

**Entwicklung und Charakterisierung  
verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme  
zur Untersuchung von Membranproteinen**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von  
Katja Bender  
geboren in Limburg a. d. Lahn

Mainz 2004

D77

(Dissertation am Fachbereich Chemie und Pharmazie der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz)

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 2004

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von

Herrn Prof. Dr. W. Knoll

und Frau Dr. R. Naumann in der Zeit von

Mai 2000 bis Juni 2004

am Max Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz und am Dept. of Chemical Eng.  
der Stanford University, Stanford, USA angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Mainz, im Juli 2004

---

Man muss noch Chaos in sich haben  
um einen tanzenden Stern gebären zu können.

**Friedrich Nietzsche**

---



für meinen Vater  
und  
meine Schwester Petra





<b>1</b>	<b>Einführung in die Thematik</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Bedeutung und Funktion der biologischen Membran</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Biomimetische Lipidmembransysteme</b>	<b>5</b>
1.2.1	Monomolekulare Lipidfilme	6
1.2.2	Liposomale Dispersionen	6
1.2.3	Schwarze Lipidmembranen ( <i>BLM's, black lipid membrane</i> )	7
1.2.4	Festkörperunterstützte Modellmembranen ( <i>sBLM's, solid-supported membranes</i> )	8
1.2.5	Oberflächenverankerte Modellmembranen ( <i>tBLM's, tethered bilayer lipid membranes</i> )	8
<b>1.3</b>	<b>Lipide</b>	<b>11</b>
1.3.1	Lipide natürlicher Membranen	11
	Formel	13
1.3.2	Lipide für den Aufbau der in dieser Arbeit beschriebenen Membranmodelle	17
1.3.2.1	Lipide für den Aufbau von festkörperunterstützten (spacerlosen) Thiolipid-Modellmembranen ( <i>sBLM's</i> )	17
1.3.2.2	Lipide für den Aufbau von Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen ( <i>tBLM's</i> )	19
<b>1.4</b>	<b>Membranproteine</b>	<b>21</b>
1.4.1	Membranproteine, allgemein	21
1.4.2	Membranproteine dieser Arbeit	22
1.4.2.1	Annexin V	22
1.4.2.2	Valinomycin	28
1.4.2.3	Cytochrom-c-Oxidase	30
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Motivation</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Entwicklung verschiedener Modellmembransysteme</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembranen (<i>sBLM's</i>)</b>	<b>39</b>
3.1.1	Weiterentwicklung der spacerlosen Thiolipid-Modellmembran	40
<b>3.2</b>	<b>Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützte Modellmembranen (<i>tBLM's</i>)</b>	<b>43</b>
3.2.1	Weiterentwicklung der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran	45
3.2.1.1	Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	45
3.2.1.2	Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	47
<b>4</b>	<b>Charakterisierungsmethoden</b>	<b>51</b>

<b>4.1 Impedanzspektroskopie (EIS)</b>	<b>51</b>
4.1.1 Die elektrische Doppelschicht	52
4.1.2 Grundlagen der Impedanzspektroskopie (EIS)	58
4.1.3 Ersatzschaltkreise und Impedanzspektren (Grundlagen)	65
4.1.3.1 Bode-Plot	65
4.1.3.2 Der Nyquist-Plot	73
4.1.3.3 Der frequenzreduzierte Admittanz- oder Kapazitäts-Plot	77
4.1.4 Ersatzschaltkreise für Modellmembransysteme	82
4.1.5 Kapazität und Widerstand zur Kontrolle des Aufbaus und als Qualitätsmerkmal biomimetischer Membransysteme	84
<b>4.2 Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)</b>	<b>89</b>
4.2.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)	89
4.2.2 Oberflächenplasmonen	92
4.2.2.1 Otto-Konfiguration	97
4.2.2.2 Kretschmann-Konfiguration	97
4.2.3 Einfluss dünner dielektrischer Schichten auf die Anregung des Oberflächenplasmons	98
<b>4.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)</b>	<b>101</b>
4.3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie (AFM)	102
4.3.2 Messmethode	104
4.3.2.1 Kontakt-Modus (engl. contact mode)	104
4.3.2.2 Kontaktfreier Modus (engl. non-contact mode)	105
4.3.2.3 Periodischer Kontakt-Modus (engl. intermittent-contact mode, tapping mode)	105
4.3.2.4 Aufzeichnung der Phase (engl. Phase Imaging)	106
4.3.2.4 Bestimmung der relativen Oberflächenbelegung mittels Bildanalyse	106
<b>4.4 Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (FRAP)</b>	<b>107</b>
4.4.1 Grundlagen FRAP	107
<b>4.5 Kontaktwinkel-Messung</b>	<b>109</b>
4.5.1 Grundlagen Kontaktwinkel	110
4.5.2 Hysterese in Kontaktwinkelmessungen	112
<b>5 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>115</b>
<b>5.1 Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembran (sBLM's)</b>	<b>115</b>
5.1.1 Aufbau der binären Submonolage aus 2-Mercaptoethanol/DPPTE, 2-step self-assembly versus Koadsorption	115
5.1.1.1 Optische Schichtdicken der binären Submonolagen	116
5.1.1.2 Elektrochemische Eigenschaften der binären Submonolagen	117
5.1.1.3 Untersuchung der Oberflächentopographie (AFM) und der Kontaktwinkel der Submonolage	119
5.1.1.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.1	132
5.1.2 Membranaufbau durch Vesikelspreitung	133
5.1.2.1 Vesikelspreitung auf reinen DPPTE-Monolagen	133
5.1.2.2 Vesikelspreitung auf durch Koadsorption präparierten binären Monolagen	138

5.1.2.3 Vesikelspreitung auf zweistufig präparierten (2-step self-assembling) binären Submonolagen	139
5.1.2.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.2	152
5.1.3 Anwendung der sBLM zur Untersuchung der in vitro-Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten und deren Hemmung	153
5.1.3.1 Proteinbindung	153
5.1.3.2 Proteinaktivität	155
5.1.3.3 AFM-Messungen an der Annexin V-Schicht	163
5.1.3.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.3	166
<b>5.2 Die Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer (MAH-PP) unterstützte Modellmembran (tBLM)</b>	<b>168</b>
5.2.1 Quellbarkeit des Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymers (MAH-PP)	169
5.2.1.1 Wasseraufnahmefähigkeit des MAH-PP	169
5.2.1.2 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.1	170
5.2.2 Membranaufbau auf plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	171
5.2.2.1 Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	171
5.2.2.2 Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	174
5.2.2.2.1 Funktionalisierung mit Decylamin	174
5.2.2.2.2 SPS- und EIS-Messungen der Vesikelspreitung	176
A) Spreitung von zwitterionischen DPhytPC-Lipiden	176
B) Spreitung von negativ geladenen DPhytPG und zwitterionischen DPhytPC-Lipidmischungen	178
5.2.2.2.3 FRAP-Messungen an auf Decylamin modifizierten MAH-PP aufgebauten Lipidmembranen	183
A) FRAP-Messungen an einer auf einem Decylamin modifizierten MAH-PP Film aufgebauten Ca <sup>2+</sup> -freien Membran	184
B) FRAP-Messungen an einer auf Decylamin modifizierten MAH-PP Filmen aufgebauten Ca <sup>2+</sup> -haltigen Membran	186
5.2.2.2.4 Einbau und Aktivität von Membranproteinen	187
A) Valinomycin	188
B) Cytochrom-c-Oxidase (CcOX)	189
5.2.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.2	191
<b>6 Experimenteller Teil</b>	<b>195</b>
<b>6.1 Materialien</b>	<b>195</b>
<b>6.2 Pufferherstellung</b>	<b>196</b>
<b>6.3 Substrat-Lösungen</b>	<b>198</b>
<b>6.4 Proteine</b>	<b>198</b>
<b>6.5 Vesikelpräparation</b>	<b>199</b>
<b>6.6 Assemblierungslösungen</b>	<b>200</b>
<b>6.7 Probenpräparation</b>	<b>200</b>

<b>6.8 Untersuchungsmethoden</b>	<b>202</b>
<b>7 Abschließende Diskussion</b>	<b>211</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>215</b>
<b>8.1. Plasma und Plasmapolymerisation</b>	<b>215</b>
<b>8.2 Messzellen (Abbildungen)</b>	<b>223</b>
8.2.1 Messzelle für die kombinierte Oberflächenplasmonen- und Impedanzspektroskopie	223
8.2.2 Messzelle für die elektrochemische Impedanzspektroskopie	224
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>225</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>233</b>
<b>Danksagung</b>	<b>253</b>
<b>Lebenslauf</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>A</i>	Fläche
<i>AFM</i>	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)
<i>Au(111)</i>	Gold in kristalliner Orientierung (111)
<i>a. u.</i>	Arbitrary Unit
<i>BLM</i>	Schwarze Lipidmembrane (BLM, black lipid membrane)
<i>C</i>	Kapazität (in Farad, F)
<i>CcOX</i>	Cytochrom-c-Oxidase
<i>C<sub>d</sub></i>	Kapazität der elektrischen Doppelschicht
<i>C<sub>D</sub></i>	Kapazität der diffusen Schicht
<i>C<sub>ges.</sub></i>	Gesamtkapazität aus <i>C<sub>d</sub></i> und <i>C<sub>sBLM</sub></i>
<i>C<sub>H</sub></i>	Kapazität der Helmholtz-Schicht
<i>C<sub>sBLM</sub></i>	Kapazität der Membran
<i>CW</i>	Continuous Wave
<i>d</i>	Dicke des Dielektrikums
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
<i>DC</i>	duty cycle
<i>d<sub>p</sub></i>	Eindringtiefe des evaneszenten Feldes
<i>E</i>	Spannung
<i>E</i>	Evaneszentes Feld
<i>EIS</i>	Elektrochemische Impedanzspektroskopie
$\varepsilon (\varepsilon', \varepsilon'')$	Dielektrizitätskonstante (Realteil, Imaginärteil)
$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante im Vakuum ( $8,854 \cdot 10^{-12} [\text{C}^2 \text{J}^{-1} \text{m}^{-1}]$ )
$\varepsilon_D$	relative Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums
<i>F</i>	Kraft
<i>f</i>	Frequenz in Hertz
$\theta$	Kontaktwinkel
$\Theta$	Bedeckungsgrad

$\Theta_{(ein, C, trans)}$	Einfallswinkel, Grenzwinkel der Totalreflektion, bzw. Winkel des transmittierten Strahls
$\Theta$	Resonanzwinkel
$I$	Intensität
$I$	Strom
$k$	Federkonstante
$k$	Wellenvektor
$k$	Imaginärteil des Brechungsindex
$L$	Propagationslänge
$\lambda$	Wellenlänge
$M$	Monomer
$n$	Realteil des Brechungsindex
$N$	Komplexer Brechungsindex
$P$	Leistung
$Q$	Ladung (in Coulomb, C)
$R$	Widerstand
$R$	Relative Fluoreszenzwiedererlangung
$SAM$	Selbstorganisierte Monolage (self-assembled monolayers)
$SPS$	Oberflächenplasmonenspektroskopie
$sBLM$	Festkörperunterstützte Modellmembran (solid-supported membranes)
$\sigma$	Ladungsdichte [ $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ]
$t$	Zeit
$T$	Temperatur
$T_m$	Hauptphasenübergangstemperatur
$tBLM$	Oberflächenverankerte Modellmembranen (tethered bilayer lipid membranes)
$\tau$	Zeitkonstante
$\gamma$	Grenzflächenenergie
$\Phi$	Potential
$\Phi$	Phasenwinkel
$\omega$	Kreisfrequenz
$w$	Radius des Laserstrahls

$X_C$	Kapazitiver Blindwiderstand (capacitive reactance)
$Y (Y', Y'')$	Admittanz (Realteil, Imaginärteil)
$Z (Z', Z'')$	Impedanz (Realteil, Imaginärteil)
$z$	Ablenkung in z-Richtung



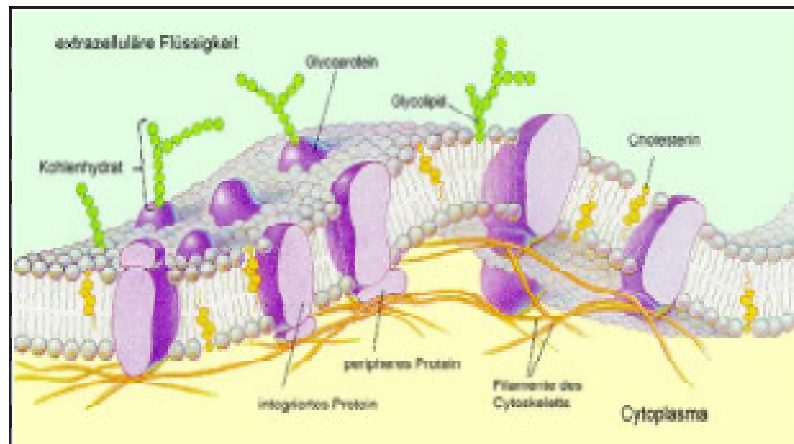


# **1 Einführung in die Thematik**

## **1.1 Bedeutung und Funktion der biologischen Membran**

Die biochemische Leistungsfähigkeit einer Zelle steht in engem Zusammenhang mit der Funktionalität ihrer Zellmembranen. Von ihrer Integrität hängt das Überleben einer jeden Zelle in entscheidender Weise ab. Die Cytoplasmamembran grenzt die Zelle zur Außenwelt ab und ist gleichzeitig Träger wichtiger Zellstrukturen, z. B. von Proteinen und Kohlenhydrat-Oligomeren, die unter anderem der Zell-Zell-Erkennung, der Signaltransduktion und der Aufrechterhaltung eines bestimmten lebenswichtigen Zellmilieus durch ihre selektive Permeabilität dienen [1]. Ähnliche Membranstrukturen findet man auch im Inneren eukariontischer Zellen. Hier bilden sie kleine Kompartimente, z. B. die Mitochondrien, die Chloroplasten, das endoplasmatische Reticulum (ER), den Golgi-Apparat, die Peroxisome und die Vakuolen aus, die es der Zelle ermöglichen, komplizierte Stoffwechselprozesse durchzuführen. So trägt die Gesamtheit der Biomembranen einer Zelle entscheidend zu ihrem Überleben bei, weswegen die einzelne Zelle die kleinste funktionale Lebenseinheit darstellt. Dabei finden die biochemischen Prozesse einerseits durch lösliche Proteine im Lumen der Kompartimente statt, andererseits ist die Zellmembran selbst Träger biochemischer Reaktionen durch membranständige oder integrale Proteine. Zellspezifisch und anhand der subzellulären Lokalisierung lassen sich verschiedene Membranen differenzieren, deren Unterschiede in der Lipidzusammensetzung (zumeist Phospholipide), in dem jeweiligen Enzymmuster und dem Protein/Lipid-Massenverhältnis zu finden sind. So besteht z. B. die mitochondriale Innenmembran zu 76 % aus Proteinen, was mit ihrer hohen Syntheseleistung einhergeht. Die Myelinmembran einer Nervenzelle weist hingegen nur einen Proteingehalt von 18 % auf, weswegen der hohe Lipidanteil einen guten elektrischen Isolator für die Nervenzelle darstellt [2]. Trotz der Vielfältigkeit biologischer Membranen, weisen sie alle eine gleiche Grundstruktur (Abb. 1.1, aus [3]) auf: jede biologische Membran besteht aus einer dünnen, etwa 5 bis 10

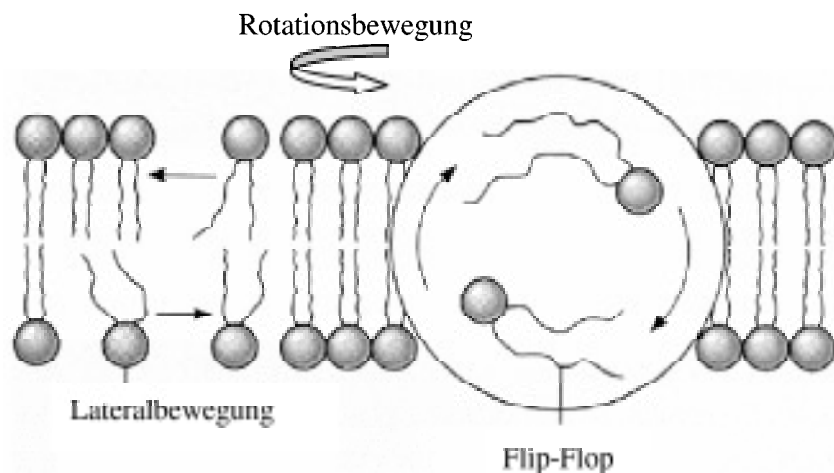
nm dicken [2], [4], [5] Doppelschicht amphiphiler Moleküle, den Lipiden, deren hydrophober Teil ins Innere der Membran gerichtet ist und deren hydrophiler Teil nach außen in den Elektrolyten reicht [6].



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung einer tierischen Zellmembran [3].

Die enge laterale Packung der Lipide wird durch die intermolekularen Wechselwirkungen der Lipidmoleküle erreicht [2]. Hierbei besitzen die hydrophoben und die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den aliphatischen Ketten benachbarter Lipide den größten Bindungsanteil. Ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der Lipide und den sie umgebenden Wassermolekülen tragen ebenfalls zur Stabilisierung der Membran bei [6].

Das in Abb. 1.1 gezeigte Membranmodell beruht weitestgehend auf dem von Singer und Nicholson [6] postulierten und mittlerweile experimentell (u. a. durch das elektronenmikroskopische Präparationsverfahren des Gefrierätzens [5]) bestätigten Flüssig-Mosaik-Modell. Dabei ist die Zellmembran ein Mosaik aus Proteinen, die in eine flüssiganaloge (*fluide*) Doppelschicht aus Lipiden eingebettet sind. Die Membran ist damit kein starres Gefüge. Aufgrund der doch schwachen Bindungen ist eine laterale Seitwärtsbewegung, bzw. eine Rotation der Lipide (Abb. 1.2) und eine Rotation einiger Proteine temperaturabhängig um ihre Längsachse möglich.



**Abb. 1.2:** Bewegungsmöglichkeiten von Lipiden in Membranen: Rotationsbewegung (schnell), Lateralbewegung (mittelschnell), Flip-Flop (sehr langsam).

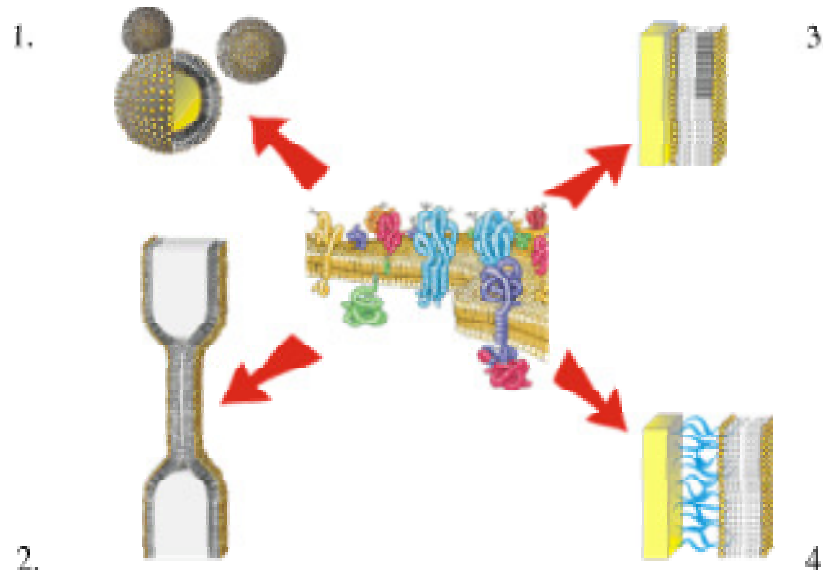
Die Permeabilität und die Proteinaktivität integraler Proteine hängt unter anderem auch von der Fluidität der Membran ab [1], [7]. In einer rigiden Membran z. B. sind Konformationsänderungen der Proteine nur schwer möglich, was sich in einer verminderten Proteinaktivität widerspiegelt. Benachbarte Lipidmoleküle können ihren Platz bis zu  $10^7$  mal pro Sekunde miteinander tauschen. Die Diffusionskonstante für die Lateraldiffusion der Phospholipide in Lipiddoppelschichten kann mit  $10^{-8}$  bis  $10^{-12}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  [8], [9], [10], und die für Proteine mit Werten von  $4 \cdot 10^{-11}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , bzw.  $3 \cdot 10^{-12}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  (Erythrozytenmembran) [11], [10], bzw.  $4 \cdot 10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  (Rhodopsinmoleküle in Sehstäbchen) angegeben werden [10]. Die Beweglichkeit der Proteine ist somit geringer. Dies mag einerseits mit der Größe der Proteine einhergehen, andererseits kann die Beweglichkeit auch durch die Bindung an Strukturproteine eingeschränkt sein. Der Austausch der Lipidmoleküle zwischen den beiden Lamellen der Lipiddoppelschicht („Flip-Flop“-Bewegung, Abb. 1.2) findet mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden nur äußerst langsam statt [10]. In natürlichen Membranen kann die Flip-Flop-Bewegung durch bestimmte Proteine katalysiert werden [2], [12]. Z. B. tritt während der Apoptose die Flip-Flop-Bewegung von Phosphatidylserin von der cytosolischen zur extrazellulären Seite der Membran auf [12], [13]. Das normalerweise auf der extrazellulären Seite nicht vorkommende Phosphatidylserin wird von Phagozyten zur Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen genutzt [14]. Phosphatidylserin tritt in einem sehr frühen Stadium der Apoptose auf. Das Protein Annexin V bindet über  $\text{Ca}^{2+}$  an Phosphatidylserin und kann

dann detektiert werden [15], [16]. Auch findet ein induzierter Flip-Flop während der Aktivierung von Thrombozyten [17], [18], bzw. auf der Außenseite von aktivierten Endothelzellen [19] statt.

Mit dem Flüssig-Mosaik-Modell allein lassen sich nicht alle Membraneigenschaften erklären. Nach diesem Modell wäre zu erwarten, dass alle Zellen, ähnlich wie Liposomen, eine globuläre Gestalt besitzen und bei direktem Kontakt miteinander verschmelzen. Das Flüssig-Mosaik-Modell muss daher um eine weitere Komponente, das Cytoskelett, erweitert werden. Das Cytoskelett erlaubt den Zellen, ihre zelltyp-spezifische Form (z. B. die Diskusform der Erythrozyten) einzunehmen [10], [20].

Die Anordnung der Lipidmoleküle in der Membran und die Proteinausstattung der Membran tragen maßgeblich zur selektiven Permeabilität bei. Dabei wirkt sich eine reine Lipiddoppelschicht wie ein Isolator aus. Aufgrund der Ladungsseparation durch die Membran verhält sich die Lipiddoppelschicht wie ein Plattenkondensator und besitzt wegen der isolierenden Wirkung auch einen Widerstand. Für eine natürliche Zellmembran werden Widerstände von  $10^5$ - $10^9 \Omega\text{cm}^2$  [10,21,22] und Kapazitäten von  $0,5$ - $1,3 \mu\text{Fcm}^{-2}$  [10] angegeben. Sie ist praktisch undurchlässig für geladene Teilchen wie Ionen. Hingegen können hydrophobe Moleküle wie Kohlenwasserstoffe und sehr kleine ungeladene Teilchen wie Sauerstoff die Membran nahezu ungehindert durch Diffusion passieren. Das gleiche gilt auch für sehr kleine polare Moleküle wie Wasser und Kohlendioxid. Hingegen ist die Membran nur schwach durchlässig für größere polare Moleküle wie Glucose. Der dennoch lebenswichtige Stofftransport von nicht membrangängigen Molekülen in und aus der Zelle, bzw. in und aus den Kompartimenten wird von Transportproteinen übernommen, die eine hohe Substratspezifität besitzen, d. h. sie transportieren nur ein bestimmtes Substrat. Dabei lässt sich der aktive Transport, d. h. unter Aufwendung von Energie und entgegengesetzt zum Konzentrationsgefälle, und der passive Transport, d. h. ohne Energieverbrauch und mit dem Konzentrationsgefälle, durch erleichterte Diffusion, unterscheiden [1].

## 1.2 Biomimetische Lipidmembransysteme



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der wichtigsten Modellmembransysteme: 1. liposomale Dispersionen, 2. schwarze Lipidmembranen (BLM's), 3. festkörperunterstützte Modellmembranen (sBLM's) und 4. oberflächenverankerte Modellmembranen (tBLM's) (Zeichnung von F. Gieß).

Die Komplexität biologischer Membranen und die damit verbundene Vielfältigkeit membranassoziierter biochemischer Prozesse erschweren die Untersuchung und das Verständnis biochemischer und biophysikalischer Membraneigenschaften. So sind die physikalischen Prinzipien der Selbstorganisation von Proteinen und Lipiden in biologischen Membranen noch immer wenig verstanden [7], [23]. Viele Effekte sind überlagert und nur schwer zugänglich. So fordert z. B. die Einzelkanalmessung an einem bestimmten Ionenkanal die Anwendung der Patch-Clamp-Technik [24], da andernfalls die simultane Aktivität aller Ionenkanäle der betreffenden Zelle gemessen würde [25].

Es wurden verschiedene Modellmembranen entwickelt (Abb. 1.3, oben), mit deren Hilfe die biochemischen und biophysikalischen Zusammenhänge der Membranen untersucht werden können, z. B. zur Aufklärung von Prozessen an Membranproteinen. Die Modellentwicklungen jüngster Zeit sind auch von technologischem Interesse, z. B. für die Anwendung als Biosensoren [26], [27], [28], [29]. Die Reduzierung solcher biologischer

Systeme auf Modellcharakter bietet den Vorteil, die Komplexität echter Zellmembranen zu reduzieren und auf wenige definierte Bestandteile zu beschränken [23].

### 1.2.1 Monomolekulare Lipidfilme

Diese sehr reduzierten Modellsysteme werden durch die Spreitung von Lipiden an der Wasser/Luft-Grenzfläche hergestellt [30]. Sie liefern Informationen über die thermodynamischen Eigenschaften von Lipidmonolagen, z. B. das Phasenverhalten der betrachteten Monolage und von deren Bestandteilen [31], [32].

### 1.2.2 Liposomale Dispersionen

Kolloidale sphärische Gebilde (Vesikel, Liposomen), bestehend aus einer Doppelschicht reiner oder gemischter Lipide und einem wässrigen Kern [33], können zur Untersuchung des thermotropen und lyotropen Polymorphismus von Membranen herangezogen werden [34], [35]. Zur Untersuchung der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit von Phospholipiden in der Membran wurden ebenfalls Vesikel als Zellmodell herangezogen [36]. Auch kann die Phasenseparation von Lipidgemischen untersucht werden, z. B. hervorgerufen durch die Einwirkung zweiwertiger Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ , wenn mindestens ein Lipidbestandteil geladen ist [37] oder durch die Einwirkung von Proteinen [38], [39]. Die Untersuchung integraler Membranproteine an diesem Modellsystem ist ebenfalls möglich [40]. Hierzu kann neben den klassischen biochemischen Methoden auch die Patch-Clamp Technik Verwendung finden [24], [41].

