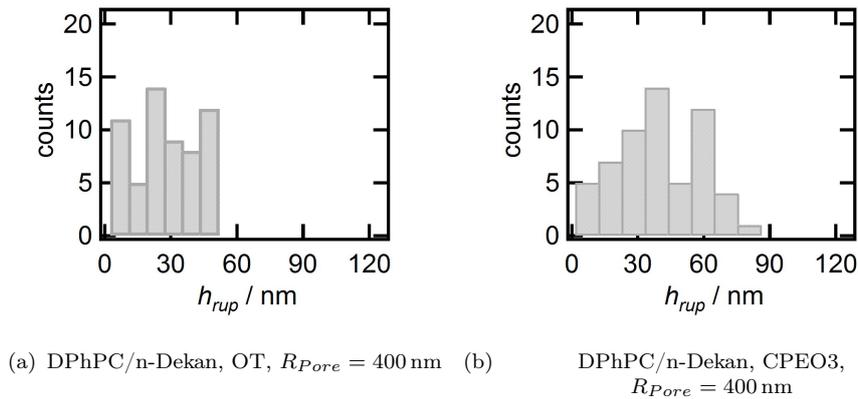


Abbildung 4.14: Die Histogramme zeigen die Eindringtiefe der *Cantilever*-Spitze in eine nano-BLM bis zum ersten Rissereignis der Membran für a) OT und b) CPEO3 funktionalisierte Substrate mit einem Porenradius von 400 nm.

Durchbruchereignisse und es werden maximale Flächenvergrößerungen von 4% gefunden im Gegensatz zu den 2% bei OT funktionalisierten Substraten. Es ist möglich, dass die rudimentär ausgebildete untere Lipidschicht ein Reservoir darstellt, welches höhere Flächenvergrößerungen erlaubt als für den Fall der dichtgepackten OT Funktionalisierung. Wie bereits angedeutet zeigten hybride, porenüberspannende Lipidmembranen auf CPEO3 einen erhöhten Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu hybriden Membranen auf DPPTE [39]. Durch die weniger dichte Packung von CPEO3 auf der Oberfläche ergibt sich auch ein geringerer Energiegewinn der Lipide auf den Stegen, während auf dicht gepackten OT Flächen die Lipide durch die hydrophobe-hydrophobe Wechselwirkung einen hohen

Energiegewinn aufweisen. Diese würde entsprechend dem vorgestellten Gedankenexperiment auch eine geringere Vorspannung in der Membran bedeuten.

Sowohl die erhöhte Mobilität der oberen Lipiddoppelschicht als auch die verminderte Vorspannung gehen folglich einhand mit einer geringeren apparenten Federkonstante. Folgende erweiterte Annahmen lassen sich für die elastische Antwort hybrider, porenüberspannender Membranen treffen:

- Die Oberflächenfunktionalisierung beeinflusst die apparente Federkonstante. Je höher die Diffusion der Lipide auf der Funktionalisierung desto niedriger die apparente Federkonstante.
- Die weniger dichte Packung von CPEO3 ermöglicht den Aufbau einer rudimentären unteren Lipidschicht. Damit können einerseits die höheren Eindringtiefen bis zu dem ersten Durchbruchereignis erklärt werden. Andererseits würde diese eine geringere freie Energie für porenüberspannende Membranen auf CPEO3 als auf OT funktionalisierten Substraten bedeuten und folglich auch eine geringere Vorspannung.
- Die Durchbruchereignisse und die postulierten Vorspannungen legen nahe, dass Spannungen innerhalb der Membran die elastische Antwort determinieren. Dennoch scheint die Mobilität der oberen Lipidschicht einen Einfluss zu haben, wie die höheren Indentationstiefen bei CPEO3 funktionalisierten Substraten vermuten lassen.

4.2.6 Einfluss des Lösungsmittels

Auch restliches Lösungsmittel in der Membran hat, wie in der Arbeit von Weiskopf *et al.* gezeigt [39], einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Lipide in hybriden, porenüberspannenden Modellsystemen und entsprechend der obigen Argumentation damit auch einen Einfluss auf die apparente Federkonstante. Es wurden entsprechend Vergleiche zwischen lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien Membranen durchgeführt. Schon an klassischen BLMs wurden Untersuchungen zu dem Einfluss des Lösungsmittels durchgeführt. Hierbei zeigten sich Einflüsse auf die Oberflächenspannung der Membranen [47]. BLMs präpariert aus unterschiedlichen Lösungsmitteln, zeigen unterschiedliche Dicken und Oberflächenspannungen. Präparationen aus n-Dekan Lösungen zeigten in den Experimenten Oberflächenspannungen von 3.8 mN/m während aus Squalen präparierte Membranen nur eine Spannung von 1.5 mN/m zeigten. Ebenso wird gezeigt, dass n-Dekan dickere Membranen erzeugt als Squalen, durch Einlagerungen von n-Dekan in die Lipiddoppelschicht.

Weiskopf *et al.* zeigten, dass lösungsmittelhaltige Membranen höhere Diffusionskoeffizienten haben als lösungsmittelfreie [39].

Im Rahmen dieser Arbeit werden die mechanischen Eigenschaften lösungsmittelhaltiger und lösungsmittelfreier DPhPC und DPPC nano-BLMs miteinander verglichen. Die hybriden, po-

renüberspannenden Lipiddoppelschichten wurden entweder durch *Lipid-Painting* oder durch Spreiten von GUVs auf Oktanthiol funktionalisierten Substraten präpariert. DPPC konnte nur in der fluiden Phase lösungsmittelfrei präpariert werden. nach Abkühlen und Übergang in die Gel Phase rissen die hybriden, porenüberspannenden DPPC Membranen. Kraft-Indentations-Kurven auf DPhPC und DPPC nano-BLMs mit und ohne Lösungsmittel sind in Abbildung 4.15 gezeigt. Für beide Lipidzusammensetzungen zeigen lösungsmittelhalti-

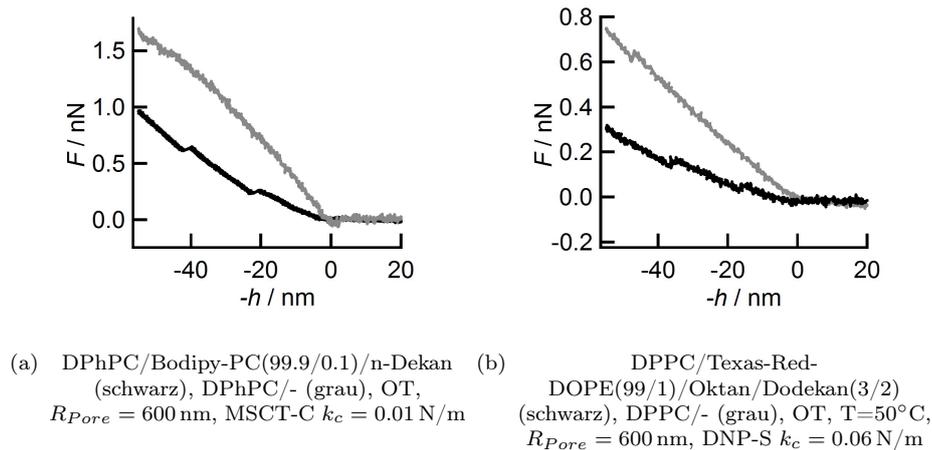


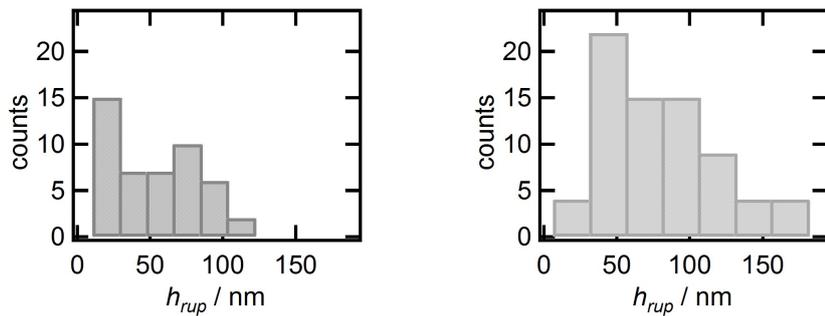
Abbildung 4.15: Vergleich der elastischen Antwort von DPhPC (a) und DPPC (b) nano-BLMs präpariert mit (schwarz) und ohne (grau) Lösungsmittel. DPPC wurde bei 50°C gemessen und befand sich in der fluiden Phase. Unabhängig von dem verwendeten Lipid zeigen Membranen mit Lösungsmittel eine geringere elastische Antwort.

ge Lipiddoppelschichten (schwarz) eine geringere apparente Federkonstante als lösungsmittelfreie (grau). Dieser Befund geht einhand mit gemessenen Diffusionskoeffizienten von lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien nano-BLMs [39, 51]. In klassischen BLMs wurde für POPC:DOPE Membranen ohne Lösungsmittel ein Diffusionskoeffizient von $D_{LM} = (13.2 \pm 1.02) \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden wohingegen lösungsmittelhaltige POPC:POPE Lipiddoppelschichten einen fast doppelt so hohen Diffusionskoeffizienten von $D = (20.6 \pm 0.9) \mu\text{m}^2/\text{s}$ zeigten [125, 126]. Das gleiche Verhalten konnte für mikro BLMs gefunden werden. Der Diffusionskoeffizient ist hierbei für lösungsmittelhaltige Membranen $D_{LM} = (8.5 \pm 4.7) \mu\text{m}^2/\text{s}$ und halbiert sich bei Präparationen ohne Lösungsmittel. Das Lösungsmittel verursacht eine erhöhte Mobilität in den porenüberspannenden Lipiddoppelschichten und ebenso eine niedrigere apparente Federkonstante der nano-BLMs. In Tabelle 4.4 sind die apparenten Federkonstante für lösungsmittelhaltige und lösungsmittelfreie nano-BLMs zusammengefasst.

Die Histogramme der Indentation für das erste Durchbruchereignis für porenüberspannende DPhPC Membranen, sowohl mit als auch ohne Lösungsmittel, (Abbildung 4.16) zeigen ebenfalls einen Einfluss auf die Durchbruchlänge. Lösungsmittelhaltige Membranen reißen offensichtlich bei kleineren Indentationstiefen als lösungsmittelhaltige.

Lipid/Lösungsmittel	$k_{app,avg}$ / mN/m
DPhPC/n-Dekan	25 ± 6
DPhPC/ -	34 ± 5
DPPC/Oktan/Dodekan	9 ± 2
DPPC/ -	21 ± 3

Tabelle 4.4: Mittelwerte der gemessenen apparenten Federkonstanten (k_{app}) von DPhPC und DPPC (bei 50°C) Lipiddoppelschichten mit und ohne Lösungsmittel auf OT funktionalisierten Substraten. Lösungsmittelhaltige Membranen zeigen stets eine niedrigere apparente Federkonstante.



(a) DPhPC/n-Dekan, OT, $R_{Pore} = 600$ nm

(b) DPhPC/-, OT, $R_{Pore} = 600$ nm

Abbildung 4.16: Histogramme der Durchbruchereignisse von DPhPC nano-BLMs sowohl mit (a) als auch ohne Lösungsmittel (b). Lösungsmittelfreie Membranen zeigen tiefere Indentationstiefen bis zum ersten Rissereignis.

Zusammengefasst zeigen lösungsmittelfreie Lipiddoppelschichten höhere apparente Federkonstanten und tiefere Indentationen bis zum ersten Durchbruchereignis. Einerseits wird durch das Lösungsmittel wie bereits beschrieben, die Diffusion der Lipide gesteigert, was eine Verringerung der apparenten Federkonstante zur Folge hat. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass eingelagertes Lösungsmittel in der Membran einen Einfluss auf die Spannung in dieser hat. Das Lösungsmittel scheint die Spannung in der Membran zu reduzieren, indem es die Differenz der freien Energien zwischen unterstützten und freistehendem Membranbereich reduziert.

Die Durchbruchslängen hängen nur von der Dehnung der unteren Lipidmonoschicht ab. Daher muss gefolgert werden, dass lösungsmittelfreie hybride, porenüberspannende Membranen bessere Kompensationsmöglichkeiten für die Dehnung der unteren Lipidmonolage haben als lösungsmittelhaltige. Folgende Annahme kann diesen Sachverhalt erklären: Durch *Lipid-Painting* kann zwischen den Lipiden Lösungsmittel eingelagert werden. Daher können diese Lipide einen größeren Abstand zueinander einnehmen ohne den hydrophoben Kontakt zwischen den Lipidketten verlieren. Dies hat zur Folge, dass bei Flächenvergrößerungen schneller das kritische Limit erreicht wird und die Membran zerreißt. Die Annahmen zu den mechanischen Eigenschaften von hybriden, porenüberspannenden Membranen können nun

erweitert werden:

- Lösungsmittelhaltige Membranen sind beweglicher und zeigen niedrigere apparente Federkonstanten, daher sollte die Vorspannung in Lösungsmittelhaltigen Membranen geringer sein..
- Die Präparationstechnik bzw. das Vorhandensein von Lösungsmittel während der Präparation beeinflusst die Durchbruchslängen und die apparente Federkonstante. Lösungsmittelfreie Membranen zeigen tiefere Indentationen bis zu dem ersten Durchbruchereignis als lösungsmittelhaltige.

4.2.7 Einfluss der Membranphase

Der Einfluss der Fluidität wurde durch Experimente an DPPC in verschiedenen Phasen: fluide Phase, Gel Phase und flüssig-kristalline Phase überprüft. Die Fluidität von nano-BLMs kann einerseits, wie schon gezeigt, durch Veränderung der Oberflächenfunktionalisierung, andererseits durch Veränderung der Lipidphase beeinflusst werden. Im Folgenden wird die elastische Antwort von DPPC Lipiddoppelschichten in verschiedenen Phasen untersucht. Hierzu wurden lösungsmittelhaltige DPPC nano-BLMs auf OT funktionalisierten porösen Substraten mit einem Porenradius von 600 nm präpariert, und sowohl unterhalb als auch oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur von $T_m = 41.5^\circ\text{C}$ mittels Kraft-Indentations-Experimenten untersucht. Abbildung 4.17 zeigt Kraft-Indentations-Kurven auf DPPC nano-BLMs sowohl in der Gel (schwarz) als auch in der fluiden (grau) Phase. Es ist

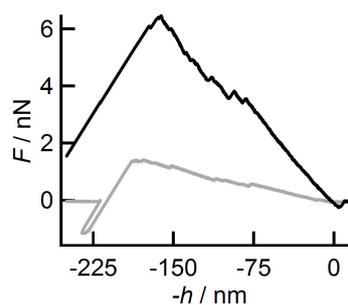


Abbildung 4.17: DPPC/Texas-Red-DOPE(99/1)/Oktan/Dodekan(3/2), OT, $R_{Pore} = 600$ nm, DNP-S $k_c = 0.06$ N/m; Kraft-Indentations-Kurven von DPPC nano-BLMs präpariert mit der *Lipid-Painting* Technik auf OT funktionalisierten Substraten. Die schwarze Kurve wurde unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur ($T_m = 41.5^\circ\text{C}$) bei 20°C , in der Gel Phase, aufgenommen, während die graue Kurve oberhalb des Schmelzpunktes bei 50°C , in der fluiden Phase, aufgenommen wurde. Deutlich ist zu sehen, dass die elastische Antwort in der Gel Phase deutlich härter ausfällt als in der fluiden Phase.

offensichtlich, dass eine fluide nano-BLM deutlich geringere apparente Federkonstanten

zeigt, als das stärker geordnete Lipidsystem in der Gel Phase. Die apparente Federkonstante für das fluide System ist $k_{app,avg,f} = (9 \pm 2) \text{ mN/m}$ und für DPPC in der Gel Phase $k_{app,avg,g} = (40 \pm 4) \text{ mN/m}$. Die apparente Federkonstante einer Gel Phasen Membran ist viermal höher als die einer fluiden Membran. Zusätzlich wurden Experimente mit Mischungen von DPPC und Cholesterol durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.6 bereits erwähnt, induziert Cholesterol die Bildung einer sogenannten flüssig-geordneten Phase, d.h. Systeme die ursprünglich in der Gel Phase waren, werden etwas ungeordneter/fluidier, während Systeme die sich in der fluiden Phase befanden, eine höhere Ordnung erfahren und etwas Fluidität verlieren. Es wurden unter gleichen Bedingungen mittels *Lipid-Painting* Technik nano-BLMs aus DPPC/Chol (75:25) erzeugt und bei 20°C und 50°C vermessen. Die Kraftkurven auf cholesterolhaltigen nano-BLMs sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Die rote bzw.

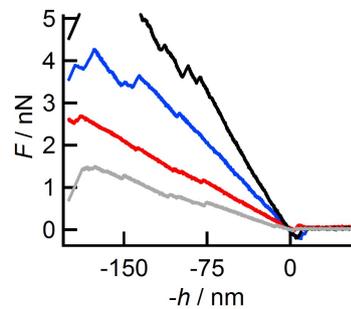


Abbildung 4.18: Kraft-Indentations-Kurven von DPPC, hier grau und schwarz, und DPPC/Chol(75:25), hier blau und rot, nano-BLMs präpariert mit der *Lipid-Painting* Technik auf OT funktionalisierten Substraten ($R_{Pore} = 600 \text{ nm}$, DNP-S $k_c = 0.06 \text{ N/m}$). Die schwarze/blau Kurve wurde bei Raumtemperatur, unterhalb des Schmelzpunktes während die graue/rote Kurve oberhalb des Schmelzpunktes aufgenommen wurde. Auch für die Mischungen mit Cholesterol ist die apparente Federkonstante unterhalb des Schmelzpunktes höher als oberhalb. Im Vergleich zu den reinen DPPC Membrane zeigt sich allerdings, dass oberhalb des Schmelzpunktes die apparente Federkonstante steigt (grau zu rot) und unterhalb fällt (schwarz zu blau).

blaue Kraft-Indentations-Kurve zeigen Indentationsexperimente in den Lipidmischungen im Vergleich mit den reinen DPPC-nano-BLMs (schwarz/grau). Die apparente Federkonstante ist unterhalb des Schmelzpunktes niedriger und oberhalb des Schmelzpunktes höher als in den cholesterolfreien Systemen. Dieses Verhalten entspricht den Erwartungen und dem fluiden Charakter der nano-BLMs [127]. Die apparenten Federkonstanten für DPPC und DPPC/Chol sind in der folgenden Tabelle 4.5 zusammengefasst. Eine Veränderung der Mobilität der Lipide geht direkt einhand mit einer Veränderung der apparenten Federkonstante für die freitragenden Membranen. Die Durchbruchereignisse bleiben, wie auch in den vorherigen Experimenten, weiterhin erhalten. Die Histogramme der Durchbruchlängen von DPPC nano-BLMs sind in Abbildung 4.19 gezeigt. In den Histogrammen zeigen DPPC nano-BLMs unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur Durchbruchereignisse bei etwas größeren Flächenvergrößerungen als fluide Membranen. Eine mögliche Erklärung

Lipid	$k_{app,avg}$ / mN/m
DPPC (RT)	40 ± 4
DPPC (50°C)	9 ± 2
DPPC/Chol (RT)	31 ± 4
DPPC/Chol (50°C)	14 ± 3

Tabelle 4.5: Mittelwerte der gemessenen apparenten Federkonstanten (k_{app}) von DPPC und DPPC/Chol Lipiddoppelschichten auf OT funktionalisierten porösen Substraten. Die apparente Federkonstante ist abhängig von der Phase der Lipiddoppelschicht. Je fluider die Lipiddoppelschicht, desto niedriger ist auch die elastische Antwort.

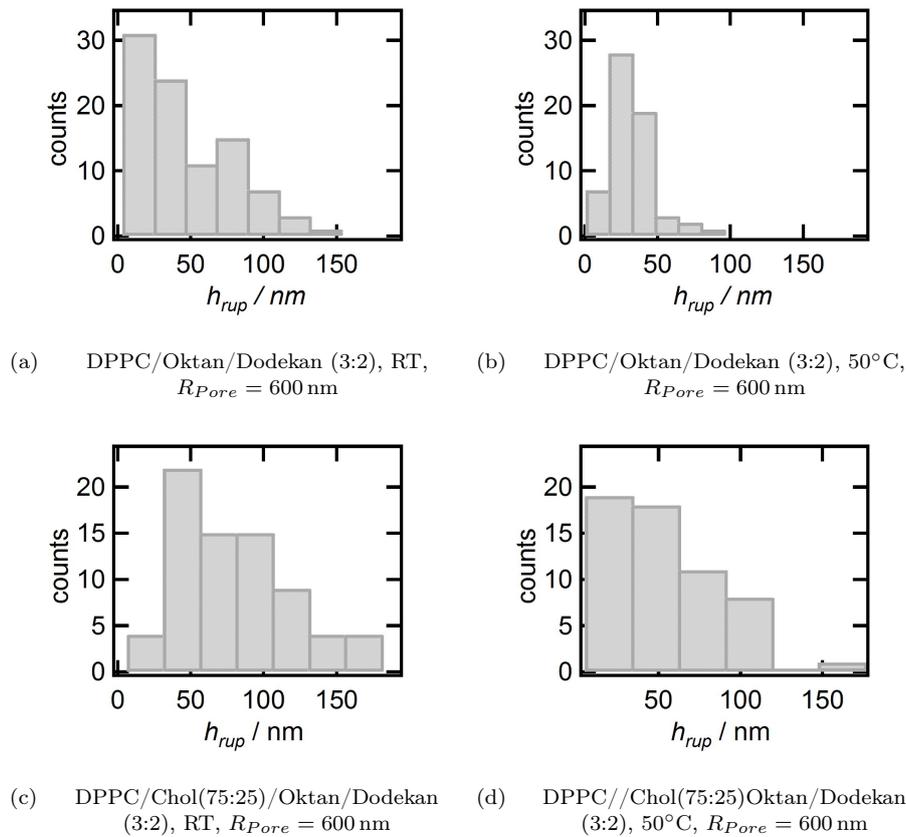


Abbildung 4.19: Histogramme der Indentationstiefe für das erste Durchbruchereignis von DPPC nano-BLMs in der fluiden und Gel Phase, sowie Mischungen von DPPC und Cholesterol. Gel Phasen zeigen eine etwas längere Durchbruchlänge als fluide Systeme, beide reißen aber meistens bei geringen Eindringtiefen um die 50 nm. Für Mischungen mit Cholesterol sind Durchbruchlängen zwischen den reinen DPPC Phasen zu erkennen.

ist die dichtere Struktur der Gel Phase. Mehr Lipide innerhalb einer porenüberspannenden Membran bieten die Möglichkeit Flächenvergrößerung zu kompensieren unter Umständen sogar durch lokale Phasenumwandlungen von der Gel in die fluide Phase innerhalb der Lipidschichten.

Einen Vergleich der Flächenkompressionsmodule K_A für DPPC in der fluiden und in der

Gel Phase unterstützt die Annahme einer Vorspannung innerhalb von hybriden, porenüberspannenden Membranen. Sowohl Biegemodul, als auch Flächenkompressionsmodul [5] sind um einen Faktor 10 höher in Gel Phase. Die Spannung in einer Membran hängt über $\sigma = K_A \Delta A / A$ mit dem Flächenkompressionsmodul und der Flächenvergrößerung zusammen. ein höheres Flächenkompressionsmodul bedeutet auch, dass höhere Spannungen in der Membran möglich sind. Die Mischungen von Cholesterol zeigen verglichen mit der fluiden Phase ebenfalls tiefere Indentationen bis zu dem ersten Durchbruchereignis. Dies kann ebenfalls durch eine Veränderung des Flächenkompressionsmoduls erklärt werden. Mischungen fluider Phasen mit Cholesterol zeigen mit steigendem Cholesterolgehalt auch steigende Flächenkompressionsmodule [28].

Zusammenfassend lassen sich folgende Beschreibungen für die gefundenen Eigenschaften von hybriden porenüberspannenden Membranen finden:

- Die porenüberspannende Membran ist nicht auf gleicher Höhe mit den Stegen, sondern formt sich am Ende der Funktionalisierung innerhalb einer Pore.
- Die Oberflächenfunktionalisierung beeinflusst die apparente Federkonstante. Je höher die Diffusion der Lipide auf der Funktionalisierung desto niedriger die apparente Federkonstante.
- Die freistehenden Lipidmembranen reißen oberhalb einer kritischen Flächenvergrößerung von einigen Prozenten unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung und der Membranphase. Dies kann durch Spannungen während der Indentation erklärt werden. Es werden sowohl partielle Durchbrüche als auch Rissereignisse der Membran beobachtet.
- Eine Vorspannung innerhalb der Lipiddoppelschicht kann das spontane Reißen und die generell geringen Eindringtiefen bis zu dem ersten Durchbruchereignis erklären.
- Lösungsmittelgehalt und Lipidphase beeinflussen die Durchbruchslängen und apparente Federkonstanten. Es kann angenommen werden, dass die Vorspannung ebenfalls durch Lösungsmittel und Membranphase beeinflusst wird. Es wurde folgender Zusammenhang gefunden: Je höher das Flächenkompressionsmodul der Lipidmembran desto höher die apparente Federkonstante.

4.3 Unterstützte porenüberspannende Membranen

Im Gegensatz zu den hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, existieren bei unterstützten, porenüberspannenden Membranen auch auf den Porenrändern homogene frei bewegliche Lipiddoppelschichten. Sowohl obere als auch untere Schicht haben Zugriff auf ein Lipidreservoir auf dem Porenrand. Dies lässt erwarten, dass Spannungen in der Membran nicht mehr die dominierende Größe sein werden. Die verwendeten Substrate zeichnen sich durch eine geringe Porosität aus, da dies die Adhäsionsfläche für Vesikel erhöht und somit den Spreitvorgang erleichtert. Gespreitet wurden DPhPC GUVs auf den Substraten und im Folgenden werden zuerst die Substrate in Bezug auf Ihre Wechselwirkung mit der *Cantilever*geometrie untersucht. Anschließend werden Messungen an unterstützten, porenüberspannenden DPhPC Lipiddoppelschichten vorgestellt.

4.3.1 Unterstützte porenüberspannende DPhPC Membranen

Wie im Falle von hybriden, freistehenden Membranen wird der Erfolg der Präparation mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert, und mit Hilfe der Fluoreszenzaufnahmen die Rastersonde im Bereich von porenüberspannenden Membranen positioniert. Eine erfolgreiche Präparation ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass der Belegungsgrad

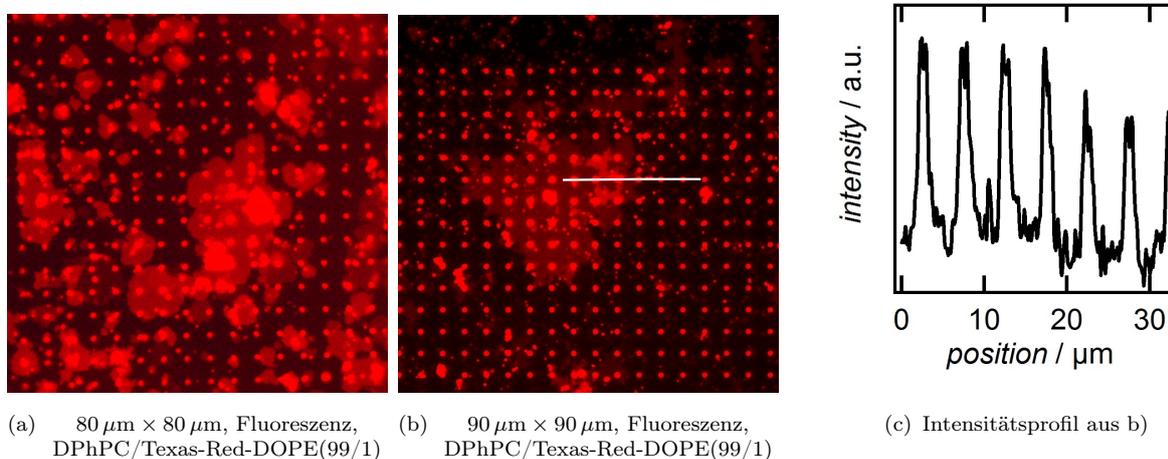


Abbildung 4.20: a) und b) zeigen Fluoreszenz Aufnahmen von DPhPC/TR-DOPE(99/1) GUVs gespreitet auf porösen Si/SiO₂ Substraten. Deutlich sind einzelne Patches zu erkennen, welche poröse Bereiche bedecken. Erstaunlicherweise zeigen diese Substrate eine sehr starke Eigenfluoreszenz, Poren in von Membran unbedeckten Bereichen fluoreszieren ebenfalls. c) Ein Profil entlang der Markierung in b) zeigt einen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen bedeckten und unbedeckten Poren.

nicht so hoch ist, wie im Falle von hybriden Systemen. Die Präparation beruht auf dem Spreiten von GUVs durch Adhäsion an die Oberfläche. Die geringe Belegung deutet schon auf sehr niedrige Adhäsionskräfte im Vergleich zu hybriden, freistehenden Membran Präpa-

rationen hin.

Die Rastersonde konnte im Falle dieser Substrate nicht so genau positioniert werden, da eine markante Strukturierung wie im Falle der fluXXion Substrate fehlt. Abbildung 4.21 a) zeigt in einer topographischen Aufnahme zwei überspannte und zwei nicht überspannte Poren, sowie die Grenzen des Membranpatches. Entlang der schwarzen Linie wird das Höhenprofil in b), mit der typischen Höhe von ca. 6 nm für eine Lipiddoppelschicht, dargestellt. Ein weiteres Höhenprofil entlang der grauen Linie (Abb. 4.21 c)) zeigt den Unterschied zwischen einer überspannten Pore und einer unbedeckten. Aus einem Vergleich mit Abbildung 4.4 geht her-

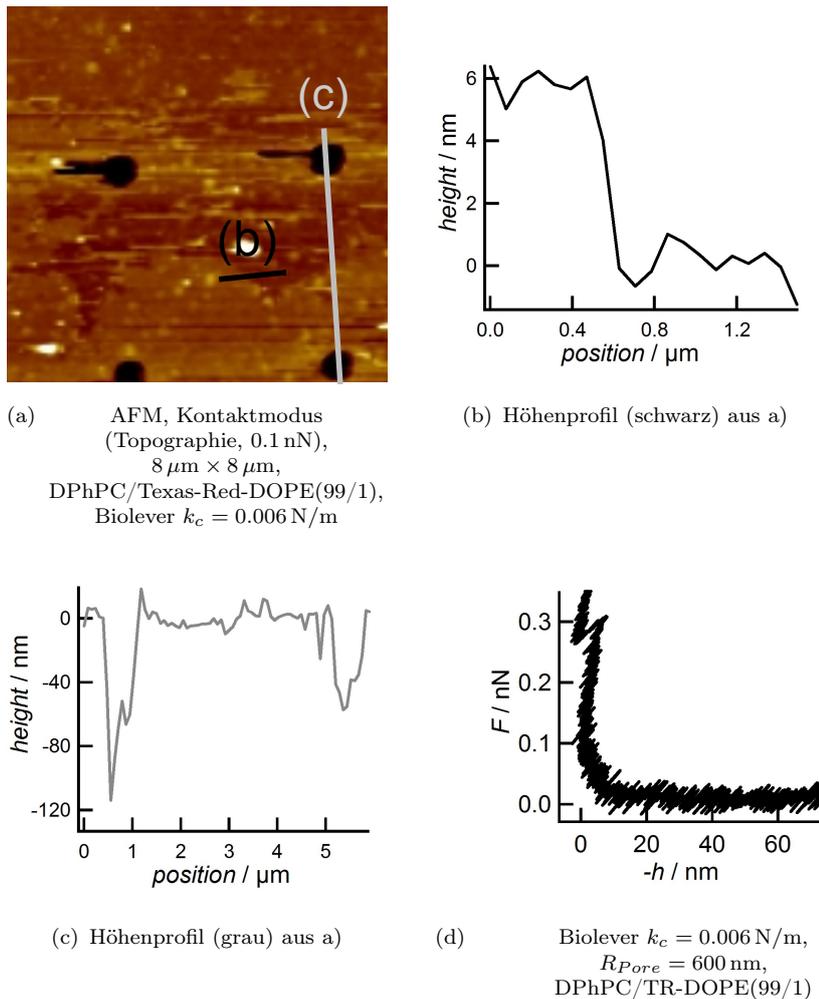


Abbildung 4.21: Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme in a) zeigt deutlich die Ränder eines Bereiches der von einer Lipiddoppelschicht bedeckt ist, wie es durch die Kantenhöhe anhand des Linienprofiles in b) verdeutlicht wird. Ein Unterschied in der Indentationstiefe zwischen belegten und un belegten Poren wird in c) gezeigt. Durch die geringe Kraft bei der Abbildung erreicht die Sondenspitze allerdings auch in der leeren Pore nicht die maximale Indentationstiefe. Eine Kraft-Abstands-Kurve auf den belegten Porenstegen ist in d) gezeigt, deutlich ist ein Durchbruchereignis mit einer Länge von etwa 6 nm bei einer Kraft von 300 pN zu erkennen.

vor, das hier nicht die maximale Eindringtiefe erreicht wird. Dies erklärt sich aus der geringen Kraft (ca. 100 pN) die für die Abbildung benutzt wurde um die Lipiddoppelschicht nicht zu

beschädigen. Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse von Ladekraft und Regelparametern, können die Daten aus den AFM-Aufnahmen nicht für eine quantitative Analyse heran gezogen werden. Es ist jedoch möglich auf die Belegung der Pore anhand des Unterschieds in den Eindringtiefen, in Kombination mit der abgebildeten Lipiddoppelschicht-Kante und den Fluoreszenzaufnahmen zu schließen.

In Abbildung 4.21 d) ist ein Durchbruchereignis in einer Kraft-Abstands-Kurve auf dem Porensteg gezeigt. Die Durchbruchlänge von ca. 6 nm bei einer Kraft von 300 pN entspricht der Dicke einer Lipiddoppelschicht. Solche Durchbrüche durch fluide Lipiddoppelschichten sind schon bekannt und hinreichend in der Literatur diskutiert [128], hier dienen sie dazu den porenüberspannenden Bereich nachzuweisen. Weiterhin ist die Eindringtiefe in die Pore innerhalb des Membranfragments geringer als die in der Pore außerhalb der Membran, folglich kann eine porenüberspannende Membran angenommen werden.

Es wurden Kraft-Abstands-Kurven (Abbildung 4.22) in der Mitte einer bedeckten Pore (schwarz) und als Referenz eine Kurve auf den Porenstegen (rot) aufgenommen, um die nötigen Parameter wie Kontaktpunkt und INVOLS/Sensitivität zu bestimmen. Es zeigt sich

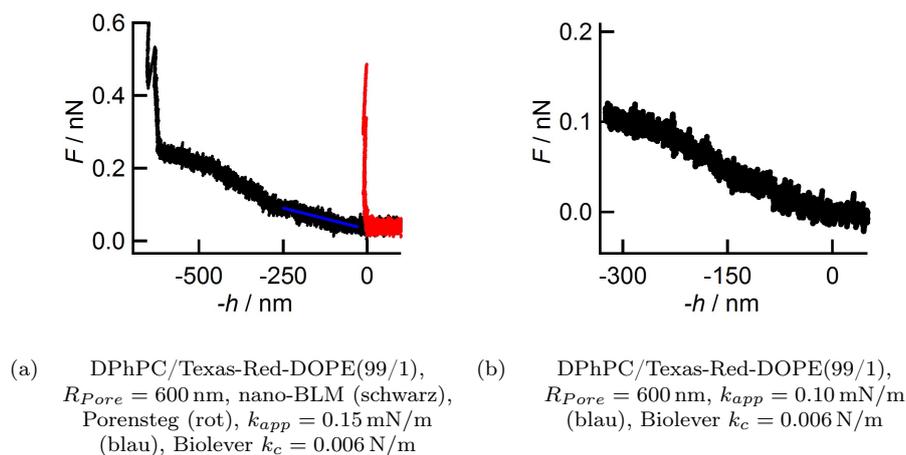


Abbildung 4.22: Kraft-Abstands-Kurven unterstützter, porenüberspannender Lipiddoppelschichten. a) verdeutlicht, dass im Gegensatz zu hybriden Systemen die Membran (schwarz) auf Höhe des Porenrandes (rot) ist und durch die blaue Linie wurde die apparente Federkonstante bestimmt. b) zeigt ein weiteres Indentationsereignis, die Antwort ist über einen Indentationsbereich von etwa 150 nm linear, anschließend zeigt sich ein nicht lineares Verhalten.

auch hier ein lineares Indentationsereignis bis zu einer Tiefe von 150 nm. Allerdings beginnt dieses Ereignis auf Höhe des Porenrandes. Die Kraft-Indentations-Kurven zeigen über eine Länge von über 500 nm keine Durchbruchereignisse, folglich werden diese Membranen nicht durch Flächenvergrößerung oberhalb eines kritischen Wertes zerstört.

Die apparente Federkonstante für diese Membranen wurde in dem anfänglichen linearen Bereich, wie in a) gezeigt, bestimmt. Die mittlere apparente Federkonstante für unterstützte, porenüberspannende DPhPC Lipiddoppelschichten beträgt $k_{app,avg} = (0.21 \pm 0.05)$ mN/m. Die Tatsache der wesentlich niedrigeren Rückstellkräfte, sowie das Fehlen von Durchbruch-

sereignissen während der Indentation lassen den Schluss zu, dass die Flächenvergrößerung während der Indentation durch ein Nachfließen von Lipiden aus dem Reservoir auf den Porenstegen kompensiert wird. FRAP Experimente von Weiskopf *et al.* an unterstützten, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten [39] zeigen Diffusionskoeffizienten im Bereich von $D = (3.8 \pm 0.5) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, dies sind mit Diffusionskoeffizienten von festkörperunterstützten Membranen vergleichbare Werte. Hier konnte gezeigt werden, dass Lipide zwischen Membranreservoir auf den Stegen und dem porenüberspannenden Teil ausgetauscht werden. Im Gegensatz zu hybriden Systemen diffundieren hier Lipide aus beiden Schichten frei über das Substrat.

Trotz der geringeren Diffusionskonstanten im Vergleich zu hybriden, porenüberspannenden Membranen, zeigen unterstützte, porenüberspannende Lipiddoppelschichten apparente Federkonstanten die um einen Faktor 100 niedriger sind. Aufgrund der niedrigen Adhäsionsenergie zwischen Membran und hydrophilen Porenstegen im Vergleich zu der sehr hohen Energie der Membran auf den hydrophobisierten Stegen von hybriden Systemen, ist zu erwarten, dass die Vorspannung in diesen Membranen wesentlich geringer sind.

Die Beiträge zu der elastischen Antwort werden folglich Verbiegung und nötige Kraft, um Lipide von dem Rand in die Pore zu ziehen, sein. Schematisch ist ein solches Indentationsergebnis in Abbildung 4.23 dargestellt.

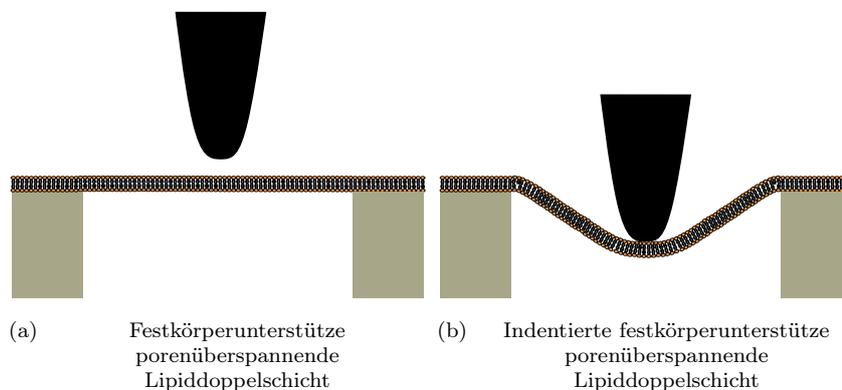


Abbildung 4.23: Die Schemazeichnungen zeigen wie sich auf porösem Si/SiO₂ Oberflächen präparierte Lipiddoppelschicht verhält. Sie liegt planar mit dem Porenrand auf. Während einer Indentation bleibt der Abstand zwischen zwei Lipiden konstant und wird nicht verändert, da Lipide von dem Porenrand während der Indentation in die Pore nachfließen.

4.4 Vergleich der artifiziiellen porenüberspannenden Membranen

Die vorgestellten experimentellen Ergebnisse führen zu fundierten Schlüssen über die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen freitragenden Membransysteme. Hybride Membranen (Abb. 4.8 a)) zeigen apparente Federkonstanten im Bereich von einigen

10 mN/m und bei sehr geringen Indentationstiefen treten Durchbruchereignisse auf. Ähnliche Befunde wurden für BLM Membranen von Ovalle-Garcia *et al.* [48] gefunden. BLMs gespannt über Aperturen mit einem Durchmesser von $15\ \mu\text{m}$ zeigen ebenfalls eine lineare Antwort während der Indentation und ebenso Durchbruchereignisse. Die gefundenen apparenten Federkonstanten von ca. $3\ \text{mN/m}$ sind etwa einen Faktor 10 niedriger als die hier präsentierten Ergebnisse für hybride Systeme. Dies kann durch den erheblich größeren Porenradius begründet werden.

Unterstützte Membranen weisen niedrigere apparente Federkonstanten um die $100\ \mu\text{N/m}$ auf und keine Durchbruchereignisse während der Indentation, sogar bei erheblichen Flächenvergrößerungen von 20% und mehr.

Die Einflüsse auf die elastischen Antworten setzen sich aus verschiedenen Prozessen zusammen: Biegung, Dehnung der Membran und Nachfließen von Material von den Porenstegen. In Abhängigkeit von Präparationstechnik, Membranzusammensetzung und Wechselwirkung zwischen Membran und Substrat haben diese Prozesse einen unterschiedlich großen Beitrag. Dehnung kann noch unterteilt werden zu Flächenvergrößerung während der Indentation und Vorspannung innerhalb einer Membran. Die gezeigten Experimente legen für hybride, porenüberspannende Membranen eine hohe Vorspannung nahe. Der Vergleich der Flächenkompressionsmodule für DPPC [5] ($K_{A,DPPC,gel} \approx 1000\ \text{mN/m}$ und $K_{A,DPPC,fluide} \approx 100\ \text{mN/m}$) bestätigt auch den Trend in den gefundenen Durchbruchslängen. DPhPC hingegen ist zwar ein Lipid in der fluiden Phase, hat jedoch ein Flächenkompressionsmodul $K_{A,DPhPC} \approx 670\ \text{mN/m}$ [129]. Dies ist wesentlich höher als fluides DPPC und erklärt ebenfalls die relativ hohe Flächenvergrößerung bis zu dem ersten Durchbruchereignissen der Membranen. Mischungen von DPPC mit Cholesterol zeigen ebenfalls die gleichen Tendenzen. Cholesterol erhöht in fluiden Membranen das Flächenkompressionsmodul [28]. Dies erklärt die gefundenen Tendenzen der apparenten Federkonstante im Vergleich zu reinen DPPC Membranen und ebenfalls den Trend für die Durchbruchslängen.

Ähnliche Experimente wurden mit *S-Layern* [16] und Graphit Monolagen [18] auf porösen Siliziumsubstraten mit vergleichbaren Porenradien durchgeführt. Im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen weisen die Kraft-Indentations-Kurven deutlich andere Charakteristika auf. So zeigen beide Systeme keine lineare Antwort sondern ein kubisches Verhalten der Kraft mit steigender Eindringtiefe. Steltenkamp *et al.* [15] hingegen fanden für Membranen auf porösen Substraten ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen Kraft und Eindringtiefe. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lipidmembran durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Kopfgruppe und einer negativ geladenen Oberflächenfunktionalisierung präpariert. Die in dieser Arbeit gefundenen apparenten Federkonstanten liegen ebenfalls im Bereich von einigen mN/m.

Der Porenradius hingegen war um einen Faktor 4 bis 10 kleiner als in den vorgestellten Experimenten, was die hohen apparenten Federkonstanten erklären kann. Zusammengefasst können folgende Schlüsse für die vorgestellten porenüberspannenden Membranen getroffen werden:

- Hybride, porenüberspannende Membranen bilden eine freistehende Lipiddoppelschicht unterhalb des Porenrandes, unterstützte, porenüberspannende Membranen sind in gleicher Höhe zu den Porenrändern.
- Spannungen innerhalb einer Membran bilden den Hauptbeitrag der elastischen Antworten. Hybride Membransysteme haben keine Möglichkeiten Flächenvergrößerungen der unteren Lipidschicht zu kompensieren, daher kommt es zu Durchbruchereignissen. Unterstützte, freistehende Membranen kompensieren Flächenvergrößerungen durch das Nachziehen von Lipidschichten von den Stegen in die Pore.
- Für hybride Membransysteme zeigt die Lipidphase einen Einfluss auf Durchbruchslängen und die apparente Federkonstante.
- Je größer der Porenradius desto niedriger ist die apparente Federkonstante.
- Der porenüberspannende Teil der Membran hat eine höhere freie Energie als die auf den Porenstegen adhärennten Membranteile. Daraus lässt sich eine Vorspannung in der Membran postulieren. Die Vorspannung ist für hybride, porenüberspannende Membranen wesentlich größer als für unterstützte, porenüberspannende Membranen. Die apparente Federkonstante beschreibt die Vorspannung innerhalb einer Membran.
- Die Oberflächenfunktionalisierung hat einen Einfluss auf die apparente Federkonstante und Durchbruchslängen einer Membran. Auf CPEO3 kann eine rudimentäre untere Lipiddoppelschicht angenommen werden, aufgrund der weniger dichten Packung der CPEO3 Funktionalisierung im Vergleich zu der OT Funktionalisierung. Die Vorspannung von Membranen auf CPEO3 ist geringer als auf OT. Die rudimentäre untere Lipidschicht kann Flächenvergrößerungen besser kompensieren, wodurch Durchbruchereignisse später stattfinden.
- Je höher das Flächenkompressionsmodul einer Membran, desto höher ist die apparente Federkonstante und desto später treten Durchbruchereignisse auf.

Wie in den bereits erwähnten Arbeiten wurden die Daten mittels geeigneter theoretischer Modelle weiter prozessiert um mechanische Parameter für die einzelnen Modellsysteme zu bestimmen. Dies wird in Abschnitt 6 vorgestellt.

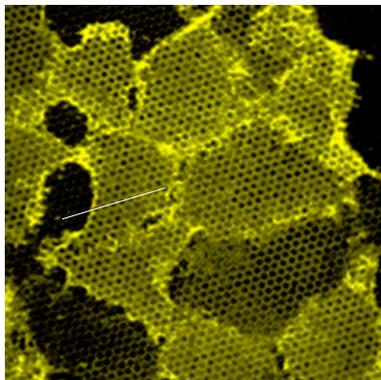
Kapitel 5

Ergebnisse und Interpretation - Zellmembranen

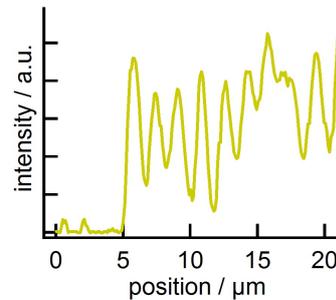
Lipiddoppelschichten bilden einen Hauptbestandteil von biologischen Membranen, jedoch nicht den einzigen. Ein hoher Anteil an Proteinen ist in der Zellmembran vorhanden. Einige solcher Proteine verbinden die Zellmembran mit dem Zytoskelett der Zelle [7, 130]. Diese Kombination aus flüssig-kristalliner Matrix und Biopolymeren die in dieser Matrix verankert sind, beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Zellmembranen maßgeblich. Daher ist es interessant, die mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Zellmembranen zu untersuchen, um den Einfluss der Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett orts aufgelöst zu bestimmen. Eine ähnliche Untersuchung wurde von Merkel *et al.* an ganzen Zellen durchgeführt [7]. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine lokal aufgelöste Studie der basolateralen Zellmembran von MDCK II Zellen präsentiert. Durch die Verwendung von porösen Substraten ist es möglich, lokale Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften der Zellmembran zu untersuchen, und der Heterogenität von Zellmembranen Rechnung zu tragen. Basolaterale Zellmembranen von MDCK II Zellen wurden auf Gold bedampften Substraten mittels der Lysis-Squirting Technik präpariert. Die Zellmembran, sowie extrazelluläre Matrix (ECM) und Teile des Zytoskeletts bleiben auf dem Substrat zurück und bilden eine heterogene Membran [119]. Im Folgenden wird die Präparation von basolateralen Membranfragmenten mit fluoreszenzmikroskopischen Färbungen charakterisiert, und mit rasterkraftmikroskopischen Studien porenüberspannender Zellmembranfragmente verglichen. Kraft-Indentations-Experimente wurden analog zu den künstlichen Membranen in der Mitte einer Pore durchgeführt und die apparente Federkonstante bestimmt. Hierbei wurden Experimente an nativen und fixierten Zellmembranen durchgeführt, um den Einfluss des Biopolymernetzwerkes zu bestimmen.

5.1 Charakterisierung basaler Zellmembranen

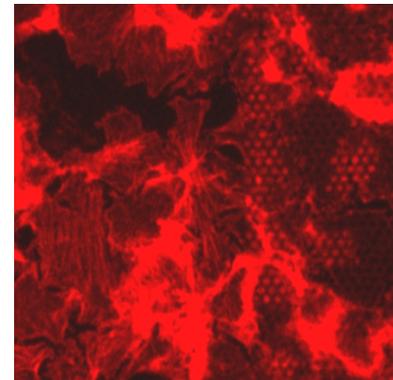
Abbildung 5.1 zeigt einige Aufnahmen von basolateralen Zellmembranfragmenten auf porösen Substraten, die mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen wurden. In a) ist



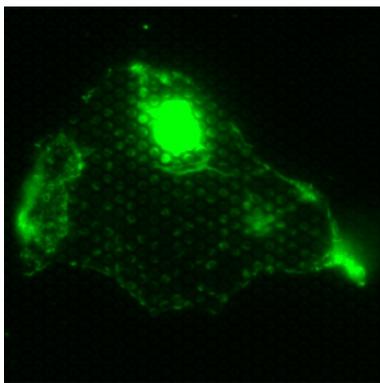
(a) $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$, Fluoreszenz/CLSM (FITC), YFP-Protein, unfixiert



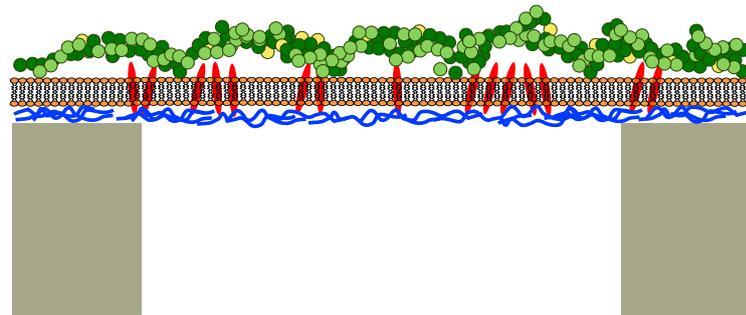
(b) Intensitätsprofil aus a)



(c) $55\ \mu\text{m} \times 55\ \mu\text{m}$, Fluoreszenz (Alexa561), Phalloidinfärbung von Aktin, fixiert, Si/SiO₂/Poly – D – lysin,



(d) Fluoreszenz (Alexa488), Phalloidinfärbung von Aktin, unfixiert, Si/SiO₂/Poly – D – lysin,



(e) Schema eines freistehenden Membranfragmentes über einer Pore.

Abbildung 5.1: a) Die Zellmembran von genetisch manipulierten Zellen, welche ein gelb fluoreszierendes Protein in der Zellmembran haben, präpariert auf porösem Si/SiO₂ Oberflächen mit einem Porenradius von 600 nm. b) Das Intensitätsprofil zeigt porenüberspannende Zellmembran. unbedeckte Poren außerhalb des Zellmembranfragments zeigen keine Fluoreszenz, wohingegen Poren innerhalb des Fragments gelb fluoreszieren. Eine Färbung von Aktin mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin an fixierten und unfixierten Membranen auf porösen Substraten ist in c) und d) gezeigt. Schematisch wird ein freistehendes Membranfragment in d) verdeutlicht. Oberhalb, der Lipiddoppelschicht der Rastersonde zugewandt, befindet sich ein Aktingerüst (grün) und unterhalb, dem Substrat zugewandt, die extrazelluläre Matrix (blau).

eine Aufnahme von Zellmembranfragmenten einer MDCK II Zellmutante gezeigt. Das ABCG2 Membrantransporterprotein wurde in dieser Mutante mit einem gelbfluoreszierenden Farbstoff modifiziert. Dieses Protein kommt nur in der Zellmembran vor, daher kann aus den Fluoreszenzintensitäten in b) geschlossen werden, dass Zellmembran über die Poren gespannt ist. Präpariert wurden sowohl native, unfixierte Membranen, als auch mit

Paraformaldehyd behandelte, fixierte Zellmembranen [131]. Fixierung bedeutet, dass die Biopolymere innerhalb des Zellmembranfragmentes sich untereinander, durch Ausbildung von Bindungen, vernetzen. Die Färbung des Aktinskeletts durch Fluoreszenzmarkiertes Phalloidin an unfixierten und fixierten Proben ist in c) bzw. d) gezeigt. Es ist deutlich, dass Reste des Aktinskeletts während der Präparation mit dem Fragment assoziiert bleiben. Ein Zellmembranfragment setzt sich demzufolge aus dem restlichen Aktinskelett an der Innenseite der Zelle, der Zellmembran und der extrazellulären Matrix (ECM) zusammen (vgl. Abbildung 5.1 e)). Ähnliche Ergebnisse über die Präparation basolateraler Membranfragmente auf planaren Substraten wurden schon von Ziegler *et al.* berichtet [119]. Zellmembranfragmente sind ein äußerst heterogenes, porenüberspannendes System, das im Folgenden mittels Kraft-Indentations-Experimenten untersucht wird.

Der Vergleich von Fluoreszenzaufnahmen des Aktinskeletts mit topographischen Abbildungen der entsprechenden Fragmente zeigt ähnliche bis identische Strukturen (Abbildung 5.2). Stark fluoreszierende, aktinreiche Bereiche zeigen im AFM deutliche Erhöhungen, wie es in den Randbereichen des fixierten Fragmentes in a) und b) sehr gut zu erkennen ist. Anhand des Höhenprofils entlang der Linie in a) kann zwischen unbedeckten Poren und bedeckten Poren unterschieden werden. Die Eindringtiefe des Cantilevers bei einer Kraft von etwa 0.5 nN in eine unbedeckte Pore beträgt ca. 375 nm während in einer bedeckten Pore zwischen 100 bis 250 nm gemessen wird. Ein unfixiertes Zellfragment d) und das entsprechende Höhenprofil f) zeigen schon bei geringeren Ladekräften von 0.3 nN Eindringtiefen von 250 nm bis zu 375 nm auf bedeckten Poren. Bei einem unfixierten Membranfragment kann nicht immer allein durch die Höheninformation zwischen einer bedeckten und unbedeckten Pore unterschieden werden, jedoch zeigen die Fluoreszenzfärbungen e), dass eine Membran die Pore bedeckt. Der Vergleich der Eindringtiefen für fixierte und unfixierte Membranfragmente zeigt schon deutlich den zu erwartenden versteifenden Effekt bei Fixierung eines Membranfragmentes mit Paraformaldehyd [11]. Das Höhenprofil f) zeigt auf den Porenstegen innerhalb des Fragments im Vergleich zu den blanken Porenstegen die Dicke der Zellmembranfragmente, die gemessen an einigen Fragmenten im Mittel 58 ± 12 nm beträgt. Dieser Wert ist gut vergleichbar mit den gefundenen Membrandicken auf planaren Substraten [119].

Etablierte Methoden, wie z.B. Mikropipetten Aspirationsexperimente [7], haben den Nachteil, dass keine ortsaufgelösten Daten gewonnen werden, und viskoelastische Eigenschaften des Zellinneren sowie Druckveränderungen ebenfalls die Messung beeinflussen können. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen ganzer Zellen in Abhängigkeit des osmotischen Druckes verdeutlichen, dass in diesen Messungen Druck und das Zellinnere einen maßgeblichen Beitrag für die gemessenen Parameter geben [11]. Die so bestimmten Eigenschaften, wie z.B. Elastizitätsmodule der Zellen, können zwar ortsaufgelöst aber nicht unabhängig von dem viskosen Inneren der Zelle aufgenommen werden. Durch porenüberspannende Zell-

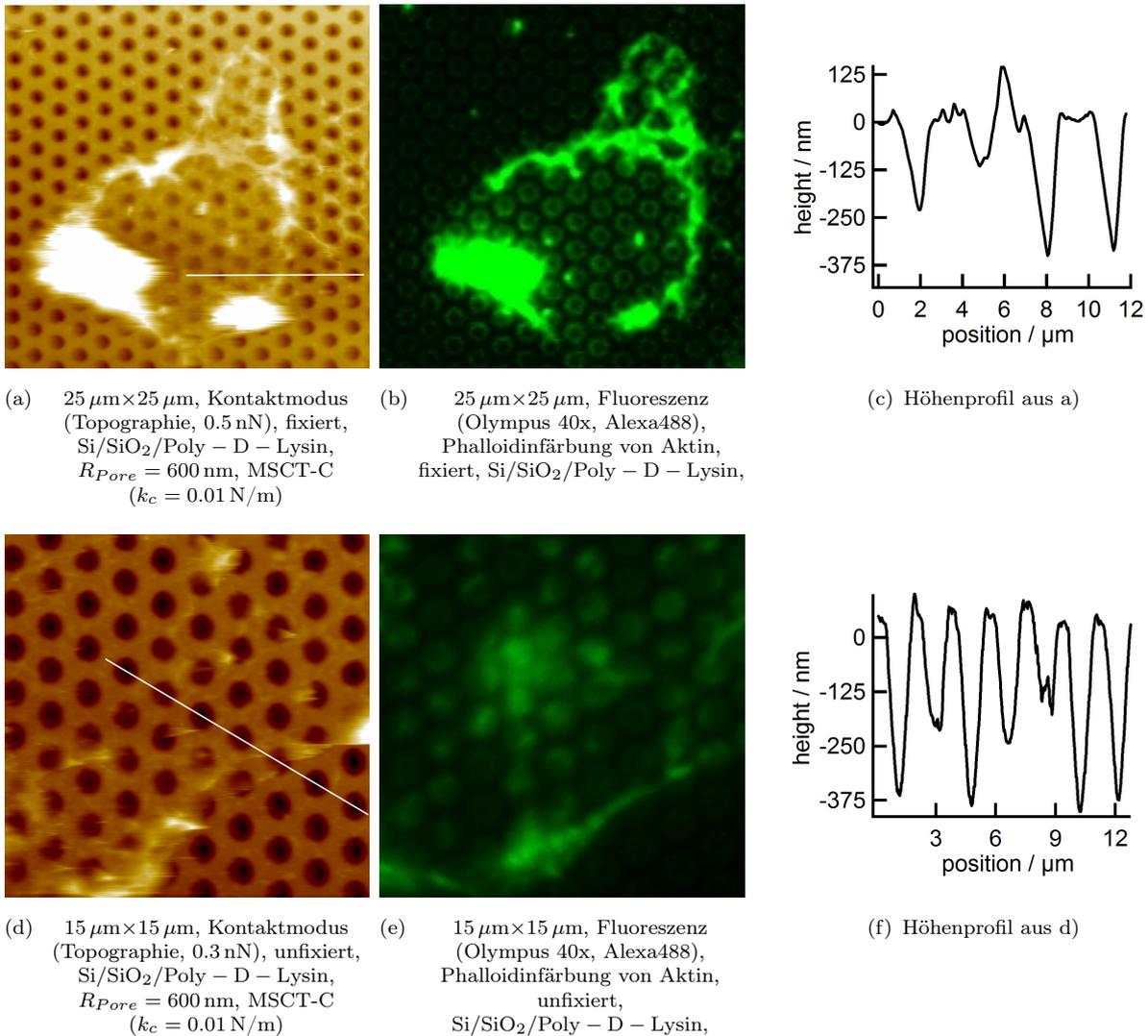
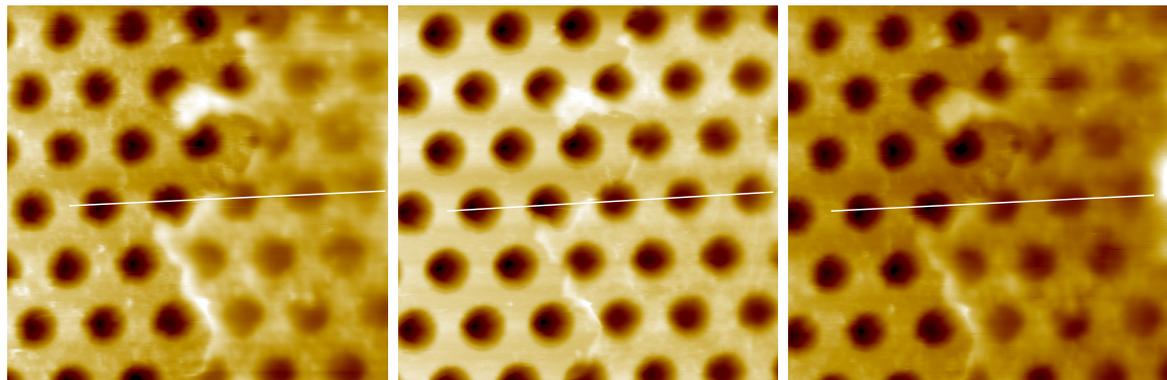


Abbildung 5.2: Der Vergleich von topographischen Informationen (a, d) und der Phalloidin-färbung des Aktinskelettes (b, d) zeigt deutlich Übereinstimmungen, Bereiche mit hohem Aktinanteil stellen sich in der Topographie als Höhen dar, wie es an den Rändern des Fragmentes sehr gut zu erkennen ist. Ein Höhenprofil (c, f) verdeutlicht den Unterschied zwischen bedeckten Poren und unbedeckten Poren anhand unterschiedlicher Eindringtiefen. Sowohl in fixierten (a, b, c) als auch in unfixierten (d, e, f) Proben konnte das Aktinskelett angefärbt und das Fragment mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden. Fixierte Membranfragmente zeigen niedrigere Eindringtiefen als unfixierte.