Neben der Verwendung als Modellsysteme, finden sowohl unilamellare Liposomen (Vesikel), d. h. solche mit einer Lipiddoppelschicht, als auch multilamellare Liposomen, d. h. mit mehreren Lipiddoppelschichten, Anwendung als Transportvehikel für Arzneistoffe (*drug delivery system*) [42], [43]. Die Einbettung von Wirkstoffen in solche Systeme kann zur Erniedrigung der Toxizität [33], zu einer besseren Bioverfügbarkeit [44], [45] oder zu einer Verbesserung der Therapiebefolgung (*Compliance*), z. b. durch Änderung der

Applikationsart (orales Insulin [46], [47], [48], [49]) führen. Ebenfalls erfährt der Wirkstoff selbst einen gewissen Schutz gegenüber dem enzymatischen Abbau auf dem Weg zum Zielorgan (z. B. orales Insulin). Auch die Immunisierung [50] oder eine Gentherapie ist denkbar und möglich [43]. Die beobachtete Akkumulation der Liposomen in bestimmten Geweben wie den Lymphknoten und der Leber, ermöglicht die Adressierbarkeit von Wirkstoffen (*drug targeting*) für die Therapie von Erkrankungen dieser Organe. Des Weiteren kann es bei subkutaner Gabe zu einer Depotbildung kommen [43], [33]. Sowohl Depotbildung als auch Akkumulation können von Vorteil sein oder zu Nebenwirkungen führen. Jedoch stellen viele technologische Probleme, wie z. B. die chemische und physikalische Stabilität liposomaler Zubereitungen, die ausgedehnte pharmazeutische Anwendung dieser Formulierungen in Frage. So befinden sich viele Ansätze noch immer im Forschungsstadium.

### **1.2.3 Schwarze Lipidmembranen (*BLM's*, *black lipid membrane*)**

Dieses Membransystem besteht aus einer von wässrigem Medium umgebenen Lipiddoppelschicht, die über ein kleines Loch in einer Teflonfolie gespannt ist [51]. An ihr lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Lipidmembranen und der in ihr inkorporierten Membranproteine untersuchen [52-54]. So können Einblicke in den molekularen Mechanismus von integralen Membranproteinen gewonnen, sowie der Einfluss der Lipidmembran auf transmembrane Transportmechanismen untersucht werden [55]. Aufgrund der sehr guten elektrischen Eigenschaften dieser Modellsysteme können auch Einzelkanalmessungen vorgenommen werden. Von Nachteil ist die geringe mechanische Stabilität sowie der vom Herstellungsprozess verbliebene Lösungsmittelrest in der Membran [56].

#### 1.2.4 Festkörperunterstützte Modellmembranen (*sBLM's*, *solid-supported membranes*)

sBLM's [29], [57] ermöglichen die deutliche Verbesserung der mechanischen Stabilität [29,58,59] und sind im Gegensatz zu den bisher genannten Modellsystemen gleichzeitig einer Fülle von oberflächenanalytischen und elektrochemischen Meßmethoden zugänglich [29], [60]. Hieraus ergibt sich die Devicefähigkeit eines solchen Systems, weswegen sie zum Aufbau von Biosensoren dienen können [29], [61]. Der Aufbau von festkörperunterstützten Modellmembranen (sBLM's) erfolgt durch Physisorption oder Chemisorption auf hydrophilen Oberflächen wie Glas, Silizium- oder Glimmer- (Mica) Substraten, auf reinen unfunktionalisierten Metalloberflächen, sowie auf selbstorganisierten (*self-assembled*) Alkanthiolmonolagen [62-68] und Thiolipidschichten [68],[60] vornehmlich an Goldoberflächen, aber auch an Silber und Quecksilber [69] (aus [58] und dort zitierter Literatur). Der Nachteil besteht hier im Fehlen eines wassergefüllten Reservoirs mit cytosolischer Funktion [29], [58], wie er bei den schwarzen Lipidmembranen besteht. Dadurch ist es schwierig, transmembrane Membranproteine zu untersuchen, besonders wenn Ionentransportprozesse von Interesse sind. Vor allem aber besteht die Gefahr der Denaturierung der Proteine, wenn diese die Substratoberfläche berühren [4].

#### 1.2.5 Oberflächenverankerte Modellmembranen (*tBLM's*, *tethered bilayer lipid membranes*)

Diese Modellsysteme kompensieren die oben genannten Nachteile, ohne auf die Vorteile der sBLM's gegenüber den anderen Modellsystemen zu verzichten. Die räumlichen Nähe der inkorporierten Membranproteine zur Substratoberfläche kann bei *festkörperunterstützten Modellmembranen (sBLM's)* zur Denaturierung der Proteine führen. Um die Denaturierung zu verhindern und gleichzeitig ein genügend großes Reservoir zur Verfügung zu stellen, wurden mit der Entwicklung der *oberflächenverankerten Modellmembranen (tBLM's)* submembrane Abstandshalter (*spacer*) [29], [70] eingeführt, die für eine Entkopplung der Membran vom Substrat (z. B.



einer Gold-Elektrode) sorgen. Ein solcher Spacer erleichtert auch den Einbau von Proteinen mit einem großen extramembranen Proteinanteil, da dieser genügend Platz im Reservoir findet [71], [72]. Die Art des Spacers und seine Länge haben direkten Einfluss auf die Leitfähigkeit des Ionenkanals [73], [58]. Nicht nur die Distanz der Membran zur Substratoberfläche ist für die Biomimetik wichtig, sondern auch die laterale Dichte der Spacermoleküle trägt zur Funktionalität bei. Eine zu dichte laterale Packung der Spacermoleküle, bzw. Lipide, besonders wenn das Lipid oder Lipidanalogen mit dem Spacer oder dem Substrat kovalent verknüpft ist, kann zu einer Einschränkung der Fluidität der Lipidmembran führen [7,26,74,75], da die Lateral- und Rotationsbewegungen der verankerten Lipide erschwert, bzw. nicht mehr möglich sind. Die Inkorporation von Membranproteinen und deren Aktivität können dann signifikant erschwert sein [72]. Ein zu hoher Lateraldruck der Membranlipide kann die Konformationsänderungen innerhalb des Proteins während seiner Aktivität erschweren und zu einem Aktivitätsverlust führen. Durch die Einführung von Spacermolekülen lässt sich nicht nur, wie schon erwähnt, die vertikale Distanz der Membran zur Substratoberfläche regulieren, sondern auch die Ankerdichte der kovalent gebundenen Lipide einstellen, indem man eine laterale Verdünnung der Lipidanker vornimmt [26], [74], [61], [76]. Die Einführung so genannter hydrophiler Abstandshalter (*spacer*) stellt somit eine Weiterentwicklung der festkörperunterstützten Modellmembranen dar. Eine Vielzahl oberflächengebundener Modellmembrane wurden auf der Basis von verschiedenen hydrophilen Spacern entwickelt. Nachfolgend wird eine Auswahl der derzeit bestehenden Systeme aufgeführt:

- **Synthetische Polymere und Oligomere:**

- Polyethylenglycole verschiedener Kettenlänge [26,58,73,77-82],
- Polyacrylamidderivate [83]
- Polyethyloxazoline [74] und Polymethyloxazoline [84],
- Copolymere verschiedener Acrylsäurederivate [85]
- Polydiallyldimethylammoniumchlorid/Alkylthiol-Spacer [86]
- Plasmapolymersiertes Maleinsäureanhydrid zur elektrostatischen Anbindung der Lipidmembran [87]
- Dextrane [70]

- **Biopolymere:**

- Peptide verschiedener Länge und Sequenzen [71], [88], [89], [69], [90]
- Prokaryotische S-Schicht-Proteine [91]
- Streptavidin [92-94]

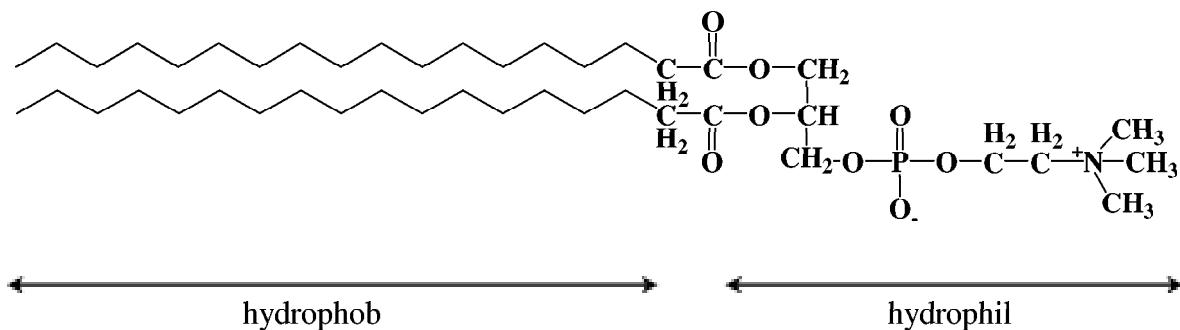
Ziel solcher Spacer ist es, die Modellmembranen in ihren Eigenschaften (Fluidität der Membran, Reservoircharakter, elektrisch isolierend) den natürlichen Membranen anzugleichen und trotzdem den Modellcharakter dieser Systeme zu wahren. Jedoch erhöht die Einführung der Spacer die Komplexität um ein vielfaches, weswegen bisher zumeist nicht alle Eigenschaften natürlicher Lipidmembranen in einem biomimetischen Membransystem realisiert werden konnten. Oft müssen für bestimmte Anwendungen Kompromisse in den Membraneigenschaften der künstlichen Systeme eingegangen werden. So kann z. B. für reine Bindungsstudien von Proteinen zumeist auf die elektrische Dichtigkeit der Membran verzichtet werden, aber nur bedingt auf die Fluidität der Membran, wohingegen Einzelkanalmessungen elektrisch isolierende Membranen benötigen.

Die Modellsysteme sind nicht nur von grundsätzlichem biologischen Interesse für die Untersuchung von Membranproteinen [68,80,95-100] und Membraneigenschaften, sowie deren Organisation, sondern auch von erheblichem pharmakologischem und pharmazeutischen Interesse, z. B. für die Identifizierung potentieller Wirkstoffe (drug screening) [101], [97], für die Quantifizierung und Qualifizierung von Wirksubstanzen oder für den Einsatz als Biosensoren in der Diagnostik [76], [61]. Auch sind biopharmazeutische Untersuchungen denkbar, vor allem im Hinblick auf die Pharmakodynamik (Wirkung eines Pharmakons auf den Organismus) und die Pharmakokinetik (Wirkung des Organismus auf das Pharmakon), da z. B. die Wirkstoff- oder Antikörperinteraktionen mit ihren Zielstrukturen (*targets*) untersucht werden können, wobei empfindliche Meßmethoden für den Nachweis von Wirkstoffen und deren Metaboliten nötig sind.

## 1.3 Lipide

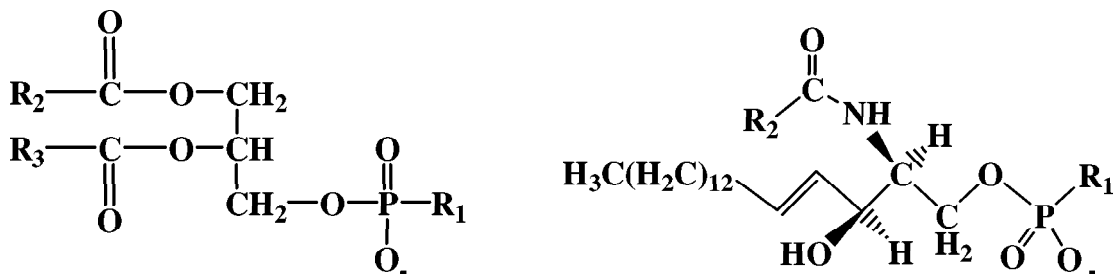
### 1.3.1 Lipide natürlicher Membranen

Lipide sind wasserunlösliche Moleküle, die in organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich sind. Lipide haben ein breites Spektrum an biologischen Funktionen: Sie dienen dem Organismus als Membrankomponenten, als Energiespeicher sowie als Signal- und Brennstoffmoleküle [102].



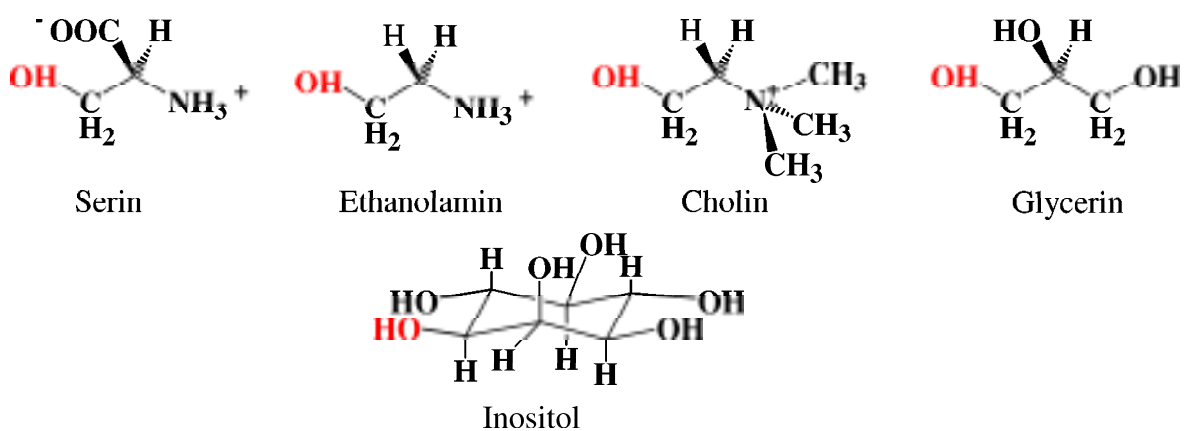
**Abb. 1.4:** Struktur von Distearoylphosphatidylcholin: Die Länge der hydrophoben Alkylketten und die Art des am Phosphat befindlichen Restes (hier Cholin) bestimmen die Eigenschaften des Lipids.

Membranlipide stellen mit den Membranproteinen und den Kohlehydraten die wichtigsten Bestandteile der Membran dar [6]. Drei Klassen von Membranlipiden können unterschieden werden: *Phospholipide*, *Glykolipide* und *Steroide*. Abb. 1.4 verdeutlicht an Hand eines Phospholipids ein wesentliches gemeinsames Merkmal der Lipide, nämlich die Unterteilbarkeit in einen hydrophoben und einen hydrophilen Molekülteil, was den amphiphilen Charakter dieser Moleküle ausmacht. Der aliphatische Teil der Lipide wird zumeist aus zwei Fettsäureresten gebildet (Tab. 1-1, unten), die im Fall der Phosphoglyceride (Abb. 1.5) mit einem Glycerin an dessen Hydroxylgruppen am C-1 und C-2 verestert sind.



**Abb. 1.5:** Struktur der auf Glycerin (links) und auf Sphingosin (rechts) basierenden Phospholipiden. Die Reste R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> stehen für verschiedene Fettsäurereste (vergl. Tab. 1-1). R<sub>1</sub> steht für verschiedene, in Abb. 1-4 aufgeführte Alkohole. Bei Sphingosinlipiden steht R<sub>1</sub> für Cholin oder Inositol.

Die Hydroxylgruppe am C-3 des Glycerins hingegen, ist mit einer Phosphorsäure verestert. Eine weitere Esterbindung besteht zwischen der Phosphatgruppe und einem weiteren Alkohol (Rest R<sub>1</sub>), der Serin, Ethanolamin, Cholin, Inositol oder Glycerin sein kann (Abb. 1.6). Diese Phospholipide werden aufgrund des Glycerinanteils auch als *Phosphoglyceride* bezeichnet. Zu den Phospholipiden zählen auch die *Sphingolipide* (Abb.1.5, rechts). Hier ist der Aminoalkohol *Sphingosin*, der selbst eine lange ungesättigte Kohlenwasserstoffkette trägt, über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft. Sphingosin bildet ebenfalls eine Esterbindung zur Phosphorsäure aus, die wiederum mit einem Cholin oder einem Inositol verestert sein kann. Die Sphingomyeline stellen Sphingosine, verestert mit einer Fettsäure und einem Phosphocholin dar, die gehäuft in der Myelinscheide von Nervenzellen vorkommen.



**Abb. 1.6:** Struktur verschiedener Alkohole, die mit dem Phosphatrest der Phospholipide verestert sein können (R<sub>1</sub>) und den hydrophilen Teil der Phospholipide bilden.

Fettsäure	Kohlenstoffatom : Doppelbindung	Formel
Laurinsäure	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Myristinsäure	15 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitinsäure	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearinsäure	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Arachidinsäure	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Behensäure	22 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Lingnocerinsäure	24 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Palmitoleinsäure	16 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Ölsäure	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
<b>Linolsäure</b>	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
<b><math>\alpha</math>-Linolensäure</b>	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
$\gamma$ -Linolensäure	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
<b>Arachidonsäure</b>	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

**Tab. 1-1:** Trivialnamen und Formeln ausgewählter Fettsäuren, die den hydrophoben Anteil der Lipide ( $R_1$ ,  $R_2$ ) bilden. Hervorgehoben sind die essentiellen Fettsäuren. Diese können im Säugetier-Organismus nicht *de novo* aufgebaut werden.

Die Membranlipide von *Archaeaarten* weisen keine Esterbindung, sondern eine Etherbindung zwischen verzweigten aliphatischen Ketten und dem Glycerinrückgrat auf. Etherbindungen sind weniger hydrolyseempfindlich und die verzweigte Struktur der Seitenketten ist oxidationsunempfindlicher. Beide Attribute ermöglichen es diesen Organismen unter extremen Bedingungen zu überleben [102]. *Glykolipide* hingegen enthalten keinen Phosphatrest, sondern stattdessen einen Mono- oder Oligosaccharid-Rest, der glykosidisch an die C-3 Stelle des Glycerins gebunden ist. In tierischen Zellen leiten sie sich ebenfalls vom Sphingosin ab. Glykolipide bilden zusammen mit den Glykoproteinen die Glykokalix, die wiederum wichtige Erkennungsstrukturen für die Zellerkennung darstellt. In der Klasse der Steroide ist vornehmlich das *Cholesterin* zu nennen. Es besitzt eine völlig andere Struktur als die bisher genannten Lipide. Ihm liegt ein Steroidgerüst zugrunde (Abb. 1.7), dessen OH-Gruppe mit den hydrophilen Kopfgruppen anderer Lipide

interagiert. Cholesterin findet man nicht in Prokaryonten, ist aber fast immer Bestandteil von Säugetierzellen.

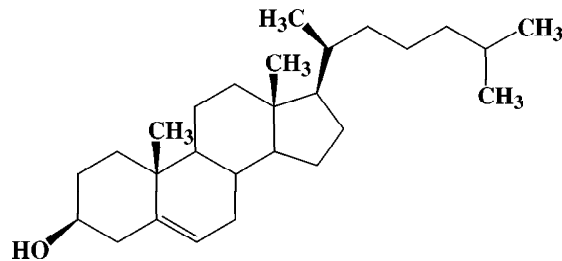
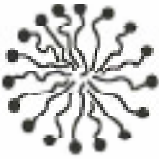



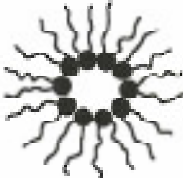



Abb. 1.7: Cholesterin

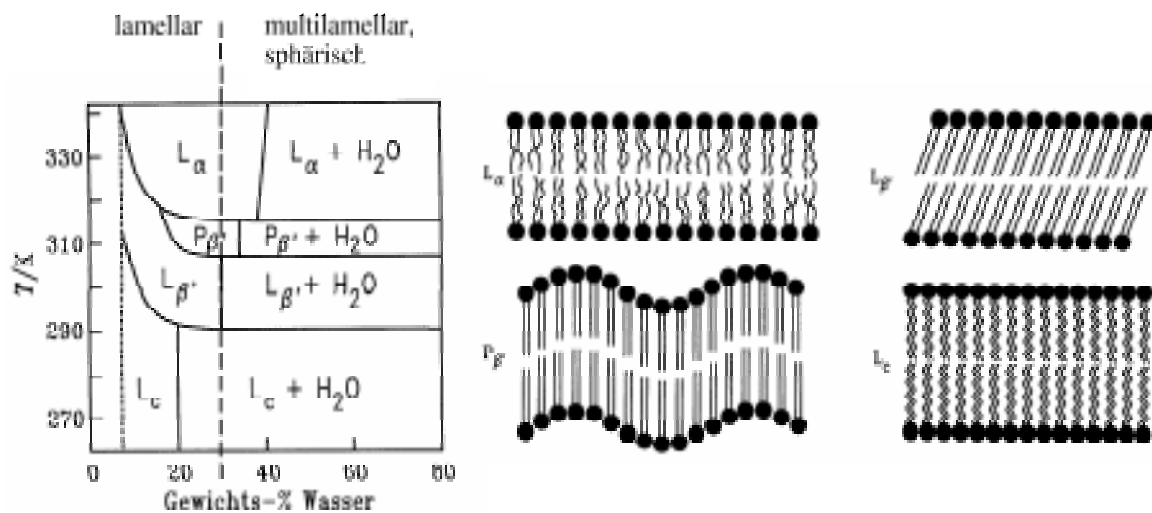
Aufgrund des hydrophoben Effektes sind diese amphiphilen Moleküle, oberhalb der *kritischen Micellbildungskonzentration, CMC*, in der Lage höhere Aggregate zu bilden [35], [103]. Die Tendenz zur Micellbildung ist umso größer und damit die CMC umso kleiner, je größer der hydrophobe Anteil im amphiphilen Molekül ist [103]. Die Gestalt der Aggregate wird im Wesentlichen von dem Verhältnis aus Volumen  $V$  des hydrophoben Anteils zur benötigten Fläche  $A$  der hydrophilen Kopfgruppe, normiert auf die Kettenlänge  $l$ , bestimmt. Dieses Verhältnis wird auch als *kritischer Packungsparameter CPP* bezeichnet. Auch die Ladungen der Kopfgruppen beeinflussen die Aggregatstruktur. Die Fläche der Kopfgruppe ist u. a. abhängig von dem pH-Wert, der Ionenstärke des umgebenden Mediums und der Temperatur. Abb. 1.8 [103] zeigt eine Auswahl verschiedener Aggregatstrukturen amphiphiler Moleküle in Abhängigkeit ihrer Packungsparameter. Die relativ sperrigen Fettsäurereste der Membranlipide verhindern die Aggregation zu Micellen und begünstigen die bimolekulare Anordnung zu einer Doppelschicht. Die hydrophoben Wechselwirkungen haben drei wichtige biologische Effekte: Erstens neigen Lipiddoppelschichten zum Zusammenschluss mit sich selbst, d. h. es gibt keine Elektrolyt exponierten „Ränder“ freiliegender Kohlenwasserstoffketten, mit dem Effekt der Kompartimentbildung. Zweitens sind Membranen bestrebt sich auszubreiten. Drittens besitzen Lipiddoppelschichten die Eigenschaften, Defekte in der Membran zu schließen, da diese in der Doppelschicht energetisch ungünstig sind.

Struktur	Platzbedarf	$CPP, \frac{V}{A \cdot l}$	Beispiel
Kugelmicelle			$< \frac{1}{3}$ SDS
Doppelschicht			$\frac{1}{2}$ bis 1 Phosphatidylcholine
inverse Micelle			$> 1$ ungesättigte Phosphatidylethanolamine

**Abb. 1.8:** Auswahl einiger Aggregatstrukturen in Abhängigkeit des molekularen Platzbedarfs und des kritischen Packungsparameters CPP.  $V$  Volumenbedarf der hydrophoben Kette,  $A$  Flächenbedarf der Kopfgruppe,  $l$  Kettenlänge [103].

Dispergiert man Phospholipide in einer wässrigen Phase, so zeigen sie eine große Strukturvielfalt (*lyotroper Polymorphismus*) in Abhängigkeit von ihrer Konzentration. Abbildung 1.9 (aus [103], leicht abgewandelt) zeigt einerseits die Abhängigkeit der Aggregatstruktur von der Lipidkonzentration, bzw. von dem Wassergehalt, andererseits nimmt sie auch Bezug auf den *thermotrophen Polymorphismus* am Beispiel des Dipalmitoylphosphatidylcholins. In Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  und dem Wassergehalt treten verschiedene Phasen auf. Die Sub-Gel-Phase  $L_c$  tritt bei Temperaturen kleiner 291 K auf und ist durch eine kristalline Anordnung der Kohlenwasserstoffe in einem orthorombischen Gitter charakterisiert. Bei Temperaturen zwischen 291 und 307 K tritt die  $L_\beta$ -Phase auf. Hier liegen die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich gestreckt in der all-trans Konformation, leicht geneigt, vor. Die dichteste Packung wird durch die

Anordnung in einem verzerrten hexagonalen Gitter erreicht. Bei weiterer Temperaturerhöhung erfolgt der Übergang in die  $P_{\beta}$ - oder Rippel-Phase ( $307 \text{ K} < T < 314 \text{ K}$ ). Sie ist von einer Überstruktur in Form einer periodischen Welle und Ausbildung hexagonaler Gitterstrukturen gekennzeichnet. Oberhalb  $314 \text{ K}$  erfolgt der Übergang in die  $L_{\alpha}$ -Phase [35], [103] (Hauptphasenübergangstemperatur  $T_m$ ). Sie wird wegen der hohen Beweglichkeit der Lipidmoleküle auch als flüssig-kristalline Phase bezeichnet.



**Abb. 1.9:** Das Phasendiagramm zeigt den Existenzbereich verschiedener thermotroper, lamellarer Phasen von Dipalmitoylphosphatidylcholin in Mischung mit Wasser. Unterhalb  $\sim 30$  Gewichts-% Wasser liegen mehrschichtige Lamellarstrukturen vor, die durch Erhöhung des Wasseranteils in multilamellare und schließlich bimolekulare Liposomen übergehen. Aus [103]

Die Beweglichkeit der Lipidmoleküle wird durch die Bildung von gauche-Isomeren ermöglicht. Es kommt hierdurch zur Ausbildung so genannter Kinken (Abb. 1.10), die die lateralen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten mindert. Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  von der Gel-Phase ( $L_c$  - bis  $P_{\beta}$  -Phase) zur  $L_{\alpha}$ -Phase nimmt mit der Kettenlänge des hydrophoben Lipidanteils zu und sinkt mit der Anzahl der Doppelbindungen im Alkylrest. Auch besitzen verzweigte Kohlenwasserstoffketten erniedrigte Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu unverzweigten Ketten gleicher Länge [104]. Die hohe laterale Beweglichkeit der Lipidmoleküle in der Membran ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen [103].



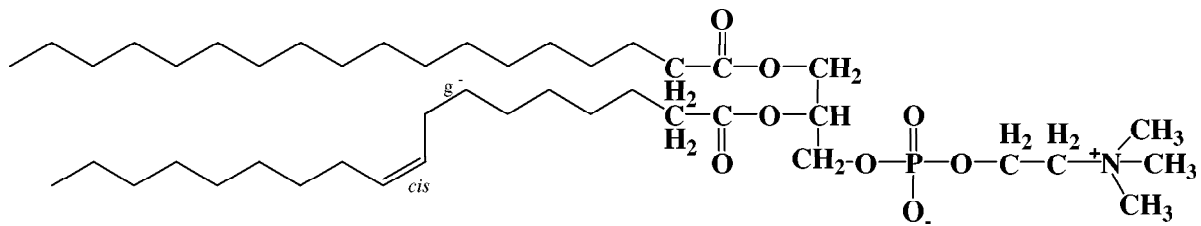


Abb. 1.10: Ungesättigtes Phospholipid mit „Kinke“ (*cis-t-g* - Sequenz) im Fettsäurerest.