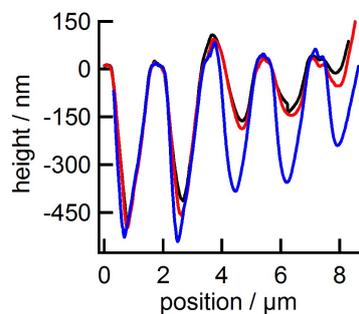
membranen sind lokale Untersuchungen auf einer sub-Mikrometer Skala ohne Einfluss des Zellinnenlebens möglich. In Abhängigkeit des Porenradius und des Porenabstandes kann so die Elastizität der Zellmembran kartiert werden.

5.2 Elastische Eigenschaften basolateraler Zellmembranen

Die elastischen Eigenschaften von Zellmembranen wurden, wie bereits für die Modellsysteme gezeigt, durch Rasterkraftmikroskopie bestimmt. Ein Membranfragment wurde im Kontaktmodus bei einer niedrigen, anschließend einer hohen und dann wieder bei der ursprünglichen Ladekraft abgebildet (Abbildung 5.3). In einer Abbildung mit geringer Ladekraft (Abb. 5.3



(a) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), fixiert, Si/SiO₂/Cr/Au, $R_{\text{Pore}} = 600\ \text{nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01\ \text{N/m}$)
 (b) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 1 nN), fixiert, Si/SiO₂/Cr/Au, $R_{\text{Pore}} = 600\ \text{nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01\ \text{N/m}$)
 (c) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), fixiert, Si/SiO₂/Cr/Au, $R_{\text{Pore}} = 600\ \text{nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01\ \text{N/m}$)



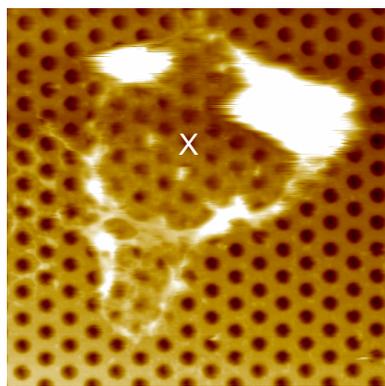
(d) Höhenprofile aus a) (schwarz), b) (blau) und c) (rot)

Abbildung 5.3: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der gleichen Position mit niedriger (a), hoher (b) und wieder niedriger Ladekraft (c) eines fixierten Membranfragmentes zeigen, dass die Poren auch bei starker Indentation durch die AFM Spitze bedeckt bleiben. Verdeutlicht wird dies in einem Vergleich der Höhenprofile (d) bei den verschiedenen Kräften. Auch nach der Einwirkung von hoher Kraft (blau) auf das Zellmembranfragment kehrt bei erneuter Abbildung mit niedriger Kraft die Membran in ihre Ausgangsposition zurück (Vgl. schwarz mit rot).

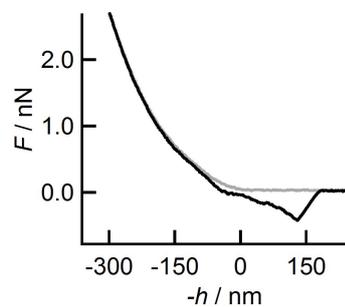
a)) werden leere Poren über 450 nm tief indentiert, während belegte Poren zwischen 50 nm und 150 nm tief dargestellt werden. Wird die Kraft erhöht, so wird die Zellmembran bis zu 350 nm tief in eine Pore gedrückt (Abb. 5.3 b)). In einer anschließenden Abbildung der Membran mit der ursprünglichen Kraft (Abb. 5.3 c)), zeigt sich die gleiche Situation wie in a). Die Höhenprofile entlang der Linien in Abb. 5.3 a)-c) zeigen, dass sich Zellmembranen

reversibel indentieren lassen. Die Membran stellt auch nach einer Abbildung mit hoher Ladekraft (blaue Linie) ihre ursprüngliche Form wieder her (rote Linie). Die Höhenprofile verdeutlichen auch die Heterogenität von porenüberspannenden Zellmembranen, da die Eindringtiefe um ± 100 nm variiert.

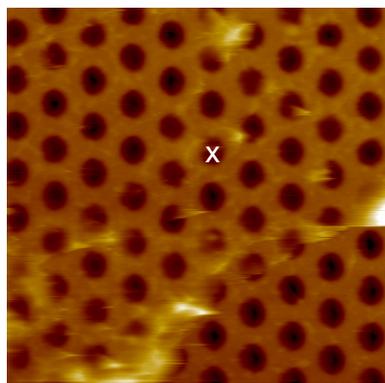
Das reversible Verhalten der Zellmembranen kann durch einen Vergleich der elastischen Antwort bei der Indentation und dem Zurückziehen des Cantilevers verdeutlicht werden. Dies wurde für unfixierte (Abb. 5.4 a) und b)) und fixierte (Abb. 5.4 c) und d)) Zellmembranfragmente durchgeführt. Die Kraft-Indentations-Kurven zeigen sowohl den



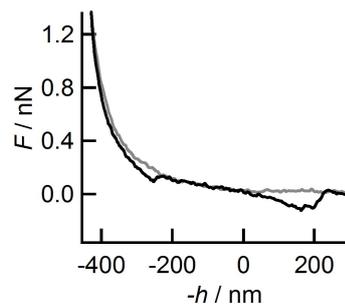
(a) $16.5 \mu\text{m} \times 16.5 \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), fixiert, Si/SiO₂/Poly – D – Lysin, $R_{\text{Pore}} = 600 \text{ nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$)



Markierung in a), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$)



(c) $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), unfixiert, Si/SiO₂/Poly – D – Lysin, $R_{\text{Pore}} = 600 \text{ nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$)



Markierung in c), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$)

Abbildung 5.4: Topographische Aufnahmen von fixierten (a) und unfixierten (c) Membranfragmenten auf porösen Substraten. An den entsprechenden Markierungen wurden Kraft-Indentations-Kurven aufgenommen. Dargestellt sind sowohl Indentation (schwarz) der Membran, als auch der Rückzug (grau) des Cantilevers. Sowohl für fixierte, als auch für unfixierte Membranen zeigen sich keine hysteretischen Effekte. Der Prozess der Indentation ist vollständig reversibel.

Indentationsvorgang der Membran (schwarz) als auch den Rückweg des Cantilevers (grau).

Weder für fixierte noch für unfixierte Zellmembranfragmente wurden hysteretische Effekte gefunden. Der Prozess der Indentation läuft vollkommen elastisch und reversibel ab, wie die Abbildungen 5.3 a)-c) es schon gezeigt haben.

Die Kraftkurven zeigen Indentationstiefen über 400 nm ohne Durchbruchereignisse, jedoch sind die elastischen Antworten der Zellmembranfragmente in beiden Fällen nur für geringe Indentationen durch ein lineares Verhalten zu beschreiben. Oberhalb von 100 nm weichen die Indentations-Kurven stark von dem linearen Verhalten ab.

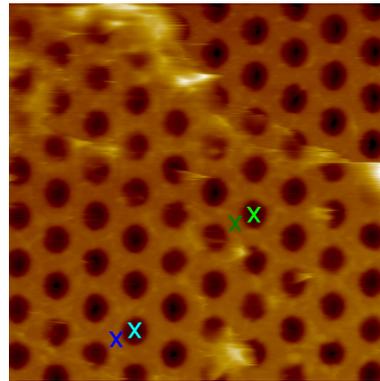
Zellmembranfragmente können eine erhebliche Flächenvergrößerung kompensieren ohne zu zerreißen. Zusätzlich hat die Fixierung der Membran keinen Einfluss darauf, ob die Membran zerreißt oder nicht. Dies legt, entsprechend den Ausführungen für unterstützte, porenüberspannende Membranen (Abschnitt 4.3.1), den Schluss nahe, dass Material von den Rändern in die Pore nachfließt, um den erhöhten Flächenbedarf zu kompensieren. Wie in Abschnitt 4 ausgeführt, zerreißen Lipiddoppelschichten bei etwa 5% Flächenvergrößerung. Membranen mit einem hohen Proteinanteil können bis zu 10% Flächenvergrößerung gedehnt werden [16]. Wird die Flächenvergrößerung durch einen Kegel abgeschätzt, betragen die Flächenvergrößerungen für porenüberspannende Zellmembranfragmente um die 20%, ohne Durchbruchereignisse aufzuweisen. Die Annahme, dass Material von den Rändern „nachfließt“ ist die einzige schlüssige Erklärung für die gefundenen Eigenschaften der freistehenden Zellmembranfragmente.

Die Reversibilität der Indentation zeigt, dass keine Energie dissipiert wird, d.h. die Membran verhält sich vollkommen elastisch. Messungen an ganzen Zellen zeigen oft eine Hysterese zwischen Indentation und Retraktion des *Cantilevers* [132]. Dies bedeutet, dass Energie durch Fließprozesse in der Membran abgebaut wird (s. hierzu auch Kapitel 6). Messungen der apikalen Zellmembran von MDCK II Zellen zeigen eine Hysterese [133]. Es sind jedoch auch Messungen an Zellmembranen bekannt, die keine oder nur geringe Hysteresen in Kraft-Abstands-Kurven zeigen [12].

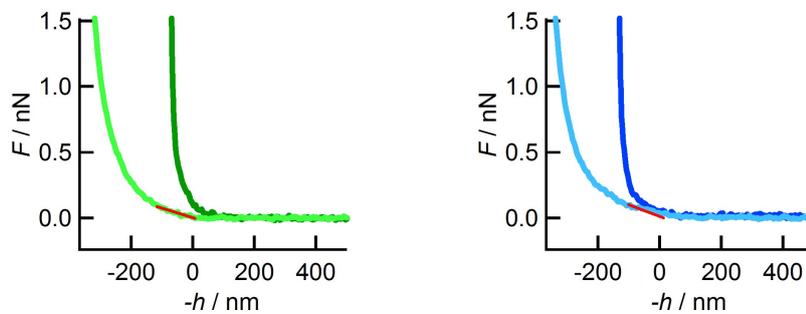
Das nicht-lineare Verhalten in Kraft-Indentations-Kurven bei hohen Eindringtiefen ist die größte Abweichung verglichen mit den in Kapitel 4 vorgestellten Experimenten. Zellmembranfragmente sind etwa um einen Faktor 10 dicker als Lipiddoppelschichten. Die Annahme liegt daher nahe, dass Verbiegung der Membran eine wichtigere Rolle einnehmen kann als für künstliche porenüberspannende Lipiddoppelschichten. Ebenso wird Dehnung und Verbiegung des Netzwerks aus extrazellulärer Matrix und Zytoskelett einen erheblichen Beitrag zu der elastischen Antwort geben, sowie die nötige Energie um Material von den Rändern in die Pore zu ziehen.

Die Quantifizierung der Kurven wurde dennoch mittels der apparenten Federkonstante

durchgeführt. Diese wurde über einen Indentationsbereich von 50 nm bestimmt, da in diesem Bereich eine annehmbare lineare Anpassung erreicht werden konnte. Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, wurden Kraft-Indentations-Kurven und Referenz-Kurven auf den benachbarten Porenrändern aufgenommen, um die elastische Antwort von Zellmembranfragmenten zu bestimmen. Betrachtet man typische Indentationsexperimente von unfixierten Zellmembranfragmenten auf Si/SiO₂/Poly – D – Lysine porösen Substraten (Abbildung 5.5) so stellt man fest, dass auch Randkurven nicht das typische Verhalten auf harten Substraten zeigen. Kraft-Abstands-Kurven auf den Porenstegen zeigen nicht-lineare Ereignisse



(a) 15 $\mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), fixiert, Si/SiO₂/Cr/Au, $R_{\text{Pore}} = 600 \text{ nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$)



(b) grüne Markierungen in a), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$), $k_{\text{app},100 \text{ nm}} = 0.5 \text{ mN/m}$ (rot) (c) blaue Markierungen in a), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$), $k_{\text{app},100 \text{ nm}} = 0.7 \text{ mN/m}$ (rot)

Abbildung 5.5: Kraft-Indentations-Kurven auf einem unfixierten Membranfragment an den in dem Höhenbild (a) angegebenen Positionen. Stets ist der Porenrand (dunkelgrün, dunkelblau) mit der elastischen Antwort der Membran in der Pore (hellgrün, hellblau) in einem Graphen gezeigt. Zusätzlich wurde die apparente Federkonstante über eine Indentationstiefe von 100 nm (rot) bestimmt.

von bis zu 100 nm Länge bis der typische Kontakt mit harten Oberflächen entsteht. Da aus den Abbildungen schon bekannt ist, dass die Dicke einer Membranpräparation etwa 50 nm beträgt, lassen sich die Ereignisse auf dem Porenrand durch eine Kompression des Materials zwischen Spitze und Porenrand erklären. Die bestimmten apparenten Federkon-

stanten für nicht fixierte Zellmembranfragmente liegen in einem Bereich von 0.2 mN/m bis 2.5 mN/m bei einer maximalen Eindringtiefe von 100 nm. Der Mittelwert wurde zu $\langle k_{app} \rangle = (0.8 \pm 0.4)$ mN/m bestimmt. Wie bereits der Fehler der mittleren apparenten Federkonstante andeutet, streuen die Ergebnisse sehr stark. Dies verdeutlicht nochmals die Heterogenität von nativen Membranen. Die apparente Federkonstante variiert stark innerhalb eines Membranfragmentes. Die vorgestellten Experimente lassen folgende Aussagen für porenüberspannende, basolaterale Zellmembranfragmente von MDCK II Zellen zu:

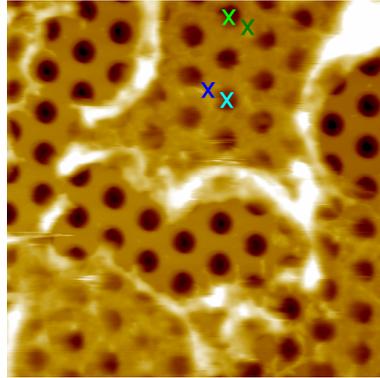
- Basolaterale Zellmembranfragmente von MDCK II Zellen zeigen ein vollkommen elastisches, reversibles Verhalten.
- Die apparenten Federkonstanten sind entsprechend der Heterogenität der Membran breit verteilt.
- Flächenvergrößerungen von bis zu 20% führen nicht zu der Zerstörung der Membran.

5.3 Einfluss der Fixierung auf die Elastizität

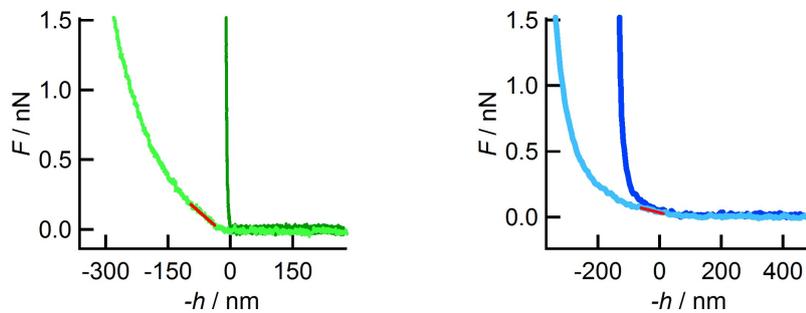
Fixierung einer Zellmembran durch Paraformaldehyd führt zu einer Vernetzung der Biopolymere (z.B. Proteine) und somit zu einer Stabilisierung der Zellmembran. In Abbildung 5.6 sind Kraft-Indentations-Kurven und deren Positionen in einem Höhenbild auf einem fixierten Zellmembranfragment dargestellt.

Fixierte Fragmente zeigen deutlich höhere Kräfte bei gleichen Eindringtiefen als unfixierte Proben (vgl. Abbildung 5.2). Vergleicht man die hier für fixierte Membranen gefundenen apparenten Federkonstanten mit denen aus Abbildung 5.5, so erkennt man an den Zahlenwerten, aber auch an der Kurvenform, dass eine Versteifung stattgefunden hat. Dies war zu erwarten, doch streuen die Ergebnisse für die apparenten Federkonstanten bei fixierten Proben noch stärker (von 1.4 mN/m bis zu 8 mN/m), wie ein Vergleich der Histogramme in Abb. 5.7 zeigt. Im Mittelwert wurde $\langle k_{app} \rangle = (4 \pm 2)$ mN/m gefunden. Trotz der sehr breiten Verteilung beider Histogramme zeigt ein Student-t-Test einen signifikanten Unterschied für fixierte und unfixierte Membranen. Sie zeigen, ebenso wie die Mittelwerte der apparenten Federkonstanten, den Effekt der Versteifung durch die Fixierung der Zellmembranfragmente. Ein ähnlicher Befund über die Fixierung konnte für apikale Zellmembranfragmente von MDCK II Zellen gezeigt werden [133]. Indentationsexperimente eines Membranfragmentes, vor und nach Fixierung, zeigen deutlich eine Versteifung der Membran. Die bereits getroffenen Aussagen lassen sich hierdurch erweitern:

- Eine Fixierung der Membran führt zu höheren und breiter verteilten apparenten Federkonstanten.



(a) $16.5 \mu\text{m} \times 16.5 \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, 0.3 nN), fixiert, Si/SiO₂/Cr/Au, $R_{\text{Pore}} = 600 \text{ nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$)



(b) grüne Markierungen in a), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$), $k_{\text{app},100 \text{ nm}} = 2.7 \text{ mN/m}$ (rot) (c) blaue Markierungen in a), MSCT-C ($k_c = 0.01 \text{ N/m}$, $v_{\text{Ind}} = 2 \mu\text{m/s}$), $k_{\text{app},100 \text{ nm}} = 3.3 \text{ mN/m}$ (rot)

Abbildung 5.6: Kraft-Indentations-Kurven an einem mittels Paraformaldehyd (4%_{aq}, 40 min) fixierten Membranfragment an den in dem Höhenbild (a) angegebenen Positionen. Stets ist der Porenrand (dunkelgrün, dunkelblau) mit der elastischen Antwort der Membran in der Pore (hellgrün, hellblau) in einem Graphen gezeigt. Zusätzlich wurde die apparente Federkonstante bis zu einer Indentationstiefe von 100 nm (rot) bestimmt.

5.4 Einfluss von ECM und Zytoskelett

Sowohl die Verteilung von Aktinfilamenten innerhalb des Zellmembranfragmentes, als auch die von der Zelle gebildete extrazelluläre Matrix, sind sehr inhomogen und für die breite Verteilung der apparenten Federkonstanten verantwortlich. Höhenbild und Höhenprofil in Abbildung 5.8 zeigen deutlich Filamente mit einer Höhe von bis 100 nm. Die exakte Höhenbestimmung ist aufgrund des inhomogenen Untergrunds nicht möglich. Es ist aber offensichtlich, dass die Filamente auch Poren überspannen und daher ebenfalls einen Beitrag zu der Biegesteifigkeit geben.

Mittels Rasterelektronenmikroskopie ist es möglich, Aufnahmen des Materials über den porösen Substraten zu machen. Die Präparation solcher Proben erfordert einerseits fixierte Proben und andererseits kann, da die Messungen bei Drücken im Bereich von 10^{-6} bar

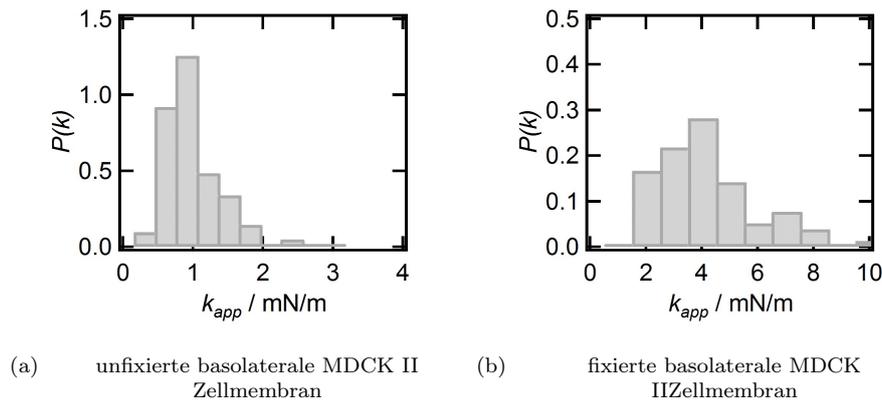


Abbildung 5.7: Histogramm (Wahrscheinlichkeitsdichte $P(k)$) der apparenten Federkonstanten von fixierten (a) und unfixierten (b) Zellmembranfragmente. Eine Fixierung führt zu einer deutlichen Erhöhung aber breiter verteilten apparenten Federkonstante.

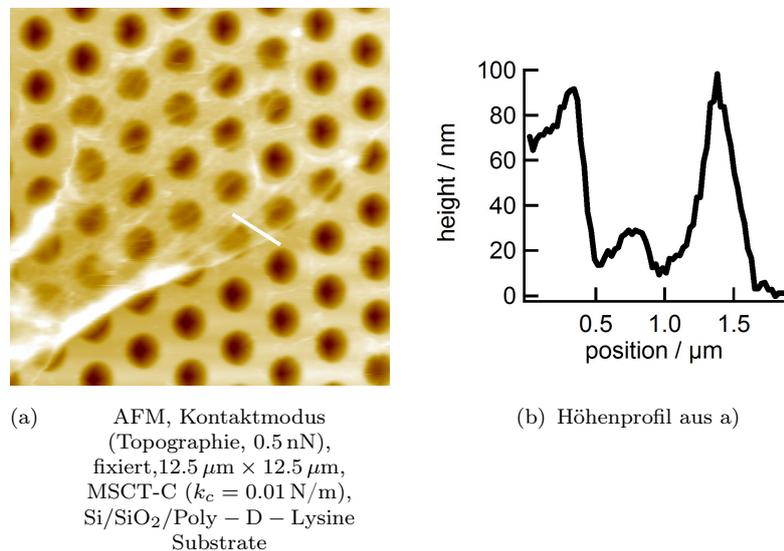
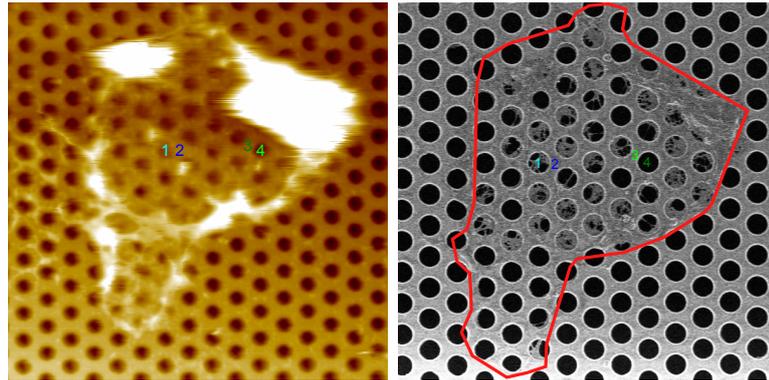


Abbildung 5.8: Abbildung eines Zellmembranfragmentes mit stark ausgeprägten Filamenten. Diese restlichen Teile des Zytoskeletts überspannen auch die Poren. Ein Höhenprofil zeigt eine Filamenthöhe von 50 bis 100 nm.

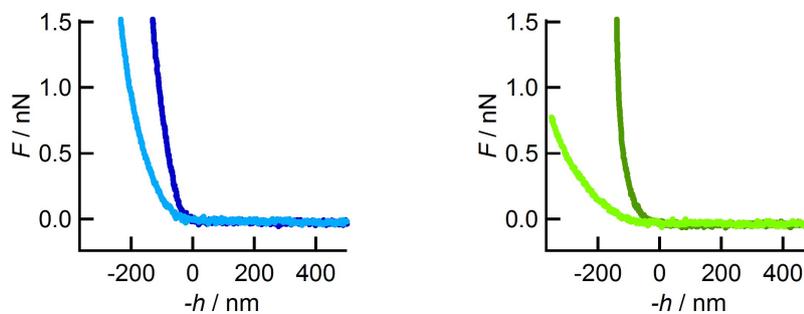
durchgeführt werden, davon ausgegangen werden, dass nur extrazelluläre Matrix und Zytoskelett abgebildet werden, da Lipiddoppelschichten bei dem Trocknungsvorgang zerstört werden. Abbildung 5.9 vergleicht die Steifigkeit von Zellmembranen anhand von solch einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme. Das generelle Verhalten der Kurven ist in Abhängigkeit vom Zytoskelett und extrazellulärer Matrix deutlich unterschiedlich. Je mehr Material in der REM Aufnahme dargestellt ist, desto steiler steigen die Kraft-Indentations-Kurven an, und zeigen auch in dem anfänglichen linearen Bereich höhere apparente Federkonstanten.

Dies kann auch durch einen Vergleich der apparenten Federkonstanten, der Topographie



(a) $16.5\ \mu\text{m} \times 16.5\ \mu\text{m}$, Kontaktmodus (Topographie, $0.3\ \text{nN}$), fixiert, Si/SiO₂/Poly – D – Lysin, $R_{\text{Pore}} = 600\ \text{nm}$, MSCT-C ($k_c = 0.01\ \text{N/m}$)

(b) $16.5\ \mu\text{m} \times 16.5\ \mu\text{m}$, REM, fixiert



(c) Kraft-Abstands-Kurven (hellblau: porenüberspannende Membran, dunkelblau: Porenrand), MSCT-C $k = 0.01\ \text{N/m}$, $k_{app} = 2.8\ \text{mN/m}$

(d) Kraft-Abstands-Kurven (hellgrün: porenüberspannende Membran, dunkelgrün: Porenrand), MSCT-C $k = 0.01\ \text{N/m}$, $k_{app} = 1\ \text{mN/m}$

Abbildung 5.9: Vergleich von REM und topographischer Aufnahme eines fixierten Membranfragmentes. Das REM Bild zeigt gut die extrazelluläre Matrix und Zytoskelett. Anhand von Poren mit viel und wenig Material wird anschaulich der Einfluss von Filamenten und ECM dargestellt.

und der Färbung des Aktins innerhalb eines Patches verdeutlicht werden. Die dreidimensionale Darstellung in Abbildung 5.10 verdeutlicht die Topographie, welche mittels einer Fluoreszenzaufnahme des Aktins innerhalb des Membranfragmentes (gefärbt durch Alexa(488)-Phalloidin) texturiert wurde. Durch eine Balkendarstellung ist die apparente Federkonstante für einzelne Poren graphisch eingefügt worden. Deutlich zeigen Positionen mit einem erhöhten Aktingehalt auch eine erhöhte Steifigkeit des Membranfragmentes. Daraus lässt sich schließen, dass die elastische Antwort von Zellmembranfragmenten deutlich von der vernetzten Struktur des Zytoskeletts und der ECM beeinflusst wird. Zusätzlich wurde durch Behandlungen mit Mercaptoethanol und DNase I das Zytoskelett von Zellmembranfragmenten abgebaut. Dies führte zu einer Reduzierung der apparenten Federkonstante um 65% bzw. 44% [52]. Sowohl Fixierung, als auch Abbau des Zytoskeletts verdeutlichen dessen Einfluss auf die Biegesteifigkeit von Zellmembranen. Die Annahmen zu den mechanischen Einflüssen während der Indentation von Zellmembranen

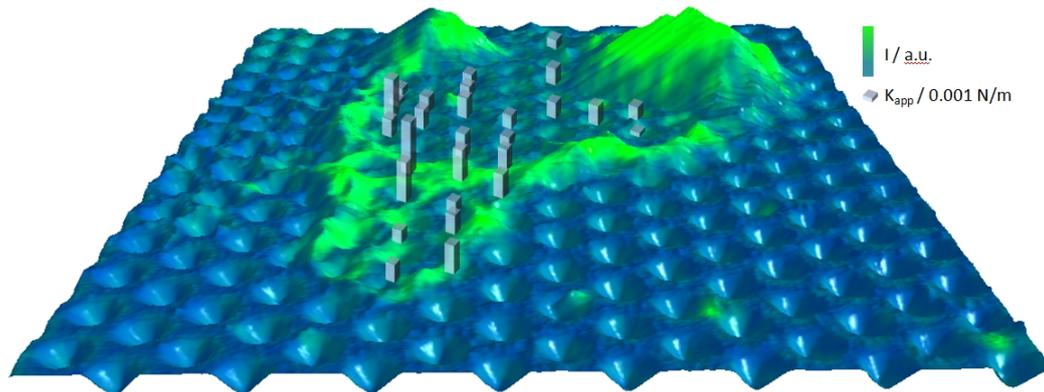


Abbildung 5.10: Darstellung der apparenten Federkonstanten in einem Vergleich mit Topographie (3D) und Aktgehalt (grüne Färbung) des Membranfragments. Höhere Fluoreszenzintensitäten bedeutet einen erhöhten Aktgehalt und zeigen, durch Balken dargestellt, auch eine erhöhte apparente Federkonstante.

lassen sich nochmals erweitern:

- Die apparente Federkonstante nimmt mit steigendem Aktgehalt in der Membran zu.

5.5 Diskussion nativer Zellmembranfragmente

Im Vergleich zu den artifiziellen Systemen liegen die apparenten Federkonstanten der nativen Zellmembranen zwischen den stark vorgespannten hybriden, porenüberspannenden Membranen und den weniger stark gespannten unterstützten, porenüberspannenden Membranen. Da Zellmembranfragmente deutlich dicker sind als die artifiziellen Modellsysteme, kommt der Einfluss durch Verbiegung bei wesentlich geringeren Eindringtiefen zum Tragen. Die Indentationsexperimente zeigen insgesamt eine höhere Vergleichbarkeit mit den unterstützten, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, als mit den hybriden, porenüberspannenden Membranen.

Vergleichbar zu den hier gefundenen Ergebnissen bezüglich des Einflusses des Zytoskeletts, fanden Merkel *et al.* [7] durch Untersuchungen an ganzen Zellen einen Einfluss des Zytoskeletts auf die elastischen Eigenschaften der Zellmembran. Mikropipetten Aspirationsexperimente an *Dictyostelium* und Mutanten, denen Myosin II, Talin oder beides fehlte, wurden von Merkel *et al.* durchgeführt. Beide Proteine sind wichtige Membrananker für das Zytoskelett. Es wurde in dieser Veröffentlichung gezeigt, dass die Kopplung der Membran an das Zytoskelett zu einer erheblichen Versteifung und somit einer Stabilisierung führt. Mutanten waren nicht immer in der Lage sich selbständig aus der Pipette zurückzuziehen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit dem Befund, dass Positionen mit erhöhtem Anteil

von Zytoskelett auch höhere elastische Antworten zeigen. Der wesentliche Unterschied ist die höhere Ortsauflösung der hier vorgestellten Methodik. Während bei Aspirationsexperimenten Aussagen über die gesamte Zelle getroffen werden, konnte hier eine mikroskopische Aussage über die Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett getroffen werden.

Messungen an der apikalen Zellmembran von MDCK II Zellen zeigen für unfixierte Membranfragmente vergleichbare apparente Federkonstanten zu den hier gezeigten basolateralen Membran [133] ($\langle k_{app,apikal} \rangle = (0.9 \pm 0.5) \text{ mN/m}$ und $\langle k_{app,basal} \rangle = (0.8 \pm 2) \text{ mN/m}$). Diese Experimente wurden in der gleichen Weise durchgeführt und ausgewertet, wie es in dieser Arbeit beschrieben ist. Durchbruchereignisse wurden auch im Falle von apikalen Membranen nicht detektiert. Obwohl die Zellen polar sind, weisen beide Zellseiten ähnliche mechanische Eigenschaften auf. Teilweise ist dies auf die Präparationstechnik zurückzuführen. Auch für die Präparation der apikalen Membran wurden die Zellen durch osmotischen Druck aufgebläht und somit Mikrovilli auf der Zelloberseite geglättet. Fixierung der apikalen Membran führte ebenfalls zu einer Erhöhung der apparenten Federkonstante. Für apikale Zellmembranen konnte gezeigt werden, dass Fixierungen mit Paraformaldehyd (PFA) weniger effektiv sind als solche mit Glutardialdehyd (GDA). GDA bewirkt eine wesentlich effektivere Vernetzung in der Zellmembran [11]. Der Effekt der Fixierung auf die apparente Federkonstante war für apikale Membranen wesentlich geringer als für basolaterale Membranen. In basolateralen Membranfragmenten zeigt die Fixierung ungefähr eine Erhöhung um den Faktor 4 in der apparenten Federkonstante, während in apikalen Fragmenten nur eine Verdopplung erreicht wird. Dennoch ist die Verteilung der apparenten Federkonstante, in beiden Fällen nach der Fixierung stark verbreitert.

Im Gegensatz zu der Reversibilität der basolateralen Membran, zeigen apikale Membranen ein viskoelastisches Verhalten. Mit steigender Geschwindigkeit wird eine Hysterese zwischen Indentation und Retraktion des Cantilevers sichtbar. Ähnliche Eigenschaften wurden an menschlichen Neutrophilen bereits gemessen [123]. Die Hysterese der Indentation von Zellen und Zellmembranen nimmt mit steigender Geschwindigkeit zu. Nach Fixierung zeigen die Zellmembranfragmente keine oder nur eine sehr geringe Hysterese verglichen mit den unfixierten Membranen.

Indentationsexperimente mittels Rasterkraftmikroskopie an freistehenden Membranen von Gram-negativen *murei sacculi* aus *escherichia coli* und *pseudomonas aeruginosa* zeigen im Gegenzug keine hysteretischen Effekte [12]. Für die Experimente wurde diese Membranen getrocknet und rehydriert, daher kann angenommen werden, dass in diesem Fall Lipiddoppelschichten größtenteils zerstört wurden und Zytoskelett sowie restliche Proteine den größten Einfluss auf die Messungen haben.

Allgemein zeigt dies, dass für die elastischen Eigenschaften von Zellmembranfragmenten ein

erheblicher Einfluss von Biopolymeren in und an der Membran besteht. Für basolaterale Membranen ist eine Fixierung mit PFA sehr effektiv, dies bedeutet, dass der Einfluss des Zytoskeletts für diese Membran wesentlich größer ist als für apikale Zellmembranfragmente. Diese Aussage wird unterstützt durch Mikropipetten Aspirationsexperimente [7], welche für Zellen mit einer guten Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett höhere Rückstellkräfte fanden. Zusammengefasst sind folgende Aussagen für porenüberspannende Zellmembranfragmente möglich:

- Basolaterale Zellmembranfragmente von MDCK II Zellen zeigen ein vollkommen elastisches, reversibles Verhalten.
- Flächenvergrößerungen von bis zu 20% führen nicht zu der Zerstörung der Membran.
- Die apparenten Federkonstanten sind entsprechend der Heterogenität der Membran breit verteilt.
- Die apparente Federkonstante nimmt mit steigendem Aktiningehalt in der Membran zu.
- Die Fixierung der Zellmembran führt zu einer etwa fünfmal höheren, aber auch breiter verteilten apparenten Federkonstante.
- Durch die strukturierten porösen Substrate ist es möglich eine Karte der elastischen Antworten eines Zellmembranfragments zu erstellen.

Durch die Kartierung der apparenten Federkonstante konnte ein Zusammenhang zwischen vorhandenem Zytoskelett und apparenter Federkonstante verdeutlicht werden. Messungen an ganzen Zellen führen zu gemittelten Werten über ein System, das auf kleinen Größen sehr inhomogen ist. Dies zeigt die Notwendigkeit, Untersuchungen auf einer sub-Mikrometer Skala durchzuführen, um die Einflüsse einzelner Komponenten, wie z.B. die Kopplung von Aktin und Zellmembran, orts aufgelöst zu untersuchen.

Kapitel 6

Mechanik porenüberspannender Membranen

Lipiddoppelschichten, der Hauptbestandteil von Zellmembranen, bilden eine ultra dünne, hoch flexible Membran. Das Studium der mechanischen Eigenschaften dünner Filme ist schon seit langem ein reges Betätigungsfeld, sowohl theoretischer als auch experimenteller Natur [12, 15, 16, 134–139]. Ziel ist es, die Mechanik der Deformation dünner Filme zu verstehen, Eigenschaften, wie das Elastizitätsmodul, zu bestimmen um letztlich die Mechanik einer Zelle zu verstehen und nachahmen zu können. Die Kombination von Eigenschaften in natürlichen Membranen ist bis heute durch synthetische Membranen noch unerreicht. Doch neuere Konzepte, wie Polymerosome aus Blockcopolymeren [140], ahmen das natürliche Verhalten von Lipiddoppelschichten nach. Es ist daher notwendig die mechanischen Eigenschaften natürlicher und nachgeahmter Systeme zu vergleichen.

Im Rahmen dieses Kapitels werden Modelle, zur Beschreibung der Deformation von runden, freistehenden Membranen vorgestellt. Es wird deren Anwendbarkeit auf die unterschiedlichen experimentellen Daten zur Indentation künstlicher und natürlicher Membranen diskutiert. Durch ein geeignetes Modell werden die mechanischen Parameter porenüberspannender Membranen charakterisiert und die Vergleichsmöglichkeiten der Modelle zu natürlichen Membranen diskutiert.

6.1 Vergleich von Modellen und Experimenten

Für die Bestimmung der mechanischen Parameter aus den experimentellen Daten, werden theoretische Ansätze aus der Literatur vorgestellt, und auf Ihre Anwendbarkeit überprüft. Hierzu werden die experimentellen Befunde der hybriden, porenüberspannenden Membranen und deren Implikation für ein Modell diskutiert. Folgende Fragestellungen werden hierzu bearbeitet:

- Kann das Material als isotrop angenommen und als Kontinuum betrachtet werden?
- Zeigt das Material elastische, plastische oder viskoelastische Eigenschaften bei der Deformation?
- Welche Deformationen können beitragen: Verbiegung, Dehnung, Scherung?
- Was passiert an den Rändern der Membran: Sind diese festgeklemmt oder frei beweglich? Existiert ein Membranreservoir auf dem Randbereich?
- Existiert eine Vorspannung in der Membran?

6.1.1 Kontinuumsannahme

Grundlage der meisten theoretischen Modelle ist die Annahme einer isotropen Membran, welche als ein Kontinuum beschrieben werden kann. Dies ist gegeben, wenn die Ausmaße der Membran sehr groß gegen die Dimensionen eines Lipids sind. Zusätzlich muss die Deformation klein, verglichen mit den Ausmaßen der Membran, sein. Die Dicke der Membranen liegen bei 4-6 nm [2], wohingegen die Geometrie der Poren in den vorgestellten Experimenten (s. Abbildung 4.1) bei einigen hundert Nanometern liegt. Die Annahme eines Kontinuums kann daher für die Ebene der Membran erfüllt werden [15].

Isotropie ist die Unabhängigkeit einer oder mehrerer Eigenschaften, wie z.B. das Elastizitätsmodul von den räumlichen Richtungen. Für fluide Lipiddoppelschichten kann, aufgrund von fehlender Fernordnung, ein isotropes Verhalten der Eigenschaften in der Ebene der Membran angenommen werden [6, 141]. Im Weiteren werden Membranen als isotrope, homogene, kontinuierliche zweidimensionale Körper betrachtet.

6.1.2 Deformationen einer Membran

Wirkt eine äußere Kraft F auf eine Membran ein, so kann diese deformiert werden. Es muss zwischen elastischer, plastischer und viskoelastischer Deformation unterschieden werden. Die Unterschiede sollen hier, anhand der Verformung eines Flächensegmentes mit der Fläche A_0 , für einfache Fälle veranschaulicht werden. Abbildung 6.1 zeigt die Deformation des Flächensegments durch Dehnung um den Betrag ΔA unter Einwirkung einer Kraft F entlang der

x-Koordinate. Drei für biologische Proben relevante Fälle können unterschieden werden:

1. Elastische Materialien: Der Körper relaxiert in seinen Ursprungszustand A_0 zurück. Dies ist im einfachsten eindimensionalen Fall durch eine Hooksche Feder beschreibbar. Diese zeigt kein zeitabhängiges Verhalten. Die durch die Dehnung der Feder in dieser gespeicherte Energie wird nach Abschalten der Kraft vollständig wieder hergestellt.
2. Viskoelastische Flüssigkeit (Maxwell Modell): Die Kombination von Feder und *Dashpot* in einer Reihe beschreibt viskoelastische Flüssigkeiten. Durch Einwirkung einer Kraft wird der *Dashpot* und die Feder gedehnt. Es wird mehr Energie in dem *Dashpot* dissipiert je länger die Kraft auf das Element einwirkt oder je langsamer die Kraft appliziert wird. Wird die Kraft abgeschaltet kehrt die Feder in Ihren Ursprungszustand zurück. Das gesamt Element bleibt jedoch, aufgrund der bereits im *Dashpot* dissipierten Energie (dem gedehnten Zustand), in einem gestreckten Zustand $A_0 + \Delta A'$, mit $\Delta A' < \Delta A$.
3. Viskoelastische Festkörper (Kelvin-Voigt Modell): Bei Abschalten der Kraft kehrt das Material in seinen Ursprungszustand A_0 zurück. Die parallele Schaltung einer Feder mit einem *Dashpot* zeigt, dass in diesem Material eine Rückstellkraft existiert, da die Feder die gespeicherte Energie vollständig wiederherstellen kann. Die Rückkehr des Kelvin-Voigt Elements in den Ausgangszustand A_0 ist durch die Energiedissipation des *Dashpots* beeinflusst und erfolgt innerhalb einer endlichen Zeit.

Die vorgestellten Experimente zu hybriden, porenüberspannenden Membranen (s. 4.2.2) zeigen ein kein geschwindigkeitsabhängiges Verhalten (s. Abbildung 4.9). Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Energie während der Indentation dissipiert und die Membran voll elastisch deformiert wird.

Die Richtung der wirkenden Kraft ist durch das experimentelle Vorgehen (s. Abbildung 4.8) auf Kräfte entlang der Normalen der Membran beschränkt. Weiterhin wurden die Membranen stets zentral indentiert und durch die Struktur des Substrates (s. Abbildung 4.1) kann die Diskussion auf runde, zentrosymmetrische Membranen beschränkt werden. Schema 6.1 b) zeigt die möglichen Deformationen eines Flächenelements unter Berücksichtigung der experimentellen Vorgaben und unter der Annahme eines zentrosymmetrischen Systems: Dehnung, Verbiegung durch Kräfte entlang der Flächennormalen und Scherung.

Im Allgemeinen werden Modelle, welche die Streckung von Membranen beschreiben der Membrantheorie zugeordnet und das Verbiegen durch die dünne-Platten-Theorie beschrieben [139]. Um die experimentellen Daten mittels geeigneter Modelle auszuwerten, muss zunächst der energetische dominierende Beitrag während der Membrandeformation identifiziert werden. Hierzu werden die einzelnen Beiträge erläutert und charakteristische Kraft-Abstands-Beziehungen gezeigt.

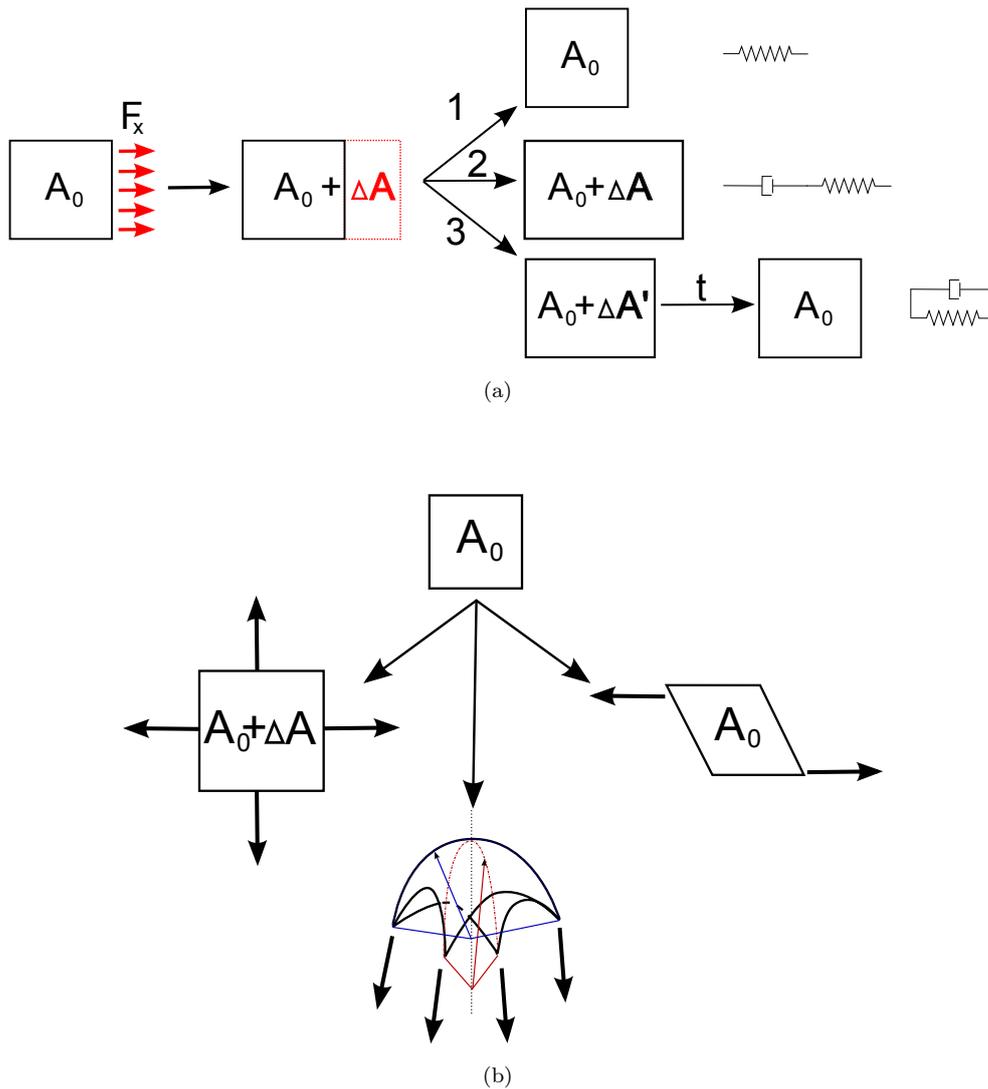


Abbildung 6.1: a) Darstellung der elastischen, plastischen und viskoelastischen Deformation eines Flächenelements A_0 . Entlang einer Raumrichtung wirkt eine Kraft F und streckt das Element um ΔA . Wird die Kraft abgeschaltet, sind drei mögliche Relaxationsprozesse dargestellt: 1. Elastische Materialien, 2. Viskoelastische Flüssigkeiten (Kelvin-Voigt Modell) und 3. Viskoelastische Festkörper (Maxwell Modell). Die mechanischen Bauelemente verdeutlichen diese Prozesse. Elastische Relaxation heißt, der Körper kehrt in den Ausgangszustand zurück. Die in der Feder gespeicherte Energie wird vollständig wiederhergestellt. In viskoelastischen Flüssigkeiten wird in dem *Dashpot* Energie dissipiert. Je nach zeitlicher Dauer und Applikationsgeschwindigkeit wird das *Dashpot* gedehnt und die Energie, der in Reihe geschalteter Feder, zu Teilen dissipiert. So kann bei Abschalten der Kraft das Material nicht in den Ausgangszustand zurückkehren, sondern behält einen gedehnten Zustand bei. Viskoelastische Festkörper werden durch eine parallele Schaltung eines *Dashpot* zu einer Feder beschrieben. Dies heißt, der deformierte Körper kehrt in den Ausgangszustand zurück sobald die externe Kraft abgeschaltet wird, da die Feder eine Rückstellkraft besitzt. Das *Dashpot* beschreibt ein Fließverhalten des Körpers welches bei der Relaxation ein zeitabhängiges Verhalten der Entspannung des Materials verursacht. b) Mögliche Deformationen durch Streckung/Kompression, Biegen oder Scherung der Membran.

Scherung

Evans *et al.* [6] zeigten, dass Scherverformung innerhalb einer fluiden Lipiddoppelschicht keinen Einfluss haben, und das Schermodul verschwindet. Folglich benötigt Scherverformung keine Energie und die Rückstellkraft wird durch Biegung oder Dehnung verursacht.

Dehnung

Eine einfache Annahme für die Beschreibung einer Membrandeformation durch Dehnung ist die Annahme eines zweidimensionalen Hookschen Gesetztes. Wie in Abbildung 6.1 b) für die Dehnung eines Elements mit der Fläche A gezeigt, wird eine homogene Spannung an den Rändern angelegt. Die auftretende Spannung innerhalb des Flächenelements ist dann

$$\sigma = K_A \frac{\Delta A}{A_0}. \quad (6.1)$$

Mit A_0 der Fläche des Körpers im Ausgangszustand, $\Delta A = A - A_0$ der Flächenvergrößerung und K_A dem Flächenkompressionsmodul. Durch Integration der Spannung über die Flächenänderung wird die Energie für die Streckung der Membran bestimmt

$$E_{Streck} = \int dA \sigma = \frac{K_A}{2} \frac{(\Delta A)^2}{A_0}. \quad (6.2)$$

Die Kraft als Funktion der Auslenkung der Membran wird durch Ableiten von Gleichung 6.2 nach der Auslenkung h gefunden. Hierzu muss die Fläche bekannt sein. Experimentell wurde die Flächenveränderung einer runden Membran durch die Annahme einer kegelförmigen Deformation bestimmt (s. Kapitel 4 und Abbildungen 5.3 a) und b)). Setzt man diese Annahme in Gleichung 6.2 ein und bildet die Ableitung, so findet man für die Kraft

$$F(h) = -\frac{h K_A \left(\pi R_{Pore}^2 - \pi R_{Pore} \sqrt{h^2 + R_{Pore}^2} \right)}{R_{Pore} \sqrt{h^2 + R_{Pore}^2}}. \quad (6.3)$$

Abbildung 6.2 a) und b) zeigen schematisch den Indentationsvorgang für eine kegelförmige Membran bei Einwirkung einer zentralen Kraft auf den Mittelpunkt. Der Zusammenhang zwischen Kraft und Indentation ist nicht linear, wie in Abbildung 6.2 c) gezeigt wird. Für die Berechnung wurde ein Flächenkompressionsmodul von $K_A = 0.2 \text{ N/m}$ verwendet, wie es experimentell für viele fluide Lipide gefunden wird [2]. Andere Beschreibungen zeigen ähnliche Kraft-Indentations-Beziehung. Für eine festgeklemmte Platte wurde, ausgehend von der vereinfachten Reissner Theorie [142] von Komaragiri *et al.* [137] unter der Annahme, dass Biegeenergien vernachlässigt werden können, ein kubischer Zusammenhang zwischen Kraft und Eindringtiefe gezeigt,

$$F(h) = g(\nu) \frac{1}{R_{Pore}^2} E d h^3. \quad (6.4)$$

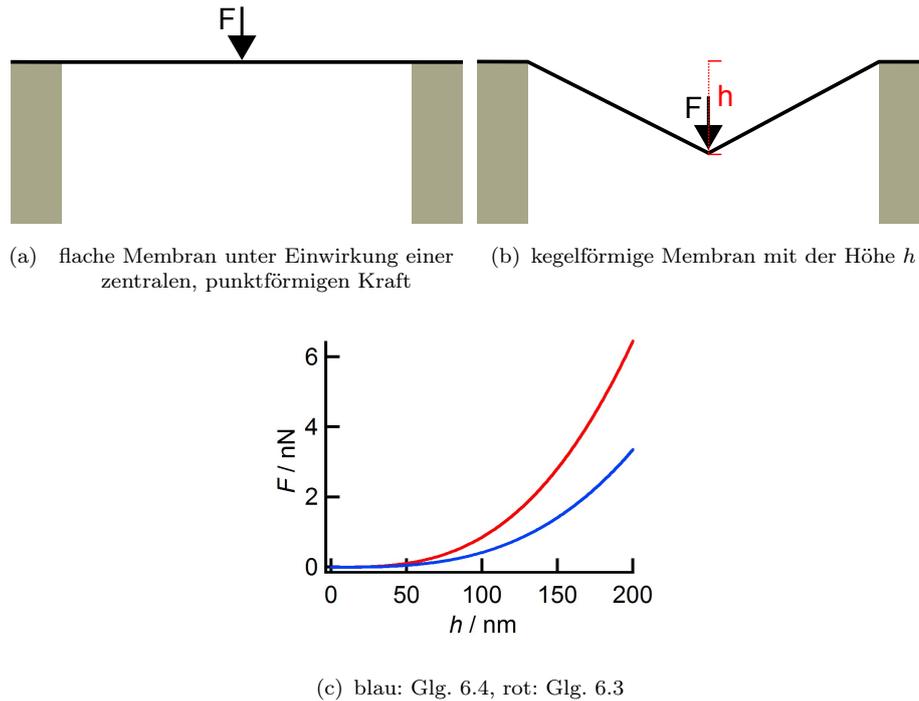


Abbildung 6.2: Darstellung von Kraft-Indentations-Kurven einer porenüberspannenden Membran durch eine zentrale, punktuell wirkende Kraft. Gleichungen 6.3 (rot) und 6.4 (blau). Deutlich ist ein nicht linearer Zusammenhang zwischen Kraft und Eindringtiefe zu erkennen.

ν ist die Poissonzahl, E das Elastizitätsmodul, d die Dicke der Membran, h die Auslenkung der Membran bzw. die Eindringtiefe und R_{Pore} der Porenradius. Es gilt $g(0.33) = \frac{\pi}{3}$ [137], wie es in der Literatur für Lipiddoppelschichten angenommen wird [2]. Gleichung 6.4 ist eine Beschreibung für Membranen ohne Vorspannung.

Das Flächenkompressionsmodul hängt über $K_A = E \cdot d$ von dem Elastizitätsmodul ab. d beschreibt die Dicke der deformierten Membran. Das Elastizitätsmodul für homogene, isotrope Materialien ist bestimmt durch das Biegemodul κ und die Poissonzahl ν des deformierten Materials

$$E = \frac{\kappa \alpha (1 - \nu^2)}{d^3}. \quad (6.5)$$

α ist eine Konstante, die abhängig von dem verwendeten Modell für eine starre Platte oder zwei beweglichen Schichten, Werte von $\alpha \in \{12, 24, 48\}$ annehmen kann [2]. Hierbei entspricht 12 der starren Platte, 48 zwei unabhängigen Schichten und 24 zwei Schichten, die durch Reibung im Kontakt stehen.

Experimentell wird bei Deformation von hybriden, porenüberspannenden Membranen eine lineare Antwort gefunden, wodurch eine erste Quantifizierung durch die apparente Federkonstante möglich ist, wie es Abbildung 4.7 gezeigt wird. Es wurde bereits in Kapitel 4.2 diskutiert, dass die freie Energie des porenüberspannenden Membranteils größer ist, als die der auf den Porenstegen adhären Membran. Dies führt zu einer Spannung innerhalb der

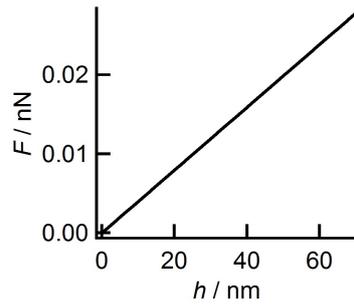


Abbildung 6.3: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Kraft und Eindringtiefe für das Verbiegen einer Membran, nach Gleichung 6.7. Für die Rechnung wurden folgende Parameter verwendet: $R_{Pore} = 225 \text{ nm}$, $\nu = 0.33$, $E = 34 \text{ MPa}$.

Membran. Ein Modell, das von einer nicht vorgespannten Membran ausgeht und nur auftretende Spannungen während der Indentation berücksichtigt, ist folglich keine hinreichende Beschreibung.

Biegung

Die verschiedenen Beiträge zeigen unterschiedliche Abhängigkeit der Kraft von der Verformung der Membran. Die Verbiegung einer runden, festgeklemmten Platte durch eine punktförmige Kraft erfordert eine Energie E_{Bieg} von [139]

$$E_{Bieg} = \pi \int_0^{R_{Pore}} dr r (\kappa(\Delta h)^2). \quad (6.6)$$

Die Kraft ist die Ableitung der Energie nach der Eindringtiefe $F(h) = -\frac{\partial E_{Bieg}}{\partial h}$. Für die Bestimmung eines Ausdruckes für die Abhängigkeit der Kraft $F(h)$ von der Eindringtiefe h muss angenommen werden, dass die auftretenden Gradienten klein sind. In der Folge meint dies, dass die Krümmungen klein gegen die Dimensionen der Membran sind. Komaragiri *et al.* führen für eine Platte, die durch eine zentrale, punktförmige Kraft verbogen wird, folgenden Zusammenhang zwischen Kraft und Auslenkung der Membran an [137]:

$$F(h) = \frac{4\pi E d^3}{3(1-\nu^2)R_{Pore}^2} h. \quad (6.7)$$

Abbildung 6.3 zeigt eine mit Gleichung 6.7 berechnete Kraft-Indentations-Kurve. Das Elastizitätsmodul lässt sich für $\nu = 0.33$ und $d = 6 \text{ nm}$ in ein Flächenkompressionsmodul von $K_A = 0.204 \text{ N/m}$ umrechnen. Die Abbildungen 6.2 und 6.3 beschreiben daher Membranen mit gleichen physikalischen Eigenschaften.