### 1.3.2 Lipide für den Aufbau der in dieser Arbeit beschriebenen Membranmodelle

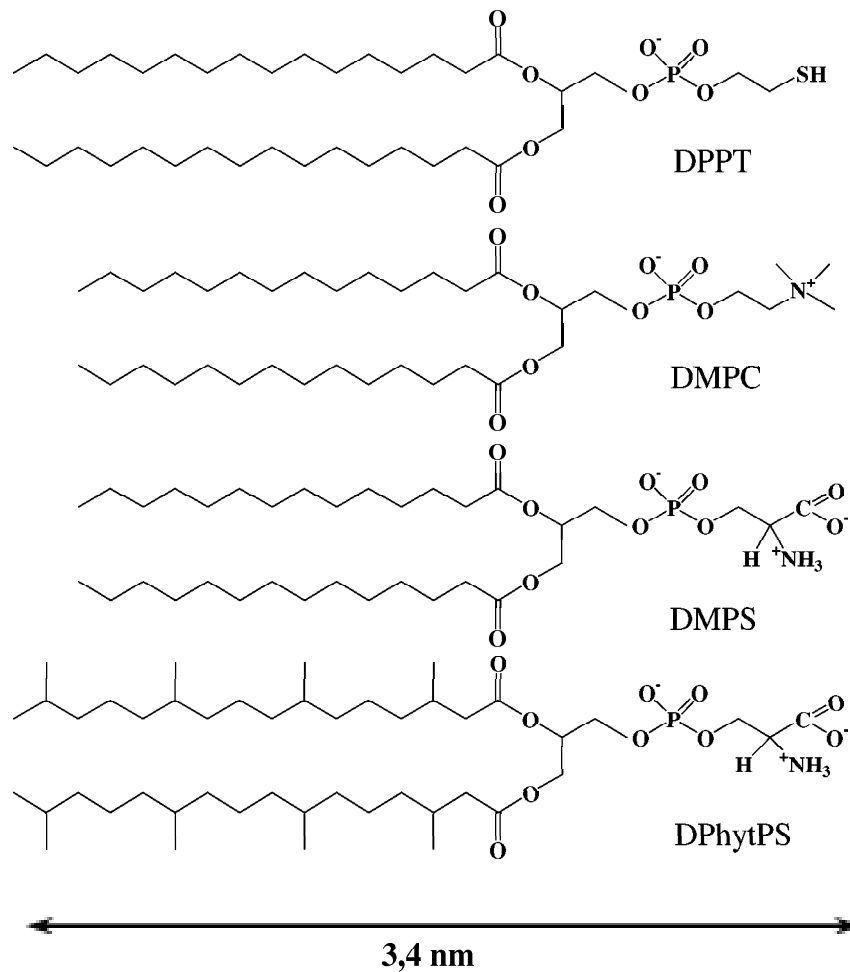
Die wesentlichen Auswahlkriterien für die Verwendung bestimmter Lipide sind:

- die Funktionalität des am Phosphat veresterten Alkohols;
- die Übergangstemperatur  $T_m$  und
- die Oxidationsempfindlichkeit

#### 1.3.2.1 Lipide für den Aufbau von festkörperunterstützten (spacerlosen) Thiolipid-Modellmembranen (sBLM's)

**DPPE** (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidyl-Thioethanol) besitzt in der polaren Kopfgruppe einen Thioethanolphosphorsäureester (Abb. 1.11). Das Thiol ist in der Lage, eine kovalente Bindung zu Metallen wie Silber, Gold oder Quecksilber auszubilden. Dadurch kann dieses Thiolipid zum Aufbau spacerloser Modellmembranen genutzt werden [105]. Die Hauptphasübergangstemperatur liegt bei  $T_m = 38\text{ °C}$  [60].

**DMPC** (1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin) (Abb. 1.11) zeigt in Lipidmembranen einen Übergang von der Gelphase  $L_{\beta'}$  - in die  $P_{\beta'}$  - Phase. Der Hauptphasenübergang erfolgt bei einer  $T_m = 23.5\text{ °C}$  [106], was eine gute Handhabung und Anwendbarkeit bei Raumtemperatur gestattet.



**Abb. 1.11:** Phospholipide zum Aufbau spacerloser Thiolipid-Modellmembranen.

**DMPS** (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylserin) (Abb. 1.11) besitzt in pH-neutraler oder basischer Umgebung eine negative Überschussladung (anionisches Lipid), weswegen es auch bivalente Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann. Dies befähigt es zur Anbindung von bestimmten Proteinen über  $\text{Ca}^{2+}$ , weswegen es unter anderem an der Blutgerinnung beteiligt ist [19], [107] und spezifisch kalziumabhängig Annexin V binden kann [19]. Die Hauptphasenübergangstemperatur  $T_m$  im Membranverband liegt bei  $39\text{ }^\circ\text{C}$  in erdalkalifreien Puffern [108].  $T_m$  kann in Anwesenheit von bivalenten Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  stark erhöht sein [108], [108,109].

**DPhytPS** (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylserin) (Abb. 1.11). Auch hier liegt die Phasenübergangstemperatur deutlich unter  $0$  (vgl. DPhytPC). Es trägt wie DMPS eine

negative Überschussladung in pH-neutraler oder basischer Umgebung. Auch DPhytPS kann wie DMPS kalziumabhängig Proteine binden.

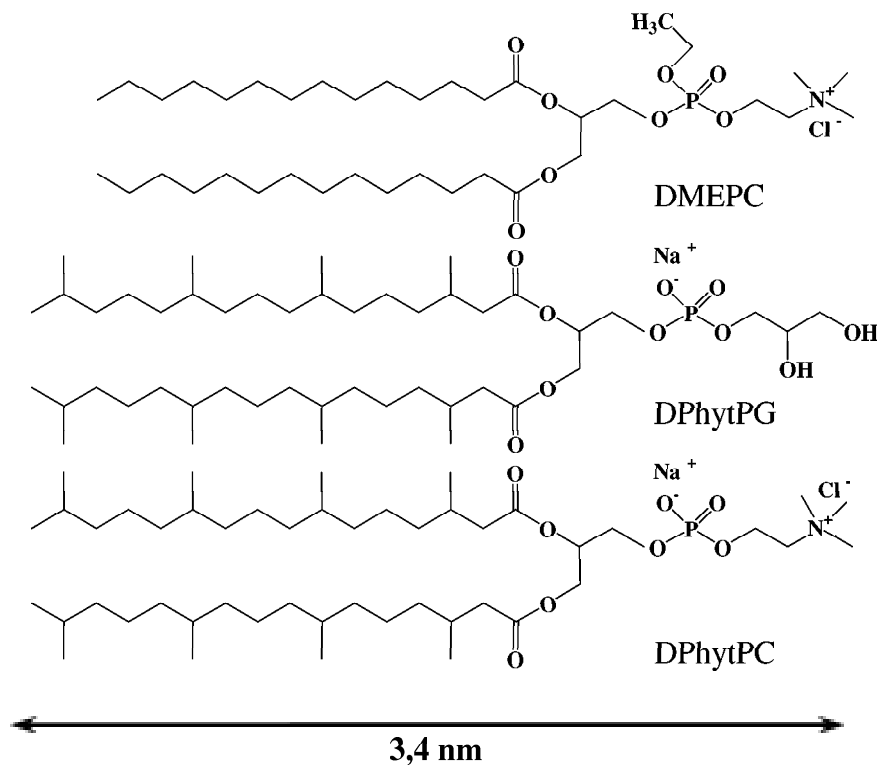
### 1.3.2.2 Lipide für den Aufbau von Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen (tBLM's)

**DMEPC** (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Ethylphosphatidylcholin) trägt an dem Phosphatrest eine Ethylgruppe, die den zwitterionischen Charakter im Vergleich zu DMPC (Abb. 1.12) aufhebt. Dadurch ergibt sich der kationische Charakter dieses Lipidtyps [106]. Wegen der positiven Ladung am quartären Stickstoff des Cholins kann es eine Ionenbindung zu negativ geladenen Substraten wie z.B. plasmapolymerisierten und anschließend hydrolysierten Maleinsäureanhydrid ausbilden. Die Hauptphasenübergangstemperatur liegt bei 25.4 °C [106] in Wasser und somit nur geringfügig über der des unsubstituierten DMPC. Wegen der positiven Ladung wäre ein größerer Unterschied zwischen den Phasenübergangstemperaturen von DMPC und DMEPC zu erwarten, da eine größere Nettoladung an der Kopfgruppe lamellarer Lipide einen größeren Raumbedarf der Lipidmoleküle bewirkt und die Phasenübergangstemperatur auch von dem Raumbedarf der Moleküle abhängt [106]. Interessanterweise und unerwartet liegt die  $T_m$  in 0,1 M NaCl etwas höher als in reinem Wasser.

**DPhytPG** (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylglycerol) (Abb. 1.12) trägt in neutraler oder alkalischer Umgebung eine negative Nettoladung, weswegen es ebenfalls zur Komplexbildung mit bivalenten Kationen wie  $Ca^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  befähigt ist. Wie bei den Phosphatidylserinen liegt die Phasenübergangstemperatur in Anwesenheit bivalenter Kationen höher als in deren Abwesenheit [110]. Generell ist zu erwarten, dass die Hauptphasenübergangstemperatur von DPhytPG ebenfalls deutlich unter 0 liegt (siehe unten unter DPhytPC).

**DPhytPC** (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin) (Abb. 1.12). Die genaue Hauptphasenübergangstemperatur von DPhytPC wird in der Literatur nicht aufgeführt. Sie

kann anhand der Phasenübergangstemperatur eines aus den gleichen Fettsäureresten aufgebauten Glycolipids abgeschätzt werden, da die Art der Fettsäurereste den größten Einfluss auf die Übergangstemperaturen hat. Für ein Diphytanylglucosylglycerol wird ein Übergangstemperaturbereich von - 61 °C bis - 84 °C angegeben [104].  $T_m$  von DPhytPC sollte demnach bei ähnlich tiefer Temperatur liegen.



**Abb. 1.12:** Phospholipide zum Aufbau von Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen.

### Fluoreszenzmarkiertes Lipid für FRAP-Messungen:

**NBD-PC** (1-Myristoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin) (Abb. 1.13) ist ein fluoreszenzmarkiertes Lipid ( $\lambda_{\text{excit}} = 460$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 534$  nm). Es findet in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (*fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP; siehe Kapitel 3) Anwendung.



Periphere Proteine (Typ I) sind nur lose mit der Membran assoziiert (Bsp.: Cytochrom c, Annexin V). Sie sind meist nur über ionische Wechselwirkungen an die Membran gebunden und können daher auch leicht abgelöst werden. Proteine mit einem hydrophoben Peptidanteil (Typ II), mit dem sie in die Membran eintauchen, aber sie nicht durchspannen (Bsp.: G-Proteine und einige Toxine). Integrale Membranproteine, deren membrandurchspannender Proteinteil nur eine Peptidkette ausmacht (Typ III). Integrale Membranproteine, deren membrandurchspannender Proteinteil aus mehreren aneinander gelagerten Peptidketten besteht (Typ IV). Zu diesen beiden Gruppen zählen viele Membranrezeptoren, Ionenkanäle und Carrier. Des Weiteren gibt es noch Proteine, die nur über einen Lipid-Anker mit der Membran in Verbindung stehen (Typ V).

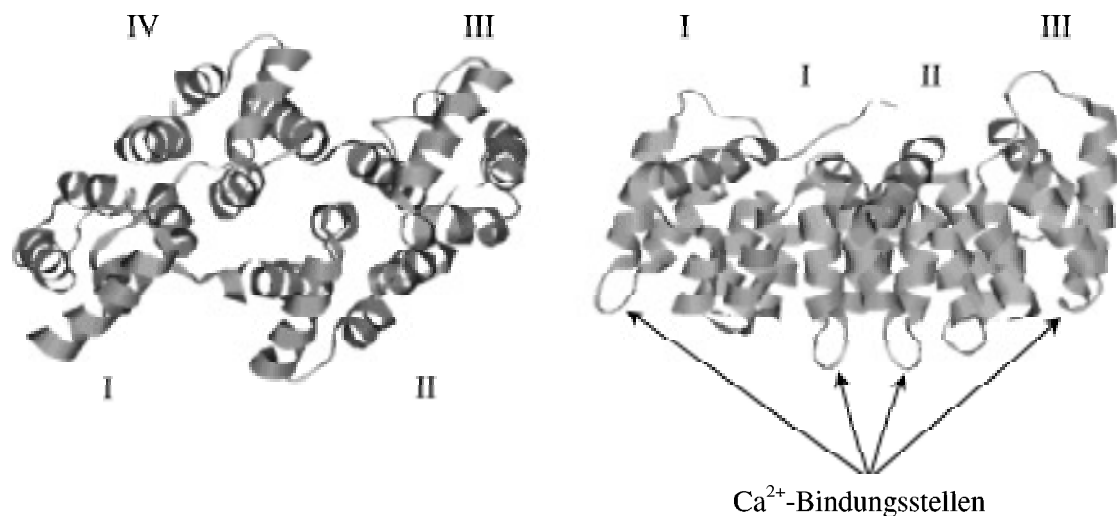
Membranproteine erfüllen wichtige Transportfunktionen. Sie bedingen eine selektive Permeabilität der Zelle und sorgen so für einen Stoffaustausch zwischen Organellen oder der Zellaußenwelt. Der Transport kann dabei aktiv, also unter Verbrauch von Energie, oder passiv, ohne Energieverbrauch, erfolgen. Dabei wird eine Versorgung der Zelle gewährleistet, aber auch die Aufrechterhaltung eines bestimmten Zellmilieus oder eines bestimmten Membranpotentials z.B. durch Pumpenproteine. Eine weitere Funktion ist die Katalyse wichtiger biochemischer Reaktionen, z. B. zur Energiegewinnung zur Versorgung und Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen eines Organismus. Wichtig ist auch die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zellorganellen, bzw. zwischen den Zellen. Diese Aufgabe, die Signaltransduktion, wird von den Rezeptoren vermittelt.

## **1.4.2 Membranproteine dieser Arbeit**

### **1.4.2.1 Annexin V**

Annexin V gehört zu der Proteinfamilie der Annexine, welche im gesamten eukariotischen Reich weit verbreitet sind. Der amphipatische Charakter dieser Proteine reiht sie zwischen löslichen und den membranintegralen Proteinen ein, da sie sich von beiden Proteintypen zwar deutlich unterscheiden, aber auch gewisse Eigenschaften beider tragen. Annexine besitzen ein hydrophiles Äußeres, was ihnen die Löslichkeit verleiht, und binden

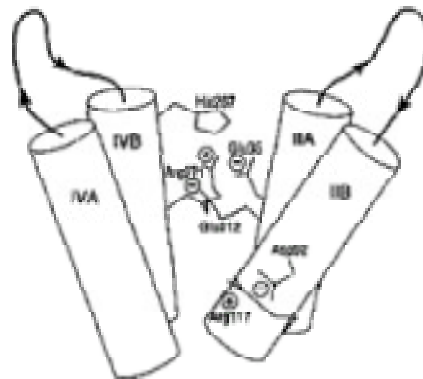
andererseits kalziumabhängig an Membranen. Dies verleiht ihnen den Namen „Janusköpfiges“ Protein [111]. Alle Annexine besitzen eine aus 70 Aminosäuren bestehende identische Proteinsequenz, welche sie als Annexine identifiziert [112]. Ein weiteres wichtiges gemeinsames Merkmal ist die Fähigkeit,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, an negativ geladene Phospholipide, z. B. an Phosphatidylserine, zu binden [113], [19], [112]. Einige Vertreter der Annexine, darunter auch das Annexin V (Abb. 1.15, aus [114]), sind in der Lage (*in vitro*) spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Ionenkanäle auszubilden [115], [116], [117]. Das in Abb. 1.15 gezeigte 320 Aminosäure lange, fast ausschließlich  $\alpha$ -helikale Annexin V besitzt eine linsenförmige Struktur. Die vier Wiederholungseinheiten der Primärstruktur bilden vier kompakte Domänen (Tertiärstruktur), bestehend aus jeweils 5  $\alpha$ -Helices (Sekundärstruktur), die wiederum in einer rechtsgängigen Superhelix organisiert ist [116]. Die vier Domänen sind zyklisch um die zentrale hydrophile Pore angeordnet, die aus vier  $\alpha$ -helikalen Sequenzen (IIA/IIB und IVA/IVB) bestehen. Der zentralen Pore wird die Ionenleitfähigkeit und –selektivität zugeschrieben [114], [116], [118].



**Abb. 1.15:** Bänderstruktur von humanem Annexin V (1AVR). Links: Die Aufsicht auf die konkave Seite des Proteins zeigt deutlich die zentrale Pore. Rechts: Seitenansicht: Die konvexe Seite beinhaltet die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen und stellt somit die der Membran zugewandte Seite dar. Die konkave Seite ist die dem Elektrolyten zugewiesene Seite [aus 114, modifiziert].

Freie Diffusion durch die zentrale wassergefüllte Pore wird durch zwei spannungsabhängige Salzbrücken verhindert, die von den Aminosäureresten des Glutamats

(Glu112) und des Arginins (Arg271), sowie des Arginins (Arg117) und des Aspartats (Asp92) gebildet werden (Abb. 1.16) [116]. Spannungsinduzierte Konformationsänderungen dieser Salzbrücken geben den Kanal für die Diffusion frei. Für die hohe Ionenselektivität des Annexins V für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird der Aminosäurerest des Glutamats (Glu95) verantwortlich gemacht [116] (Abb.1.16).

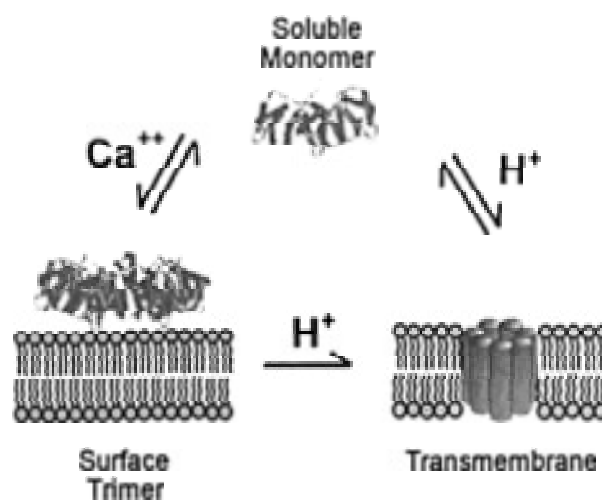


**Abb. 1.16:** Zentrale Pore des Annexin V: Glu95: ionenselektiver Filter; Glu112-Arg271 und Arg117-Asp92: Spannungsabhängige Salzbrücke [116].

Der Mechanismus der Ionenleitfähigkeit ist noch nicht vollständig geklärt. Huber et al postulierten einen Mechanismus, der die Insertion des Annexin V in die Membran ausschließt [114], [116]. Es wird ein Synergieeffekt zwischen (a) einem starken, durch die Membranbindung des Annexin V generierten, elektrostatischen Feld an der Membranbindungsseite des Proteins, ähnlich dem Mechanismus der Elektroporation [119], (b) der Interaktion zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinschleifen (Loops) des Proteins und den Kopfgruppen der Phospholipide sowie (c) dem oberflächlichen Eindringen des Tryptophanrests Trp187 der Domäne III in die Membran, wobei Trp187 möglicherweise mit den Esterbindungen der Phospholipide interagieren kann, angenommen [116]. Dadurch soll es zu einer lokalen Störung der Membranordnung kommen und auf diesem Weg weniger dicht gepackte Lipidareale entstehen, bzw. es kommt zur Ausbildung langlebiger wassergefüllter Poren, was letztendlich die Durchlässigkeit der Membran für Ionen bedingt [116]. Zusammen mit der leitfähigen zentralen Pore erfolgt schließlich die Ausbildung der Kanalaktivität dieses Proteins. Ein anderer Mechanismus der Ionenleitfähigkeit beinhaltet das Eindringen des Annexins in die Membran und dass es so zur Ausbildung eines membrandurchspannenden Ionenkanals kommt [115,117,120,121]. Das Annexin V kann



durch Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$  von der Membran abgelöst werden, wobei aber die Ionenkanalaktivität weiterhin bestehen bleibt. Es wird hier angenommen, dass nur wenige Proteine in die Membran eingebaut werden [117], die nicht durch Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$ , z. B. durch EDTA, entfernt werden können und so weiterhin Kanalaktivität bestehen bleibt. In jüngster Zeit wurde auch von der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Interaktion des Annexins V mit Phospholipidmembranen, bei leicht sauren pH-Werten, berichtet [120]. Hierbei soll es zur Ausbildung transmembraner Ionenkanäle durch Proteininsertion in die Membran kommen (Abb. 1.17, aus [120]).

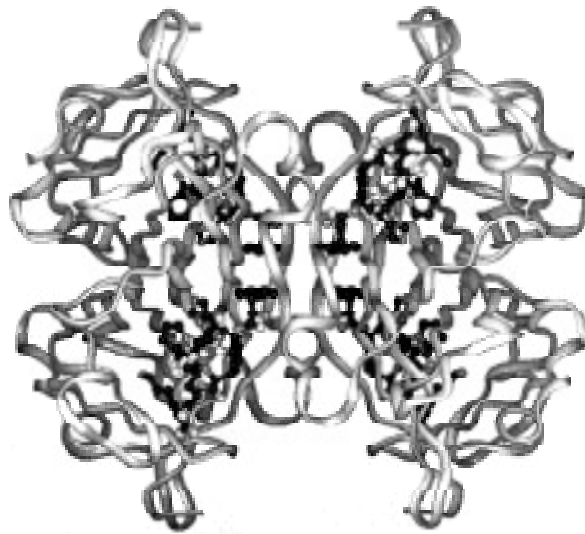


**Abb. 1.17:** Modell der  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Abhängigen Struktur und Membranassoziation von Annexin V und Annexin XII (aus [120]).

Die physiologische Bedeutung der Annexine ist bisher noch unklar, auch wenn viele ihrer *in vitro*-Aktivitäten bekannt sind. Die Annexine scheinen in eine Reihe physiologischer Prozesse involviert zu sein. Es wird ihnen eine Beteiligung bei der Endo- und Exocytose (Membranfusionsprozesse) [19], z. B. der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Exocytose von Neurotransmittern [122], der Organisation des Cytoskeletts, bei der Zell-Differenzierung (z. B. von neonatalen Myocyten [123]) und Proliferation sowie der mitogenen Zellsignaltransduktion zugeschrieben. Einem Teil der Annexine (Annexin V z. B.) wird eine antiinflammatorische und antikoagulierende Wirkung zugesprochen [19]. Wegen der Fähigkeit an negative Phospholipide wie Phosphatidylserine zu binden, wird angenommen, dass die Annexine nur indirekt inhibitorisch wirken. Im Fall der antikoagulierenden

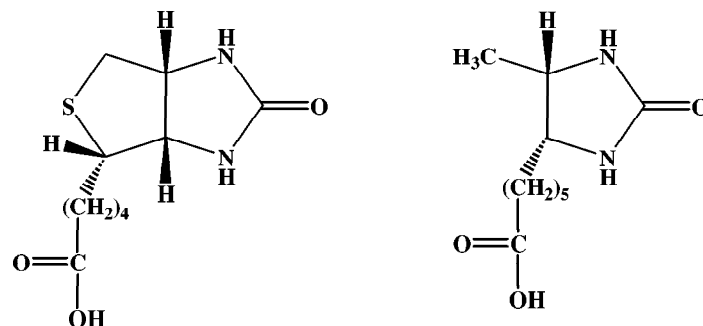
Wirkung verhindern die betreffenden Annexine die Anbindung der Phospholipase A<sub>2</sub> an ihr Substrat, die Phospholipide, und verhindert somit die Bildung der Arachidonsäure, einer wichtigen Vorstufe der auf dem Cyclooxygenaseweg oder Lipoxygenaseweg gebildeten Entzündungsmediatoren. Die Arachidonsäurekaskade [107] wird so in einem frühen Stadium gehemmt. Ähnlich liegt es bei der antikoagulierenden Wirkung des Annexin V. Annexin V bindet Ca<sup>2+</sup>-abhängig an Phosphatidylserin und kann so z. B. die Aktivierung des Prothrombins zu Thrombin verhindern [19], indem die Aktivierung von Faktor IX zu IXa und X zu Xa inhibiert wird, denn die Aktivierung dieser Faktoren erfolgt an dem VIIa-Ca<sup>2+</sup>-Lipidkomplex, der an Faktor III bindet. Die Spaltung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin erfolgt schließlich an dem Xa-Va-Ca<sup>2+</sup>-Phospholipid-Komplex [107]. Annexin V erwies sich in Tierversuchen ähnlich potent wie Heparin aber verursachte eine geringere Blutungsneigung. Evtl. spielt es auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in Herzmuskelzellen [124]. Auch eine Verlangsamung der Apoptose durch Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration konnte beobachtet werden [125]. Annexine werden auch im Zusammenhang mit der Entwicklung oder Hemmung von Krebs und als Bindungsproteine für verschiedene Viren (Influenza und Hepatitis B) diskutiert. Pollard et al. [19], Wood et al. [126] und Moss et al. [127] haben in ihren Zusammenfassungen über die Annexine versucht, den Stand der Forschung zu umreißen. Trotz des fortschreitenden Erkenntnisstands, liegt die physiologische Bedeutung dieser Proteinfamilie noch immer im Dunkeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Prof. Dr. A. Skerra, TU München, entwickeltes Fusionsprotein aus Wildtyp Annexin V und einem 9 Aminosäuren langen *Strep*-tag II Affinitätspeptid [128] untersucht. *Strep*-tag II befähigt das Annexin V zur Bindung von Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*), da *Strep*-tag II eine intrinsische Bindungsaffinität zu Streptavidin aufweist. *Strep*-tag II belegt dabei die selbe Bindungstasche wie der natürliche Ligand Biotin (Vitamin H) des aus 4 Untereinheiten aufgebauten Streptavidins (Abb. 1.18, aus [129]). In der Arbeit wurde eine Streptavidin-Mutante 1 mit einer verminderten Bindungsaffinität verwendet.

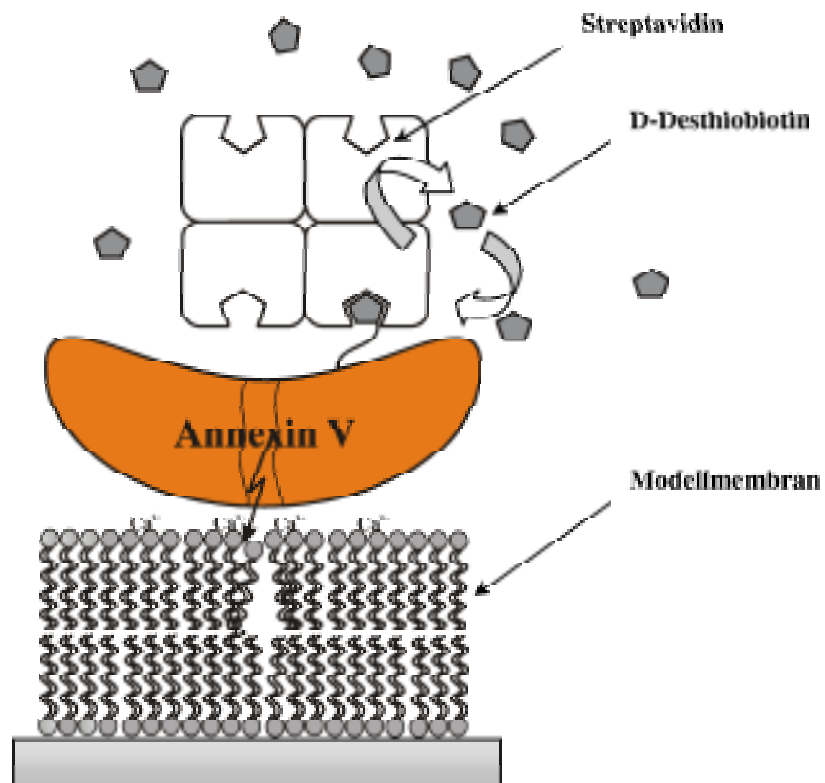


**Abb. 1.18:** Kristallstruktur des aus *Strep*-tag II und rekombinatem „core“ Streptavidin gebildeten Komplex. Deutlich sind die Bindungstaschen der vier Streptavidinuntereinheiten zu sehen.