Ist der dominierende energetische Beitrag während der Deformation einer freistehenden Membran deren Verbiegung, so findet sich ein linearer Zusammenhang zwischen Kraft und

Auslenkung der Membran. Die Steigung $k_{Bieg} = \frac{\Delta F(h)}{\Delta h}$ der modellierten Kraft-Abstands-Kurven (s. Abbildung 6.3) ist in der Größenordnung von 10^{-5} N/m bis 10^{-4} N/m, wenn physikalisch sinnvolle Parameter für Lipiddoppelschichten und Porenradien von 225 nm bis 600 nm angenommen werden. Verglichen mit den apparenten Federkonstanten der hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten (s. auch Tabelle 6.2) ist dies ein Faktor 10 bis 100 zu niedrig.

Strecken vs. Biegen

Die Unterscheidung, ob die dominierenden energetischen Beiträge während der Indentation aus Dehnung oder Biegung der Membran kommen, kann durch zwei, von Komaragiri *et al.* [137] vorgeschlagene Parameter, der Vorspannung α und der Load γ bestimmt werden. Die Gültigkeit dieser Parameter ist auf runde, isotrope Membranen, welche an den Rändern fixiert sind, beschränkt. Hierbei werden, wie in Abbildung 6.4 gezeigt, zwischen Biegung, Dehnung und einer vorgespannten Membran unterschieden. Vorspannung bedeutet, dass durch eine konstante Kraft an den Rändern der Membran, diese bereits eine Dehnung erfährt ohne durch eine Indentation ausgelenkt zu werden. Die Load γ (s. Gleichung 6.8) ist eine Darstellung der wirkenden Kräfte, skaliert mit der Geometrie des Systems und den mechanischen Parametern der Membran. Die Vorspannung α (s. Gleichung 6.9) ist ein analog der Load skaliertes Parameter, welcher die Vorspannung ϵ_0 in der Membran beschreibt. ϵ_0 ist die Dehnung der Membran ohne ausgelenkt zu sein, wobei $\epsilon_0 = 1$ einer Dehnung von 100% entspricht.

$$\gamma = \frac{\log\left(\frac{F}{2\pi ER_{Pore}d}\right)}{\log\left(\frac{d}{R_{Pore}\sqrt{12(1-\nu^2)}}\right)} \quad (6.8)$$

$$\alpha = \frac{\log(\epsilon_0)}{\log\left(\frac{d}{R_{Pore}\sqrt{12(1-\nu^2)}}\right)} \quad (6.9)$$

Abbildung 6.4 zeigt in Abhängigkeit dieser beiden Parameter drei Regionen. In Region 1 muss hauptsächlich Energie zur Verbiegung der Membran aufgebracht werden. Die Beschreibung erfolgt hier durch die dünne-Platten-Theorie. Region 2 beschreibt vorgespannte Membranen, welche durch linearisierte Membrantheorien beschrieben werden können. Region 3 beschreibt Membranen, deren benötigte Energie zur Deformation durch Flächenveränderung verursacht wird und durch nicht lineare Membrantheorien beschrieben werden kann. In Abbildung 6.4 sind Bereiche für die vorgestellten Experimente an hybriden, porenüberspannenden Membranen (s. Abschnitt 4.2) markiert. Die Parameter γ und α wurden für artifizielle Membranen mit den in Tabelle 6.1 angegebenen minimalen und maximalen Werte bestimmt. Diese Werte sind einerseits durch experimentelle Vorgaben (R_{Pore} , F) und andererseits durch bekannte Daten aus der Literatur ermittelt worden.

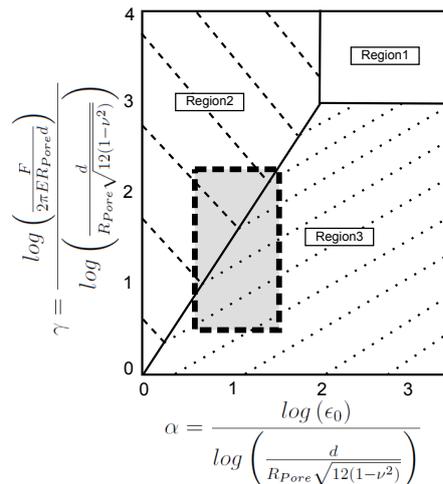


Abbildung 6.4: In der Abbildung sind 3 Regionen in Abhängigkeit des Vorspannungs- und des Ladeparameters voneinander abgegrenzt. Die einzelnen Regionen stehen für unterschiedliche energetische Beiträge während der Deformation einer runden Membran und somit auch für die Anwendung unterschiedlicher theoretischer Modelle. Region 1 wird durch die dünne Platten Theorie beschrieben, Region 2 durch linearisierte Membrantheorie und Region 3 durch nicht lineare Membrantheorien [137]. Der Bereich für die Experimente an hybriden, porenüberspannenden Membranen ist ebenfalls in der Grafik markiert.

	R_{Pore} / nm	F / nN	E / MPa	d / nm	ϵ_0
Min	225	0.01	1	4	0
Max	600	5	100	6	0.05

Tabelle 6.1: Minimale und maximale Werte, um die maximalen und minimalen Werte der Parameter γ und α entsprechend Gleichungen 6.8 und 6.9 zu bestimmen.

$\epsilon_{0,max}$ ist für Lipiddoppelschichten bekannt [28], ebenso die Dicke von Lipiddoppelschichten [8]. Die Werte für das Elastizitätsmodul wurde entsprechend Gleichung 6.6 mit $\nu = 0.33$, den angegebenen Dicken und Biegemodulen von $10^{-19} \text{ J} < \kappa < 10^{-17} \text{ J}$ bestimmt. Als Wertebereiche für die Beschreibung von hybriden porenüberspannenden Membranen wurde $\gamma \in \{0.4, \dots, 2.2\}$ und $\alpha \in \{0.5, \dots, 1.3\}$ gefunden, wie es in Abbildung 6.4 eingezeichnet ist.

Es ist zu beachten, dass diese Parameter nur für eine punktförmig auf die Mitte der runden Membran einwirkende Kraft gültig sind. AFM Spitzen sind im Bereich von 10-20 nm, während die kleinsten verwendeten Poren um einen Faktor 10 größer sind. Die Annahme ist folglich eine gültige Näherung.

Die Annahme einer eingeklemmten Platte ist ebenfalls gerechtfertigt für hybride, porenüberspannende Membranen. Es ist bekannt, dass Lipiddoppelschichten oberhalb einer kritischen Flächenvergrößerung reißen [28]. Experimentell wurde, wie in Abschnitt 4 durch die Histogrammanalysen verdeutlicht, das Durchbrechen der hybriden, porenüberspannenden

Membranen beobachtet. Daher steht dieser Membran in erster Näherung kein Reservoir zur Verfügung um Flächenveränderungen zu kompensieren. Die Annahme einer eingeklemmten Platte ist daher zulässig.

Nach Abbildung 6.4 ist es zu erwarten, dass Biegeenergien keinen Einfluss auf die Rückstellkraft bei der Indentation von hybriden porenüberspannenden Lipiddoppelschichten haben.

6.1.3 Modell der Indentation hybrider porenüberspannender Membranen

Abbildung 6.4 verdeutlicht, dass eine Beschreibung durch lineare Modelle für stark vorgespannte Membranen (Region 2) ebenfalls möglich ist. In dieser Region wird die Rückstellkraft stark durch die Vorspannung in der Membran beeinflusst. Biegeenergien können vernachlässigt werden.

Bhatia *et al.* [134] zeigen für runde, vorgespannte Membranen näherungsweise eine Lösung. Statt einer punktförmigen Kraft wird hier ein endlich großer, halbkugelförmiger Indenter angenommen. Es wird eine runde Membran beschrieben, an deren Rändern eine konstante tangentielle Kraft angelegt ist. In Abschnitt 4 wurde ein Gedankenexperiment durchgeführt, welches aufzeigt, dass der porenüberspannende Teil einer Membran durch den Verlust der Adhäsionsenergie im Vergleich zu den auf den Rändern adhärierten Membranteilen eine höhere freie Energie hat. Dies führt zu einer Vorspannung in der Membran, genau wie Bhatia *et al.* es beschreiben. Abbildung 6.5 verdeutlicht, den von Bhatia und Nachbar angenommenen Sachverhalt. An der Membran (blau) liegt eine konstante laterale Spannung σ an.

Die analytisch lösbare Beschreibung von Indentationsexperimenten (Gleichung 6.10)

$$h = \frac{F}{4\pi\sigma} \left(1 - \ln \left(\frac{FR_{Tip}}{2\pi\sigma R_{Pore}^2} \right) \right). \quad (6.10)$$

wird nur in der Näherung gefunden, dass die wirkende Kraft F klein, und die Dimensionen der Membran groß gegen die auftretenden Deformationen sind. In Gleichung 6.10 beschreibt R_{Tip} den Radius des Indenters und σ die laterale Spannung in der Membran.

Eine Möglichkeit, die Gültigkeit dieser Theorie abzuschätzen ist durch Ungleichung 6.11 [134] gegeben

$$\left(\frac{Ed}{\sigma} \right)^2 \frac{F}{8\pi Ed R_{Tip}} \ll 1. \quad (6.11)$$

Setzt man typische Werte für das Elastizitätsmodul im Bereich von 10^6 bis 10^8 ein, Spannungen im Bereich von einigen mN/m, für die Dicke der Membran Werte zwischen 4 und 6 nm und für den Indenter einen Radius von 15 nm, so ist Ungleichung 6.11 für den

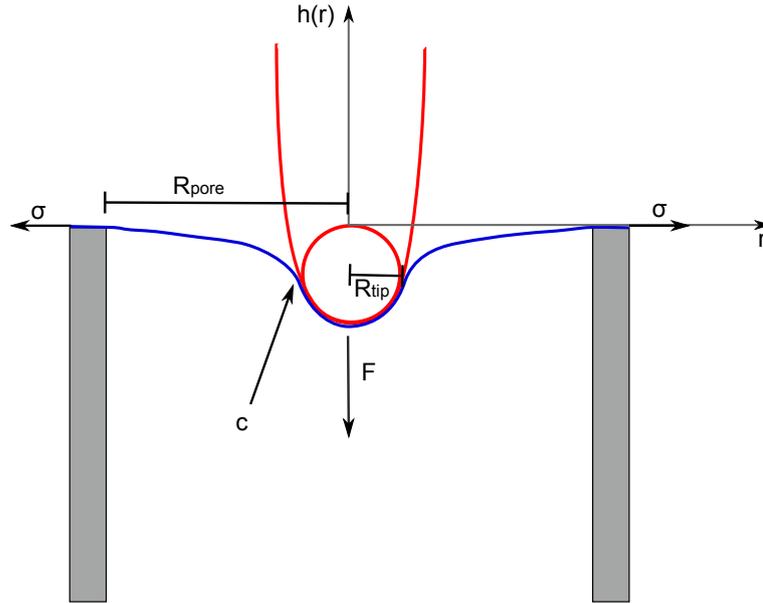


Abbildung 6.5: Schematische Darstellung der Indentation einer freistehenden Membran. Eine konstante Spannung σ liegt an der Membran an. Weiterhin sind die Überlegungen zu den Randbedingungen für die Bestimmung der Integrationskonstanten in den Gleichungen 6.15 und 6.17 gezeigt.

Bereich einiger 100 pN erfüllt. Dies heißt, dass für geringe Indentationstiefen eine Anpassung von Gleichung 6.10 an die experimentellen Daten möglich ist.

Norouzi *et al.* zeigen den gleichen Zusammenhang zwischen Kraft und Auslenkung einer runden Membran [138, 143]. Ausgehend von dem *Canham-Helfrich Hamiltonian* [141, 144] wird die Energie einer runden Membran durch Gleichung 6.12

$$E_{elast} = \int_{\Sigma} dA \left(\sigma + \frac{\kappa}{2} K^2 \right). \quad (6.12)$$

beschrieben. Das Integral wird über die freistehende Fläche der Membran Σ gebildet, auf den Porenrändern wird ein Reservoir angenommen. κ ist das Biegemodul, und K die Hauptkrümmung der Membran. Im Falle von kleinen Auslenkungen der Membran treten nur kleine Gradienten $\nabla(h)$ auf und die Beschreibung der Energie kann linearisiert werden. Für den freistehenden Bereich der Membran gilt dann Gleichung 6.13

$$E_{elast} = \int_{\Sigma_{free}} dA_{||} \left[\frac{\kappa}{2} (\nabla^2 h) + \frac{\sigma}{2} (\nabla h)^2 \right], \quad (6.13)$$

wobei $dA_{||}$ ein Flächenelement auf der runden, undeformierten Membran ist und Σ_{free} die Projektion der deformierten Membran meint. Die Energie der porenüberspannenden Membran muss minimal sein, daher wird nach Variation der Energie von $h \rightarrow h + \delta h$ die Euler-

Lagrange-Gleichung gefunden

$$\nabla^2(\nabla^2 - \frac{\sigma}{\kappa})h(r) = 0. \quad (6.14)$$

Gleichung 6.14 ist die sogenannte *shape equation*, eine Gleichung welche die Form der ausgelenkten Membran in Abhängigkeit des Radius r , des Biegemoduls κ , der Auslenkung der Membran h und der lateralen Spannung σ beschreibt.

Die allgemeine Lösung für das Eigenwertproblem in Gleichung 6.14 ergibt:

$$h_{Indenter}(r) = C_1 I_0 \left(r \sqrt{\frac{\sigma}{\kappa}} \right) + C_2 K_0 \left(r \sqrt{\frac{\sigma}{\kappa}} \right) + C_3 \ln(3) + C_4, \quad (6.15)$$

wobei C_1 bis C_4 Integrationskonstanten sind. I_0 und K_0 sind modifizierte Besselfunktionen erster und zweiter Art. Für den Fall von Membranen welche eine hohe laterale Spannung haben, vereinfacht sich die Euler-Lagrange Gleichung zu der Laplace Gleichung [138]

$$\Delta h = 0 \quad (6.16)$$

und die Lösung des Eigenwertproblems ist dann

$$h(r) = d_1 + d_2 \ln \left(\frac{r}{R_{Pore}} \right) \quad (6.17)$$

Durch Randbedingungen die aus geometrischen Überlegungen zu den experimentellen Vorgaben getroffen wurden (s. Abbildung 6.5), werden die Konstanten $C_1 \dots C_4$ bzw. d_1, d_2 in Gleichungen 6.15 und 6.17 bestimmt werden.

- Die Membran liegt flach auf dem Porenrand, $h(R_{Pore}) = 0$
- Der Kontaktwinkel zwischen Porenrand und Membran ist Null, $\frac{d}{dr}h(R_{Pore}) = 0$
- Die gebundene Fläche der Membran im Bereich des Indenters folgt dem Profil des Indenters $t(r)$ bis zu dem Kontaktpunkt zwischen Indenter und Membran, $h(r) = t(r)$ für $r \in [0, \dots, c]$
- Die Steigung der Membran am Kontaktpunkt c , muss gleich der Ableitung der Eindringtiefe der Spitzenfunktion $t(c)$ sein. $\frac{d}{dr}h(r)|_{r=c} = \frac{d}{dr}t(r)|_{r=c}$
- Die Krümmung der Membran am Kontaktpunkt c , muss gleich der Krümmung der Spitze sein. $\frac{d^2}{dr^2}h(r) \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{d}{dr}h(r)^2}}|_{r=c} \approx \frac{d^2}{dr^2}t(r)|_{r=c}$

Im Grenzfall für spannungsdominierte Membranen (s. Gleichung 6.17) findet sich ein analytischer Zusammenhang, wie er in Gleichung 6.10 schon gezeigt wurde. Die Annahme einer flach auf dem Porenrand aufliegenden Membran ist für hybride porenüberspannende Membranen, wie es in Abbildungen 4.6 und 4.8 verdeutlicht wird nicht gültig. Gleichung 6.10 wird sowohl mit dem Ansatz von Norouzi *et al.* unter den oben beschriebenen Annahmen, als auch durch Bhatia *et al.* im Grenzwert für kleine Kräfte (vgl. Gleichung 6.11) erhalten.

Bhatia nehmen jedoch keine flach auf dem Porenrand aufliegende Membran an, sondern eine eingespannte Membran. Eine eingespannte Membran entspricht den experimentellen Gegebenheiten sehr gut (vgl. Abbildung 2.7 und 4.8). Folglich kann Gleichung 6.10 eine geeignete Beschreibung der experimentellen Befunde für hybride, porenüberspannende Membranen sein.

Abbildung 6.6 a) zeigt den Vergleich von, mittels Gleichung 6.10, berechneten Kraft-Abstands-Kurven zu gemessenen Daten von hybriden, porenüberspannenden Membranen. Es ist deutlich zu erkennen, dass auch oberhalb einiger hundert Piconewton eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Modell vorliegt. Der Vergleich zeigt ebenfalls, dass die Abhängigkeit der apparenten Federkonstante von der Geometrie der Poren durch das Modell korrekt vorhergesagt wird. In b) wird der Porenradius von 225 nm bis 600 nm variiert bei einer konstanten lateralen Spannung und in c) die laterale Spannung von 10^{-4} N/m bis 10^{-2} N/m bei konstantem Porenradius.

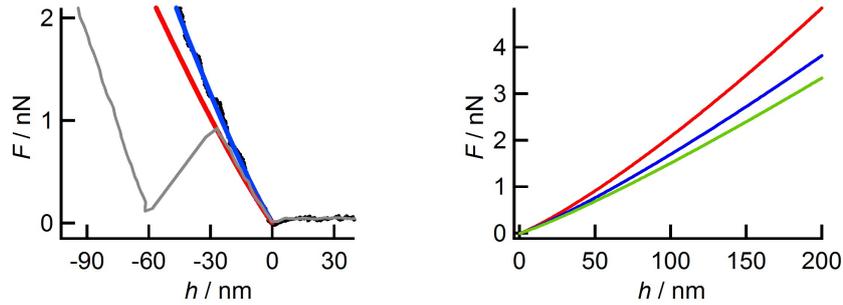
Mittels Gleichung 6.10 wurde aus den gefundenen apparenten Federkonstanten die laterale Spannung der Membran berechnet. Die gefundenen Spannungen sind in Tabelle 6.2 zusammengestellt.

Lipid	R_{Pore}/nm	Funktionalisierung	$k_{app}/\text{mN/m}$	$\sigma/\text{mN/m}$
DPhPC	225	OT	48 ± 15	22 ± 6
DPhPC	400	OT	36 ± 8	21 ± 4
DPhPC	400	CPEO3	26 ± 5	15 ± 3
DPhPC	600	OT	25 ± 6	18 ± 3
DPPC	600	OT	40 ± 4	31 ± 3
DPPC/Chol	600	OT	31 ± 4	23 ± 3
DPPC (50°C)	600	OT	9 ± 2	7 ± 1
DPPC/Chol (50°C)	600	OT	14 ± 3	11 ± 3
DPPC (GUV, 50°C)	600	OT	21 ± 3	16 ± 2
DPhPC (GUV)	600	OT	34 ± 5	26 ± 4

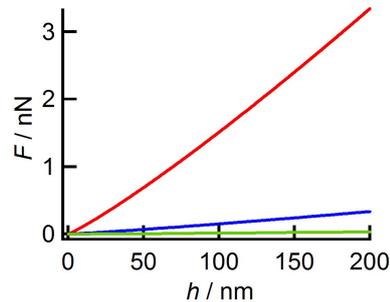
Tabelle 6.2: Aus den apparenten Federkonstanten berechnete laterale Spannungen nach Gleichung 6.10 und einige Flächenkompressionsmodule [129, 145].

Betrachtet man den Einfluss des Porenradius auf die laterale Spannung, so findet man, wie schon Abbildung 6.6 b) gezeigt, dass Gleichung 6.10 den experimentell gefundenen Zusammenhang gut wiedergibt. Die laterale Spannung σ ist, unabhängig von dem Porenradius, konstant. Die apparente Federkonstante k_{app} zeigt jedoch eine deutliche Abhängigkeit, wie die Werte in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.6 b) verdeutlichen.

Interessanterweise bewegen sich die gefundenen Werte für die laterale Spannung von DPhPC porenüberspannenden Membranen im Bereich der Oberflächenspannung von DPhPC Monolagen. Letztere wurde zu $\sigma_{mono,DPhPC} = (25.9 \pm 1.6)$ mN/m bestimmt [146]. Wie bereits im



(a) DPhPC/Bodipy-PC(99.9/0.1)/n-Dekan, OT, grau: $R_{Pore} = 400$ nm, schwarz: $R_{Pore} = 225$ nm. Rot, blau Glg. 6.10, $R_{Tip} = 15$ nm, $\sigma = 22$ mN/m
 (b) rot: $R_{Pore} = 225$ nm, blau: $R_{Pore} = 400$ nm und grün: $R_{Pore} = 600$ nm



(c) rot: $\sigma = 10^{-2}$ N/m, blau: $\sigma = 10^{-3}$ N/m, grün: $\sigma = 10^{-4}$ N/m

Abbildung 6.6: a) Gemessene Kraft-Indentations-Kurven von hybriden, porenüberspannenden DPhPC Membranen auf OT funktionalisierten Oberflächen mit Porenradien von $R_{Pore} = 225$ nm (schwarz) und $R_{Pore} = 400$ nm (grau). In blau bzw. rot sind mittels Gleichung 6.10 berechnete Kurven gezeigt. Als Parameter wurden die experimentellen Porenradien, $\sigma = 22$ mN/m und $R_{Tip} = 15$ nm genutzt. b) zeigt modellierte Kurven bei verschiedenen Porenradien und einer konstanten lateralen Spannung von $\sigma = 5$ mN/m während in c) Kurven bei einem konstanten Porenradius von $R_{Pore} = 600$ nm mit unterschiedlichen lateralen Spannungen dargestellt sind.

Ergebnisteil (s. Kapitel 4) diskutiert, spiegelt die apparente Federkonstante weitestgehend die Vorspannung in der Membran wider. Diese entspringt der Adhäsionsenergie der Lipide auf dem Porenrand, bzw. dem Fehlen dieser Energie für den freistehenden Lipidfilm. Die unterschiedlichen Vorspannungen gehen einher mit den Flächenkompressionsmodulen der Lipide. Nicht für alle verwendeten Lipide wurde das Flächenkompressionsmodul bestimmt, jedoch kann das Flächenkompressionsmodul mit dem Biegemodul für Lipiddoppelschichten über $K_A = \frac{24\kappa}{d_{db}^2}$ [2] in Verbindung gebracht werden. Das Biegemodul für DPPC ist in der Gel Phase um einen Faktor 10 größer als in der fluiden Phase [5]. Nimmt man an, dass die Dicke der Lipiddoppelschicht gleich bleibt, so ergibt sich ein maximal um den Faktor 10 höheres Flächenkompressionsmodul. Der tatsächliche Wert wird niedriger liegen, da Lipiddoppelschichten in der fluiden Phase etwas dünner sind als solche in der Gel Phase, dennoch stimmt der Trend der apparenten Federkonstante und der lateralen Spannungen gut mit den Flächenkompressionsmodulen der Lipide überein. Daher zeigen Lipidmembranen mit höherem Flächenkompressionsmodul auch höhere laterale Spannungen. Dies erklärt den Unterschied zwischen DPPC Membranen in der fluiden und in der Gel Phase. Auch die erstaunlich hohen Spannungen einer fluiden DPhPC Membranen sind hierdurch verständlich. DPhPC hat ein sehr hohes Flächenkompressionsmodul ($K_{A,DPhPC} = 670 \text{ mN/m}$), verglichen mit dem fluiden DPPC ($K_{A,DPPC,fluid} = 250 \text{ mN/m}$).

6.1.4 Modell der Indentation unterstützter porenüberspannender Membranen

Wird nicht der Grenzfall für hohe Spannungen (Gleichung 6.17) betrachtet, sondern angenommen, dass sowohl Spannung als auch Biegung einen energetischen Beitrag liefern, so wird die Lösung von Gleichung 6.15 in

$$F = 2\pi R_{Pore} \times \kappa \frac{\partial K}{\partial r} \Big|_{r=R_{Pore}} \quad (6.18)$$

eingesetzt um die Kraft zu bestimmen. Die für Gleichung 6.15 aufgezeigten Randbedingungen werden, wie Abbildung 4.23 andeutet, erfüllt. Genaueres hierzu findet sich in [15, 120, 143].

Ausgehend von der Spannung innerhalb von freitragenden Membranen, die in den Abschnitten 4 und 6.1.3 aufgezeigt wurde, sollte die wirkende Kraft an den Membranrändern, bzw. die Vorspannung der Membran bei unterstützten, porenüberspannenden Membranen wesentlich geringer sein. Die freie Energie für hybride, porenüberspannende Membranen (s. Abbildung 2.7) wird durch den hohen energetischen Beitrag der hydrophoben/hydrophilen Grenzschicht auf den Porenstegen verursacht. Für unterstützte, porenüberspannende

Membranen (s. Abbildung 2.8) ist das Substrat hydrophil. Die Adhäsionsenergie der Lipide auf dem hydrophilen Substrat ist niedriger als der Beitrag der hydrophoben Oberfläche. Folglich sollte die entstehende Spannung aufgrund der Differenz der freien Energien zwischen freistehender und unterstützter Membranfläche geringer sein. Dies wird auch durch die wesentlich niedrigere apparente Federkonstante nahegelegt.

In diesem Modell ist die Spannung in der Membran klein und Biegeenergien können einen Beitrag zu der Rückstellkraft der elastischen Membran leisten. Die Spannung an den Porenrändern ist konstant und beschreibt die benötigte Energie um Material von den Rändern in die Pore zu ziehen, um die Flächenvergrößerung zu kompensieren. Steltenkamp *et al.* [15] zeigten bereits, dass diese Theorie geeignet ist um die Indentation von Membranen mit einem Membranreservoir auf den Porenrändern zu beschreiben.

Gleichung 6.18 ist eine weitestgehend lineare Funktion [15, 138]. Abbildung 6.7 zeigt die Anpassung einer modellierten Kraft-Indentations-Kurve an die experimentellen Daten. Durch die Kenntnis des Biegemoduls [5, 147] war es möglich, die laterale Spannung in der

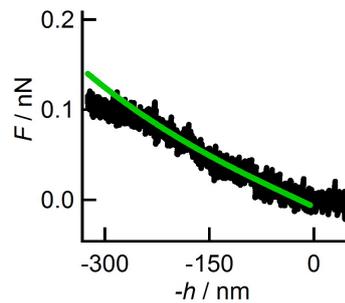


Abbildung 6.7: Dargestellt sind Messdaten einer DPhPC Membran (schwarz) und eine berechnete Kraft-Indentations-Kurve (grün) entsprechend Gleichung 6.18. Für die Rechnung wurden folgende Parameter genutzt: $R_{Pore} = 250$ nm, $R_{Tip} = 15$ nm, $\kappa = 1.3 \times 10^{-19}$ J und $\sigma = 0.1$ mN/m.

Membran zu bestimmen. Mit einem Biegemodul von $\kappa_{DPhPC} = 1.3 \times 10^{-19}$ J folgt für die lateralen Spannungen $\sigma = (150 \pm 50) \mu\text{N/m}$.

6.1.5 Modell der Indentation nativer freitragender Membranen

Die simultane Bestimmung von Biegemodul κ und lateraler Spannung σ ist wegen des linearen Zusammenhangs zwischen Kraft und Indentation nicht möglich. Für Zellmembranen sind bis jetzt weder die laterale Spannung, noch Biegemodule auf kleinen Größenskalen, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, bestimmt worden. Durch Vergleich von fixierten und unfixierten Zellmembranen ist es jedoch möglich, physikalisch sinnvolle Bereiche für die laterale Spannung und das Biegemodul anzugeben.

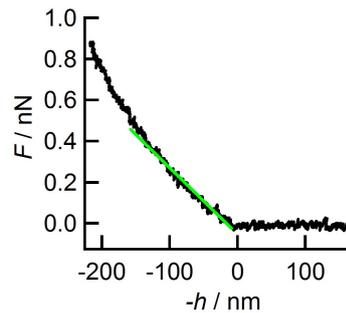
Eine Abschätzung der lateralen Spannung kann durch die Zerreißspannung und einer maximalen erlaubten Flächenvergrößerung, ähnlich wie bei Lipiddoppelschichten 5%, gemacht werden. In der Annahme, die Antwort sei durch pure Spannung dominiert, würde Gleichung 6.1 den Hauptteil der elastischen Antwort beitragen. Das Flächenkompressionsmodul kann durch das Biegemodul und die Dicke der Membran abgeschätzt werden $K_A \propto \frac{\kappa}{d^2}$. Folglich ist nur notwendig obere und untere Grenzen für das Biegemodul festzulegen. Aus der Literatur sind Biegemodule von Zellen bekannt und liegen im Bereich fluider Lipiddoppelschichten, $\kappa_{min} = 10^{-19}$ J bis hin zu $\kappa_{max} = 10^{-17}$ J [7], je nach Einfluss des Zytoskeletts und der Dicke der Membran. Die laterale Spannung kann, unter Annahme einer maximalen Flächenvergrößerung von 5% und einer Dicke von 50 nm mit dem oben gezeigten Zusammenhang durch Gleichung 6.1 abgeschätzt werden, und wird zwischen 10^{-3} N/m und 10^{-5} N/m liegen. Weiterhin wird angenommen, dass die Fixierung der Membran nur zu einer Veränderung des Beitrages durch Verbiegung führt, und keinen Einfluss auf die laterale Spannung in der Membran hat. Dies ist aus chemischer Sicht eine gültige Näherung, da die Vernetzung der Biopolymere keinen Einfluss auf die Adhäsionsenergie zwischen Membran und Porenrändern hat. Folglich bleibt auch die laterale Spannung in der Membran gleich. Mit dieser Annahme konnten Kraft-Indentations-Kurven für fixierte und unfixierte Proben in der Art und Weise angepasst werden, dass nur eine Variation des Biegemoduls bei einem konstanten Wert für σ durchgeführt wurde.

In Abbildung 6.8 ist eine angepasste Kurve a), sowie der Einfluss von Biegemodul b) und lateraler Spannung c) auf die apparente Federkonstante gezeigt. Obwohl der Einfluss der lateralen Spannung in dem vorgegeben Wertebereich größer ist, konnten durch die experimentellen Randbedingungen sinnvolle Wertebereiche für das Biegemodul, durch Anpassung von theoretischen Kurven an experimentelle Daten, festgelegt werden. Eine Anpassung wurde für $\sigma = 10^{-5}$ N/m erreicht. Abbildung a) zeigt sehr deutlich, dass über einen Bereich von 100 nm die Kurvenverläufe gut vergleichbar sind. Die gefundenen Biegemodule für Zellmembranen reichen hierbei von $\kappa = 4,5^{-19}$ J bis $\kappa = 10^{-17}$ J. Anhand des Vergleiches einer unfixierten Membran mit einer fixierten kann geschlossen werden, dass die Fixierung das Biegemodul um einen Faktor 5 bis 10 erhöht. Die breite Verteilung der Biegemodule verdeutlicht, analog der Verteilung der apparenten Federkonstanten, die Heterogenität der Zellmembranen.

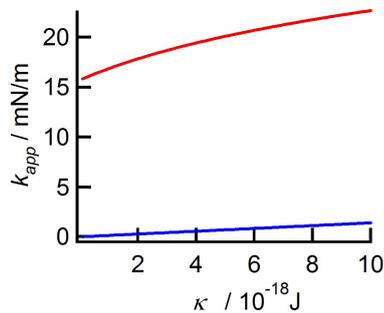
6.2 Elastizität porenüberspannender Membranen

Eine Auswahl vergleichbarer Experimente wurden unter anderem von Goncalves *et al.* [16], Ovalle-Garcia *et al.* [48] und Lee *et al.* [18] vorgestellt.

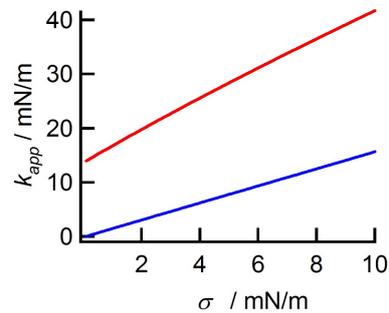
Goncalves *et al.* [16] untersuchten die äußere Membranen von *Corynebacterium glutamicum*, sogenannte *S-Layer* präpariert auf porösen Substraten mit einer hydrophilen Siliziumdioxid-



(a) schwarz: Messdaten, MDCK II basolaterale, fixierte Membran; grün: $R_{Pore} = 600$ nm, $R_{Tip} = 15$ nm, $\sigma = 10^{-5}$ N/m, $\kappa = 22^{-18}$ J



(b) $\Delta h = 50$ nm, $R_{Pore} = 600$ nm, $R_{Tip} = 15$ nm, blau: $\sigma = 10^{-5}$ N/m, rot: $\sigma = 10^{-2}$ N/m



(c) $\Delta h = 50$ nm, $R_{Pore} = 600$ nm, $R_{Tip} = 15$ nm, blau: $\kappa = 10^{-19}$ J, rot: $\kappa = 10^{-17}$ J

Abbildung 6.8: Dargestellt sind eine berechnete Kraftabstandskurve im Vergleich mit den Messdaten (a), sowie der Einfluss von lateraler Spannung σ und Biegemodul κ auf die apparente Federkonstante über eine Indentationstiefe von 50 nm, berechnet mit Gleichung 6.18. Sowohl Biegung als auch laterale Spannung haben einen Einfluss auf die Membran.

Oberfläche. Diese Membran zeigt, ähnlich wie die hier beschriebenen hybriden, porenüberspannenden Membranen, geringe Indentationen während der Abbildung im Kontaktmodus. Die Membranpräparation findet direkt auf dem Siliziumsubstrat statt und entspricht den unterstützten, porenüberspannenden Membranen (s. Abbildung 4.23).

Die mechanische Antwort des *S-Layers* ist nicht linear und zeigt nach geringen Eindringtiefen Durchbruchereignisse. Die Autoren schließen daraus, dass die elastische Antwort durch Dehnung der Membran dominiert wird. Für die Bestimmung mechanischer Parameter wird ein sogenanntes zweidimensionales Elastizitätsmodul E_{2D} angenommen. Die in der Membran entstehende Spannung kann über die Oberflächenvergrößerung δA mit dem Elastizitätsmodul in Verbindung gebracht werden [139] analog wie es in Gleichung 6.2 gezeigt wurde:

$$\sigma = E_{2D} \frac{\delta A}{A}. \quad (6.19)$$

Die Flächenvergrößerung wurde durch Annahme einer Halbkugel bestimmt und für die Abhängigkeit der Kraft F von der Indentationstiefe h wurde

$$F = \frac{2\pi E_{2D} h^3}{R_{Pore}} \quad (6.20)$$

gefunden, wobei R_{Pore} den Porenradius wiedergibt.

Die Rissereignisse finden, unter Annahme der Geometrie einer Halbkugel für die deformierte Membran, bei 10% Flächenvergrößerung und ungefähr bei einer Kraft von 3 nN statt. Ursächlich für die erhöhte Flächenvergrößerung ist die Zusammensetzung der Membran. *S-Layer* sind gewöhnlich aus einer Proteinspezies bestehende Membranen, daher werden die mechanischen Eigenschaften sich deutlich von Lipiddoppelschichten unterscheiden, wie es für die Flächenvergrößerung schon beschrieben wurde.

Die von Goncalves *et al.* präsentierten Daten zeigen, im Unterschied zu den in dieser Arbeit gemessenen linearen Kurvenverläufen von Kraft-Indentations-Experimenten, einen kubischen Zusammenhang zwischen Kraft und Indentation, wie es typisch für die Dehnung einer nicht vorgespannten Membran ist (vgl. Abbildung 6.2). Im Vergleich zu den freistehenden basolateralen Zellmembranen zeigt sich, dass die Kraft-Indentations-Kurven für Proteinmembranen wesentlich schneller steigen als für die in dieser Arbeit vorgestellten Zellmembranfragmente. Für hybride, freistehende Systeme bleibt als Übereinstimmung das Durchbrechen der Membran bei einer kritischen Flächenvergrößerung.

Die Messkurven auf Proteinmembranen legen nahe, dass im Gegensatz zu Lipidschichten, die Vorspannung innerhalb einer Proteinmembran einen geringen Einfluss auf die Rückstellkräfte während einer Indentation hat. Weiterhin zeigen Proteine keine hohe Beweglichkeit innerhalb eines Films, da die Flächenvergrößerung nicht durch das Reservoir auf den Porenstegen kompensiert wird.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zu unterstützten porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, welche ebenfalls auf Siliziumdioxid Oberflächen präpariert wurden, zeigen keine Rissereignisse und kompensieren offensichtlich die Flächenvergrößerung durch ein Membranreservoir auf den Porenstegen. Durch FRAP Experimente an unterstützten, porenüberspannenden Membranen konnte gezeigt werden, dass die Lipide innerhalb einer Membran frei diffundieren können und nicht auf Bereiche innerhalb einer Pore beschränkt sind [39]. Die gefundenen Diffusionskoeffizienten sind in der gleichen Größenordnung wie es für festkörperunterstützte Membranen gefunden wurde (s. auch Abschnitt 4.3.1).

Lee *et al.* [18] hingegen untersuchten die Indentation von Graphit Monolagen auf porösen Substraten. Auch hier wurde ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Kraft und Eindringtiefe gefunden. Die Monolage brach stets bei einer kritischen Eindringtiefe, analog den Experimenten von Goncalves *et al.* und den in dieser Arbeit gezeigte Ergebnissen zu hybriden, porenüberspannenden Membranen. Für die Bestimmung der elastischen Parameter von freistehenden Graphenmonolagen wurde allerdings ein anderer Weg gewählt. Der Zusammenhang zwischen Kraft und Auslenkung der Membran durch eine zentrosymmetrische Indentation wird durch eine lineare Kombination von Dehnung und Vorspannung beschrieben [18, 137]

$$F = \sigma_{0,2D} \pi R_{Tip} \left(\frac{h}{R_{Tip}} \right) + E_{2D} q^3 R_{Tip} \left(\frac{h}{R_{Tip}} \right)^3. \quad (6.21)$$

$\sigma_{0,2D}$ ist die Vorspannung in der Graphitmonolage und q eine dimensionslose Größe die von der Poissonzahl ν abhängt. Die gefundene Vorspannung für porenüberspannende Graphenmonolagen liegt zwischen 0.07 N/m bis 0.74 N/m. Weiterhin, folgt die Graphenmembran der Topographie des Substrates, ähnlich wie es für hybride, porenüberspannende Membranen gefunden wurde. Der porenüberspannende Teil der Membran liegt 2 bis 10 nm unterhalb des unterstützten Bereich. Die Autoren schließen aus diesem Sachverhalt, dass weitere Spannungen von 0.7 N/m bis 3.4 N/m in der freistehenden Graphenmembran entstehen. Die Ursache dieser zusätzlichen Spannung ist die notwendige Dehnung der Membran um dem Profil des porösen Substrates zu folgen. Diese Werte liegen deutlich oberhalb der Vorspannungen, folglich haben Graphenmonolagen, welche nicht über eine Apertur gespannt sind, einen komprimierten Zustand.

Die letzte Schlussfolgerung geht einhand mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen zu der Vorspannung von porenüberspannenden Membranen und dem in Abschnitt 4 diskutierten Gedankenexperiment zu der erhöhten freien Energie des freistehenden Membranteils im Vergleich zu dem unterstützten Bereich der Membran. Die Adhäsionsenergie auf den Porenrändern erzeugt eine Spannung in dem freistehenden Teil der Membran, da dieser eine höhere freie Energie hat. Beiträge durch von 0 verschiedene Kontaktwinkel mit dem Porenrand werden in den vorgestellten Modellen nicht berücksichtigt. Ein Kontaktwinkel zwischen

Membran und Porenrand von 0 ist experimentell für unterstützte, porenüberspannende Lipiddoppelschichten und Zellmembranfragmente gegeben (vgl. Abbildung 2.8). Hybride, porenüberspannende Membranen sollten, wie Abbildung 2.7 zeigt, einen von 0 verschiedenen Kontaktwinkel haben. Die Theorie von Bhatia *et al.* gilt jedoch für eingeklemmte Platten und berücksichtigt den Kontaktwinkel zwischen Membran und Porenrand nicht. Da Norouzi *et al.* im Grenzwert für hohe laterale Spannungen den gleichen Zusammenhang zwischen Kraft und Indentation finden, jedoch mit der Vorgabe eines Kontaktwinkels von 0, darf angenommen werden, dass Beiträge durch die topographische Struktur der Membran nur einen geringen Beitrag in den gefundenen lateralen Spannungen haben.

Ein Nachteil der Auswertung experimenteller Daten durch Gleichungen wie z.B. 6.4 und 6.3, ist oftmals die Näherung der Membranform durch einfache geometrische Strukturen, wie z.B. Kegel. Die Flächenvergrößerung kann durch Gleichung 6.18 jetzt genauer bestimmt werden, da hier die Membranform mittels physikalischer Parameter bestimmt wird. Abbildung 6.9 zeigt die relative Flächenveränderung zweier Kegelabschätzungen (s. Abbildung 6.9) als auch die der Membranform nach Gleichung 6.15. Deutlich wird, dass die Annahme

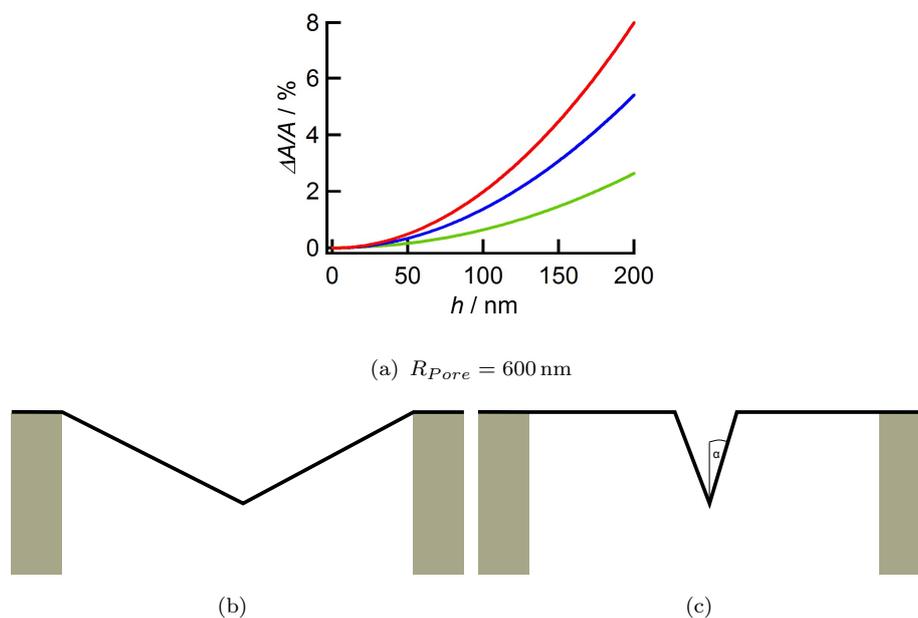


Abbildung 6.9: a) zeigt den Einfluss der Membranform auf die Flächenvergrößerung. Rot und blau sind entsprechend den Schemazeichnungen b) und c) abgeschätzte Flächenvergrößerungen. Beide Abschätzungen durch einen Kegel überschätzen die Flächenvergrößerung welche aus Gleichung 6.15 (grün) bestimmt wurde. Für die grüne Kurve wurden folgende Parameter gewählt: $R_{Tip} = 15 \text{ nm}$, $\sigma = 0.01 \text{ N/m}$ und $\kappa = 1.3 \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

einer kegelförmigen Membran die Flächenvergrößerung in beiden Fällen noch überschätzt, jedoch nicht in einem drastischen Maß. Als erste Näherung ist die Abschätzung über eine Kegelfunktion gültig. Es ist jedoch ungünstig über eine Voraussage der Membranform

quantitative Parameter zu bestimmen, da ein zusätzlicher Fehler gemacht wird. Im speziellen Fall von Gleichung 6.19 geht der Fehler der Flächenvergrößerung linear in die quantifizierten Parameter ein.

Da eine einheitliche Theorie für alle drei untersuchten Systeme Anwendung findet, ist ein Vergleich der mechanischen Parameter der Membranen untereinander möglich. Die Theorie zeigt einen Einfluss von geometrischen Parametern, wie dem Porenradius. Der Einfluss des Porenradius und des Indenterradius auf die apparente Federkonstante ist bereits von Steltenkamp *et al.* [15] gezeigt worden. Eine Vergrößerung des Spitzenradius zeigt nur einen geringen Einfluss. Der Porenradius hat einen wesentlichen Einfluss auf die apparente Federkonstante, wie es experimentell auch für hybride, porenüberspannende Membranen gefunden wurde.

Übertragen auf die Durchbruchereignisse der hybriden, porenüberspannenden Membranen lässt sich sagen, dass diese bei Flächenvergrößerungen von maximal 1.5%, bestimmt durch Gleichung 6.18, reißen. Verglichen mit den Werten von Needham *et al.* und Evans *et al.* [28] finden diese Ereignisse deutlich vor der erwartenden maximalen Flächenvergrößerung für Lipiddoppelschichten von 3-5% statt. Die gefundenen lateralen Spannungen für hybride Systeme sind gut vergleichbar mit den Zerreißspannungen. Bei geringsten Flächenvergrößerungen treten Durchbruchereignisse auf. Hybride, porenüberspannende Membranen zeigen ein spontanes Zerreißen der Membranen ohne äußere Einwirkungen [51]. Diese Argumente verdeutlichen, dass eine Vorspannung die experimentellen Befunde in einem theoretischen Modell erläutern kann.

Lipidmembranen mit höherem Flächenkompressionsmodul zeigen auch höhere laterale Spannungen und eine höhere Deformierbarkeit bis zu dem Rissereignis. Die Spannung ist aufgrund der hohen Energie der hydrophoben/hydrophilen Grenzschicht zwischen dem wässrigen Medium und dem funktionalisierten Substrat sehr hoch, verglichen mit den unterstützten, porenüberspannenden Membranen und den freistehenden Zellmembranfragmenten. Die laterale Spannung für hybride, porenüberspannende Membranen bewegt sich im Bereich $\sigma_{DPhPC,Hybrid} = 10^{-2} \text{ N/m}$

.

Unterstützte, porenüberspannende Membranen zeigen Flächenvergrößerungen bis zu 20% ohne zu zerreißen. Ein analoges Verhalten wurde für die porenüberspannenden Zellmembranfragmente gefunden. Für beide Systeme muss dementsprechend ein Materialreservoir auf den Porenstegen zur Verfügung stehen, welches während der Indentation die Flächenvergrößerung kompensiert. Die laterale Spannung ist aufgrund der geringeren Adhäsionskraft zwischen Siliziumdioxid und Lipidmembran deutlich verringert. Für unterstützte, porenüberspannende Membranen wurden laterale Spannungen im Bereich von $\sigma_{DPhPC/SiO_2} = 10^{-4} \text{ N/m}$ gefunden, wohingegen Zellmembranfragmente einen Faktor 10 niedrigere laterale Spannungen zeigen.

Über die Adhäsion zwischen Zellmembran und Pore kann keine direkte Aussage getroffen werden, da Zellen eine extrazelluläre Matrix auf dem Substrat bilden und letztlich auf dieser adhären.

Die apparenten Federkonstanten sind für Zellemembranfragmente ungefähr einen Faktor 10 höher, trotz einer geringeren lateralen Spannung in der Membran. Folglich müssen in freistehenden Zellmembranfragmenten Biegeenergien einen größeren Einfluss auf die Mechanik der Indentation haben, als es für Lipiddoppelschichten gefunden wurde, trotz der geringen Krümmungen. Zellmembranen sind um einen Faktor 10 dicker als Lipiddoppelschichten, daher führen auch wesentlich geringere Krümmungen schon zu relevanten energetischen Beiträgen. Die Dehnung der Membran wurde experimentell ausgeschlossen, da keine Durchbruchereignisse beobachtet wurden.

Es ist aus chemischer Sicht eine gültige Annahme, dass Fixierung der Zellmembran nicht die Adhäsion der Membran mit dem Porenrand verändert und somit die laterale Spannung in der Membran auch nach der Fixierung unverändert bleibt. So konnte durch Anpassen von Gleichung 6.15 mittels passender Randbedingungen [15] an die Messdaten, die laterale Spannung für Zellmembranen zu $\sigma_{Zell} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}$ bestimmt werden, während für das Biegemodul ein Bereich von 10^{-19} J bis 10^{-17} J gefunden wurde, welche durch die Fixierung sogar um einen Faktor 5 bis 10 erhöht wird.

Zellmembranfragmente sind ungefähr einen Faktor 10 dicker als Lipiddoppelschichten. Untersuchungen durch Mikropipetten Aspirationsexperimente an Polymerosomen zeigen, dass die Dicke der Membran einen erheblichen Einfluss auf das Biegemodul hat ($\kappa \propto d^3$) [140]. Ein Faktor zwei in der Membrandicke, 8 nm auf 15 nm, zeigt sich in dem Biegemodul durch eine Erhöhung auf das zehnfache. Dies verdeutlicht, dass bei Zellmembranen Biegeenergien einen wesentlich größeren Einfluss haben können als für Lipiddoppelschichten, gemessen mit gleichen geometrischen Voraussetzungen.

Merkel *et al.* [7] untersuchten mittels Mikropipetten-Aspiration die mechanischen Eigenschaften von Zellmembranen sowie den Einfluss des Cytoskeletts auf diese. Hierzu verwendeten sie *wild-type* Dictyostelium Zellen und Mutanten, welchen Ankerproteine zwischen Membran und Cytoskelett fehlten. Für die Quantifizierung der Daten wurde ein Ansatz analog Gleichung 6.15 für runde, isotrope Membranen genutzt. In Anpassung an die Experimente wurde statt eines Indenters ein homogenes Druckprofil auf die Membran angewendet. So konnten Merkel *et al.* einen Kopplungsparameter zwischen Membran und Cytoskelett quantifizieren. Einen großen Unterschied fanden Sie für den Kopplungsparameter für Zellen ohne das Ankerprotein Talin ($\sigma_{coup,Talin-Null} = 4 \text{ mN/m}$) verglichen mit den *wild-type* Zellen ($\sigma_{coup,wild-type} = 11 \text{ mN/m}$). Ferner beobachteten Sie, dass Zellen ohne Talin, manchmal nicht mehr in der Lage waren sich selbständig aus der Pipette zurückzuziehen, also plastisch deformiert wurden. Ferner bestimmen Sie für das Biegemodul der Membranen einen oberen Grenzwert von $\kappa = 10^{-17} \text{ J}$.

Dies ist identisch zu dem in dieser Arbeit bestimmten maximalen Wert mit dem Anpassungen an experimentelle Daten vorgenommen werden konnten. Spannungen in Zellmembranen liegen zwischen $10^{-6} \text{ N/m} < \sigma_{\text{Zell}} < 10^{-5} \text{ N/m}$ [7], dies ist ebenfalls vergleichbar mit den in dieser Arbeit gefundenen lateralen Spannungen von $\sigma = 10^{-5} \text{ N/m}$. Der Vorteil des hier präsentierten Experimentes liegt in der hohen lokalen Auflösung, mit der Eigenschaften der Zellmembran und Einfluss von Zytoskelett und ECM bestimmt werden können.

Erstaunlich ist, dass für basolaterale Zellmembranen keine Hysteresen gefunden wurden, während Fine *et al.* [133] für die apikale Membran von MDCK II Zellen eine Hysterese fanden. Hier scheint sich widerzuspiegeln, dass MDCK II Zellen polare Zellen sind, deren apikale und basolaterale Membran unterschiedliche Zusammensetzungen haben. Eine erste Vermutung ist die Annahme, dass es sich um die Kopplung zwischen Membran und Cytoskelett handelt. Die basolaterale Seite besitzt zu dem noch die extrazelluläre Matrix. Sind ECM und Cytoskelett über viele Ankerproteine an die Membran gekoppelt, würde dies ein elastisches Verhalten erklären, während eine schlechte Verankerung viskoelastische oder plastische Effekte zulassen würde. Dieses Ergebnis fanden auch Merkel *et al.* [7]. Zellen mit verminderter Kopplung zwischen Cytoskelett und Membran zeigten z.B. geringere elastische Rückstellkräfte sobald die externe Kraft abgeschaltet wurde. Solch manipulierte Zellmembranen zeigten oft sehr geringe bis keine Rückstellkräfte.

In der Literatur sind auch Beispiele für native Membranen die keine Hysterese zeigen bekannt [12]. Diese Membranen setzen sich jedoch, bedingt durch den Präparationsprozess, fast ausschließlich aus Cytoskelett zusammen. Dies unterstützt die Annahme, dass Energie während der Indentation durch Fließeekte zwischen zwischen Cytoskelett und Membran dissipiert wird. Messungen an ganzen Zellen zeigen meist geschwindigkeitsabhängige Hysteresen [122, 123], wobei hier das viskoelastische Innere der Zellen mit gemessen wird, und nicht nur ausschließlich Zellmembran und verankertes Cytoskelett.

A. A. Boulbitch verfasste 1998 eine Abhandlung über die Energien und Kräfte für die Deformation einer Zellmembran durch eine lokal wirkende Kraft [100]. Er berücksichtigte sowohl Dehnung, Biegung als auch Effekte durch das Cytoskelett der Membran. In dieser Abhandlung wurde eine Federkonstante für die Membran abgeschätzt. Er fand für die Zellmembran eine Wert von 10^{-4} N/m für die Federkonstante der Membran. Dieser Wert entspricht den in dieser Arbeit gemessenen Werten für die apparente Federkonstante von Zellmembranen sehr gut. Weiterhin begründen diese niedrigen Werte der Federkonstante, warum für Messungen an ganzen Zellen Druckdifferenzen zwischen Zellinnerem und Zelläußeren, und viskoelastische Effekte des Zellinneren einen großen Einfluss auf die Messungen haben [100].

Porenüberspannende Zellmembranfragmente sind eine gute Beschreibung der mechanischen Eigenschaften von Membranen intakter Zellen. Die mechanischen Eigenschaften von

Zellmembranfragmenten konnten mit einer räumlichen Auflösung von ungefähr einem Mikrometer bestimmt werden. Weiterhin sind so Untersuchungen an der Zellmembraninnenseite möglich.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass porenüberspannende Membranen, aufgrund des Unterschied in der freien Energie zwischen porenüberspannenden und auf den Porenstegen adhärierten Membranbereichen, vorgespannt sind. Die apparente Federkonstante wird für porenüberspannende Lipidmembranen von dieser Vorspannung dominiert, während für Zellmembranen ein Einfluss durch Biegeenergien gezeigt werden konnte. Quantifiziert wurde die Spannung durch die Theorie von Norouzi *et al.* [138] und Bhatia *et al.* [134]. Durch die linearen Zusammenhänge sowohl in den Theorien, als auch in den experimentellen Daten, war die simultane Bestimmung des Biegemoduls und der lateralen Spannung nicht möglich. Für Zellmembran konnte eine Abschätzung der lateralen Spannung und der Biegemodule, aufgrund des experimentellen Vorgehens und vorhandener Daten aus Messungen an intakten Zellen, gemacht werden. Es konnten physikalisch sinnvolle Wertebereiche für das Biegemodul und die laterale Spannung angegeben und der Einfluss der Fixierung auf die Zellmembran quantifiziert werden. Folgende Aussagen für porenüberspannende Membranen getroffen werden:

- Freistehende Membranen stehen unter Spannung. Diese Spannung entspricht der erhöhten freien Energie freistehender Membranen im Vergleich zu festkörperunterstützten Membranen.
- Für hybride, porenüberspannende Membranen dominiert die Vorspannung die elastische Antwort. Unterstützte, porenüberspannende Membranen stehen unter wesentlich geringerer Spannung, wie es in der wesentlich niedrigeren apparenten Federkonstante zum Ausdruck kommt. Zellmembranen zeigen die niedrigsten lateralen Spannungen und einen deutlichen Einfluss durch Biegeenergien.
- Für hybride, porenüberspannende Membranen gilt: Je höher das Flächenkompressionsmodul einer Membran, desto höher kann auch die Vorspannung in dieser sein.
- Die Theorie von Norouzi *et al.* ist eine gute Beschreibung der experimentellen Daten. Durch Gleichungen 6.18 und 6.10 können die lateralen Spannungen in freitragenden Membranen quantifiziert werden.
- Für Zellmembranen konnten sinnvolle Wertebereiche für Spannung und Biegemodul angegeben, und der Einfluss der Fixierung quantifiziert werden.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, porenüberspannende Membranen als Modellsystem für biologische Membranen zu charakterisieren, und so einen Weg für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von nativen Zellmembranen aufzuzeigen.

Porenüberspannende Lipiddoppelschichten zeigen lineare Kraft-Indentations-Kurven. Ihre elastischen Antworten wurden durch die sogenannten apparenten Federkonstanten ausgewertet. Anhand hybrider, porenüberspannender Membranen wurde gezeigt, dass Geometrie der Poren, Oberfläche des Substrats, Membranphase und vorhandenes Lösungsmittel einen Einfluss auf die apparente Federkonstante haben. Die experimentellen Daten legen nahe, dass aufgrund des Unterschieds in der freien Energie zwischen porenüberspannendem Teil und auf dem Randbereich adhäriertem Membranteil eine Vorspannung in dem freitragenden Membranbereich entsteht.

Es ist möglich, die experimentellen Daten mit einem theoretischen Modell zu beschreiben und die Vorspannung zu quantifizieren. Für hybride Lipiddoppelschichten liegen die Vorspannungen in Bereichen von 7 mN/m bis zu 31 mN/m , während unterstützte porenüberspannende Membranen Vorspannungen von $150 \mu\text{N/m}$ zeigen.

Die freie Energie des freistehenden Bereichs unterstützter, porenüberspannender Membranen ist deutlich geringer als die von hybriden, porenüberspannenden Membranen. Die Ursache ist die geringere Adhäsionsenergie zwischen Membran und hydrophiler Oberfläche für unterstützte, porenüberspannende Membranen im Vergleich zu dem hohen Energiebeitrag durch die hydrophil/hydrophobe Grenzfläche in hybriden, porenüberspannenden Membranen.

Die experimentellen Daten zeigen weiterhin einen Zusammenhang zwischen Flächenkompressionsmodul und Vorspannung der Membran. Je höher das Flächenkompressionsmodul, desto höher wird auch die Vorspannung der Membran.

Kraft-Indentations-Kurven an echten Zellmembranen wurden ebenfalls mittels der apparenten Federkonstanten ausgewertet. Der Einfluss des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix auf die apparente Federkonstante, und somit auf die mechanischen Eigenschaften,

konnte innerhalb eines basolateralen Zellmembranfragments kartiert werden, wobei die Periodizität und der Porendurchmesser des Substrates das räumliche Auflösungsvermögen bestimmen. Die mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden, echten Zellmembranen können mit den gleichen theoretischen Modellen, die für künstliche Membranen angewendet wurden, beschrieben werden. Sowohl Biegung als auch laterale Spannung in der Membrane zeigen einen Einfluss auf die apparente Federkonstante. Es wurden laterale Spannungen von 10^{-5} N/m gefunden. Der Einfluß von Biegeenergien auf die elastische Antwort von Zellmembranfragmenten während der Indentation wurde anhand der Fixierung der Membran mit Paraformaldehyd gezeigt. Das Biegemodul fixierter basolateraler Zellmembranfragmente erhöhte sich um einen Faktor 5 bis 10. Es konnte ein Verfahren etabliert werden um eine „Karte“ der mechanischen Eigenschaften eines nativen Zellmembranfragments mit einer Auflösung von etwa einem Mikrometer zu erstellen.