Dem Wildtyp Annexin V fehlt die Möglichkeit der Ionenkanalregulation. Das *Strep*-tag II-Affinitätspeptid soll diese Reglerfunktion übernehmen, indem es reversibel Streptavidin bindet und es somit zu einem Verschluss der zentralen Pore im Protein kommt. Durch Zugabe von Biotin oder Desthiobiotin (Abb. 1.19) kann das Streptavidin kompetitiv von seiner Bindungsstelle am Annexin V- *Strep*-tag II-Fusionsprotein entfernt werden [130], was die Freigabe des Ionenkanals zur Folge hat. Die Reversibilität der Hemmung des Annexin V sollte somit möglich sein. In Abb. 1.20 wird der angedachte Mechanismus der Annexin V-Hemmung skizziert. Bei dem verwendeten Streptavidin handelt es sich ebenfalls um eine Mutante (Streptavidinmutante 1 [130]) mit verbesserter Affinität zum Affinitätsprotein *Strep*-tag II.



**Abb. 1.19:** Strukturvergleich zwischen D-Biotin (links) und D-Desthiobiotin (rechts).



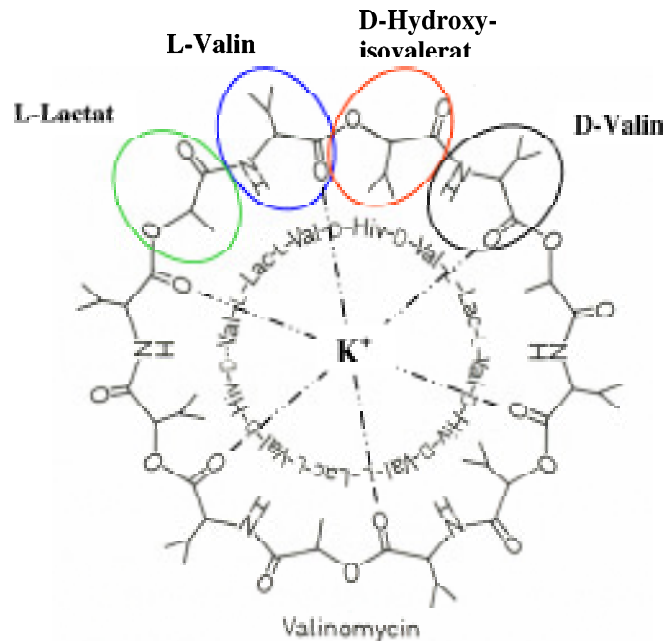
**Abb. 1.20:** Schematische Darstellung der reversiblen Anbindung von Streptavidin an das Fusionsprotein bestehend aus Annexin V und *Strep*-tag II.

#### 1.4.2.2 Valinomycin

Das Cyclodepsipeptid Valinomycin gehört zu den Transportantibiotika. Es wurde 1955 erstmals aus *Streptomyces fulvissimus* isoliert. 6 Aminosäuren (L- und D-Valin (Val)) und 6 Hydroxysäuren (L-Lactat (Lac) und D-Hydroxyisovalerat (Hiv)) bilden die in Abb. 1.21 gezeigte cyclische Struktur durch Ausbildung von alternierenden Peptid- und Esterbindungen.

Als Ionophor erhöht Valinomycin signifikant die Membranpermeabilität für  $K^+$ -Ionen, was zu starken Störungen im Elektrolythaushalt und letztendlich zum Untergang der betreffenden Zelle führt [5]. Die hohe Selektivität für  $K^+$ -Ionen wird durch die Größe des Ionenradius und der Anzahl der Wassermoleküle in der Hydratationshülle des Kaliumions bestimmt. Kalium-Ionen (Ionenradius 133 pm) passen optimal in die Koordinationslücke

des Valinomycins. Für Natrium-Ionen (95pm) ist die Lücke zu groß, weswegen eine 10000-fach höhere Affinität für Kalium- als für Natrium-Ionen besteht [131].



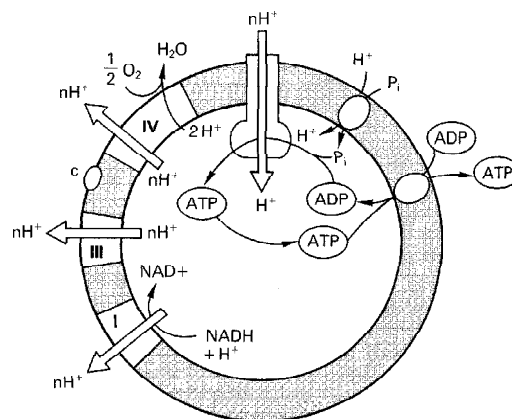
**Abb. 1.21:** Valinomycin: Angedeutet sind die Koordinationsstellen für das Kalium-Ion. Die komplexierenden Carbonylsauerstoffe treten bei  $K^+$ -Bindung nach innen.

Valinomycin komplexiert ein  $K^+$  über sechs oktaedrisch angeordnete Carbonylsauerstoffe, die dem Valin entstammen, wobei die nach Außen orientierten Methyl- und Isopropylseitenketten des Komplexes eine hydrophobe Hülle bilden. Dadurch kann sich der Komplex in dem hydrophoben Teil der Membran lösen und als mobiler Carrier Kaliumionen durch die Membran transportieren (erleichterte Diffusion). Die Wassermoleküle der Hydratationshülle werden sukzessiv gegen die Carbonylsauerstoffe der Valine ausgetauscht und bei Abgabe des  $K^+$  wieder sukzessiv gelöst. Die Aktivierungsenergie für die Bindung und Abgabe von  $K^+$  ist sehr gering, denn neue Bindungen werden geknüpft, wenn alte gebrochen werden [5]. Valinomycin wird wegen seiner hohen Toxizität therapeutisch nicht genutzt, ist aber ein gut charakterisierter Ionencarrier und wird deswegen oft als Testsystem in der Forschung genutzt. Valinomycin, als einfacher und gut charakterisierter Stellvertreter der Membranproteine, wird oft zur Testung biomimetischer Modellmembranen hinsichtlich ihrer Tauglichkeit als Biosensoren

herangezogen [80], [69]. Auch können die Reservoirigenschaften oberflächengebundener Modellmembranen (tBLM's) untersucht werden [58], [132].

### 1.4.2.3 Cytochrom-c-Oxidase

Ein wichtiger biochemischer Vorgang ist die Energiegewinnung durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und deren Konservierung und Bereitstellung in Form von ATP (Adenosintriphosphat). Da diese Reaktion stark exergonisch ist und eine freie Energie von  $-219$  kJ liefert, die für Zellen so nicht genutzt werden kann, wird diese Reaktion von der *Atmungskette* in Teilprozesse zerlegt (Abb. 1.22, aus [107]).

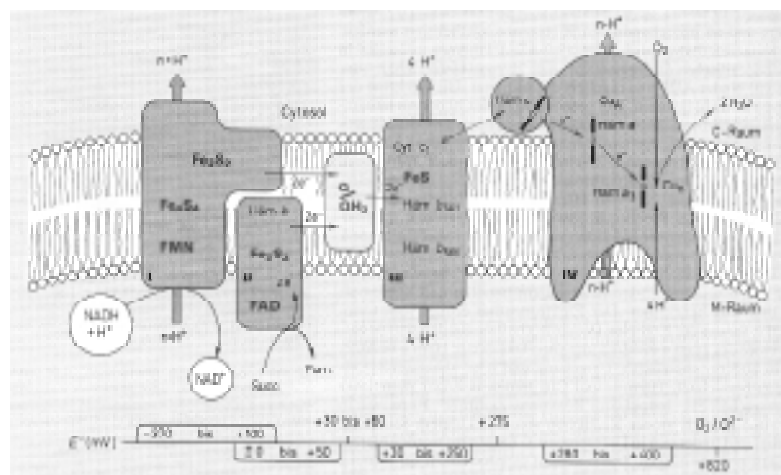


**Abb. 1.22:** Protonenflüsse durch die Mitochondrienmembran im Fließgleichgewicht. Gezeigt sind Komplex I, III und IV der Atmungskette, die an dem Aufbau des Protonengradienten beteiligt sind, sowie die ATP-Synthase und zwei für die ATP-Synthese Edukt liefernde Carrier. Aus [107].

Bei der Zellatmung wird in erster Linie NADH (reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotid) aus dem Citratzyklus oxidiert. Die Atmungskette baut dabei einen Protonengradienten über die Membran auf, der dann von der ATP-Synthase (Komplex V), eines weiteren Komplexes der Mitochondrienmembran, für die stark endergone Synthese von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) ausgenutzt wird. Der Elektronentransfer und der damit verbundene Aufbau eines elektrochemischen Potentials von H<sup>+</sup>-Ionen (Aufbau eines Protonengradienten), sowie die Nutzung dieser protonenmotorischen Kraft (*chemiosmotische Hypothese* von

Mitchell [133]) zur ATP Synthese (oxidative Phosphorylierung), wird auch als *Atmungsketten-Phosphorylierung* bezeichnet.

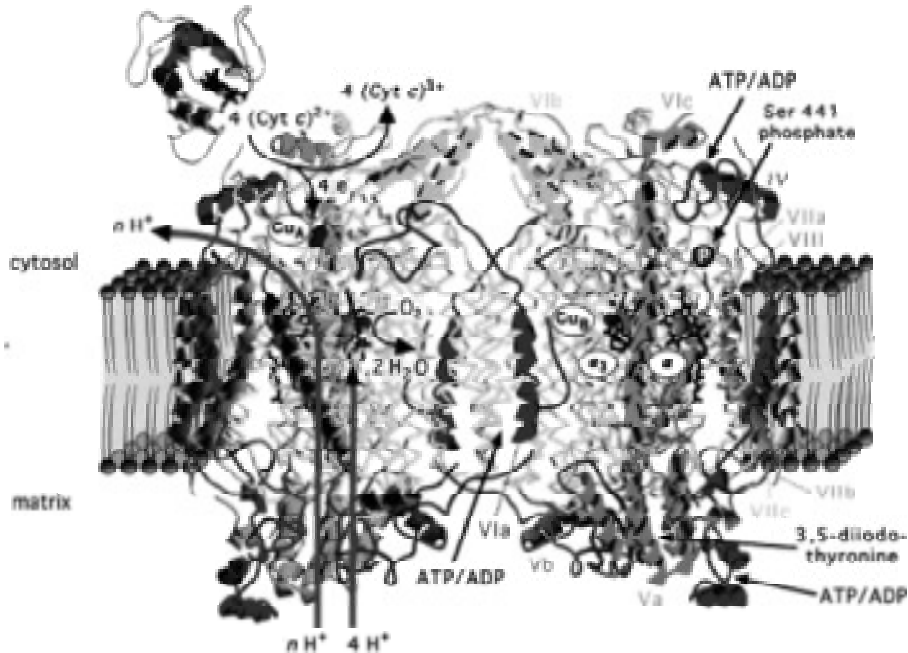
Die Atmungskette ist bei eukaryontischen Zellen in der inneren Mitochondrienmembran und bei aeroben und anaeroben Bakterien in der Plasmamembran lokalisiert. Die Erzeugung eines Protonengradientens (in umgekehrter Richtung) und dessen Ausnutzung zur ATP Synthese erfolgt auf ähnlicher Weise in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten [102], [107]. Das membranintegrale Protein Cytochrom-*c*-Oxidase (CcOX) bildet den terminalen Komplex IV der Atmungskette. Seine Aufgabe besteht in der Reduktion von molekularem O<sub>2</sub> zu zwei Molekülen Wasser, indem es vom Komplex III der Atmungskette reduziertes Cytochrom *c* (Hämoprotein) oxidiert und gleichzeitig Protonen von der Matrixseite zur cytosolischen Seite der Mitochondrien pumpt [134] (Abb. 1.23, aus [107]).



**Abb. 1.23:** Topologisches Schema zur Anordnung von Redoxsystemen der mitochondrialen Atmungskette. Als Abszisse sind die Redoxpotentialbereiche der einzelnen Komponenten angezeigt [107].

In der vorliegenden Arbeit wurde Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* verwendet, die aus vier Untereinheiten I-IV aufgebaut ist. Im Gegensatz hierzu besteht die CcOX aus Rinderherzmitochondrien aus 13 Untereinheiten. Da die drei größten Untereinheiten (I-III) der CcOX aus Rinderherzmitochondrien homolog derer aus *Paracoccus denitrificans* sind [135], wird die Funktionsweise anhand der in Abb. 1.24 (aus

[136], bzw. aus [137]) gezeigten, besser charakterisierten CcOX aus Rinderherzmitochondrien erläutert.



**Abb. 1.24:** Struktur der dimeren CcOX aus Rinderherzmitochondrien. Das linke Monomer zeigt schematisch die enzymatische Leistung von Komplex IV und das rechte Monomer zeigt die Regulation der enzymatischen Leistung. [136] und [137].

Die CcOX enthält zwei Häm-*a*-Gruppen (Abb. 1.25 aus [107]), Häm *a* und Häm *a*<sub>3</sub> (in Untereinheit I), und drei Kupferionen in zwei Kupferzentren, die als Cu<sub>A</sub> (in Untereinheit II) und Cu<sub>B</sub> (in Untereinheit I) bezeichnet werden. Das Kupferzentrum Cu<sub>A</sub> beinhaltet zwei Kupferionen unterschiedlicher Wertigkeit (Cu<sup>1+</sup>/Cu<sup>2+</sup>). Cu<sub>A</sub> nimmt ein Elektron des reduzierten Cytochrom *c* (Substrat der CcOX) auf. Häm *a* übernimmt das Elektron von Cu<sub>A</sub>-Zentrum und gibt es an das Häm *a*<sub>3</sub>-Zentrum ab. Das Häm *a*<sub>3</sub> transportiert das Elektron zum Cu<sub>B</sub>, das dann von Cu<sup>2+</sup> in Cu<sup>1+</sup> übergeht. Ein zweites Cytochrom *c* führt ein weiteres Elektron ein, das den gleichen Weg bis zum Häm *a*<sub>3</sub> (Fe<sup>3+</sup>) durchläuft und das Eisenzentrum zum Fe<sup>2+</sup> reduziert. Das Häm *a*<sub>3</sub> ist nun in der Lage Sauerstoff zu binden. Die räumliche Nähe des Häm *a*<sub>3</sub> zum Cu<sub>B</sub> erlaubt die Reduktion des Sauerstoffs zum Peroxid und der sich anschließenden Spaltung der O–O-Bindung, wobei beide Sauerstoffatome in der formalen Oxidationsstufe wie in Wasser vorliegen. Der molekulare Sauerstoff wird so unter der gleichzeitigen Aufnahme von Protonen zu Wasser reduziert.



Die zusätzlichen beiden Elektronen für diesen Mechanismus liefert kurzfristig a) das Eisenzentrum, indem das Eisen formal zum Ferryl ( $\text{Fe}^{4+}$ ) oxidiert wird und b) ein benachbarter Tyrosin-Rest, der in einen radikalischen Zustand übergeht. Die Regenerierung des katalytischen Zentrums erfolgt durch die erneute Aufnahme zweier Elektronen die den Tyrosin-Rest wieder in seinen Grundzustand überführen und das  $\text{Fe}^{4+}$  des Häm  $a_3$ -Zentrums zum  $\text{Fe}^{3+}$  reduzieren. Mechanismus siehe Abb. 1.26 [136], wobei die Pfeile den derzeit diskutierten Protonentransportweg anzeigen.

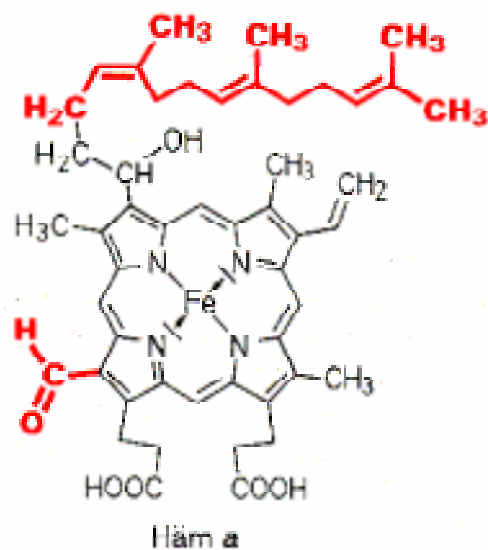


Abb. 1.25: Häm a-Molekül: Es unterscheidet sich vom Häm h des Blutfarbstoffs durch die Formylgruppe und dem Farnesyl-Rest (Fett unterlegt) [107].

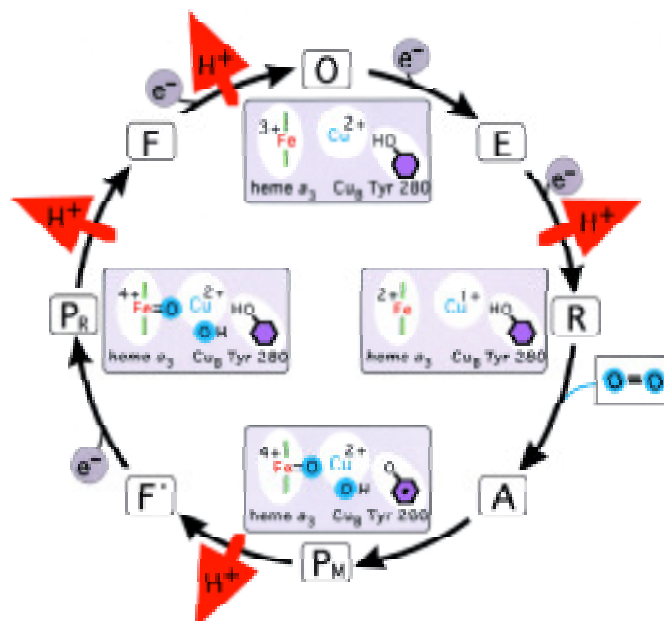
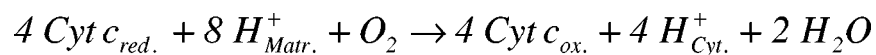


Abb. 1.26: Derzeit postulierter katalytischer Zyklus der CcOX (aus [136]).

In dem in Abb. 1.26 gezeigten Zyklus werden vier Protonen aus der Matrixseite nur durch die Oxidation des Sauerstoffes zu Wasser entfernt, was zum Aufbau des Protonengradienten beiträgt. Weitere vier Protonen werden von der Matrixseite zur cytosolischen Seite während eines Zyklus gepumpt. Welcher Elektronentransferschritt mit dem Pumpen der Protonen gekoppelt ist, ist noch nicht völlig geklärt. Abb. 1.26 aus [138] zeigt die Oxidationsschritte des Sauerstoffes. Die Nettoreaktion der CcOX kann wie folgt festgehalten werden [138]:



Die CcOX aus Rinderherzmitochondrien besitzt noch einige wichtige regulatorische Untereinheiten. Z. B. kann das Enzym allosterisch durch ATP gehemmt werden, wenn eine ausreichend hohe Konzentration an ATP von der ATP-Synthase gebildet wurde. Dies hat zur Folge, dass das  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Verhältnis erniedrigt wird. Die allosterische Hemmung der CcOX durch ATP kann von 3,5-Dijodthyronin (Schilddrüsenhormon) aufgehoben werden ([136], [139] und dort zitierte Literatur).

## **2 Motivation und Zielsetzung**

### **2.1 Motivation**

Die Komplexität biologischer Membranen, ihre damit verbundenen vielfältigen Aufgaben zur Erhaltung wichtiger physiologischer Funktionen und der sich daraus ergebenden Bedeutung für das Leben, macht die Erforschung dieses Systems so bedeutungsvoll. Nicht zuletzt auch deswegen, weil eine ganze Reihe von pathologischen Veränderungen auf Defekten von Membranproteinen beruht (z. B. die cystische Fibrose, Diabetes mellitus). Auch lässt sich durch die Stimulation von Membranproteinen (z. B. des Acetylcholinrezeptors oder des Dopaminrezeptors) aktiv in den Zellstoffwechsel eingreifen. Damit besteht die Möglichkeit einer symptomatischen Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen. Auch die Barrierefunktion der Membran ist von pharmakologischem Interesse. Die Membran muss zunächst von den Wirkstoffen überwunden werden, um an den Wirkort gelangen zu können. Des Weiteren trägt die Grundlagenforschung an biologischen Membranen zum besseren Verständnis membranassoziierter Prozesse bei. Die Entwicklung festkörperunterstützter, bzw. oberflächengebundener Modellmembranen und die Inkorporation von Membranproteinen eröffnet die Möglichkeit, membranassozierte Prozesse gezielt zu untersuchen, da Modellmembranen eine Reduzierung natürlicher Membranen auf wenige charakteristische Bestandteile darstellen. Auch ihr großes Potential zur Klärung pharmakologischer Fragestellungen machen künstliche Biomembranen so interessant. Festkörperunterstützte Modellmembranen sind einer Reihe von oberflächenanalytischen und elektrochemischen Meßmethoden zugänglich [29], [101]. Ihre dadurch bedingte Devicefähigkeit (siehe Kapitel 1.2) ermöglicht die Entwicklung von Testsystemen zur Auffindung und Testung potentieller Wirkstoffe (drug screening) [101], [97]. Auch können auf ähnliche Weise Biosensoren für die Labordiagnostik [76], [61] und für die Umweltanalytik realisiert werden.

## 2.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung von Modellsystemen der Lipidmembran zur Inkorporation und Untersuchung von Membranproteinen. Hinsichtlich ihres Verwendungszwecks ist es sinnvoll, den Membranproteintyp zu berücksichtigen. *Periphere Membranproteine* (vgl. Kapitel 1.4) benötigen keinen Submembranraum, wohingegen *transmembrane Proteine* wegen eines oft vorhandenen extramembranen Proteinanteils einen Submembranraum (siehe Kapitel 1.2) benötigen. Dadurch wird die Denaturierung der Proteine durch den direkten Elektrodenkontakt vermieden.

Außerdem müssen die Modellmembranen einer Reihe von Charakterisierungsmethoden zugänglich sein, um ihre Devicefähigkeit zu gewährleisten. Die Anwendung elektrochemischer Methoden, z. B. der Impedanzspektroskopie (Kapitel 4) zur Charakterisierung der Modellmembranen, bedingt ihren Aufbau auf Goldelektroden. Gleichzeitig wird damit der Einsatz der Oberflächenplasmonenspektroskopie (Kapitel 4) zur Verfolgung des Architekturaufbaus über die Schichtdicke ermöglicht. Die Goldelektrode dient hier ebenfalls zur Anbindung der Membran an das Substrat über Sulfidbindungen.

Für die Untersuchung von peripheren Membranproteinen bieten sich spacerlose *festkörperunterstützte Lipidmodellmembranen* an. Ein solches peripheres Membranprotein stellt das in dieser Arbeit zu untersuchende Annexin V dar (Kap. 1.4). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Möglichkeit der reversiblen Hemmung der Kanaleigenschaften des gentechnisch veränderten Annexin V (Fusionsprotein aus *Strep-tag II* und dem Wildtyp Annexin V) durch die Streptavidin-Mutante 1 (Kapitel 1.4.1). Vorausgegangene Arbeiten von H. Wieder [60] konnten zwar die Kanaleigenschaften und die Hemmung der Annexin V-Mutante zeigen, jedoch nicht die Reversibilität der Hemmung, obwohl die Verdrängung des Streptavidins von seiner Bindungsstelle möglich war. Ein Ziel dieser Arbeit besteht somit in der eindeutigen Klärung der Möglichkeit zur reversiblen Hemmung des Annexins V, sowie in der Entwicklung einer festkörperunterstützten Lipidmodellmembran zu diesem Zweck. H. Wieder benutzte für seine Studien an der gleichen Annexin V-Mutante eine

festkörperunterstützte Modellmembran, bestehend aus dem Ankerlipid DPPE und den freien Lipiden DMPC/DMPS [60] (siehe Kapitel 3). Auf DPPE basierende Modellmembranen sind bisher gut charakterisiert worden [60,68,105,140], und stellen daher auch in dieser Arbeit den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer festkörperunterstützten Modellmembran zur Untersuchung der Annexin V-Mutanten dar. Bei der Betrachtung des derzeit meist diskutierten Mechanismus zur Ausprägung der Ionenleitfähigkeit durch das Annexin V (Synergieeffekt zwischen Störung der Membran durch Generierung eines elektrischen Feldes, der Interaktion des Tryptophanrestes mit der Membran und der Anbindung an die Membran über  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie der zentralen Pore im Protein (siehe Kapitel 1.4.1)), könnte der Grund für die fehlende Reversibilität in der unzureichenden Fluidität der von H. Wieders verwendeten Membran liegen (Anteil der Ankerlipide 80 – 85 %). Eine rigide Membran erschwert die Störung der Membranintegrität, bzw. verhindert die Reorganisation nach erfolgter Proteinhemmung. Die initiale Störung der Membranintegrität durch die Annexinbindung kann zwar zunächst noch an H. Wieders Modellmembransystem erfolgen, aber dieser wichtige Anteil an dem oben beschriebenen Synergieeffekt (Annexinbindung über  $\text{Ca}^{2+}$ ) fehlt bei der Reaktivierung des Annexins V durch die kompetitive Verdrängung des Streptavidins mit D-Desthiobiotin. Ein wichtiger Teil des diskutierten Synergieeffekts fällt somit bei der Reaktivierung des Annexins V aus, was es dem Protein erschwert, eine erneute Leitfähigkeit der Membran durch Störung der Membranintegrität zu erzeugen. Um dennoch eine erneute Leitfähigkeit durch das Annexin V zu ermöglichen, muss die Beweglichkeit der freien Lipide in der Modellmembran erhöht werden. In der vorliegenden Arbeit soll daher eine einfach herzustellende, festkörperunterstützte Modellmembran entwickelt werden, an der die Kanalaktivität und vor allem die reversible Hemmung der Annexin V-Mutanten durch die Streptavidin-Mutante 1 untersucht werden kann. Der Aufbau der Modellmembran soll im Gegensatz zu H. Wieders System gut kontrollierbar sein, gleichzeitig aber nur aus wenigen definierten Bestandteilen aufgebaut sein. Die Entwicklung einer kovalent an die Goldelektrode gebundenen Membran mit einem gut einzustellenden, frei beweglichen Lipidanteil in der Membransubstanz, erfordert daher auch die Entwicklung einer neuen Präparationstechnik. Diese soll, als weiteres Ziel dieser Arbeit, eine bessere Kontrolle des freien Lipidanteils zulassen.