Hybride, porenüberspannende Membranen sind so stark vorgespannt, dass intrinsische Parameter, wie das Biegemodul der Membran, nicht messbar sind. Die hohen Spannungen können jedoch als Chance genutzt werden um mechanosensitive Kanäle zu untersuchen. Ein kombinierter Aufbau aus Einzelkanalmessmethoden und Rasterkraftmikroskopie wäre so in der Lage, die Funktion der Kanäle in Abhängigkeit der Spannung in der Membran zu messen. Unterstützte, porenüberspannende Lipiddoppelschichten sind ein geeignetes Modellsystem, um mikromechanische Eigenschaften natürlicher Membranen zu beschreiben. Sie zeigen eine niedrige laterale Spannung von 10^{-4} N/m, die ähnlich denen eines Zellmembranfragmentes sind. Weiterführende Experimente sollten sich mit dem Aufbau eines künstlichen Zytoskeletts auf unterstützten Lipiddoppelschichten beschäftigen, um so das natürlich System der Zellmembran nachzubauen. So wäre es möglich, durch Variation der Ankerproteine in der Membran gezielte Aussagen über die Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett zu treffen.

Weiterhin wäre ein Vergleich der mechanischen Eigenschaften von *wild-type* Zellen und Mutanten, denen Ankerproteine zwischen Membran und Zytoskelett fehlen, interessant. Auf diese Weise könnten Kopplungsparameter für einzelne Proteine bestimmt werden, um die mechanischen Vorgänge in lebenden Zellen weiter aufzuklären.

Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731, 1972.
- [2] D. Boal. *Mechanics of the cell*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- [3] L. Stryer. *Biochemistry*. W.G. Freedman and Co., New York, 1999.
- [4] A. Stier and E. Sackmann. Spin Labels As Enzyme Substrates - Heterogeneous Lipid Distribution in Liver Microsomal Membranes. *Biochim. et. Biophys. A.*, 311:400–408, 1973.
- [5] Lin W.-C. Lee, C.-H. and Wang J. All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Phys. Rev. E*, 64(2):020901, Jul 2001.
- [6] E.A. Evans. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys. J.*, 14:923–931, 1974.
- [7] R. Merkel, R. Simson, D. A. Simson, M. Hohenadl, A. Boulbitch, A. Wallraff, and E. Sackmann. A Micromechanical Study of Cell Polarity and Plasma Membrane Cell Body Coupling in Dictyostelium. *Biophys. J.*, 79:707–719, 2000.
- [8] A. Janshoff and C. Steinem. Scanning force microscopy of model membranes. *Biospektrum*, 5:401–406, 2000.
- [9] H. Lang, C. Duschl, and H. Vogel. A new class of thiolipids for attached bilayers on gold surfaces. *Langmuir*, 10:197–210, 1994.
- [10] Y. Cheng, S. D. Ogier, R. J. Bushby, and S. D. Evans. Discrete membrane arrays. *Rev. Mol. Biotechn.*, 74:159–174, 2000.
- [11] S. Steltenkamp, C. Rommel, J. Wegener, and A. Janshoff. Membrane Stiffness of Animal Cells Challenged by Osmotic Stress. *Small*, 2:1016–1020, 2006.
- [12] X. Yao, M. Jericho, D. Pink, and T. Beveridge. Thickness and Elasticity of Gram-Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy. *J. Bact.*, 181:6865–6875, 1999.

- [13] C. Hennessal and C. Steinem. Pore-Spanning Lipid Bilayers Visualized by Scanning Force Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8085–8086, 2000.
- [14] C. Hennessal, J. Drexler, and C. Steinem. Membrane-suspended nanocompartments based on ordered pores in alumina. *ChemPhysChem*, 3:885–889, 2002.
- [15] S. Steltenkamp, M.M Müller, M. Deserno, C. Hennessal, C. Steinem, and A. Janshoff. Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by scanning force microscopy. *Biophys. J.*, 91:217–226, 2006.
- [16] R.P. Goncalves, G. Agnus, P. Sens, C. Houssin, B. Bartenlian, and S. Scheuring. Two-Chamber AFM: probing membrane proteins separating two aqueous compartments. *Nat. Meth.*, 3:1007–1012, 2006.
- [17] W. Xu, P.J. Mulhern, B.L. Blackford, M.H. Jericho, M. Firtel, and T.J. Beveridge. Modelling and Measuring the Elastic Properties of an Archaeal Surface, the Sheath of *Methanospirillum hungatei*, and the Implication for Methane Production. *J. Bact.*, 178:3106–3112, 1996.
- [18] C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, and J. Hone. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science*, 321(5887):385–388, 2008.
- [19] R. D. Piner, T. T. Xu, F. T. Fisher, Y. Qiao, and R. S. Ruoff. Atomic Force Microscopy Study of Clay Nanoplatelets and Their Impurities. *Langmuir*, 19:7995–8001, 2003.
- [20] D.A. Kunz, E. Max, R. Weinkammer, T. Lunkenbein, J. Breu, and Frey. A. Deformation Measurements on Thin Clay Tactoids. *Small*, 9:1816–1820, 2009.
- [21] K. Simons and E. Ikonen. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature*, 387:569–572, 1997.
- [22] Simmons. K. and D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.*, 1:31–39, 2000.
- [23] G. Cevc and D. Marsh. *Phospholipid bilayers*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA, 1987.
- [24] R. B. Gennis. *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer-Verlag New York Inc., New York, N.Y., USA, 1989.
- [25] H.P. Duwe, H. Engelhardt, H. Zilker, and WE. Sackmann. Curvature elasticity of smectic A lipid bilayers and cell plasma membranes. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 152:1–7, 1987.
- [26] L. Bo and R.F. Waugh. Determination of bilayer membrane bending stiffness, by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, 55:2123–2128, 1998.

- [27] E. Evans and W. Rawicz. Entropy driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 64:2094–2097, 1990.
- [28] D. Needham and R.S. Nunn. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.*, 58:997–1009, 1990.
- [29] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans. Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79(1):321–327, July 2000.
- [30] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79(1):328–339, July 2000.
- [31] W. Rawicz, B.A. Smith, T.J. McIntosh, S.A. Simon, and E. Evans. Elasticity, Strength, and Water Permeability of Bilayers that Contain Raft Microdomain-Forming Lipids. *Biophysical Journal*, 94(12):4725–4736, June 2008.
- [32] U. Seifert and R. Lipowski. Adhesion of vesicles. *Phys. Rev. A.*, 42(8), 1990.
- [33] S. Schuy, N.C. Yoder, V. Kalsani, K. Kumar, A. Janshoff, and R. Vogel. Structure and thermotropic phase behavior of fluorinated phospholipid bilayers: A combined attenuated total reflection FTIR spectroscopy and imaging ellipsometry study. *J. Phys. Chem. B*, 112:8250–8256, 2008.
- [34] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, and H. Fuchs. Force Spectroscopy of Molecular Systems - Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:3212–3237, 2000.
- [35] Steinem-C. Janshoff A. Johnson J. E. Ghadiri M. R. Bong, D. T. Y. A highly membrane active peptide in Flock House virus: Implications for the mechanism of nodavirus infection. *Chem. Biol.*, 6:473–481, 1999.
- [36] Steinem C. Sieber-M. el Bâya A. Schmidt M. A. Galla H.-J. Janshoff, A. Quartz crystal microbalance investigation of the interaction of bacterial toxins with ganglioside containing solid supported membranes. *Eur. Biophys. J.*, 26:261–270, 1997.
- [37] S. Faiss, Kastl. K., A. Janshoff, and C. Steinem. Irreversible formation of protein domains on POPC/POPS solid supported membranes by annexin A1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778:1601–1610, 2008.
- [38] Schäfer E. Schuy, S., N.C. Yoder, R. Vogel, S. Hobe, K. Kumar, and A. Janshoff. Coiled coil lipopeptides mimicking the prehairpin intermediate of gp41. *Angew. Chemie. Int. Ed.*, 48:751–754, 2009.
- [39] D. V. Weiskopf. *Stabilität und laterale Mobilität an porenüberspannenden Membranen*

- auf porösen Siliziumsubstraten*. PhD thesis, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2009.
- [40] Dertinger T., I. von der Hocht, Benda A., M. Hof, and J. Enderlein. Surface Sticking and lateral diffusion of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir*, 22:9339–9344, 2006.
- [41] Lopez A., L. Dupou, A. Altibell, J. Trotard, and J.F. Tocanne. Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions and, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficients. *Biophys. J.*, 53:963–970, 1998.
- [42] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Wescott. Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System. *Nature*, 194(4832):979–980, 1962.
- [43] M. Montal and P. Mueller. Formation of biomolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(12):3561–3566, 1972.
- [44] P. Müller, D. O. Rudin, H. T. tein, and W. C. Wescott. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 67:534–535, 1963.
- [45] E. Bamberg, H. Alpes, H. J. Apell, R. Bradley, B. Harter, M.J. Quelle, and D. W. Urry. Formation of Ionic Channels in Black Lipid-Membranes by Succinic Derivatives of Gramicidin-A. *J. Membrane Biol.*, 50(3-4):257–270, 1979.
- [46] M. Naumowicz, A. D. Petelska, and Z. A. Figaszewski. Impedance analysis of a phosphatidylcholine-phosphatidylethanolamine system in bilayer lipid membranes. *Electrochim. Acta*, 51(24):4024–5028, 2006.
- [47] S.B. Hladky and D.W.R. Gruen. Thickness Fluctuations in Black Lipid Membranes. *Biophys. J.*, 38:251–258, 1982.
- [48] E. Ovalle-Garcia and I. Ortega-Blake. Joining patch-clamp and atomic force microscopy techniques for studying black lipid bilayers. *Appl. Phys. Lett.*, 91, 2007.
- [49] E.K. Schmitt, M. Nurnabi, R. J. Bushby, and C. Steinem. Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading. *Soft Matter*, 4:250–253, 2008.
- [50] E. K. Schmitt, M. Vrouwenraets, and C. Steinem. Channel activity of OmpF monitored in nano-BLMs. *Biophys. J.*, 91:2163–2171, 2006.
- [51] D. Weiskopf, E.K. Schmitt, M.H. Klühr, S.K. Dertinger, and C. Steinem. Micro-BLMs

- on highly ordered porous silicon substrates: Rupture process and lateral mobility. *Langmuir*, 23:9134–9139, 2007.
- [52] B. Lorenz, I. Mey, S. Steltenkamp, T. Fine, C. Rommel, M. M. Mueller, A. Maiwald, J. Wegener, C. Steinem, and A. Janshoff. Elasticity Mapping of Pore-Suspending Native Cell Membranes. *Small*, 5(7):832–838, 2009.
- [53] I. Mey, M. Stephan, E. K. Schmitt, M. M. Mueller, M. Ben Amar, C. Steinem, and A. Janshoff. Local Membrane Mechanics of Pore-Spanning Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 131(20):7031–7039, 2009.
- [54] A. Janshoff and C. Steinem. Lipid membranes on highly ordered porous alumina substrates. In M. Schwarz, editor, *Smart Materials*, chapter 33. CRC Press., 2008.
- [55] Hennesthal and C. Steinem. Pore suspending membranes on highly ordered porous alumina and porous silicon substrates: Preparation, characterization, and application. In A. Leitmannova Liu, editor, *Advances on planar lipid bilayers and liposomes*, chapter 3. 2008.
- [56] C. Kepplinger, I. Höfer, and C. Steinem. Impedance analysis of valinomycin activity in nano-BLMs. *Chem. Phys. Lipids*, 160:109–113, 2009.
- [57] W. Roemer and C. Steinem. Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina. *Biophys. J.*, 86:955–965, 2004.
- [58] M. Böcker, S. Muschter, E.K. Schmitt, C. Steinem, and T.E. Schaffer. Imaging and patterning of pore-suspending membranes with scanning ion conductance microscopy. *Langmuir*, 25:3022–3028, 2009.
- [59] G. Lenaz. Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Biosci Rep.*, 7(11):823–837, 1987.
- [60] T. Cavalier-Smith. The origin of eukaryote and archaeobacterial cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 503:17–54, 1987.
- [61] R. A. Demel, J. W. C. M. Jansen, P. W. M. Van Dijk, and L. L. M. Van Deenen. The preferential Interaction of Cholesterol with Different Classes of Phospholipids. *Biochim. et Biophys. Acta*, 465:1–10, 1977.
- [62] K. J. Tierney, D. E. Block, and M. L. Longo. Elasticity and phase behaviour of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol and ethanol. *Biophys. J.*, 89:2481–2493, 2005.
- [63] J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, and M. J. Zuckermann. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*, 908:162–172, 1987.

- [64] O. G. Mouritsen and M. J. Zuckermann. What's so special about cholesterol? *Lipids*, 39:1101–1113, 2004.
- [65] G. Loeffler. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. CSpringer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [66] R. Winter. Struktur und Dynamik von Modellmembranen. 1990.
- [67] B. Pajak, U. Wojewodzka, B. Gajkowska, and Orzechowski A. Lipid rafts in anticancer therapy, Theory and practice (Review). *Mol. Med. Rep.*, 1:167–172, 2008.
- [68] G. Binning and C.F. Quate. Atomic force microscope. *Physical Letter*, 56(9):930–934, 1986.
- [69] V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press, 57 Shelton Street, Covent Garden, London, 1999.
- [70] H. Takano, J. R. Kenseth, S. Wong, J. C. O'Brien, and M. D. Porter. Chemical and Biochemical Analysis Using Scanning Force Microscopy. *Chem. Rev.*, 99:2845–2890, 1999.
- [71] A. Ikai. STM and AFM of bio/organic molecules and structures. *Surface Science Reports*, 26:261–332, 1996.
- [72] Y. F. Dufrene and G. U. Lee. Advances in the characterisation of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1509:14–41, 2000.
- [73] M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, and H.E. Gaub. From Molecules to Cells: Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Science*, 257:1900–1905, 1992.
- [74] D.J. Müller, F.A. Schabert, G. Büldt, and A. Engel. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 68:1681–1686, 1995.
- [75] H.-A. Kolb, O. Enders, and R. Schauer. Morphology of native and reconstituted biological membranes and their components analysed with atomic force microscopy. *Applied Physics A*, 68:247–254, 1999.
- [76] O. H. Willemsen, M. M. E. Snel, K. O. van der Werf, B. G. de Grooth, J. Greve, P. Hinterdorfer, H. J. Gruber, H. Schindler, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. Simultaneous Height and Adhesion Imaging of Antibody-Antigen Interactions by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 75:2220–2228, 1998.
- [77] D. J. Müller, D. Fotiadis, and A. Engel. Mapping flexible protein domains at subnanometer resolution with the atomic force microscope. *FEBS Letters*, 430(1):105–111, 1998.

- [78] Y. Jiao and T.E. Schäffer. Accurate Height and Volume Measurements of Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 20:10038–10045, 2004.
- [79] Y. Martin, C. C. Williams, and H. K. Wickramasinghe. Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J. Appl. Phys.*, 61:4723, 1987.
- [80] J. E. Stern, B. D. Terris, H. J. Mamin, and D. Rugar. Deposition and imaging of localized charge on insulator surfaces using a force microscope. *Appl. Phys. Lett.*, 53:2717, 1988.
- [81] R. Erlandsson, G. M. McClelland, C. M. Mate, and S. Chiang. Atomic force microscopy using optical interferometry. *J. Vac. Sci. Technol. A*, 6(2):266–270, 1988.
- [82] Y. Martin and H. K. Wickramasinghe. Magnetic imaging by “force microscopy” with 1000 Å resolution. *Appl. Phys. Lett.*, 50:1455, 1987.
- [83] J. J. Sáenz, N. Garcia, P. Grütter, E. Meyer, H. Heinzelmann, R. Wiesendanger, L. Rosenthaler, H. R. Hidber, and H. J. Güntherodt. Observation of magnetic forces by the atomic force microscope. *J. Appl. Phys.*, 62:4293, 1987.
- [84] S. Porthun, L. Abelmann, and C. Lodder. Magnetic force microscopy of thin film media for high density magnetic recording. *J. Magn. Magn. Mater.*, 182:238–273, 1998.
- [85] M. R. Koblischka and U. Hartmann. Recent advances in magnetic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 97:103–112, 2003.
- [86] S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, and J. Gurley. An atomic-resolution atomic-force-microscope implement using optical lever. *J. Appl. Phys.*, 65:164–167, 1989.
- [87] G. Meyer and N. M. Amer. Erratum: Novel optical approach to atomic force microscopy [Appl. Phys. Lett. 53, 1045 (1988)]. *Appl. Phys. Lett.*, 53:2400, 1988.
- [88] H.-J. Butt, B. Cappella, and M. Kappl. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, 59:1–152, 2005.
- [89] T. E. Schaffer and P. K. Hansma. Characterization and optimization of the detection sensitivity of an atomic force microscope for small cantilevers. *J. Appl. Phys.*, 84:4661, 1998.
- [90] S. M. Hues, C. F. Draper, K. P. Lee, and R. J. Colton. Effect of PZT and PMN actuator hysteresis and creep on nanoindentation measurements using force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 65:1561, 1994.
- [91] M. Preuss and H.-J. Butt. Direct Measurement of Particle-Bubble Interactions in Aqueous Electrolyte: Dependence on Surfactant. *Langmuir*, 14:3164–3174, 1998.

- [92] J. Alcaraz, L. Buscemi, Puig de Morales. M., J. Colchero, A. Baro, and D. Navajas. Correction of Microrheological Measurements of Soft Samples with Atomic Force Microscopy for the Hydrodynamic Drag on the Cantilever. *Langmuir*, 18:716–721, 2002.
- [93] M. B. Viani, T. E. Schäffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, and P. K. Hansma. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *Journal of Applied Physics*, 86(4):2258–2262, 1999.
- [94] D. Sarid. *Scanning Force Microscopy: With Applications to Electric, Magnetic, and Atomic Forces*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, 1994.
- [95] H.-J. Butt, P. Siedle, K. Seifert, K. Fendler, T. Seeger, E. Bamberg, A. L. Weisenhorn, K. Goldie, and A. Engel. Scan speed limit in atomic force microscopy. *J. Microsc.*, 169:75, 1993.
- [96] J. E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, and L.R. White. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.*, 66:3789, 1995.
- [97] J. E. Sader, Chon J. W. M., and P. Mulvaney. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.*, 70:3967, 1999.
- [98] M. Benoit, T. Holstein, and H. E. Gaub. Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles. *Eur. Biophys. J.*, 26:283–290, 1997.
- [99] J. Rädler, M. Radmacher, and H. E. Gaub. Velocity-dependent forces in atomic force microscopy imaging of lipid films. *Langmuir.*, 10:3111–3115, 1994.
- [100] A.A. Boulbitch. Deflection of a cell membrane under application of a local force. *Phys. Rev. E.*, 57:2123–2128, 1998.
- [101] B. Gotsmann and H. Fuchs. Damping mechanism in dynamic forces. *Appl. Surf. Sci.*, 188:355–362, 2002.
- [102] B. Gotsmann. *Dynamische Kraftspektroskopie*. PhD thesis, Physikalisches Institut, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster, 2000.
- [103] D. Krüger, B. Anczykowski, and H. Fuchs. Physical properties of dynamic force microscopy in contact and noncontact operation. *Annalen der Physik*, 6:341–363, 1997.
- [104] B. Cappella and G. Dietler. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, 34:1–104, 1999.
- [105] M. Janke, Y. Rudzevich, O. Molokanova, T. Metzroth, I. Mey, G. Diezemann, P.E. Marszalek, J. Gauss, V. Böhmer, and A. Janshoff. Mechanically interlocked calix[4]arene dimers display reversible bond breakage under force. *Nat. Nanotechnol.*, 4:225–229, 2009.

- [106] J.P. Junker, F. Ziegler, and M. Rief. Ligand-Dependent Equilibrium Fluctuations of Single Calmodulin Molecules. *Science*, 323:633–637, 2009.
- [107] J. H. Hoh and W. F. Heinz. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Nanotechnology*, 17:143–150, 1999.
- [108] K. O. van der Werf, C. A. J. Putman, B. G. de Groth, and J. Greve. Adhesion force imaging in air and liquid by adhesion mode atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 65:1195, 1994.
- [109] B. Cappella, P. Baschieri, C. Frediani, P. Miccoli, and C. Ascoli. Improvements in AFM imaging of the spatial variation of force–distance curves: on-line images. *Nanotechnology*, 8:82, 1997.
- [110] D. D. Koleske, G. U. Lee, B. I. Gans, K. P. Lee, D. P. Dilella, K. J. Wahl, W. R. Barger, L. J. Whitman, and R. J. Colton. Design and calibration of a scanning force microscope for friction, adhesion, and contact potential studies. *Rev. Sci. Instrum.*, 66:4566, 1995.
- [111] M. Radmacher, M. Fritz, J. P. Cleveland, D. A. Walters, and P. K. Hansma. Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope. *Langmuir*, 10:3809, 1994.
- [112] D. R. Baselt and J. D. Baldeschwieler. Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope. *J. Appl. Phys.*, 76:33, 1994.
- [113] M. Heuberger, G. Dietler, and L. Schlapbach. Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope. *Nanotechnology*, 6:12, 1995.
- [114] N. H. Green, S. Allen, M. c. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, and P. M. Williams. Force sensing and mapping by atomic force microscopy. *TrAC Trends in Anal. Chem.*, 21:65–74, 2002.
- [115] C. C. Dupont-Gillain, B. Nysten, V. Hlady, and P. G. Rouxhet. Atomic Force Microscopy and Wettability Study of Oxidized Patterns at the Surface of Polystyrene. *J. Colloid Interf. Sci.*, 220:163, 1999.
- [116] M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit, and H. E. Gaub. Affinity Imaging of Red Blood Cells Using an Atomic Force Microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, 48:719, 2000.
- [117] Y. Jiao and T. E. Schäffer. Accurate Height and Volume Measurements on Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 20(23):10038–10045, 2004.

- [118] L.A. Bagatolli, T. Parasassi, and E. Gratton. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: A two photon fluorescence microscopy study . *Chem. Phys. Lipids*, 105:135–147, 2000.
- [119] U. Ziegler, A. Vinckier, P. Kernen, D. Zeisel, J. Biber, G. Semenza, H. Murer, and P. Groscurth. Preparation of basal cell membranes for scanning probe microscopy. *FEBS Lett.*, 436:179–184, 1998.
- [120] S. Steltenkamp. *Mechanische Eigenschaften von freitragenden artifiziellen und nativen Membranen*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2006.
- [121] A.M. Kleinfeld, P. Chu, and C. Romero. Transport of Long-Chain Native Fatty Acids across Lipid Bilayer Membranes Indicate That Transbilayer Flip-Flop is Rate Limiting. *Biochemistry*, 36:14146–14158, 1997.
- [122] C.Y. Zhang and Y.W. Zhang. Effects of membrane pre-stress and intrinsic viscoelasticity on nanoindentation of cells using AFM. *Philosophical Magazine*, 87:3415–3435, 2007.
- [123] G. Xu and J.-Y. Shao. Human neutrophil surface protusion under a point load: location independence and viscoelasticity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 295:C1434–C1444, 2008.
- [124] E.K. Schmitt, Nurnabi, M., R.J. Bushby, and C. Steinem. Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading. *Soft Matter*, 4:250–253, 2007.
- [125] A. Sonnleitner, G.J. Schütz, and T. Schmidt. Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. *Biophys. J.*, 77:2638–2642, 1999.
- [126] S. Ladha, A.R. Mackie, L.J. Harvey, D.C. Clark, E.J. Lea, M. Brullermann, and H. Duclouhier. Laterale diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophys. J.*, 71:1364–1373, 1996.
- [127] M. A. Gedig. Quantitative Untersuchungen zur Interdigitation festkörperunterstützter Lipidmembranen mit Hilfe abbildender Ellipsometrie. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2007.
- [128] Volker Franz, Simona Loi, Henning Müller, Ernst Bamberg, and Hans-Jürgen Butt. Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23(2-3):191 – 200, 2002.
- [129] W. Shinoda and M. Mikami. Molecular Dynamics Study of Bipolar Tetraether Lipid Membranes. *Biophys. J.*, 89:3195–3202, 2005.

- [130] R. Simson, E. Wallraff, J. Faix, J. Niewenhöher, G. Gerisch, and E. Sackmann. Membrane bending modulus and adhesion energy of wildtype and mutant cells of *Dictyostelium* lacking talin or cortexillins. *Biophys. J.*, 74:514–522, 1998.
- [131] D.D. Sabatini, K. Bensch, and Barnettm R.J. CYTOCHEMISTRY AND ALACTRON MICROSCOPY - The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. *J. Cell Biol.*, 17:20–58, 1963.
- [132] A.B. Mathur, A.M. Collinsworth, W.M. Reichert, W.E. Kraus, and G.A. Truskey. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J. Biomech.*, 34:1545–1553, 2001.
- [133] T. Fine, I. Mey, C. Rommel, J. Wegener, C. Steinem, and A. Janshoff. Elasticity mapping of apical cell membranes. *Soft Matter*, 5:3262–3265, 2009.
- [134] N.M. Bhatia and W. and Nachbar. Finite Indentation of an elastic Membrane by a spherical indenter. *Int. J. Non-Linear Mechanics*, 3:307–324, 1968.
- [135] N.M. Bhatia and W. and Nachbar. Finite Indentation of an elastic-perfectly plastic Membrane by a spherical indenter. *AIAA J.*, 6:1050–1057, 1968.
- [136] M.R. Begley and T.J. Mackin. Spherical indentation of freestanding circular thin films in the membrane regime. *J. Mechanics Phys. Solids*, 52:2005–2023, 2004.
- [137] U. Komaragiri, M. R. Begley, and J. G. Simmonds. The mechanical response of free-standing circular elastic films under point and pressure loads. *Journal of Applied Mechanics*, 72(2):203–212, 2005.
- [138] D. Norouzi, M.M. Müller, and M. Deserno. How to determine local elastic porperties of lipid bilayer membranes from atomic-force-microscope measurements: A theoretical analysis. *Phys. Rev. E.*, 75:061914, 2006.
- [139] L.D. Landau and E.M. Lifschitz. *Theory of Elasticity*. Pergamom Press, New York, 1986.
- [140] H. Bermdez, D.A. Hammer, and D.E. Discher. Effect of Bilayer Thickness on Membrane Bending Rigidity. *Langmuir*, 20:540–543, 2004.
- [141] W. Helfrich. Elastic properties of lipid bilayer: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch.*, 28(c):693–703, 1973.
- [142] A. Libai and J.G. Simmonds. *The Non-Linear Theory of Elastic Shells*, 2nd Ed. *Cambridge University Press*, 1998.
- [143] M.M. Mueller. *Theorethische Unetrsuchung zur Mechanik fluider Membranen*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2007.