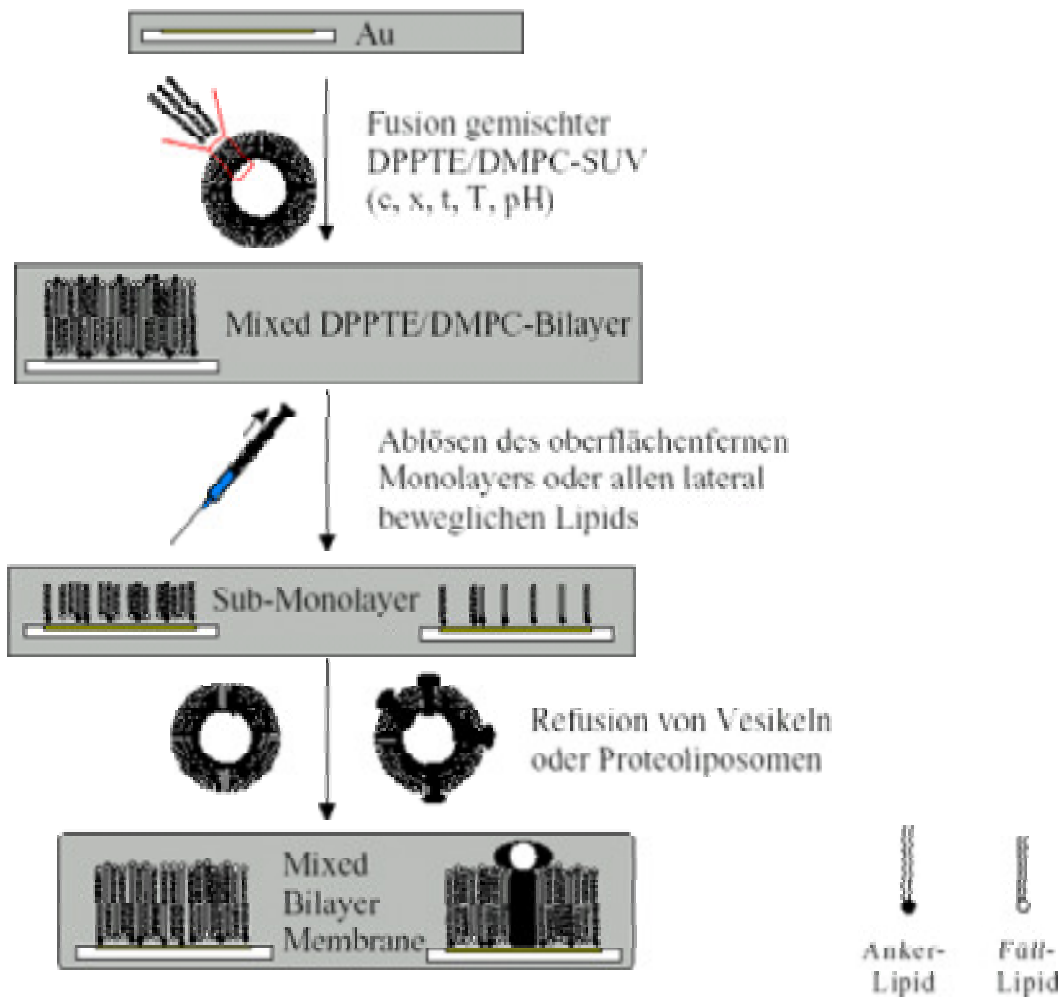
Viele physiologisch und pharmakologisch interessante Proteine (z. B. Cytochrom-c-Oxidase, Rezeptoren der Neurotransmitter,  $H^+/K^+$ -ATPase der Belegzellen des Magens, L- und T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal des Herzens,  $\beta$ -Rezeptoren um nur einige zu nennen) stellen transmembrane Proteine dar. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung eines *oberflächenverankerten Lipidmodellmembransystems* mit einem *großen Reservoir*. Dieser Modellmembrantyp ermöglicht die Aufnahme komplexer Proteine, vor allem solcher mit einem ausgedehnten extramembranen Proteinanteil [71,72,89]. Die elektrischen Eigenschaften natürlicher Membranen [10] müssen dabei berücksichtigt werden. Die Reservoirgröße unter der Membran [58,73], die Fluidität [1,7] und die Ionenundurchlässigkeit der Membran [1] sind wichtige Faktoren, die die Funktion der Membran und der in ihr integrierten Proteine beeinflussen. Diese Faktoren müssen neben der Anwendbarkeit und der Praktikabilität der Herstellung berücksichtigt werden.

Wegen der oft zu hohen Ankerdichte und der kurzen, wenig flexiblen Spacermoleküle, besitzen viele, auf Oligomeren oder kurzkettigen Polymeren basierenden tBLM's nur eine eingeschränkte Fluidität der Lipide und eine eingeschränkte Beweglichkeit der Membranproteine. Eine verbesserte Fluidität kann demnach durch Verringerung der Ankerdichte [26] und/oder durch Erhöhung der Beweglichkeit der Spacermoleküle erreicht werden. Dicke, quellbare Polymerkissen als Spacer können hier Abhilfe leisten [74]. Besonders geeignet erscheinen daher leicht herzustellende Polymere, deren Dicke und Quellungsgrad kontrollierbar ist. Eine polymerunterstützte Lipidmembran mit großem Reservoir soll daher zur Aufnahme komplexer transmembraner Proteine entwickelt werden. Die Reservoirgröße soll dabei leicht anzupassen sein. Besonders geeignet erscheint die Verwendung von plasmapolymersiertem Maleinsäureanhydrid [141] als Membransupport zu sein, da der Prozess der Polymerisation eine nahezu unbegrenzte Vielfalt der Polymereigenschaften ermöglicht [87], [141].

### 3 Entwicklung verschiedener Modellmembransysteme

#### 3.1 Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembranen (sBLM's)

Das bisher verwendete sBLM-System zur Untersuchung der Annexin V-Mutanten wurde nach folgendem Prinzip aufgebaut (Abb. 3.1 aus [60]).



**Abb. 3.1:** Schema zum Aufbau spacerloser, binärer Modellmembranen (aus [6]). Gemischte DPPTE/DMPC-Vesikel werden direkt auf Gold gespreitet. Nach Entfernung der freien Lipide, werden diese durch freie Lipide gewünschter Art ersetzt und so die Submonoschicht zur Lipiddoppelschicht komplettiert.

Auf einer mit Piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. und  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Verhältnis 3:1 gemischt) gereinigten und hydrophilisierten Goldoberfläche (thermisch aufgedampftes Gold auf Glaträgern) wurden zunächst gemischte DPPTE (Thiolipid)/DMPC-Vesikel gespreitet [68]. Das DMPC in den Vesikeln dient dabei der Reduzierung der Ankerdichte in der Submonoschicht, umso eine höhere Beweglichkeit der Membranlipide zu erreichen. Anschließend wurde die distale Lipidmonolage, bzw. die freien ungebundenen Lipide durch mehrfaches durchlaufen der Luft/Elektrolyt-Phase aus der sich gebildeten Membran entfernt. In einem zweiten Fusionschritt zur Komplettierung der DPPTE-Monolage zur Lipiddoppelmembran wurden dann die für die Annexinbindung notwendigen DMPS-Lipide eingeführt, indem DMPC/DMPS-Vesikel fusioniert wurden.

Diese Präparationstechnik zeigte eine Abhängigkeit des gebundenen Lipidanteils (DPPTE) vom Molenbruch DPPTE/DMPC [140], [68] sowie von der Fusionszeit [60]. Es zeigte sich, dass die DPPTE-Lipide (80-85 % DPPTE in der Submonoschicht) aufgrund ihrer großen Bindungsaffinität zum Gold auf der Elektrode kumulieren und somit die Kontrolle der Ankerdichte praktisch nicht möglich war. Die geringfügige Reduzierung der Ankerdichte erwies sich trotzdem als wichtiges Kriterium für die Hemmung der Ionenkanalaktivität, da eine Membran mit einer reinen DPPTE-Monolage in der Subschicht zwar Ionenkanalaktivität des Proteins zeigte, jedoch nicht dessen Hemmung [60]. Durch die laterale Verdünnung der DPPTE-Schicht mit DMPC konnte H. Wieder dann zwar die Hemmung der Annexin V-Mutanten aufzeigen, jedoch erwies sich diese als irreversibel, obwohl die kompetitive Verdrängung der Streptavidin-Mutanten 1 von ihrer Bindungsstelle möglich war. Eine erneute Störung der Membranintegrität der von H. Wieder verwendete binäre Membran erwies sich durch das Ablösen der Streptavidin-Mutanten somit als nicht möglich.

### 3.1.1 Weiterentwicklung der spacerlosen Thiolipid-Modellmembran

Um eine höhere Beweglichkeit der Lipide in der Membran zu erreichen und dabei gleichzeitig die Kontrolle der Ankerdichte der chemisorbierten DPPTE-Thiolipide zu ermöglichen, muss die laterale Verdünnung der Ankerdichte quasi konserviert werden, um

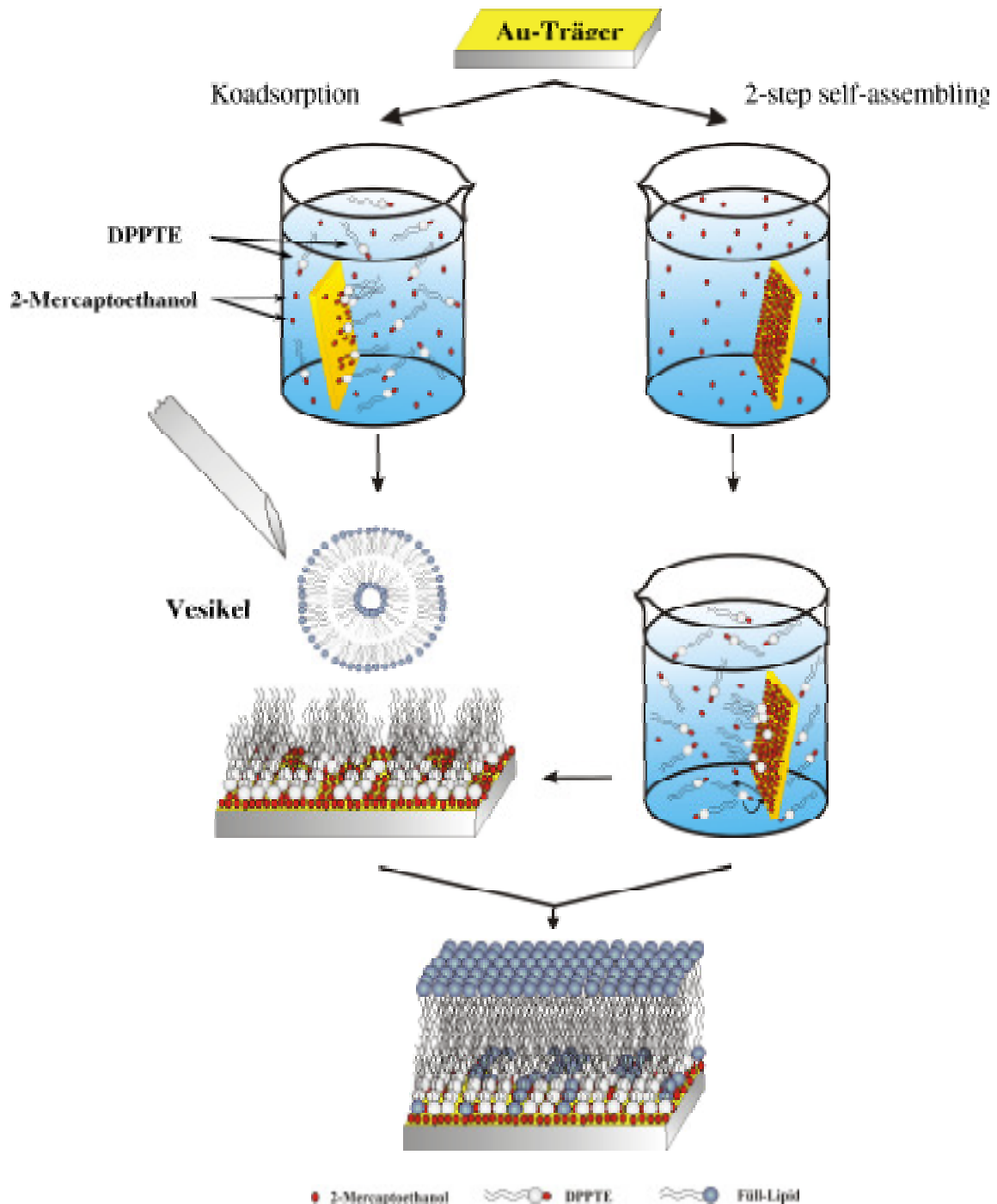


ein Kumulieren der DPPTE-Moleküle auf der Oberfläche zu verhindern. Hierzu muss ein anderer Weg für die laterale Verdünnung der DPPTE-Monolage gefunden werden, als die direkte Vesikelspreitung gemischter Lipide [68]. Hierzu müssen die möglichen Bindungsstellen für das DPPTE auf dem Metallsubstrat (für diese Arbeit wurde ausnahmslos Gold verwendet) verringert werden, umso die Ankerdichte zu limitieren. Durch die Einführung eines lateralen Abstandshalters, der ebenfalls kovalent an das Gold bindet, können so die Bindungsstellen für das DPPTE verringert werden. Das Verdünnermolekül muss auch den Einbau von freien Lipiden in die DPPTE-Schicht ermöglichen, um defektfreie, geschlossene Modellmembranen zu bekommen.

2-Mercaptoethanol [142] wurde in der vorliegenden Arbeit als lateraler Abstandshalter verwendet, da das Thiolipid DPPTE (vgl. Kapitel 1.3.2.1) eine Esterbindung zu einem 2-Mercaptoethanol aufweist. Die freien Lipide können zudem mit ihrer hydrophilen Kopfgruppe mit der OH-Gruppe des 2-Mercaptoethanols wechselwirken, so dass der Einbau dieser Lipide in die Submonoschicht ermöglicht wird. Der Aufbau der binären Submonoschicht kann durch zwei Präparationsmethoden erfolgen (Abb. 3.2), die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden:

1. Durch die **Einschritt-Methode** (*Koadsorption*, Abb. 3.2 A). Hierbei erfolgt in einer einstufigen Präparation der Aufbau der Submonolage durch Selbstorganisation (*self-assembly*) aus einer Mischung aus DPPTE und 2-Mercaptoethanol. Diese Methode stellt den normalerweise üblichen und damit meist gebrauchten Präparationsweg für den Aufbau von binären Thiolschichten dar (vergleiche hierzu auch [142], [143], bzw. bei Alkanthiolen [144], [145]).
2. Durch die **Zwei-Schritt-Methode** (*2-step self-assembly*, Abb. 3.2 B). Hierbei erfolgt zunächst der Aufbau einer monomolekularen Thiolschicht durch die Chemisorption von 2-Mercaptoethanol. In einem sich anschließenden zweiten Präparationsschritt erfolgt dann zeitabhängig der Austausch des 2-Mercaptoethanols gegen das DPPTE. Diese Präparationstechnik wurde für den Aufbau von Modellmembranen bisher noch nicht genutzt und wird daher hier erstmals für diesen Zweck verwendet. Selbst für den Aufbau von reinen

Alkanthiolschichten [146-148] spielt diese Methode bisher keine große Rolle und wurde deswegen bisher nur wenig charakterisiert.



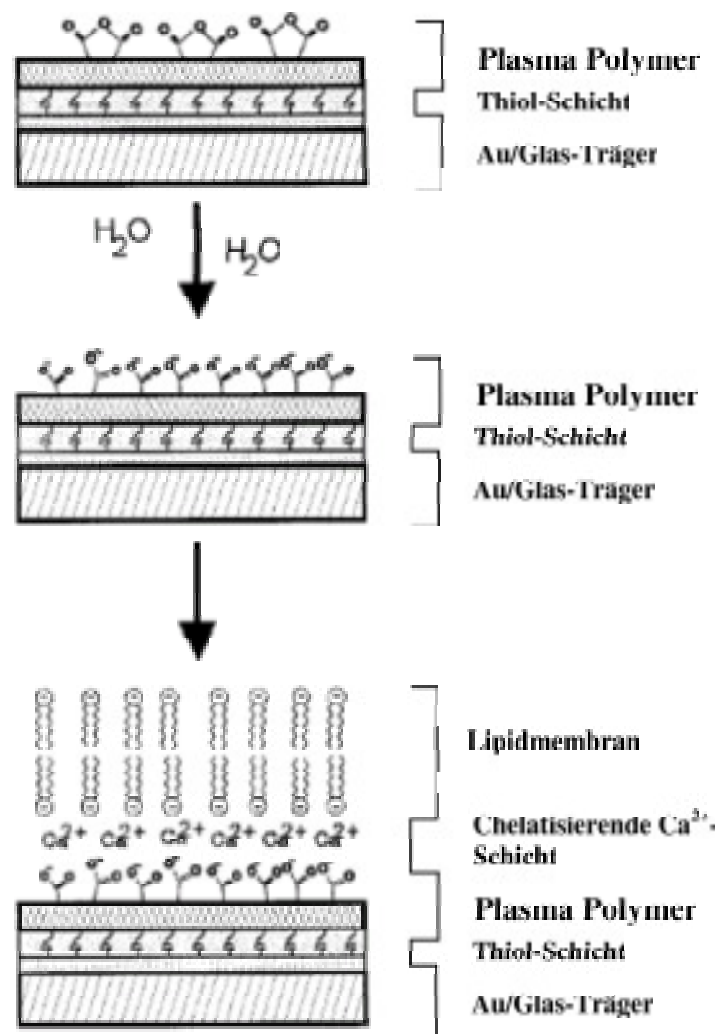
**Abb. 3.2:** Schematischer Aufbau der auf DPPTE und 2-Mercaptoethanol beruhenden Modellmembran. Der Aufbau der Submonoschicht kann durch Koadsorption (links) oder durch eine zweistufige Präparationstechnik (*2-step self-assembly*) erfolgen. Anschließend erfolgt die Komplettierung der Monoschicht zur Membran mittels Vesikelspreitung.

Beide, in Abb. 3.2 gezeigte Präparationswege werden hinsichtlich der Kontrolle der Ankerdichte des Thiolipids über die Assemblierungszeit untersucht. Die Komplettierung der Submonolage zur Membran erfolgt durch Vesikelspreitung. Die Vesikel bestehen wie bei H. Wider aus den für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Annexin V-Anbindung notwendigen DPhytPS-, bzw. DMPS-Lipiden, gemischt mit DMPC als Verdünnungslipide. Eine Verdünnung der Serin-haltigen Lipide auf einen Anteil von 10 mol% ist aus Stabilitätsgründen der Lipidmembran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffern notwendig [60].

### **3.2 Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützte Modellmembranen (tBLM's)**

Die meisten, bisher entwickelten Modellmembranen besitzen mit einer Schichtdicke von 2-10 nm nur relativ kurze Spacer [69,72,76,77,82,89,149,150], deren Länge meistens nur durch aufwendige Synthesen erhöht werden können. Die Mannigfaltigkeit der Plasmapolymer-Filme im Hinblick auf ihre leicht zu variierende Schichtdicke, die chemische Zusammensetzung, das Quellverhalten und die Anzahl an funktionellen Gruppen (abhängig von den experimentellen Bedingungen: Eingangsleistung, Zusammensetzung des Reaktionsgases, Flussrate des Monomers, Polymerisationszeit (siehe Anhang) prädestinieren diese zur Funktionalisierung von Oberflächen [87], [141]. Aufgrund der guten Quellbarkeit und der leicht zu variierenden Schichtdicke der auf Maleinsäureanhydrid beruhenden Plasmapolymere [141], können diese als Membransupport Reservoirfunktionen auch für sehr große transmembrane Proteine übernehmen. In vorausgegangenen Arbeiten über Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymeren (MAH-PP) wurde zunächst auf die Goldelektrode eine Monoschicht aus Allylmercaptan als Adhäsionsvermittler für das Polymer [141] durch Selbstorganisation (self-assembly) aufgebracht. Nach erfolgter Quellung des Polymers und Hydrolyse der Maleinsäureanhydrid-Gruppen wurden negativ geladene Lipide über chelatisierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die Carboxylgruppen gebunden [87]. Abb. 3.3 verdeutlicht den von *Jenkins et al* [87] verfolgten Weg. Die ausschließliche elektrostatische Anbindung der Lipidmembran über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen birgt gewisse Risiken hinsichtlich der Empfindlichkeit solcher Systeme

gegenüber Elektrolytverschiebungen.  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Stoffe wie EDTA können zur Ablösung der Membran führen [68]. Das bisher auf plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid beruhenden Membranmodell [87] soll dahingehend weiterentwickelt werden, dass eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Zusammensetzung des Elektrolyten besteht, indem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Systems vermieden oder zumindest reduziert werden kann.



**Abb. 3.3:** Schematischer Aufbau einer auf Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymere beruhenden Modellmembran (aus Jenkins et al [87]).

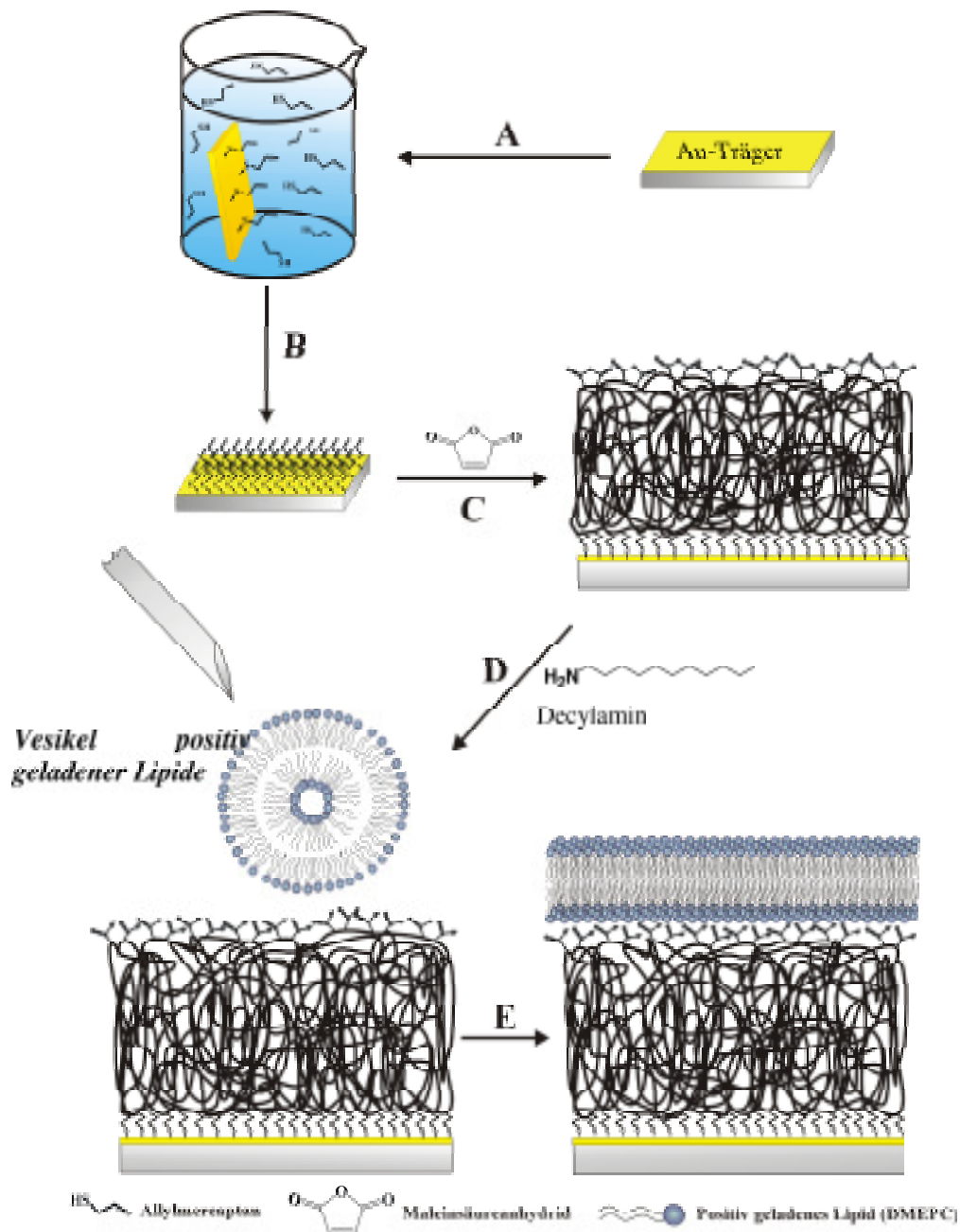
### **3.2.1 Weiterentwicklung der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran**

Zwei verschiedene Wege zur Weiterentwicklung der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen wurden in dieser Arbeit verfolgt:

1. Die direkte elektrostatische Anbindung positiv geladener Lipide an das Polymer
2. Die kovalente Anbindung eines Lipidanalogen an das Polymer, wobei Decylamin zur Reaktion mit den Anhydridgruppen des Polymers gebracht (Aminolyse) wird und so die Submonoschicht der Membran ausgebildet wird.

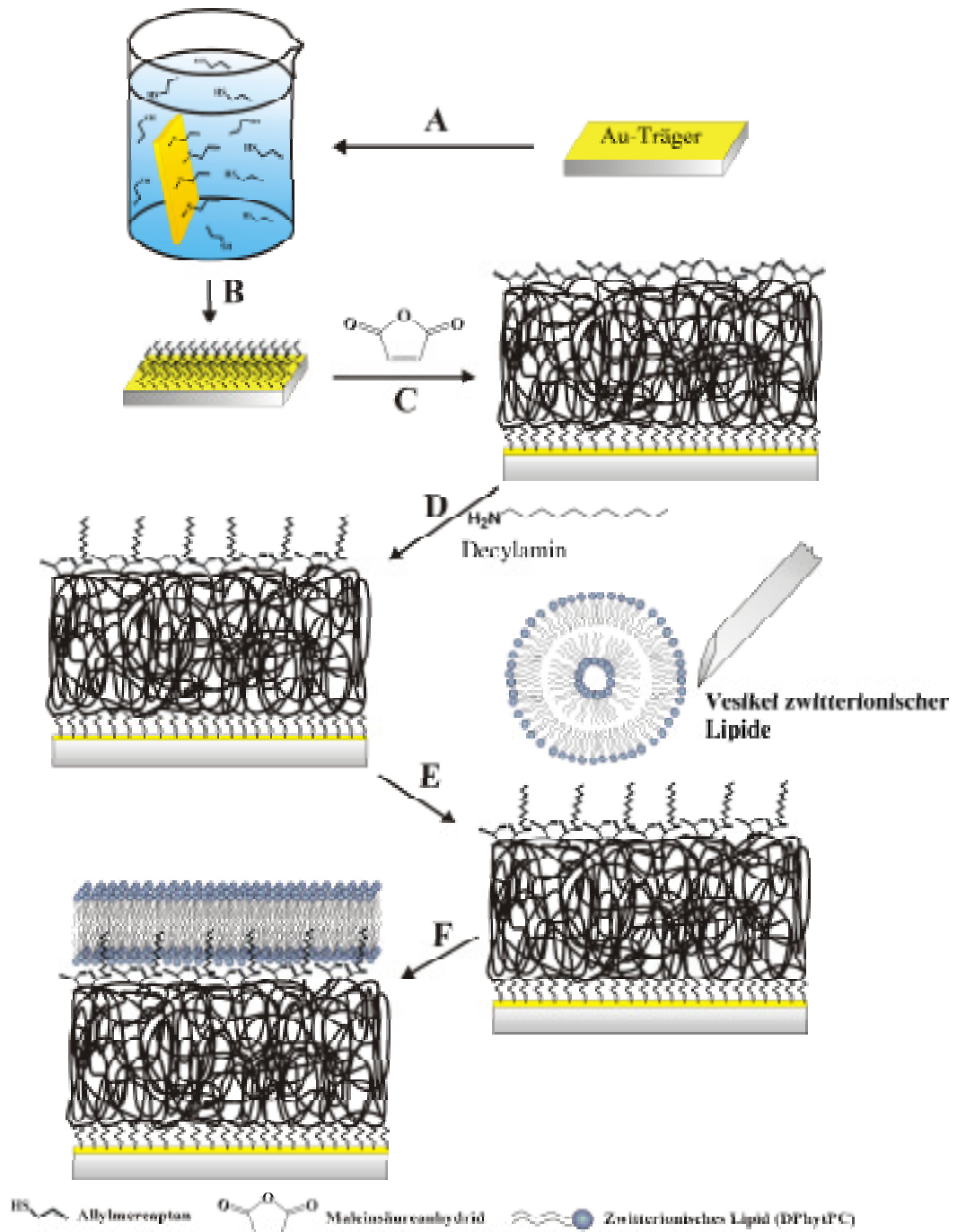
#### **3.2.1.1 Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen**

Analog zu vorausgegangenen Arbeiten [87,141] wird, wie in Abb. 3.4 A u. B dargestellt, zunächst eine Adhäsionsschicht aus Allylmercaptan [141] durch Selbstorganisation (*self-assembly*) auf einem dünnen, thermisch aufgedampften Goldfilm, hergestellt. Auf diese Adhäsionsschicht erfolgt der Aufbau des Maleinsäureanhydrid-Polymerfilms durch Plasmapolymerisation [151], [152] (Abb. 3.4 C), wobei das Plasma gepulst, d.h. ein und aus geschaltet wird, um eine hohe Dichte an Maleinsäureanhydridgruppen zu erhalten [151], [87], [141] (näheres über Plasma und Plasmapolymerisation siehe Anhang). Nach der Polymerisation erfolgt der Aufbau der Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion positiv geladener Lipide (DMEPC, Kapitel 1.3.2.2) in Gegenwart eines leicht alkalischen Puffers (D + E). Der alkalische Puffer hat einerseits die Funktion der Hydrolyse der Maleinsäureanhydridgruppen des Polymers, sowie der anschließenden Deprotonierung der entstandenen Carbonsäurefunktionen.



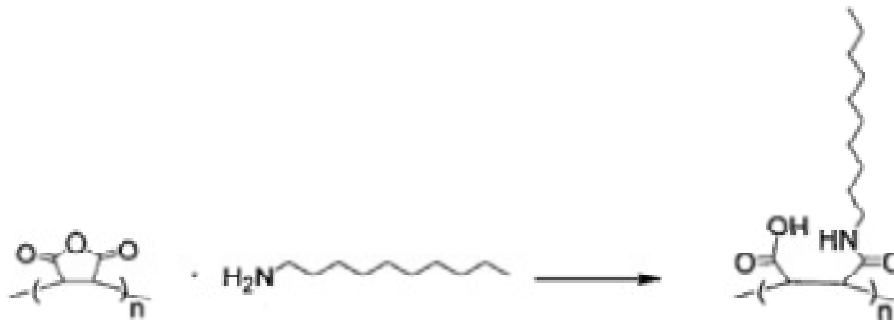
**Abb. 3.4:** Stufenweiser Aufbau der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran. (A + B) Aufbau der Adhäsionsschicht aus Allylmercaptan. (C) Aufbau des Polymerkissens durch Plasmapolymersation und des sich anschließenden Membranaufbaus durch Vesikelfusion **positiv geladener Lipide**.

### 3.2.1.2 Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma- polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen



**Abb. 3.5:** Stufenweiser Aufbau der Decylamin modifizierten Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran. (A + B) Aufbau der Adhäsionsschicht aus Allylmercaptan. (C) Aufbau des Polymerkissens durch Plasmapolymersation, (D) Modifikation mit Decylamin und des sich anschließenden Membranaufbaus durch Vesikelfusion **zwitterionischer Lipide** (E + F).

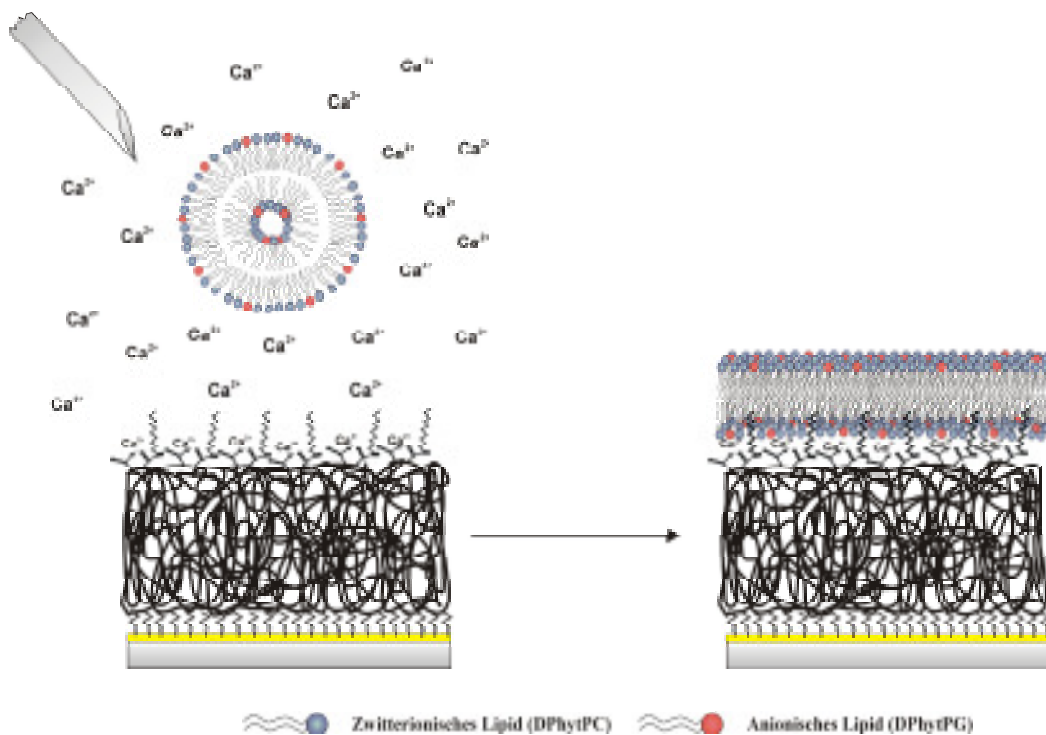
Ein anderer Weg stellt die Herstellung eines „Pseudo-Lipopolymers“ dar. Hierbei wird analog zu dem bereits unter Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Herstellungsverfahren zunächst die Polymerschicht aufgebaut (Abb. 3.5 A-C, siehe oben). In einem weiteren Schritt erfolgt die Aminolyse der Anhydridgruppen mit Decylamin (1-Aminodecan) [141], (Abb. 3.5 D, bzw. Abb. 3.6 aus [141]). Die Alkylketten der oberflächlichen Decylamide übernehmen die Funktion der Lipid-Submonoschicht (= Pseudolipidschicht) der Membran. Anschließend erfolgt durch Spreitung zwitterionischer DPhytPC-Lipide die Komplettierung der Pseudo-Lipidmonoschicht zur Membran (Abb. 3.5 E u. F).



**Abb. 3.6:** Vereinfachte Darstellung der Reaktion zwischen plasmapolymerisiertem Maleinsäureanhydrid und Decylamin (aus [141]).

In einer weiteren Variante werden die beiden oben beschriebenen Prinzipien der kovalenten (Abb. 3.5 u. Abb. 3.6) und der elektrostatischen Anbindung über Ca<sup>2+</sup>-Ionen [87] miteinander kombiniert. Neben den Van-der-Waals-Wechselwirkungen soll durch die zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkungen ein größerer Spreitungsdruck auf die Vesikel ausgeübt werden, was sich positiv in Hinsicht auf die Membranausbildung und –stabilität auswirken soll. Analog des in Abb. 3.5 gezeigten Präparationswegs wird hier ebenfalls ein Decylamin modifiziertes Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer hergestellt. Die Komplettierung der Lipidmembran erfolgt durch Vesikelspreitung zwitterionischer Phospholipide (DPhytPC, Kapitel 1.3.2), gemischt mit anionischen Phospholipiden (DPhytPG, Kapitel 1.3.2) in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer bei pH 8 (Abb. 3.7).





**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung einer auf Decylamin modifiziertem Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer aufgebauten Modellmembran durch die teilweise erfolgende elektrostatische Anbindung von anionischen, freien Lipiden in der Submonoschicht der Lipidmembran.



## 4 Charakterisierungsmethoden

### 4.1 Impedanzspektroskopie (EIS)

Die Impedanzspektroskopie (*Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS*) stellt eine sehr vielseitige und empfindliche Methode zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Materialien verschiedenster Art dar. Dabei können die elektrischen Materialeigenschaften in der Bulkphase oder an der Grenzfläche zu einem elektrischen Leiter (Elektrode) untersucht werden. Hierdurch können Informationen über die Dynamik gebundener oder mobiler Ladungen erhalten werden, die Aufschluss über bestimmte Materialeigenschaften geben. Die zu untersuchenden Materialien können dabei leitend oder nicht leitend sein. Durch die Impedanzspektroskopie lassen sich Informationen über Korrosionsprozesse, der Qualität von Filmüberzügen (*Coatings*), Elektrodenvorgängen z. B. in Batterien, Elektrodeposition und Elektro-Organische Synthese von Materialien und über Halbleiter z. B. in der Photovoltaik gewinnen. In dieser Arbeit findet die Impedanzspektroskopie Anwendung in der Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften der Modellmembranen, um Aussagen über den erfolgenden Architekturaufbau und die Qualität der Membran treffen zu können. Um die Lipidmodellmembranen der Impedanzspektroskopie zugänglich zu machen, müssen sie auf einer Elektrode aufgebaut werden. Elektrodenmaterial ist hier Gold, das thermisch auf einen Glasträger aufgedampft wird. Das Aufbringen der Membran auf eine Elektrode ist ein wichtiger Punkt für die Devicefähigkeit, auch da hierdurch die Lipidmodellmembranen einer Vielzahl von oberflächensensitiven Methoden (SPS, AFM, FRAP, IR, Kontaktwinkel etc., siehe hierzu Unterkapitel in Kap. 4) zugänglich gemacht werden.

### 4.1.1 Die elektrische Doppelschicht

Bringt man eine Elektrode in Kontakt mit einem Elektrolyten, erfolgt eine Aufladung der Elektrodenoberfläche, die durch entgegengesetzte Ladungen im Elektrolyten kompensiert werden. Hierdurch kommt es zur Ausprägung einer *elektrischen Doppelschicht* entgegengesetzter Ladungen an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt. Ladungsträger können hier freie Elektronen, Ionen oder polarisierte Atome, sowie Dipole sein. Ob die Ladungen an der Elektrode positiv oder negativ sind, hängt stark vom Elektrodenmaterial, dem Elektrolyten und dem herrschenden Potential an der Grenzfläche ab.

Das einfachste Modell der elektrischen Doppelschicht stellt das **Modell von Helmholtz** dar. Hierbei wird von einer Neutralisation der Ladungen an der Elektrodenoberfläche durch eine starre, monomolekulare Schicht gegensätzlicher Ladungen ausgegangen (Abb. 4.1a), was zu der Bezeichnung *Doppelschicht* führte. Dabei fällt das Potential  $\Phi$  über diese starre Schicht linear ab (Abb. 4.1b).

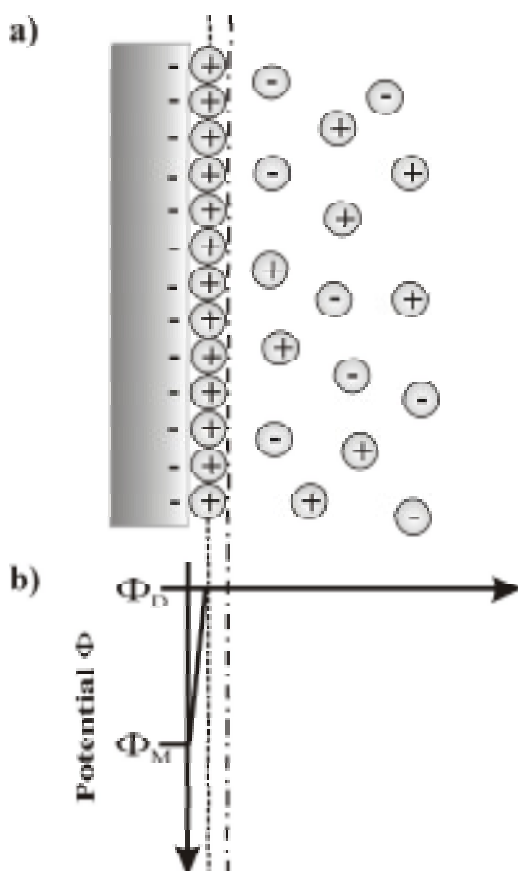


Abb. 4.1: Helmholtzmodell der elektrischen Doppelschicht (a) mit Potentialverlauf  $\Phi$  (b) senkrecht zur Elektrodenoberfläche (wobei  $\Phi_M$  gleich dem Potential an der Elektrodenoberfläche zur starren Schicht der Gegenionen und  $\Phi_D$  das des Dielektrikums in der Bulkphase (Elektrolyt z. B.) ist. --- stellt die inner Helmholtzschicht (IHP) und - - - - die Grenze zur Bulkphase dar.

Betrachtet man dieses System genauer, so fällt auf, dass sich die Grenzflächen wie ein Plattenkondensator verhalten müssten, d. h. es kommt zur Ladungsseparierung. Für die Grenzfläche im Gleichgewicht kann man dann folgende Gleichung formulieren (Gl. 4-35):

$$C_d = \frac{Q}{E} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_D A}{d} \quad \text{Gl. 4-1}$$

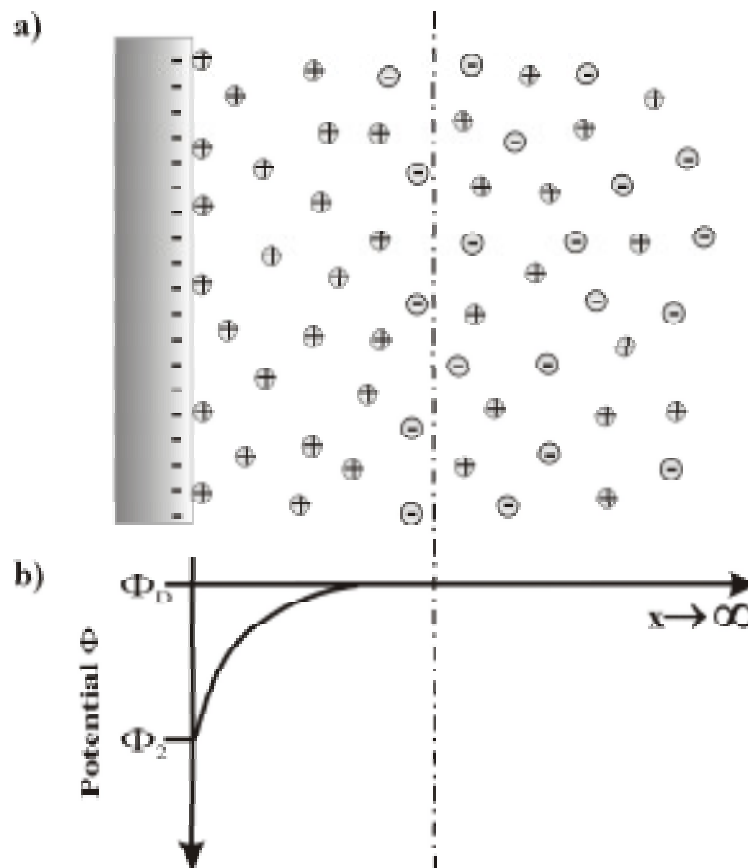
mit

- $C_d$  = Kapazität (in Farad, F)
- $Q$  = Ladungen (in Coulomb, C)
- $E$  = Spannung (in Volt, V)
- $\epsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante im Vakuum  $8,854 \cdot 10^{-12} [\text{C}^2 \text{J}^{-1} \text{m}^{-1}]$
- $\epsilon_D$  = relative Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums
- $A$  = Fläche der Kondensatorplatten, bzw. der Elektrode
- $d$  = Dicke des Dielektrikums

Die Anzahl der Ladungen an der Metallelektrode  $Q_M$  ist in dieser Betrachtung gleich der Anzahl der Ladungen im Elektrolyten  $Q_S$  ( $-Q_M = Q_S$ ). Für die Kapazität  $C_d$  der elektrischen Doppelschicht findet man üblicherweise Werte zwischen 10 und 40  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  [153] (für Goldelektroden  $\sim 30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) in Abhängigkeit des Potentials. Aus Gl. 3-45 wird deutlich, dass der Wert für  $C_d$  konstant sein müsste.  $C_d$  ist jedoch abhängig vom angelegten Potential und der Konzentration des Elektrolyten, was eine Abhängigkeit von  $\epsilon$  oder  $d$  suggeriert. Hiermit wird auch die Schwachstelle dieses Modells deutlich.

**Gouy und Chapman** erkannten, dass die Ladungen in einem Elektrolyten frei beweglich sind und thermischen Bewegungen unterliegen, und dass es zwar an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt zu einer elektrostatischen Interaktion zwischen den Ladungen auf der Elektrodenoberfläche und den gegensätzlichen Ladungen im Elektrolyten kommt, jedoch die gegensätzlichen Ladungen der Grenzfläche frei gegen die aus der Bulkphase des Elektrolyten austauschbar sind, d. h. es gibt keine starre Fixierung von Ladungsträgern an der Grenzfläche. Durch die elektrostatische Anziehungskraft ergibt sich eine diffuse Ladungsverteilung in der Nähe der Elektrode, wobei die Konzentration der Gegenionen an der Elektrodenoberfläche am größten ist und progressiv in den Elektrolyten abnimmt, bis

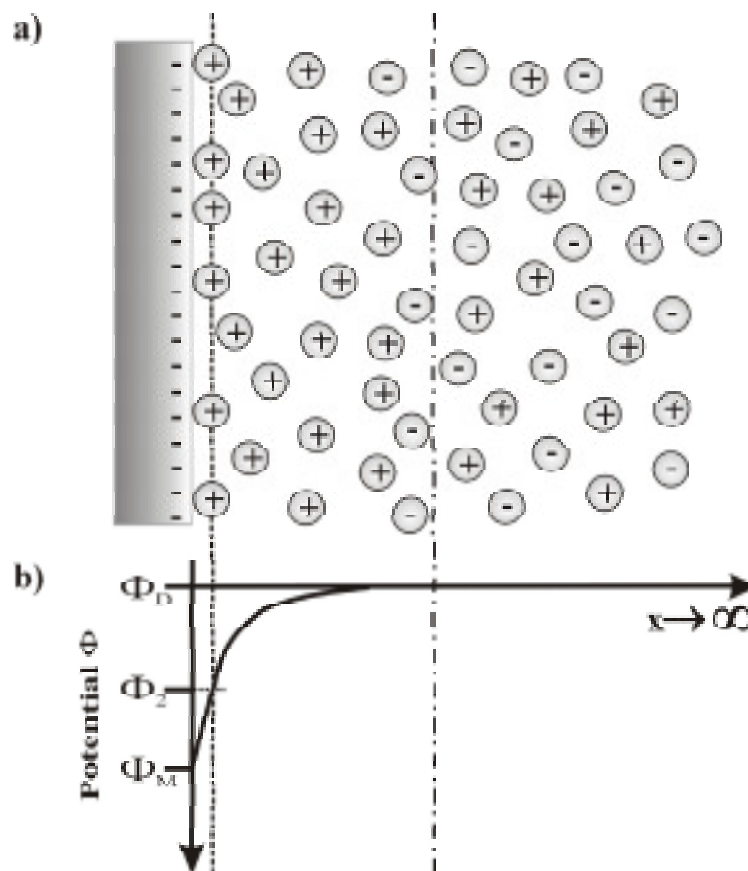
Neutralität in der Bulkphase des Elektrolyten herrscht (Abb. 4.2a) (*engl. Electrostatic Theory*). Das Potential nimmt ebenfalls progressiv in den Elektrolyten ab (Abb. 4.2b). Hieraus lässt sich zwar die Abhängigkeit  $C_d$  von dem Potential und der Konzentration erklären, d. h.  $C_d$  steigt mit zunehmendem Potential und zunehmender Konzentration, jedoch gilt dieses Modell nur für kleine Potentiale und niedrige Konzentrationen.



**Abb. 4.2:** Gouy-Chapman-Modell der elektrischen Doppelschicht (a) mit Potentialverlauf  $\Phi$  (b) senkrecht zur Elektrodenoberfläche (wobei  $\Phi_2$  gleich dem Potential an der Elektrodenoberfläche zur diffusen Schicht der Gegenionen und  $\Phi_1$  das des Dielektrikums in der Bulkphase (z. B. Elektrolyt) ist. - - - - stellt die Grenze zur Bulkphase dar.

Die Theorie von Gouy and Chapman vernachlässigt völlig den Ionenradius, da sie Ladungen wie Punktladungen behandelt, die sich der Elektrode beliebig weit annähern können. **Stern** berücksichtigte die Ionengröße in der Weise, dass sich die Ionen eines

Elektrolyten nur bis zu einem bestimmten Abstand der Elektrode nähern können (*plane of the closest approach*). Die Basis des **Stern'schen Modells** bildet jedoch die Kombination aus Helmholtz- und Gouy-Chapman-Modell, d. h. dass an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt eine starre Schicht gegensätzlicher Ladungen besteht (Helmholtz-Modell), gefolgt von einer diffusen Schicht von Gegenionen (Gouy-Chapman-Modell) (Abb. 4.3a). Dabei fällt das Potential zunächst linear über die starre Schicht auf einen bestimmten Wert ab und dann in der diffusen Schicht exponentiell auf 0 (Abb. 4.3b).



**Abb. 4.3:** Stern-Modell der elektrischen Doppelschicht (a) mit Potentialverlauf  $\Phi$  (b) senkrecht zur Elektrodenoberfläche (wobei  $\Phi_M$  gleich dem Potential an der Elektrodenoberfläche zur diffusen Schicht der Gegenionen,  $\Phi_2$  das zur Grenzfläche der diffusen Schicht und  $\Phi_D$  das des Dielektrikums in der Bulkphase (z. B. Elektrolyt) ist. ---- stellt die innere Helmholtzschicht (IHP) dar und - - - - - trennt die diffuse Schicht von der Bulkphase ab.

Für die Kapazität  $C_d$  der elektrischen Doppelschicht gilt dann Gl. 4-2:

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad \text{Gl. 4-2}$$

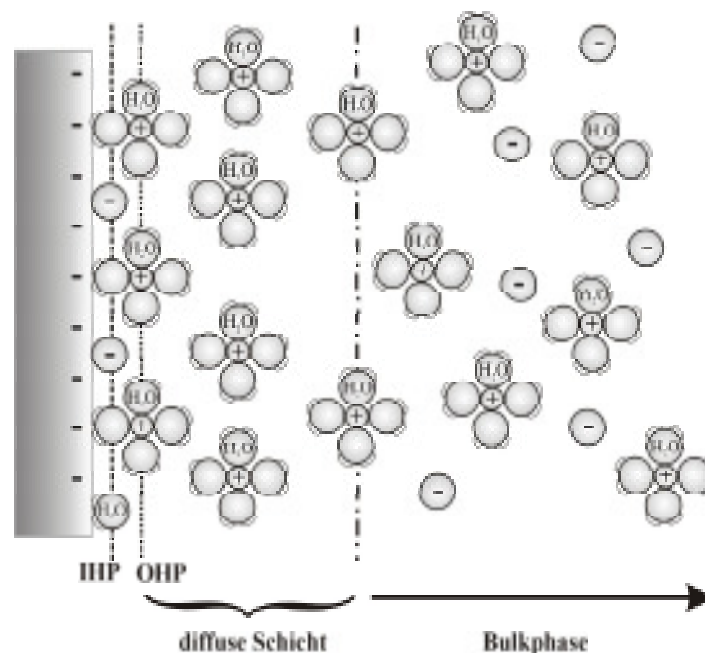
Wobei  $C_H$  die Kapazität an der äußeren Helmholtzschicht ist und  $C_D$  die Kapazität der diffusen Schicht darstellt. Aus Gl. 4-2 geht hervor, dass die einzelnen Kapazitäten in Serie sind und die Gesamtkapazität der elektrischen Doppelschicht von der kleinsten Einzelkapazität beherrscht wird.

**Grahame** erkannte, dass es zwei Ebenen der maximalen Annäherung von Gegenionen an die Elektrode geben muss (*two planes of closest approach*): Eine Ebene für spezifisch adsorbierte Ionen (*innere Helmholtz-Schicht, engl. inner Helmholtz plane (IHP)*) und eine für unspezifisch adsorbierte Ionen (*äußere Helmholtz-Schicht, engl. outer Helmholtz plane (OHP)*). Die solvatisierten Ionen des OHP können sich dabei der Elektrode nur so weit nähern, wie es der Durchmesser der Solvathülle erlaubt. Die Interaktion der Ladungen des OHP mit der Elektrode ist unabhängig von den chemischen Eigenschaften. An den OHP schließt sich die diffuse Schicht an, die bis zur Bulkphase des Elektrolyten reicht (Abb. 4.4). Die Ladungsdichte  $\sigma_D$  an der elektrischen Doppelschicht im Elektrolyten ist durch Gl. 4-3 gegeben:

$$\sigma_D = \sigma_i + \sigma_d = -\sigma_M \quad \text{Gl. 4-3}$$

$\sigma_i$  [ $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ] stellt hierbei die Ladungsdichte der spezifisch adsorbierten Ladungsträger des IHP dar.  $\sigma_d$  gibt die Ladungsdichte der diffusen Schicht an, die hier jedoch von der OHP bis in die Bulkphase reicht.  $\sigma_M$  ist die Ladungsdichte an der Elektrodenoberfläche. Die Dicke der diffusen Schicht hängt von der gesamten Ionenkonzentration in Lösung ab. Für Konzentrationen größer  $10^{-2}$  M beträgt die Dicke weniger als  $\sim 100 \text{ \AA}$  [153].