- [144] P.B. Canham. The minimum energy of bending as a possible explanation of the bi-concave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, pages 61–81, 1970.
- [145] J.F. Nagle and S. Tristram-Nagle. Structure of Lipid Bilayers. *Biochim. et. Biophys. Acta*, 1469:159–195, 2000.
- [146] J.A. Lundbaek and O.S. Andersen. Lysophospholipids Modulate Channel Function by Altering the Mechanical Properties of Lipid Bilayers. *J. Gen. Physiol.*, 104:645–673, 1994.
- [147] J. Genova, V. Vitkova, L. Aladjem, P. Meleard, and M.J. Mitov. Stroboscopic Illumination gives new opportunities and improves the precision of bending elastic modulus measurements. *Optoelectron. Adv. Mat.*, 7:257–260, 2005.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung und Strukturformeln von verschiedenen Glycerophospho-Lipiden. Die Kopfgruppe ist der hydrophile Teil (gelb) während die Ketten (schwarz) hydrophob sind.	6
2.2	a) Darstellung der Mizellkonzentration als Funktion der Monomerkonzentration in Lösung. b) Verlauf der freien Energie der Mizellbildung für Phosphocholin-Lipide mit einer bzw. zwei Ketten in Abhängigkeit der Kettenlänge. Die eingezeichneten Geraden sind mit Gl. 2.5 angepasst worden. Quelle: [23].	8
2.3	Gezeigt sind ein unilamellares Vesikel (a) welches genau eine Lipiddoppelschicht enthält, während ein multilamellares Vesikel (b) aus mehreren Doppelschichten aufgebaut ist, die übereinandergestapelt sind.	10
2.4	Schema einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht. Zwischen dem Substrat und der Lipiddoppelschicht befindet sich ein dünner Wasserfilm von etwa 1 nm Dicke.	11
2.5	Eine Lipiddoppelschicht die mittels eines Spacermolekül mit deutlichem Abstand zu dem Substrat hergestellt wird. In unserem Fall kommt Cholesterolpolyethylenoxid (CPEO3) zum Einsatz, welches mittels Thiol/Gold Chemie kovalent auf dem Substrat gebunden wird.	12
2.6	Schematische Darstellung einer <i>Black Lipid Membrane</i> die, über eine Apertur gespannt, zwei Kompartimente voneinander trennt.	13
2.7	Schema einer hybriden, porenüberspannenden Membran. Die Funktionalisierung reicht in die Pore entlang der Goldschicht hinein. Die freitragende Lipiddoppelschicht wird erst unterhalb des Porenrandes am Übergang der Goldschicht zu der Chrom/Siliziumdioxidgrenze gebildet.	14
2.8	Eine festkörperunterstützte, porenüberspannende Membran. Eine ununterbrochene Lipiddoppelschicht überspannt sowohl den Porenrand, als auch die Poren. Die Lipide können sich frei über das gesamte Substrat bewegen.	15
2.9	Schematische Darstellung vier verschiedener Phasen eine Lipiddoppelschicht: L_C , die lamellar-kristalline Phase, L_{β}' , die lamellare Gel Phase, P_{β}' die <i>rippled-gel</i> Phase und L_{α} , die flüssig-kristalline Phase.	15

2.10	Die chemische Struktur von Cholesterol. Die Hydroxylgruppe ist der polare Teil, während das Gonangerüst den unpolaren Teil darstellt. Cholesterol hat einen amphiphilen Charakter.	16
2.11	Schematische Darstellung einer Zellmembran entsprechend dem fluid Mosaic Modell von Singer und Nicolson. Innerhalb einer fluiden zweidimensionalen Matrix befinden sich Proteine und weitere Bestandteile. Die fluide Matrix ermöglicht dabei eine hohe Beweglichkeit der einzelnen Komponenten. Quelle: [66]	17
3.1	Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Die Probe wird von x,y-Piezos relativ zu dem <i>Cantilever</i> bewegt. Der <i>Cantilever</i> kann in der z-Achse ebenfalls durch einen Piezo bewegt werden. Die Auslenkung des <i>Cantilevers</i> wird mittels eines Licht-Zeiger-Systems detektiert. Ein Laserstrahl wird auf den <i>Cantilever</i> fokussiert, von diesem reflektiert und auf einer vier Quadranten Photodiode ausgelesen.	20
3.2	Schematisch ist der Einfluss der Spitzengeometrie auf das resultierende topographische Bild dargestellt. Die schwarze Linie ist die wirkliche Geometrie der Oberfläche während rot die gemessene Topographie eines Rasterkraftmikroskops zeigt. In a) wurde der Einfluss einer sehr stumpfen AFM-Spitze und in b) der Einfluss einer sehr scharfen Sonde dargestellt.	25
3.3	Von a) nach e) wird die Umrechnung der Messsignale in eine Kraft-Abstands-Kurve dargestellt (Details s. Text).	28
3.4	Der Vergleich topographischer Bilder aufgenommen a) im <i>Force Volume</i> Verfahren und b) im Kontaktmodus. Deutlich ist, dass <i>Force Volume</i> Messungen eine geringeres Auflösungsvermögen haben, jedoch zu jedem Punkt eine Kraft-Abstands-Kurve abspeichern. Somit können wesentlich mehr Informationen als nur die Topographie der Oberfläche ausgewertet werden.	31
3.5	Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.	32
3.6	Strukturformeln der verwendeten Chemikalien für die Funktionalisierung von Goldoberflächen mittels Thiol-Gold Wechselwirkung. Oktanthiol (OT) bildet eine dichteste Packung auf einer Goldoberfläche, während das Cholesterol-polyethylen-oxid sehr groß ist und keine dichteste Packung bildet. CPEO3 ist jedoch erheblich länger und wird für sogenannte <i>tethered Lipidmembranes</i> (Abschnitt 2.3.3) genutzt.	33

3.7	In a)-c) ist schematisch der Präparation von nano-BLMs mittels <i>Lipid-Painting</i> dargestellt. Lipid gelöst in einem organischen Lösungsmittel wird auf das Substrat gegeben (a). Die Lipide orientieren sich an der hydrophil/hydrophoben Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und wässrigem Medium. Das Lösungsmittel dünnt langsam aus (b), bis schließlich eine porenüberspannende Lipiddoppelschicht zurück bleibt (c). Restliches Lösungsmittels bleibt ebenfalls in der Membran zurück.	35
3.8	Hybride porenüberspannende Membranen können ebenfalls durch Spreiten von Vesikeln auf der hydrophoben Oberfläche erzeugt werden. Diese Membranen enthalten keine Lösungsmittelreste, wie es durch <i>Lipid-Painting</i> (Abb. 3.7) passiert.	36
3.9	Präparation basolateraler Zellmembran. Die Zellen werden auf dem porösen Substrat gezüchtet (a). Durch osmotischen Stress schwellen die Zellen an (b). Überspülen der geschwollenen Zellen führt zu Scherkräften, welche den apikalen Teil der Zelle (grün) abtrennen. Basolaterale Membran (rot) verbleibt auf dem Substrat.	37
4.1	a) zeigt die schematische Darstellung der verwendeten porösen Substrate. Ein Gitter ergibt sich durch die vertikale und horizontale Unterteilung des Substrates in poröse (schwarze) und nichtporöse Bereiche. b) und c) zeigen REM Aufnahmen der regelmäßigen porösen Struktur des Substrates. Die Poren sind durchgehend auf beiden Seiten geöffnet und haben eine Tiefe von etwa 1 μm . In d) ist die REM Aufnahme eines porösen Substrates mit einer 60 nm dicken Schicht Gold auf der Oberfläche gezeigt. Das Gold zeigt in der REM Aufnahme einen helleren Materialkontrast.	41
4.2	Gezeigt sind ein topographisches Bild und ein Höhenprofil entlang einer unbedeckten Pore. Deutlich zu sehen ist, dass die Porenwände kegelförmig zusammenlaufen, was im Widerspruch zu Abbildung 4.1 steht. In einem rasterkraftmikroskopischen Bild wird an diesen sprungartigen Höhenveränderungen die Spitzengeometrie der Rastersonde abgebildet.	42
4.3	a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der <i>Cantilever</i> Spitze (Veeco, MSCT-C) mit einem Spitzenradius von etwa 15 nm. Die Spitze ist nur über eine Länge von etwa 50 nm paraboloid, im Anschluss dominiert die quadratisch pyramidale Grundfläche. b) Schematische Zeichnung des Einflusses der pyramidalen Basis auf die maximale Eindringtiefe.	43

- 4.4 Charakterisierung der Siliziumsubstrate durch Rasterkraftmikroskopie. Der Durchmesser einer Pore beträgt 500 nm, die Porosität liegt bei nur 2%. Die maximale Eindringtiefe der Spitze eines Biolever beträgt hier ca. 300 nm. Deutlich sind Artefakte während des Abbildens zu erkennen welche durch die unsymmetrische Spitzengeometrie des Biolevers (c) zu erklären ist. 44
- 4.5 Darstellung der Korrelation von AFM und Fluoreszenzexperimenten. a) zeigt ein Fluoreszenzbild, vor der Durchführung rasterkraftmikroskopischer Studien in dem markierten Bereich. In b) ist die erste AFM Aufnahme innerhalb des in a) dargestellten Bereichs gezeigt, einige porenüberspannende Membranen reißen durch den Einfluss der AFM-Spitze. c) topographisches Bild nach AFM Studien in diesem Bereich, es sind sowohl geöffnete als auch geschlossene Poren vorhanden. d) zeigt in einem Höhenprofil den Unterschied der Eindringtiefe in eine belegte und eine unbelegte Pore. Die porenüberspannende Membran wird nur ca. 65 nm tief eingedrückt. e) eine Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs zeigt eine Übereinstimmung zwischen fluoreszenten/bedeckten und nicht fluoreszenten/unbedeckten Poren. Verdeutlicht wird dies in der Überlagerung beider Bilder in f). 46
- 4.6 a) Ein topographisches Bild in dem die *Cantilever*-Spitze in den Mitten der markierten Poren positioniert wurde, um Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen. In (b) ist exemplarisch der Vergleich zwischen einer Kraft-Abstands-Kurve auf dem Porenrand (rot) und der typischen elastischen Antwort einer porenüberspannenden Lipiddoppelschicht (schwarz) gezeigt. Die Spitze kommt erst 60 nm unterhalb des Porenrands in Kontakt mit der Membran (I), erfährt dann eine mit der Eindringtiefe linear steigende Kraft (II), bis die Membran schließlich reißt (III) und der *Cantilever* keine Kraft mehr erfährt (IV). 470 nm unterhalb des Porenrandes trifft der *Cantilever* auf ein hartes Substrat (V). Als Konsequenz ist in einer anschließenden Abbildung c) die Pore geöffnet. 48
- 4.7 Bestimmung der apparenten Federkonstante aus den Steigungen der Kraftkurven. a) zeigt die Kraft-Abstands-Kurve im Vergleich zum Porenrand, die Bestimmung der apparenten Federkonstante kann über den gesamten Indentationsbereich erfolgen. b) zeigt eine Indentations-Kurve, es ist kein Vergleich zum Rand gegeben und der Kontakt zwischen Membran und *Cantilever*-Spitze wurde als Nullpunkt gesetzt. Die apparente Federkonstante kann in dieser Kurve nicht über den gesamten Bereich erfolgen, da nach etwa 40 nm eine Instabilität zu sehen ist, welche die Membran allerdings nicht zerstört. 50

4.8 Schematische Darstellung von hybriden, porenüberspannenden Lipiddoppelschichten, dem Indentationsvorgang und der möglichen Interpretation von Rissereignissen in Kraft-Indentations-Experimenten. Gezeigt sind: (a) nano-BLM ohne Einwirkung des Indenters, die Indentation (b) und verschiedene mögliche Szenarien die zur Zerstörung (c) und d)) oder teilweisen Zerstörung (e) und f)) führen. 51

4.9 a) und b) zeigen Kraft-Indentations-Kurven von DPhPC nano-BLMs (mit und ohne Lösungsmittel präpariert). Deutlich wird, dass die Indentationsgeschwindigkeit keinen Einfluss auf apparente Federkonstante hat. c) zeigt weitere Experimente in einer Darstellung $k_{app}(v)$ für verschiedene Porenradien. Auch unabhängig von der Geometrie des Systems hat die Indentationsgeschwindigkeit keinen Einfluss auf die elastische Antwort der Membran. 54

4.10 Fluoreszenz (a)-c)) und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (d)-e)) von freitragenden, hybriden DPhPC Lipiddoppelschichten auf Oktanthiol funktionalisierten Substraten mit unterschiedlichem Porenradius. Es wird stets eine gute Bedeckung erreicht, selten ist eine unbedeckte Pore zu sehen. 55

4.11 Kraft-Indentations-Kurven aufgenommen in der Mitte einer porenüberspannenden DPhPC/Bodipy-PC (99.9/0.1/n-Dekan) Membran aufgenommen (MSCT-C, $k_c = 0.01 \text{ N/m}$). Die Experimente wurden auf Substraten mit verschiedenen Porenradien durchgeführt: 600 nm (grün), 400 nm (blau) und 225 nm (rot). Die Geometrie des Messsystems zeigt einen Einfluss auf die elastische Antwort, je größer der Porenradius, desto niedriger ist die apparente Federkonstante der porenüberspannenden Membran. Unabhängig von der Porengröße werden Durchbruchs- und Rissereignisse während der Indentation beobachtet. 56

4.12 Die Histogramme zeigen die Eindringtiefe der *Cantilever*-Spitze in eine nano-BLM bis zum ersten Rissereignis der Membran auf verschieden großen Poren. Die Skalierung der x-Achse geht jeweils bis zu der abgeschätzten kritischen Flächenvergrößerung von 5%. 57

4.13 a) Schematische Darstellung von nano-BLMs auf OT bzw. b) CPEO3. Auf CPEO3 ist eine rudimentäre untere Lipiddoppelschicht ausgebildet. c) zeigt Kraft-Indentations-Kurven von nano-BLMs auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen. Die schwarze Kurve wurde auf einem CPEO3 und die graue auf einem OT funktionalisierten Substrat gemessen. Nano-BLMs auf CPEO3 funktionalisierten Oberflächen zeigen eine niedrigere apparente Federkonstante. 59

4.14 Die Histogramme zeigen die Eindringtiefe der *Cantilever*-Spitze in eine nano-BLM bis zum ersten Rissereignis der Membran für a) OT und b) CPEO3 funktionalisierte Substrate mit einem Porenradius von 400 nm. 59

- 4.15 Vergleich der elastischen Antwort von DPhPC (a) und DPPC (b) nano-BLMs präpariert mit (schwarz) und ohne (grau) Lösungsmittel. DPPC wurde bei 50°C gemessen und befand sich in der fluiden Phase. Unabhängig von dem verwendeten Lipid zeigen Membranen mit Lösungsmittel eine geringere elastische Antwort. 61
- 4.16 Histogramme der Durchbruchereignisse von DPhPC nano-BLMs sowohl mit (a) als auch ohne Lösungsmittel (b). Lösungsmittelfreie Membranen zeigen tiefere Indentationstiefen bis zum ersten Rissereignis. 62
- 4.17 DPPC/Texas-Red-DOPE(99/1)/Oktan/Dodekan(3/2), OT, $R_{Pore} = 600$ nm, DNP-S $k_c = 0.06$ N/m; Kraft-Indentations-Kurven von DPPC nano-BLMs präpariert mit der *Lipid-Painting* Technik auf OT funktionalisierten Substraten. Die schwarze Kurve wurde unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur ($T_m = 41.5^\circ\text{C}$) bei 20°C, in der Gel Phase, aufgenommen, während die graue Kurve oberhalb des Schmelzpunktes bei 50°C, in der fluiden Phase, aufgenommen wurde. Deutlich ist zu sehen, dass die elastische Antwort in der Gel Phase deutlich härter ausfällt als in der fluiden Phase. 63
- 4.18 Kraft-Indentations-Kurven von DPPC, hier grau und schwarz, und DPPC/Chol(75:25), hier blau und rot, nano-BLMs präpariert mit der *Lipid-Painting* Technik auf OT funktionalisierten Substraten ($R_{Pore} = 600$ nm, DNP-S $k_c = 0.06$ N/m). Die schwarze/blau Kurve wurde bei Raumtemperatur, unterhalb des Schmelzpunktes während die graue/rote Kurve oberhalb des Schmelzpunktes aufgenommen wurde. Auch für die Mischungen mit Cholesterol ist die apparente Federkonstante unterhalb des Schmelzpunktes höher als oberhalb. Im Vergleich zu den reinen DPPC Membrane zeigt sich allerdings, dass oberhalb des Schmelzpunktes die apparente Federkonstante steigt (grau zu rot) und unterhalb fällt (schwarz zu blau). 64
- 4.19 Histogramme der Indentationstiefe für das erste Durchbruchereignis von DPPC nano-BLMs in der fluiden und Gel Phase, sowie Mischungen von DPPC und Cholesterol. Gel Phasen zeigen eine etwas längere Durchbruchlänge als fluide Systeme, beide reißen aber meistens bei geringen Eindringtiefen um die 50 nm. Für Mischungen mit Cholesterol sind Durchbruchlängen zwischen den reinen DPPC Phasen zu erkennen. 65
- 4.20 a) und b) zeigen Fluoreszenz Aufnahmen von DPhPC/TR-DOPE(99/1) GUVs gespreitet auf porösen Si/SiO₂ Substraten. Deutlich sind einzelne Patches zu erkennen, welche poröse Bereiche bedecken. Erstaunlicherweise zeigen diese Substrate eine sehr starke Eigenfluoreszenz, Poren in von Membran unbedeckten Bereichen fluoreszieren ebenfalls. c) Ein Profil entlang der Markierung in b) zeigt einen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen bedecken und unbedeckten Poren. 67

4.21 Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme in a) zeigt deutlich die Ränder eines Bereiches der von einer Lipiddoppelschicht bedeckt ist, wie es durch die Kantenhöhe anhand des Linienprofiles in b) verdeutlicht wird. Ein Unterschied in der Indentationstiefe zwischen belegten und unbelegten Poren wird in c) gezeigt. Durch die geringe Kraft bei der Abbildung erreicht die Sondenspitze allerdings auch in der leeren Pore nicht die maximale Indentationstiefe. Eine Kraft-Abstands-Kurve auf den belegten Porenstegen ist in d) gezeigt, deutlich ist ein Durchbruchereignis mit einer Länge von etwa 6 nm bei einer Kraft von 300 pN zu erkennen. 68

4.22 Kraft-Abstands-Kurven unterstützter, porenüberspannender Lipiddoppelschichten. a) verdeutlicht, dass im Gegensatz zu hybriden Systemen die Membran (schwarz) auf Höhe des Porenrandes (rot) ist und durch die blaue Linie wurde die apparente Federkonstante bestimmt. b) zeigt ein weiteres Indentationsereignis, die Antwort ist über einen Indentationsbereich von etwa 150 nm linear, anschließend zeigt sich ein nicht lineares Verhalten. 69

4.23 Die Schemazeichnungen zeigen wie sich auf porösem Si/SiO₂ Oberflächen präparierte Lipiddoppelschicht verhält. Sie liegt planar mit dem Porenrand auf. Während einer Indentation bleibt der Abstand zwischen zwei Lipiden konstant und wird nicht verändert, da Lipide von dem Porenrand während der Indentation in die Pore nachfließen. 70

5.7 Histogramm (Wahrscheinlichkeitsdichte $P(k)$) der apparenten Federkonstanten von fixierten (a) und unfixierten (b) Zellmembranfragmente. Eine Fixierung führt zu einer deutlichen Erhöhung aber breiter verteilten apparenten Federkonstante. 83

5.8 Abbildung eines Zellmembranfragmentes mit stark ausgeprägten Filamenten. Diese restlichen Teile des Zytoskeletts überspannen auch die Poren. Ein Höhenprofil zeigt eine Filamenthöhe von 50 bis 100 nm. 83

5.9 Vergleich von REM und topographischer Aufnahme eines fixierten Membranfragmentes. Das REM Bild zeigt gut die extrazelluläre Matrix und Zytoskelett. Anhand von Poren mit viel und wenig Material wird anschaulich der Einfluss von Filamenten und ECM dargestellt. 84

5.10 Darstellung der apparenten Federkonstanten in einem Vergleich mit Topographie (3D) und Aktingehalt (grüne Färbung) des Membranfragments. Höhere Fluoreszenzintensitäten bedeutet einen erhöhten Aktingehalt und zeigen, durch Balken dargestellt, auch eine erhöhte apparente Federkonstante. 85

- 6.1 a) Darstellung der elastischen, plastischen und viskoelastischen Deformation eines Flächenelements A_0 . Entlang einer Raumrichtung wirkt eine Kraft F und streckt das Element um ΔA . Wird die Kraft abgeschaltet, sind drei mögliche Relaxationsprozesse dargestellt: 1. Elastische Materialien, 2. Viskoelastische Flüssigkeiten (Kelvin-Voigt Modell) und 3. Viskoelastische Festkörper (Maxwell Modell). Die mechanischen Bauelemente verdeutlichen diese Prozesse. Elastische Relaxation heißt, der Körper kehrt in den Ausgangszustand zurück. Die in der Feder gespeicherte Energie wird vollständig wiederhergestellt. In viskoelastischen Flüssigkeiten wird in dem *Dashpot* Energie dissipiert. Je nach zeitlicher Dauer und Applikationsgeschwindigkeit wird das *Dashpot* gedehnt und die Energie, der in Reihe geschaltetem Feder, zu Teilen dissipiert. So kann bei Abschalten der Kraft das Material nicht in den Ausgangszustand zurückkehren, sondern behält einen gedehnten Zustand bei. Viskoelastische Festkörper werden durch eine parallele Schaltung eines *Dashpot* zu einer Feder beschrieben. Dies heißt, der deformierte Körper kehrt in den Ausgangszustand zurück sobald die externe Kraft abgeschaltet wird, da die Feder eine Rückstellkraft besitzt. Das *Dashpot* beschreibt ein Fließverhalten des Körpers welches bei der Relaxation ein zeitabhängiges Verhalten der Entspannung des Materials verursacht. b) Mögliche Deformationen durch Streckung/Kompression, Biegen oder Scherung der Membran. 92
- 6.2 Darstellung von Kraft-Indentations-Kurven einer porenüberspannenden Membran durch eine zentrale, punktuell wirkende Kraft. Gleichungen 6.3 (rot) und 6.4 (blau). Deutlich ist ein nicht linearer Zusammenhang zwischen Kraft und Eindringtiefe zu erkennen. 94
- 6.3 Darstellung des Zusammenhangs zwischen Kraft und Eindringtiefe für das Verbiegen einer Membran, nach Gleichung 6.7. Für die Rechnung wurden folgende Parameter verwendet: $R_{Pore} = 225 \text{ nm}$, $\nu = 0.33$, $E = 34 \text{ MPa}$ 95
- 6.4 In der Abbildung sind 3 Regionen in Abhängigkeit des Vorspannungs- und des Ladeparameters voneinander abgegrenzt. Die einzelnen Regionen stehen für unterschiedliche energetische Beiträge während der Deformation einer runden Membran und somit auch für die Anwendung unterschiedlicher theoretischer Modelle. Region 1 wird durch die dünne Platten Theorie beschrieben, Region 2 durch linearisierte Membrantheorie und Region 3 durch nicht lineare Membrantheorien [137]. Der Bereich für die Experimente an hybriden, porenüberspannenden Membranen ist ebenfalls in der Grafik markiert. 97
- 6.5 Schematische Darstellung der Indentation einer freistehenden Membran. Eine konstante Spannung σ liegt an der Membran an. Weiterhin sind die Überlegungen zu den Randbedingungen für die Bestimmung der Integrationskonstanten in den Gleichungen 6.15 und 6.17 gezeigt. 99

6.6 a) Gemessene Kraft-Indentations-Kurven von hybriden, porenüberspannenden DPhPC Membranen auf OT funktionalisierten Oberflächen mit Porenradien von $R_{Pore} = 225$ nm (schwarz) und $R_{Pore} = 400$ nm (grau). In blau bzw. rot sind mittels Gleichung 6.10 berechnete Kurven gezeigt. Als Parameter wurden die experimentellen Porenradien, $\sigma = 22$ mN/m und $R_{Tip} = 15$ nm genutzt. b) zeigt modellierte Kurven bei verschiedenen Porenradien und einer konstanten lateralen Spannung von $\sigma = 5$ mN/m während in c) Kurven bei einem konstanten Porenradius von $R_{Pore} = 600$ nm mit unterschiedlichen lateralen Spannungen dargestellt sind. 102

6.7 Dargestellt sind Messdaten einer DPhPC Membran (schwarz) und eine berechnete Kraft-Indentations-Kurve (grün) entsprechend Gleichung 6.18. Für die Rechnung wurden folgende Parameter genutzt: $R_{Pore} = 250$ nm, $R_{Tip} = 15$ nm, $\kappa = 1.3 \times 10^{-19}$ J und $\sigma = 0.1$ mN/m. 104

6.8 Dargestellt sind eine berechnete Kraftabstandskurve im Vergleich mit den Messdaten (a), sowie der Einfluss von lateraler Spannung σ und Biegemodul κ auf die apparente Federkonstante über eine Indentationstiefe von 50 nm, berechnet mit Gleichung 6.18. Sowohl Biegung als auch laterale Spannung haben einen Einfluss auf die Membran. 106

6.9 a) zeigt den Einfluss der Membranform auf die Flächenvergrößerung. Rot und blau sind entsprechend den Schemazeichnungen b) und c) abgeschätzte Flächenvergrößerungen. Beide Abschätzungen durch einen Kegel überschätzen die Flächenvergrößerung welche aus Gleichung 6.15 (grün) bestimmt wurde. Für die grüne Kurve wurden folgende Parameter gewählt: $R_{Tip} = 15$ nm, $\sigma = 0.01$ N/m und $\kappa = 1.3 \cdot 10^{-19}$ J. 109

Anhang A

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>Atomic Force Microscope</i>)
ATR-IR	<i>Attenuated Total Reflection InfraRed Spectroscopy</i>
BLM	Schwarze Membranen (<i>Black Lipid Membrane</i>)
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (<i>Critical Micelle Concentration</i>)
CPEO3	Cholesterol-Polyethylen-Oxid
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -3-glycero-phosphocholin
DPhPC	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -3-glycero-phosphocholin
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -3-glycero-phosphocholin
DPSTE	1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -3-glycero-phosphothioethanol
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
LVDT	<i>Linear Variable Differential Transformer</i>
nano-BLM	BLMs auf Substraten mit regelmäßigen Strukturen und Porengrößen von einigen Nanometern
OT	Oktanthiol
MDCK II	Hundenierenkrebszellen (<i>Madine Darby Kidney Cells</i>)
MFP	<i>Molecular Force Pulling</i>
SAM	Selbstordnende Monoschichten (<i>Self Assembled Monolayer</i>)
SSM	festkörperunterstützte Membran (<i>Solid Supported Membrane</i>)

Anhang B

Geräte und Materialien

Rasterkraftmikroskopie:

Asylum Research MFP-3D AFM

Atomic Force FE GmbH, Mannheim, GER

Cantilever:

Biolever

Olympus GmbH, Hamburg, GER

MSCT

Veeco, Mannheim, Germany

DNP-S

Veeco, Mannheim, Germany

PSA400

Veeco, Mannheim, Germany

optische Mikroskopie:

Olympus BX-51

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Objektiv: LumpPlan 100x, NA=1.0

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Objektiv: LumpPlan 40x, NA=0.8

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Filter: U-MNB2 (grün)

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Filter: U-MNg2 (rot)

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Kamera: F-View II (rot)

Olympus GmbH, Hamburg, GER

Probenpräparation:

Miniextruder LiposoFast

Avestin, Mannheim, GER

Plasmareiniger PDC-002

Harrick, USA

Aufdampfanlage, Bae 250 Balzers Coating System

Lichtenstein

Vortexer Reax Top

Heidolph, Schwabach, GER

Chemikalien:

Amoniak (28%, v/v)	Sigma, Taufkirchen, GER
Bodipy-PC	Invitrogen, California, CA, USA
Sulforhodamin-DOPE	Sigma Aldrich, Hamburg, GER
Calciumchlorid CaCl ₂	Sigma Aldrich, GER
Cholesterol	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Chrom	Umicore Material AG, Hanau-Wolfgang, GER
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPhPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPPTe	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Ethanol	Carl-Roth, Karlsruhe, GER
Flusssäure	Sigma, Taufkirchen, GER
Gold	Goodfellow, Bad Nauheim, GER
Isopropanol	Carl-Roth, Karlsruhe, GER
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen, GER
n-Dekan	Carl-Roth, Karlsruhe, GER
OT	Sigma Aldrich, Hamburg, GER
Wasserstoffperoxid	Sigma, Taufkirchen, GER

Reinstwasseranlage:

Elix 3 (UV), Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Substrate und sonst. Materialien:

Funktionsgenerator 33220A	Agilent, Böblingen, GER
Hämtokritwachs	Schütt, Göttinge, GER
Hefepilzfilter	FLUXX, Eindhoven, NL
ITO-Floatglasssubstrate	PGO, Iserlohn, GER
Kupferklebeband, leitfähig	Hamilton, Bonduaz, CH
Teflonklebefolie	Kleinfelf, Gerden, GER

Anhang C

Lebenslauf

Ingo Patrick Mey
geboren am 20.12.1978
in Mainz
verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

1985 - 1989 Martinus Grundschule Mainz

1989 - 1998 Bischöflichen Willigis Gymnasium in Mainz, Abitur 1998

Wehrersatzdienst

09/1998 - 09/1999 Wehrersatzdienst bei dem Malteser Hilfsdienst e.V., Mainz
als Rettungssanitäter und Ausbilder für:

Lebensrettende Sofortmaßnahmen, Erste Hilfe, Erste Hilfe am Kind
Sanitäter

Hochschullaufbahn

- 10/1999 Studium des Diplomstudiengangs Chemie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- 10/2002 Vordiplomprüfung des Diplomstudiengangs Chemie
- 12/2005 Diplomprüfung für den Studiengang Chemie
- 1/2006-10/2006 Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Chemie mit dem Titel:
Mechanische Untersuchung von *Calix[4]aren-Catenanen* und freitragenden Membranen
- 10/2006 Abschluss des Diplomstudiengangs Chemie mit der Note: **gut**
- 10/2006 Dissertationsvorhaben mit dem Titel:
**Elastizität porenüberspannender Membranen:
Eine kraftmikroskopische Studie**
im Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Anhang D

Veröffentlichungen

1. Fine, T.; **Mey, I.**; Rommel, C.; Wegener, J.; Steinem, C.; Janshoff, A. (2009) Elasticity mapping of apical cell membranes *Soft Matter* (in press)
2. Lorenz, B.; **Mey, I.**; Steltenkamp, S.; Fine, T.; Rommel, C.; Müller, M.M.; Maiwald, A.; Wegener, J.; Steinem, C. Janshoff, A. (2009) Elasticity Mapping of Pore Suspending Native Cell Membranes. *Small* 5, No.7, 832-838.
3. **Mey, I.**; Stephan, M. Schmitt, E.K.; Müller, M.M.; Ben-Amar, M.; Steinem, C.; Janshoff, A. (2009) Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* (submitted)
4. Janke, M.; Rudzevich, Y.; Molokanova, O.; Metzroth, T.; **Mey, I.**; Diezemann, G.; Marszalek, P.E.; Gauss, J., Böhmer, V.; Janshoff, A. (2009) Mechanically interlocked calix[4]arene dimers display reversible bond breakage under force *Nat. Nanotechnol.* 4, 225-229.
5. Meuer, S.; Fischer, K.; **Mey, I.**; Janshoff, A.; Schmidt, M.; Zentel, R. (2008) Liquid crystals from polymer functionalized TiO₂ nanorod mesogens. *Macromolecules* 41, 7946-7952.
6. Meister, A.; Drescher, S.; **Mey, I.**; Wahab, M.; Graf, G.; Garamus, V.M.; Mögel, H.-J.; Janshoff, A.; Dobner, B.; Blume, A. (2008) Helical nanofibers of self-assembled bipolar phospholipids as template for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 112, 4506-4511.
7. Wolf, S.E.; Loges N.; Mathiasch, B.; Panthöfer, M.; **Mey, I.**; Janshoff, A.; Tremel, W. (2007) Phase selection of calcium carbonate chirality of adsorbed amino acids. *Angew. Chemie* 119, 5716-5721; *Angew. Chemie Int. Ed.* 46, 5618-5623.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel durch Zitate kenntlich gemacht habe.

Ingo P. Mey

Mainz, den 6. September 2009