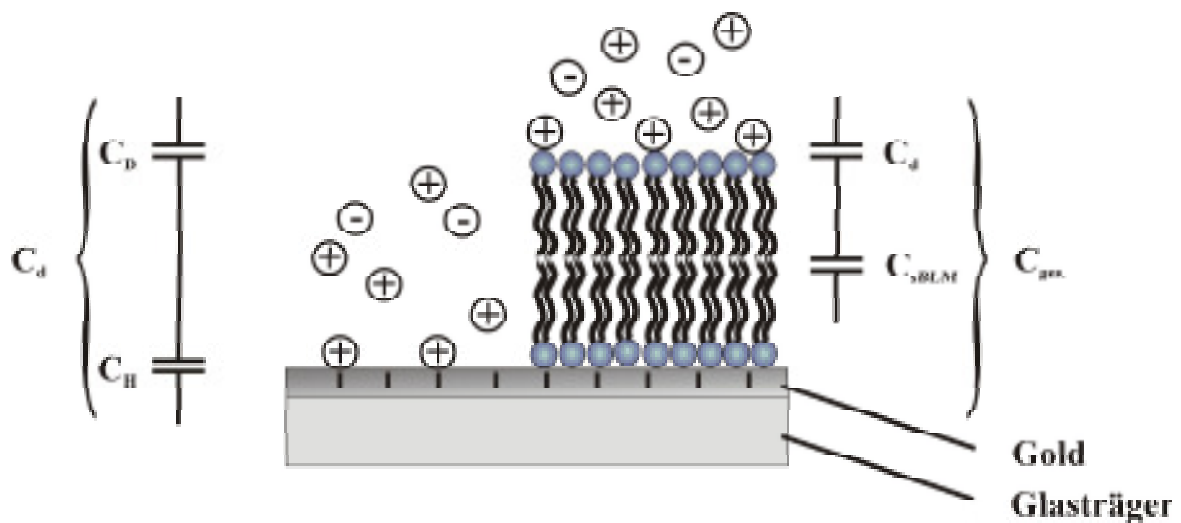


**Abb. 4.4:** Grahame-Modell der elektrischen Doppelschicht. Die an der Elektrodenoberfläche spezifisch adsorbierte Spezies bilden die innere Helmholtzschicht (IHP) und unspezifisch adsorbierte Spezies bilden die äußere Helmholtzschicht (OHP); daran schließt sich die diffuse Schicht und die Bulkphase an.

Gegenwärtig wird versucht, die Struktur der elektrischen Doppelschicht in Abhängigkeit von beeinflussenden Faktoren, wie z. B. der Adsorption von organischen Materialien an der Elektrode oder dem Einfluss des Lösungsmittels zu klären, da die Struktur der elektrischen Doppelschicht die Vorgänge an der Elektrode stark beeinflusst, besonders, wenn ein Elektronentransfer stattfindet [154]. Die Rate der Elektrodenprozesse kann durch die Struktur der elektrischen Doppelschicht beeinflusst werden, z. B. wenn eine elektrochemisch aktive Substanz an der Elektrode nur unspezifisch adsorbiert wird, d. h. sie sich der Elektrode nur bis zum OHP nähern kann, wird sie auch nur ein geringeres Potential als das tatsächlich angelegte erfahren. Das erfahrene Potential reduziert sich um den Potentialabfall über die diffuse Schicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Goldelektroden zum Aufbau der Lipidmodellmembranen benutzt. Eine reine, unbedeckte Goldelektrode bildet in einer Elektrolytlösung, wie oben beschrieben, eine dielektrische Doppelschicht aus, deren Kapazität ungefähr  $30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  beträgt. Durch den Aufbau der Modellmembranen wird die

Goldelektrode mit einer dünnen isolierenden, dielektrischen Schicht bedeckt. Hieraus resultiert eine kleine Kapazität für diese Schicht, die in Serie mit der Kapazität der elektrischen Doppelschicht steht. Die Kapazität der elektrischen Doppelschicht ist im Allgemeinen sehr groß, wo hingegen die Kapazität der aufgetragenen dielektrischen Schicht im Fall einer Lipidmembran (Abb. 4.5) mit  $\sim 0,5\text{--}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  verhältnismäßig klein ausfällt. Gemäß Gl. 4-2 fällt die Kapazität der elektrischen Doppelschicht in einer solchen Serienschaltung nicht ins Gewicht.



**Abb. 4.5:** Einfluss einer adsorbierten Lipidmembran auf die Gesamtkapazität.  $C_d$  ist die Kapazität der elektrischen Doppelschicht,  $C_D$  die der diffusen Schicht,  $C_H$  die der Helmholtz-Schicht,  $C_{SBLM}$  die der adsorbierten Lipidmembran und  $C_{ges}$  die Kapazität des gesamten Systems.

#### 4.1.2 Grundlagen der Impedanzspektroskopie (EIS)

Als **Impedanz** bezeichnet man auch den *Wechselstromwiderstand*. Die Gesamtimpedanz eines Systems setzt sich dabei aus den ohmschen Widerständen und den Widerständen der Kondensatoren und Spulen eines Systems zusammen, wobei der ohmsche Widerstand die reale Komponente und die Widerstände von Kondensatoren und Spulen den imaginären Teil der Impedanz bilden.

Bei der **Impedanzspektroskopie (EIS)** stört man das zu untersuchende System durch Anlegen einer Wechselspannung ( $E(t)$ ) mit einer sehr kleinen Amplitude (5-10 mV), wobei

man die Frequenz der angelegten Spannung moduliert. Dadurch wird die Gleichgewichtslage eines Systems gestört und die daraus resultierende Stromantwort des Systems auf diese Störung frequenzabhängig aufgezeichnet.

Zum besseren Verständnis der EIS wird hier zunächst auf die Wechselstromtheorie eingegangen.

Eine reine sinusoidale Wechselspannung ( $E(t)$ ) kann wie in Gl. 4-4 ausgedrückt werden, wobei sich die Wechselspannung zeitabhängig ( $t$ ) periodisch ändert.

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad \text{Gl. 4-4}$$

Hierbei stellt  $\omega$  die Kreisfrequenz ( $\omega = 2\pi f$ , wobei  $f$  die Frequenz in Hertz ist) und  $E_0$  die Amplitude der angelegten Spannung dar. Abb. 4.6 Veranschaulicht graphisch den zeitlichen Verlauf der Wechselspannung.

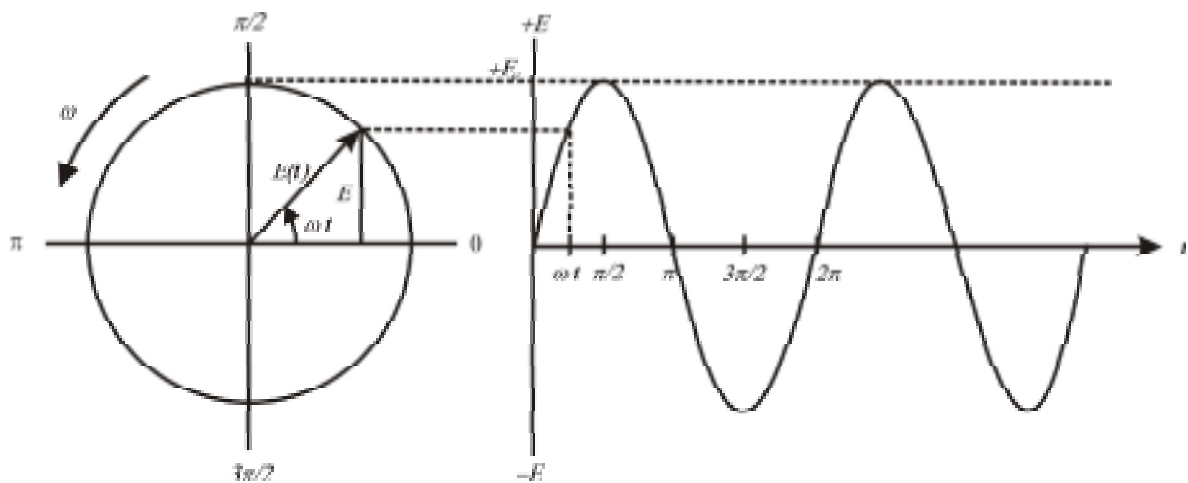


Abb. 4.6: Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung.

Die daraus resultierende Stromantwort ( $I(t)$ ) zeigt in den meisten Fällen eine Verschiebung des Phasenwinkels und eine andere Amplitude im Vergleich zu der angelegten Spannung.

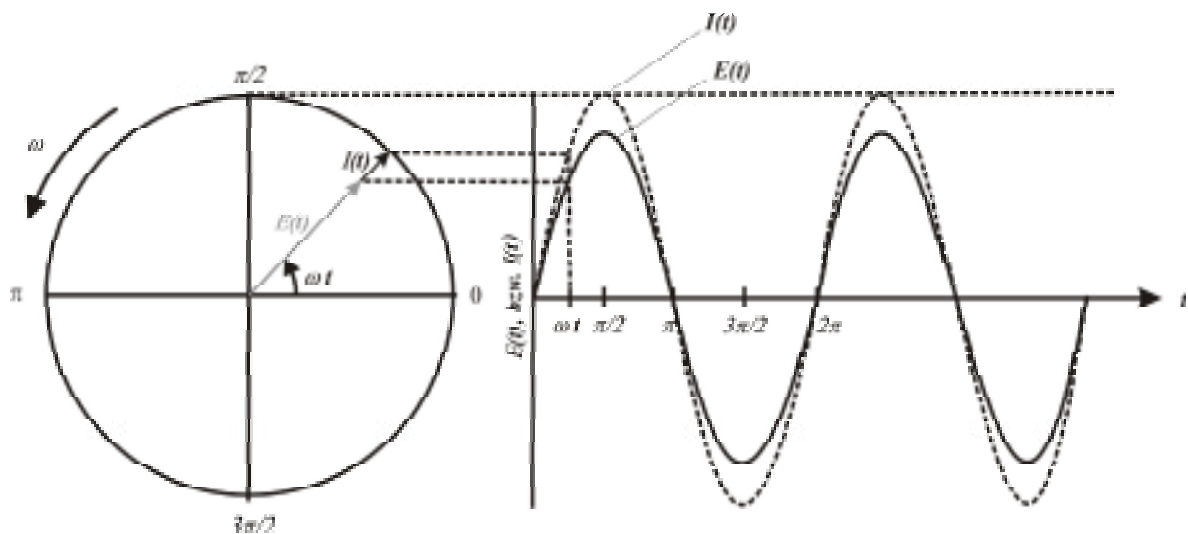
Daraus ergibt sich für die Stromantwort Gl. 4-5, wobei  $\Phi$  der Phasenwinkel ist, um dessen Wert die Stromantwort gegen den Phasenwinkel der Spannung verschoben ist.

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi) \quad \text{Gl. 4-5}$$

Wird eine Wechselspannung (Gl. 4-4) an einen reinen ohmschen Widerstand angelegt, so ergibt sich für die Stromantwort nach dem Ohmschen Gesetz Gl. 4-6,

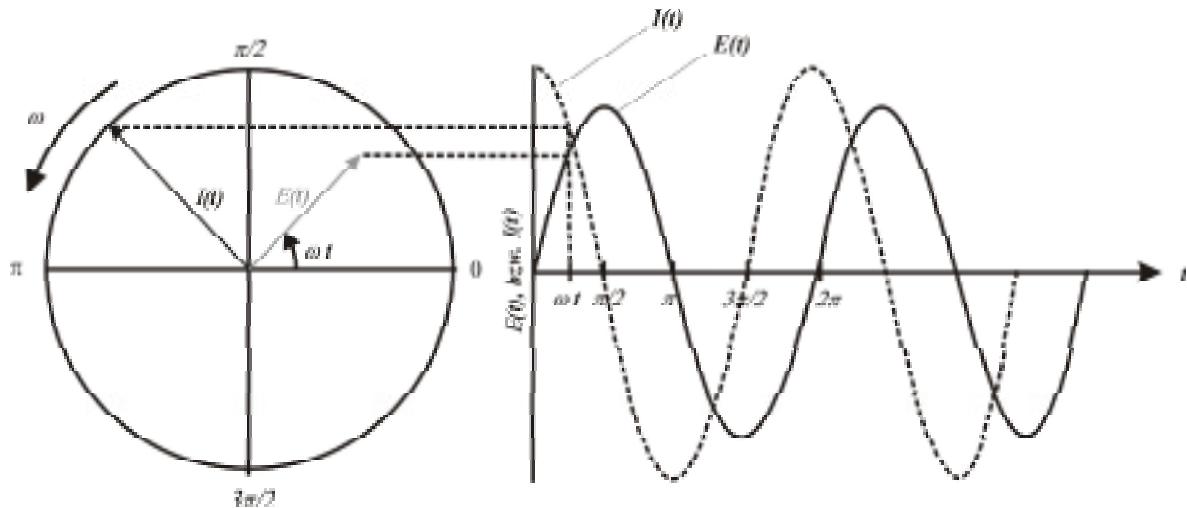
$$I(t) = (E / R) \sin \omega t \quad \text{Gl. 4-6}$$

Wobei  $R$  der Widerstand ist. Hieraus wird ersichtlich, dass die Stromantwort für einen reinen ohmschen Widerstand keine Verschiebung im Phasenwinkel zeigt (Abb. 4.7). Der Phasenwinkel  $\Phi$  ist also 0.



**Abb. 4.7:** Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung und entsprechender Stromantwort an einem ohmschen Widerstand. Die Stromantwort zeigt keine Verschiebung im Phasenwinkel, lediglich die Amplitude ist eine andere.

Durch Anlegen einer Wechselspannung an einen reinen Kondensator beobachtet man eine Verschiebung des Phasenwinkels. Die resultierende Stromantwort ist um  $90^\circ$  im Phasenwinkel verschoben, wobei die Spannung dem Strom hinterherläuft (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8** Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung und entsprechender Stromantwort an einem reinen Kondensator. Die Stromantwort zeigt eine Verschiebung des Phasenwinkels um  $90^\circ$ .

Mathematisch muss hier der Begriff der Kapazität  $C$  (Gl. 4-1) erneut aufgegriffen werden. Durch Umformung von Gl. 4-1 erhält man für die Ladung  $Q$  an den Platten eines Kondensators  $Q = CE$ . Durch Differenzierung ergibt sich die resultierende Stromantwort  $I(t)$  (Gl. 4-7).

$$I(t) = \frac{dQ}{dt} = C \frac{dE}{dt} \quad \text{Gl. 4-7}$$

Durch Einbeziehen der Gl. 4-4 resultiert Gl. 4-8:

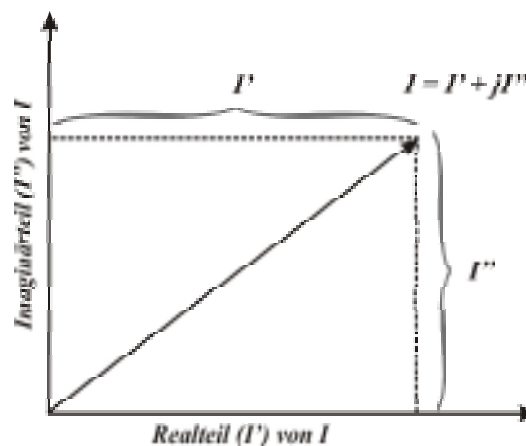
$$I(t) = \omega C E_0 \cos \omega t \quad \text{Gl. 4-8}$$

Für den Term  $1/\omega C$  kann auch der kapazitive Blindwiderstand (*capacitive reactance*)  $X_C$  eingeführt werden. Daraus folgt, bei Anwendung des Ohmschen Gesetzes Gl. 4-9, wobei  $R$  gegen  $X_C$  ausgetauscht wurde und der Phasenwinkel nicht 0 sondern  $\pi/2$  ist.

$$I(t) = \frac{E_0}{X_C} \sin(\omega t + \pi/2) \quad \text{Gl. 4-9}$$

Hierbei ist der Phasenwinkel positiv, weswegen die Stromantwort der Spannung vorausleitet. Der Phasenwinkel der Wechselspannung ist demnach negativ, also  $-\pi/2$ .

Eine einfache Methode zur Charakterisierung des Wechselstroms stellt die Vektoranalyse dar (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Vektordarstellung des Wechselstroms hinsichtlich des realen und imaginären Teils.

Durch die komplexe Schreibweise kann der Wechselstrom in einen imaginären und realen Anteil aufgespalten werden. Hierzu muss der Wert der Ordinate mit  $j = \sqrt{-1}$  multipliziert werden. Für  $E$  kann an Stelle von Gl. 4-4 unter Berücksichtigung der negativen Verschiebung des Phasenwinkels Gl. 4-10 geschrieben werden.

$$E = -jX_C I(t) \quad \text{Gl. 4-10}$$

In Gl. 4-10 ist wie im Ohmschen Gesetz auch hier ein Ausdruck für den Widerstand enthalten, jedoch als komplexe Zahl  $-jX_C$ . **Der kapazitive Blindwiderstand  $X_C$  ist von dem Reziprokwert der Frequenz und dem Reziprokwert der Kapazität abhängig; er wird ebenfalls in der Einheit Ohm angegeben.**

Für einen Widerstand (R) und einen Kondensator (C) in Serie kann die Gesamtspannung mit Gl. 4-11 angegeben werden.

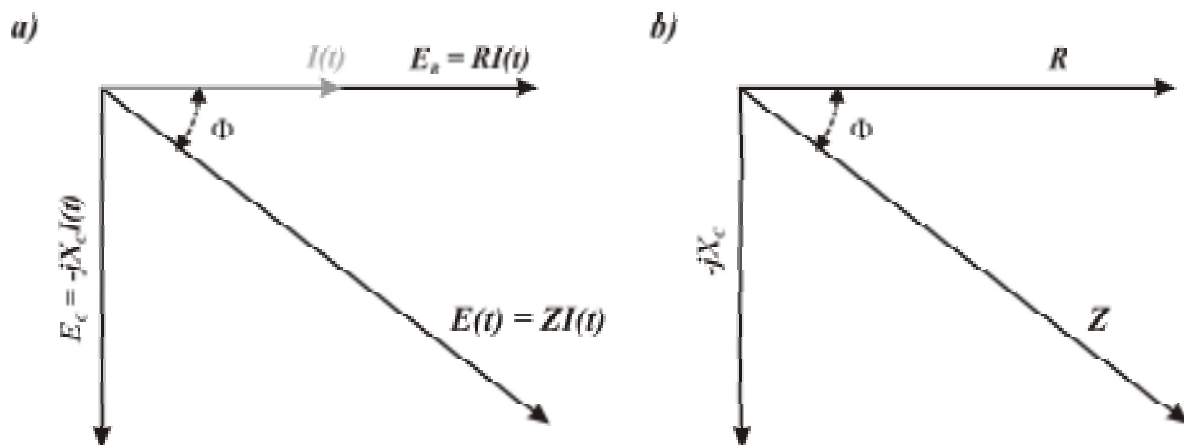
$$E = E_R + E_C \quad \text{Gl. 4-11}$$

$$E = I(t)(R - jX_C)$$

Der Term  $(R - jX_C)$  stellt die *Impedanz Z* dar. Hieraus ergibt sich Gl. 4-12.

$$E = I(t)Z \quad \text{Gl. 4-12}$$

Abb. 4.10 gibt den Zusammenhang zwischen Wechselspannung und Strom für einen Widerstand in Serie mit einem Kondensator (RC-Glied) wieder.



**Abb. 4.10:** Vektordarstellung. (a) Verhältnis zwischen Strom und Spannung für ein RC-Glied in Serie.  $E(t)$  ist die Spannung, die durch das gesamte RC-Glied läuft,  $E_R$  und  $E_C$  stellen die Komponenten von  $E(t)$  dar, die jeweils über den Widerstand und den Kondensator laufen. Hieraus resultiert die Impedanz (gezeigt in (b)).

Im Allgemeinen kann die Impedanz durch Gl. 4-13 ausgedrückt werden.

$$Z(\omega) = Z_{Re} - jZ_{Im} \quad \text{Gl. 4-13}$$

$Z_{Re}$  ( $Z'$ ) und  $Z_{Im}$  ( $Z''$ ) stellen den realen und den imaginären Teil der Impedanz  $Z(\omega)$  in Abhängigkeit der Frequenz dar. Für die beiden Teile  $Z_{Re}$  und  $Z_{Im}$  kann auch  $Z_{Re} = R$  und  $Z_{Im} = X_C = 1/\omega C$  geschrieben werden. Für den Betrag der Impedanz  $Z$  ( $|Z|$ ) kann dann Gl. 4-14 formuliert werden.

$$|Z|^2 = R^2 + X_C^2 = (Z_{Re})^2 + (Z_{Im})^2 \quad \text{Gl. 4-14}$$

Für den Phasenwinkel  $\Phi$  gilt dann Gl. 4-15.

$$\tan \Phi = \frac{Z_{Im}}{Z_{Re}} = \frac{X_C}{R} = \frac{1}{\omega RC} \quad \text{Gl. 4-15}$$

Aus Gl. 4-15 wird ersichtlich, dass der Phasenwinkel ein Indikator für den ohmschen und kapazitiven Anteil eines Systems ist. Es wird deutlich, dass der Phasenwinkel nur für reine ohmsche Systeme 0, bzw. für reine kapazitive Systeme  $\pi/2$  sein kann. **Für eine Überlappung der beiden System können dann Phasenwinkel zwischen 0 und  $\pi/2$  auftreten**, wobei der Phasenwinkel dann von den Eigenschaften des ohmschen und des kapazitiven Anteils abhängt.

Die Zeit, die ein System nach Anregung braucht, um in seine Gleichgewichtslage zurückzukehren, wird als dielektrische Relaxationszeit, bzw. Zeitkonstante  $\tau$  bezeichnet. Für sie gilt Gl. 4-16.

$$\tau = R \cdot C \quad \text{Gl. 4-16}$$

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Darstellungsarten der Impedanzspektren vorgestellt und ihr Erscheinungsbild anhand von Ersatzschaltkreisen verdeutlicht.



### 4.1.3 Ersatzschaltkreise und Impedanzspektren (Grundlagen)

In der Impedanzspektroskopie ist die Änderung der Impedanz durch Variation des Frequenzbereichs von analytischem Interesse. Dabei wird die Amplitude der angelegten Spannung konstant gehalten. *Für die Auswertung der Impedanzspektroskopie werden elektrische Ersatzschaltkreise zu Grunde gelegt, die den physikalischen Gegebenheiten des zu analysierenden Systems entsprechen.*

Für die Darstellung der aus der Impedanzspektroskopie resultierenden Daten bieten sich die nachfolgend erläuterten Diagramme (Bode-Plot, frequenzreduzierte Admittanz und Nyquist-Plot) an.

#### 4.1.3.1 Bode-Plot

Für die Darstellung im Bode-Plot (siehe nachfolgende Erläuterung) wird der logarithmische Betrag der Impedanz  $|Z|$  und der Phasenwinkel  $\Phi$  (y-Achse) gegen den logarithmischen Betrag der Frequenz (x-Achse) aufgetragen. Durch die Beobachtung des Phasenwinkels können Aussagen über den kapazitiven und ohmschen Anteil eines Systems getroffen werden. Ist der Phasenwinkel 0 und ändert sich dieser mit der Frequenz auch nicht, so liegt ein rein ohmsches System vor. Bei einem reinen kapazitiven System beträgt der Phasenwinkel über den gesamten gemessenen Frequenzbereich  $-90^\circ$  ( $-2/\pi$ ). Für gemischte Systeme, bestehend aus ohmschen Widerstand und Kondensator sind die Verhältnisse etwas komplizierter, da es frequenzabhängig zu Überlagerungen der ohmschen und kapazitiven Effekte kommen kann. Nachfolgend werden verschiedene Schaltkreise erläutert.

#### A) Ohmscher Widerstand (R):

Der Betrag der Impedanz  $|Z|$  eines reinen ohmschen Systems ist gleich dem ohmschen Widerstand dieses Systems, d.h. die Impedanz  $|Z|$  entspricht dem Realteil der Impedanz. Mathematisch lässt sich dies durch Gl. 4-17 und Gl. 4-18 ausdrücken.

$$E = E_R \quad \text{Gl. 4-17}$$

$$|Z| = \frac{E}{I} = Z' = R \quad \text{Gl. 4-18}$$

Der in Abb. 4.11 gezeigte Verlauf des Phasenwinkels und der Impedanz  $|Z|$  zeigt keine Änderung über den gesamten gemessenen Frequenzbereich. Der Phasenwinkel ist bei allen Frequenzen  $0^\circ$  und die Impedanz bei allen Frequenzen  $1\text{M}\Omega$ . Die Unabhängigkeit des Systems von der Frequenz (siehe auch Gl. 4-18) bedeutet, dass es sich um ein reines ohmsches System handeln muss.

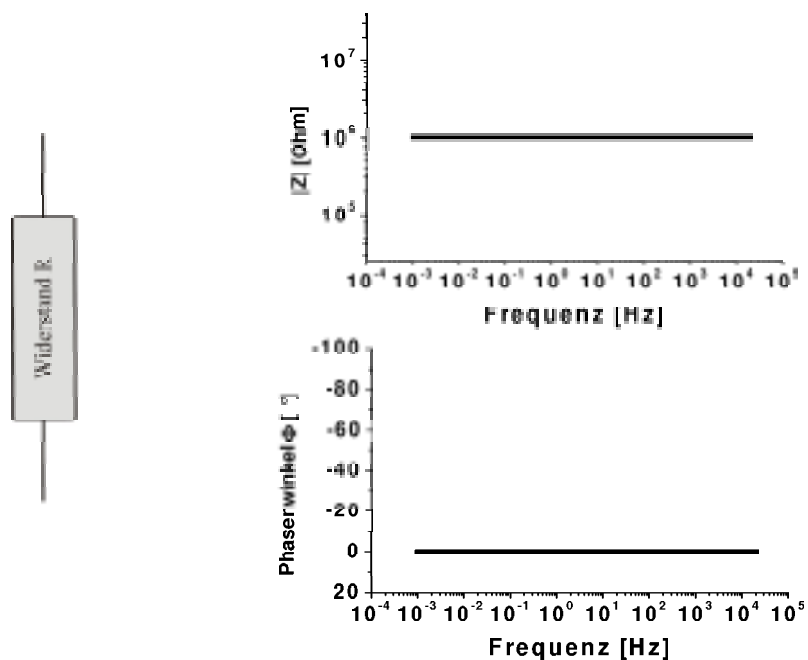


Abb. 4.11: Bode-Plot für einen ohmschen Widerstand von  $R = 1\text{M}\Omega$ .

### B) Kondensator (C):

Der frequenzabhängige Betrag der Impedanz  $|Z|$  eines reinen kapazitiven Systems ist gleich dem frequenzabhängigen Betrag der Kapazität dieses Systems, d.h. gleich dem imaginären

Anteil bei gleicher Frequenz. Mathematisch lässt sich dies durch Gl. 4-19 bis Gl. 4-21 ausdrücken.

$$E = E_c = E_0 \cdot \sin \omega t = \frac{Q}{C} \quad \text{Gl. 4-19}$$

$$I = \frac{dQ}{dt} = C \cdot \frac{dE}{dt} = \omega C \cdot E_0 \cdot \cos \omega t \quad \text{Gl. 4-20}$$

$$|Z| = \frac{E}{I} = jZ'' = -\frac{j}{\omega C} \quad \text{Gl. 4-21}$$

Abb. 4.12 zeigt den Verlauf des Phasenwinkels und der Impedanz in Abhängigkeit von der Frequenz. Für ein reines kapazitives System ist zu erwarten, dass sich der Phasenwinkel nicht mit der Frequenz ändert, sondern lediglich die Impedanz. Der Phasenwinkel eines reinen kapazitiven Systems muss also über den gesamten Frequenzbereich  $\pi/2$ , bzw.  $-90^\circ$  betragen. Die Impedanz eines Kondensators nimmt mit Abnahme der Frequenz zu, da der Widerstand eines Kondensators frequenzabhängig ist.

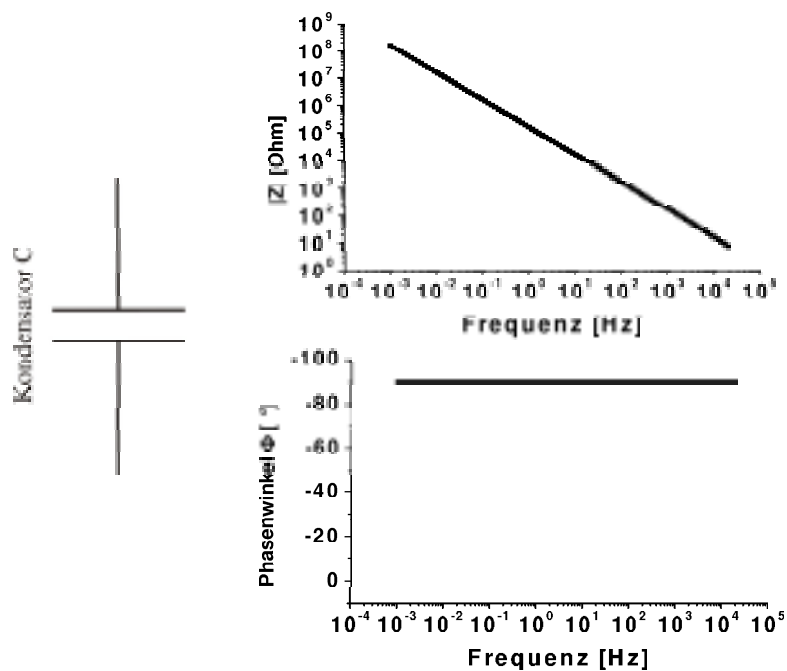


Abb. 4.12: Bode-Plot für einen Kondensator mit einer Kapazität von  $C = 1 \mu\text{F}$ .

**C) Serienschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):**

Für ein System, bestehend aus ohmschen und kapazitiven Anteilen in Serie, stellt der Betrag der Impedanz eine Mischung aus dem frequenzunabhängigen Realteil (ohmscher Widerstand R) und dem frequenzabhängigen Imaginärteil (Kondensator C) dar. Hierzu kann Gl. 4-22 und Gl. 4-23 formuliert werden.

$$E = E_R + E_C \quad \text{Gl. 4-22}$$

$$|Z| = \frac{E}{I} = Z_R + Z_C = Z' + Z'' = R - \frac{j}{\omega C} \quad \text{Gl. 4-23}$$

Der Phasenwinkel und die Impedanz ändern sich in diesem Fall mit der Frequenz (Abb. 4.13). Da die beiden Elemente des Schaltbildes in Serie geschaltet sind, müssen die Ladungen quasi erst durch den Widerstand und dann durch den Kondensator laufen. Deshalb verhält sich ein solches System im hohen Frequenzbereich wie ein ohmscher Widerstand und im niedrigen Frequenzbereich wie ein Kondensator. Für den Phasenwinkel bedeutet das, dass im hohen Frequenzbereich der Phasenwinkel für ein rein ohmsches System angezeigt wird, also  $0^\circ$ , der dann in einem intermediären Frequenzbereich eine Mischung aus typisch ohmschen und kapazitiven Phasenwinkel zeigt, um schließlich im niedrigen Frequenzbereich den typischen Phasenwinkel eines reinen kapazitiven Systems ( $\pi/2$ , bzw.  $-90^\circ$ ) anzunehmen. Der Betrag der Impedanz ändert sich ebenfalls frequenzabhängig. Im hohen Frequenzbereich wird die Impedanz des reinen ohmschen Anteils angezeigt und im niedrigen Frequenzbereich der frequenzabhängige Wert des reinen kapazitiven Anteils. Der intermediäre Bereich stellt eine Überlagerung der kapazitiven und ohmschen Effekte dar.

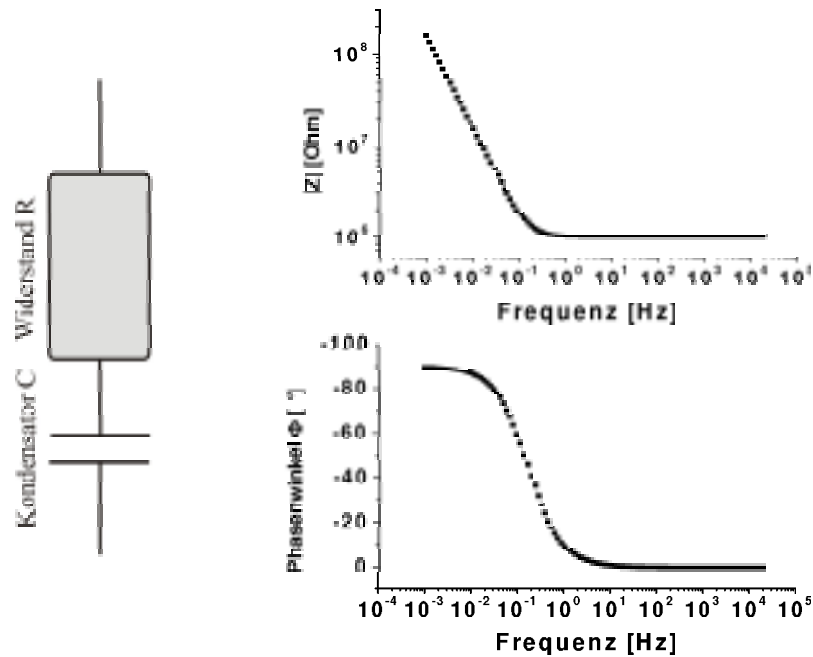


Abb. 4.13: Bode-Plot für einen Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \mu\text{F}$ ) in Serie.

#### D) Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):

Für ein System, bestehend aus ohmschen und kapazitiven Elementen in Parallelschaltung, stellt der Betrag der Impedanz ebenfalls eine Mischung aus dem Realteil (ohmscher Widerstand  $R$ ) und dem Imaginärteil (Kondensator) dar. Jedoch sind hier die frequenzabhängigen Effekte etwas anders als unter (C) geschildert. Ein RC-Glied in Parallelschaltung verhält sich im hohen Frequenzbereich wie ein Kondensator und im niedrigen Frequenzbereich wie ein ohmscher Widerstand. Dies hängt damit zusammen, dass die Leitfähigkeit eines Kondensators mit Zunahme der Frequenz steigt, d.h. der Widerstand eines Kondensators ist im hohen Frequenzbereich niedriger als er im niedrigen Frequenzbereich ist. Hierzu kann Gl. 4-24 bis Gl. 4-29 formuliert werden.

$$\frac{1}{Z_{\text{ges.}}} = \frac{1}{Z'} + \frac{1}{Z''} = \frac{1}{R} + j\omega C \quad \text{Gl. 4-24}$$

$$Z = \frac{R}{1 + j\omega RC} \quad \text{Gl. 4-25}$$

Durch Multiplikation von Zähler und Nenner mit  $(1-j\omega RC)$  ergibt sich:

$$Z = \frac{R(1 - j\omega RC)}{(1 + j\omega^2 R^2 C^2)} \quad \text{Gl. 4-26}$$

Daraus ergibt sich für den Real- und Imaginärteil:

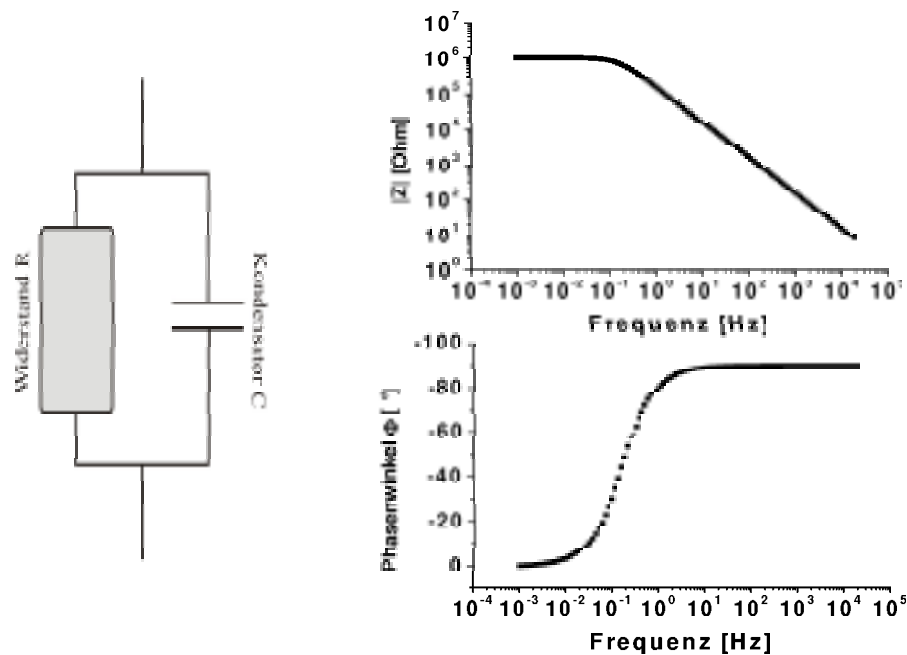
$$Z_{Re} = \frac{R}{(1 + \omega^2 R^2 C^2)} \quad \text{Gl. 4-27}$$

$$Z_{Im} = \frac{-\omega R^2 C}{(1 + \omega^2 R^2 C^2)} \quad \text{Gl. 4-28}$$

Für die Gesamtimpedanz ergibt sich dann:

$$Z = \frac{R}{(1 + \omega^2 R^2 C^2)} - \frac{j\omega R^2 C}{(1 + \omega^2 R^2 C^2)} \quad \text{Gl. 4-29}$$

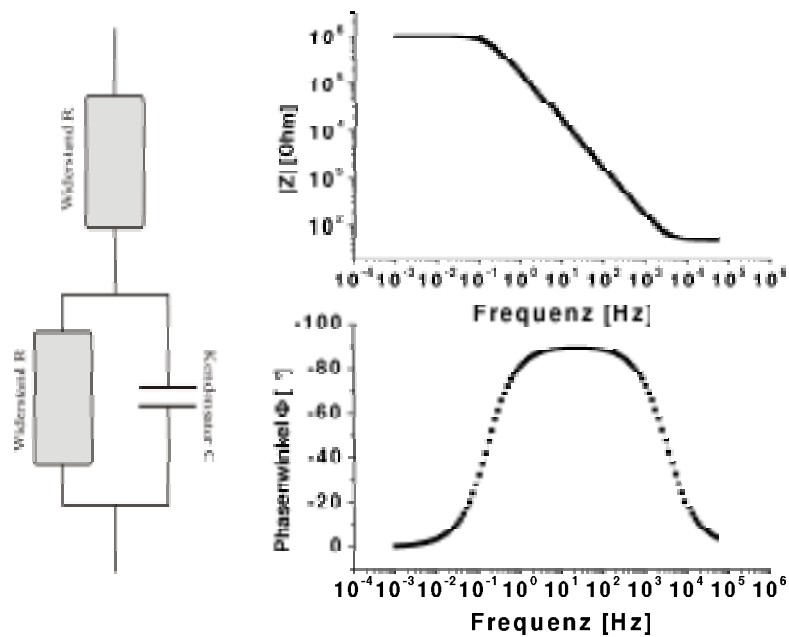
In Abb. 4.14 ist der frequenzabhängige Verlauf des Phasenwinkels und der Impedanz dargestellt. Wie oben bereits beschrieben nimmt der Betrag der Impedanz im hohen Frequenzbereich den Wert eines Kondensators an und im niedrigen Frequenzbereich den des ohmschen Widerstandes. Demnach muss auch der Phasenwinkel im hohen Frequenzbereich  $-90^\circ$  ( $\pi/2$ ) annehmen und im niedrigen Frequenzbereich  $0^\circ$  sein. Im intermediären Frequenzbereich ergeben sich Überlappungen aus ohmschen und kapazitiven Effekten.



**Abb. 4.14:** Bode-Plot für einen Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einen Kondensator ( $C = 1 \text{ }\mu\text{F}$ ) in Parallelschaltung.

**E) Parallelschaltung aus Widerstand ( $R$ ) und Kondensator ( $C$ ) mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}}$ ):**

Für ein solches Schaltbild ergibt sich die Kombination aus den oben beschriebenen Elementen. Abb. 4.15 zeigt den Bode-Plot für ein solches System. Für den hohen Frequenzbereich verhält sich dieses System wie ein ohmscher Widerstand in Serie mit einem Kondensator (vgl. Punkt C). Für den Phasenwinkel in diesem Frequenzbereich gilt dann, dass er den Wert für einen ohmschen Widerstand, also  $0^\circ$  annimmt. Im niedrigen Frequenzbereich hingegen ist das Erscheinungsbild wie für zwei ohmsche Widerstände in Serie (vgl. Punkt A). Deshalb ist auch hier der Phasenwinkel  $0^\circ$ . Im intermediären Frequenzbereich versucht der Phasenwinkel gegen den für einen Kondensator ( $-90^\circ$ ) zu laufen. Ob die  $-90^\circ$  erreicht werden können, hängt von der Größe des Vorwiderstandes ab. Für die Impedanz ergibt sich demnach für den hohen und niedrigen Frequenzbereich der Betrag für den reinen ohmschen Anteil. Jedoch stellt der Wert der Impedanz im hohen Frequenzbereich den Wert für den Vorwiderstand dar und im niedrigen Frequenzbereich nimmt die Impedanz den additiven Wert aus beiden Widerständen an.

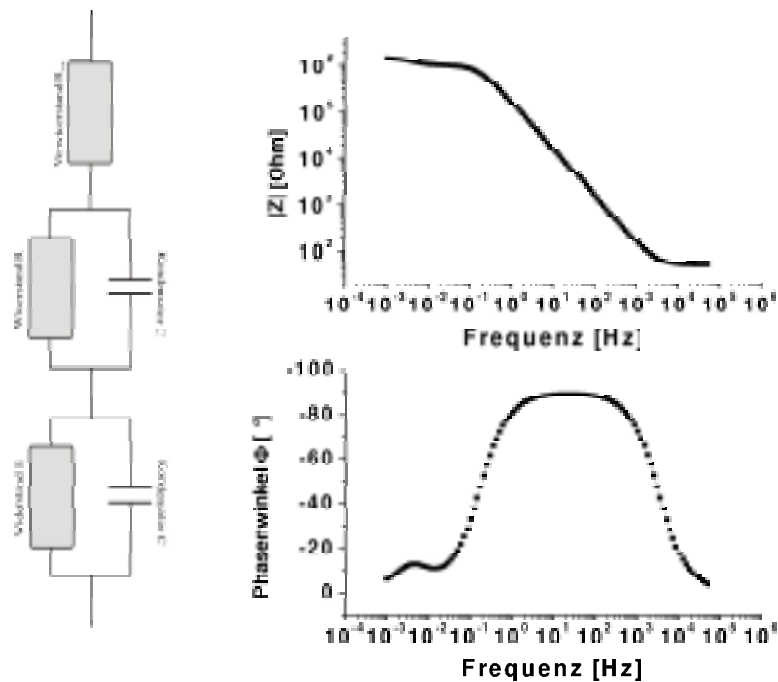


**Abb. 4.15:** Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \text{ }\mu\text{F}$ ) in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}} = 50 \text{ }\Omega$ ).

***F) Serienschaltung zweier jeweils parallelgeschalteter RC-Glieder mit einem Vorwiderstand:***

Der in Abb. 4.16 gezeigte Phasen- und Impedanzverlauf ähnelt dem unter Punkt E dargestellten Verlauf. Lediglich im niedrigen Frequenzbereich steigt der Phasenwinkel wieder etwas an, um dann erneut auf den eines reinen ohmschen Widerstandes zurückzukehren. Liegen die Zeitkonstanten (Gl. 4-16) der beiden RC-Glieder weit genug auseinander, kann eine eindeutige Zuordnung der Effekte zu den RC-Gliedern, bzw. der effektverursachenden Systembestandteile getroffen werden.





**Abb. 4.16:** Bode-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}} = 50 \Omega$ ). Erstes RC-Glied besteht aus Kondensator  $C = 1 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 1 \text{ M}\Omega$ , zweites RC-Glied aus Kondensator  $C = 100 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 0,5 \text{ M}\Omega$ .

#### 4.1.3.2 Der Nyquist-Plot

Im Nyquist-Plot wird der Realteil  $Z'$  (x-Achse) und der Imaginärteil  $Z''$  (y-Achse) der Impedanz zu jeder Anregungsfrequenz gegeneinander aufgetragen, ohne dass, wie beim Bode-Plot, die Frequenz direkt dargestellt wird. Vorteil dieser Darstellung ist die direkte Ablesbarkeit des reinen ohmschen Anteils. Der Scheitelpunkt der Kurve liegt bei  $\omega = 1/RC$ . In den nachfolgenden Graphen werden die oben beschriebenen Ersatzschaltkreise an Hand des Nyquist-Plots erneut diskutiert.

##### A) Ohmscher Widerstand (R):

Die Impedanz eines reinen ohmschen Widerstandes besitzt keinen Imaginäranteil und ist von der Frequenz unabhängig. Dadurch zeigt der Nyquist-Plot für ein solches System für

alle gemessenen Frequenzen nur einen Wert, der dem des Widerstandes entspricht. Abb. 4.17 zeigt den Nyquist-Plot für ein solches System.

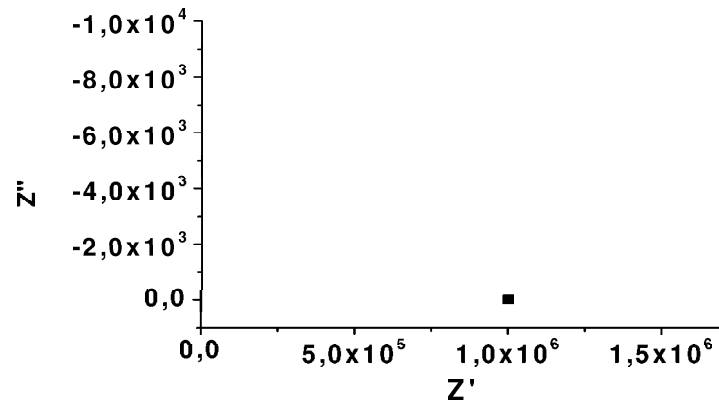


Abb. 4.17: Nyquist-Plot für einen ohmschen Widerstand von  $R = 1 \text{ M}\Omega$ .

### **B) Kondensator (C):**

Die Impedanz eines reinen Kondensators besitzt keinen Realteil, sondern nur einen Imaginärteil, dessen Wert von der Frequenz abhängig ist. Daher zeigt der Nyquist-Plot (Abb. 4.18) eine entlang der y-Achse verlaufende Gerade.

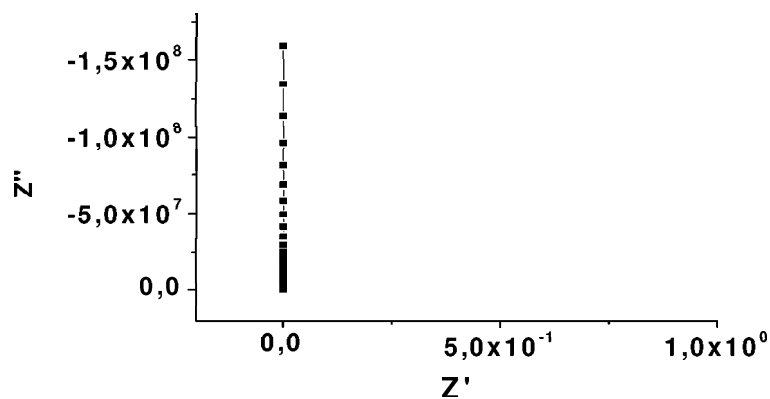
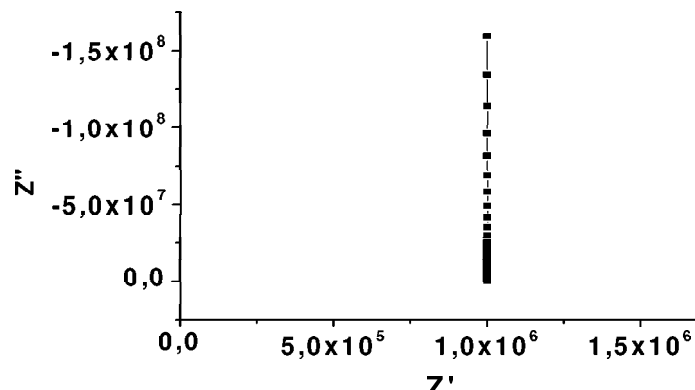


Abb. 4.18: Nyquist-Plot für einen reinen Kondensator von  $C = 1 \mu\text{F}$ .

### **C) Serienschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):**

Ein Widerstand verhält sich in Serie mit einem Kondensator im hohen Frequenzbereich wie ein reiner ohmscher Widerstand und im niedrigen Frequenzbereich wie ein reiner

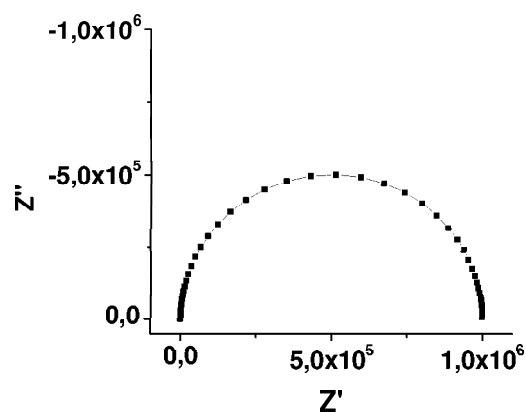
Kondensator. Dieses Verhalten spiegelt sich auch im Nyquist-Plot (Abb. 4.19) wieder. Die Impedanz besitzt hierbei für die intermediären Frequenzen sowohl einen Realteil als auch einen Imaginärteil. Im hohen Frequenzbereich kann im Nyquist-Plot der Wert für den ohmschen Widerstand abgelesen werden (x-Achse), wobei und im niedrigen Frequenzbereich der Wert für den Kondensator entnommen werden kann (y-Achse).



**Abb. 4.19:** Nyquist-Plot für einen reinen ohmschen Widerstand ( $1 \mu\Omega$ ) in Serie mit einem Kondensator ( $1 \mu\text{F}$ ).

#### ***D) Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):***

Ein solches System verhält sich im hohen Frequenzbereich wie ein reiner Kondensator, bzw. im niedrigen Frequenzbereich wie ein reiner Widerstand. Im intermediären Frequenzbereich überlagern sich die Effekte des Kondensators und Widerstandes.

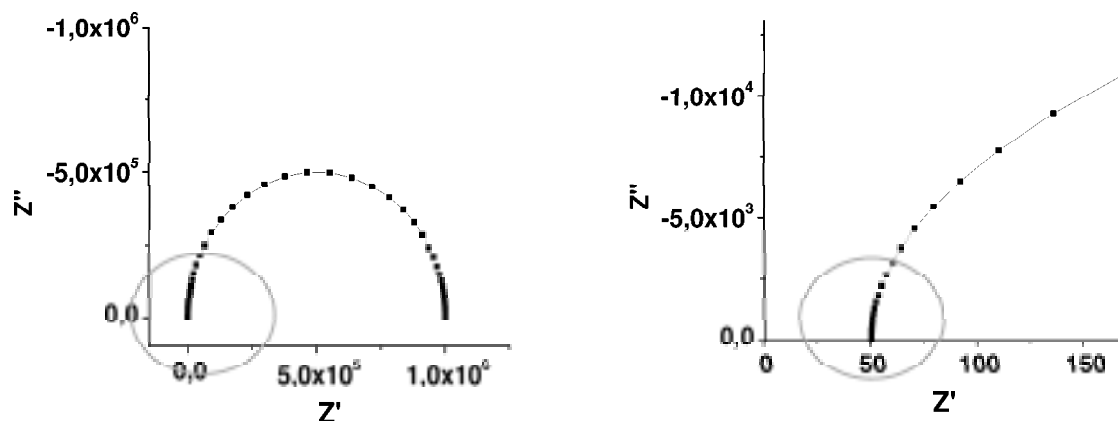


**Abb. 4.20:** Nyquist-Plot für einen Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \mu\text{F}$ ) in Parallelschaltung.

Hieraus resultiert der in Abb. 4.20 gezeigte Nyquist-Plot. An der x-Achse lässt sich der reine ohmsche Anteil (Realteil) des Systems ablesen. Der Halbkreis beginnt bei Null, da im hohen Frequenzbereich keine Anteile des ohmschen Widerstandes angezeigt werden und ein Kondensator im hohen Frequenzbereich einen sehr niedrigen Widerstand aufweist. Mit Abnahme der Frequenz nähert sich das System dem reinen ohmschen Widerstand, weswegen man aus dem zweiten Schnittpunkt mit der x-Achse den Widerstand für das reine ohmsche System ablesen kann.

**E) Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C) mit einem Vorwiderstand ( $R_{vor}$ ):**

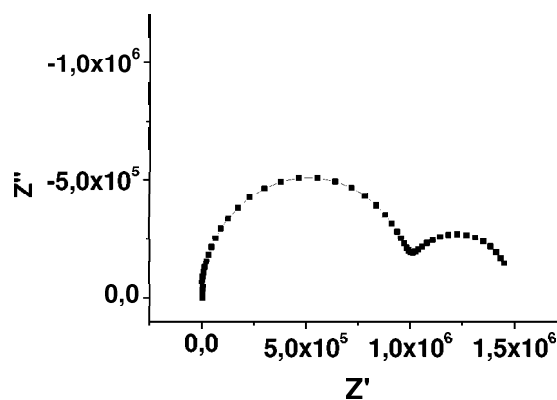
Für dieses Schaltbild ergibt sich prinzipiell der gleiche Nyquist-Plot mit dem Unterschied, dass hier noch ein Vorwiderstand existiert, dessen Wert ebenfalls an der x-Achse abgelesen werden kann. Die Kurve des Nyquist-Plots (Abb. 4.21) hat ihren Ursprung daher nicht in Null, sondern an dem Wert des Vorwiderstands (Abb. 4.21, rechts). Der zweite Schnittpunkt mit der x-Achse setzt sich additiv aus Vorwiderstand und Systemwiderstand zusammen.



**Abb. 4.21:** Nyquist-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \text{ }\mu\text{F}$ ) in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{vor} = 50 \text{ }\Omega$ ). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt.

**F) Serienschaltung zweier parallelgeschalteter RC-Glieder mit einem Vorwiderstand:**

Der Nyquist-Plot für ein solches System zeigt, falls die Zeitkonstanten (Gl. 4-16) der beiden RC-Glieder weit genug auseinander liegen, zwei Halbkreise (Abb. 4.22). Überschneiden sich die Zeitkonstanten, so überschneiden sich auch die Halbkreise des Nyquist-Plots. Der Kurvenverlauf ergibt sich aus denselben, wie oben schon genannten Gründen (siehe 4.1.3.1 F und 4.1.3.2 E). Die Schnittpunkte der Kurve mit der x-Achse ergeben sich hier ebenfalls additiv aus den Einzelwiderständen des Systems.



**Abb. 4.22:** Nyquist-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}} = 50 \Omega$ ). Erstes RC-Glied aus Kondensator  $C = 1 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 1 \text{ M}\Omega$ , zweites RC-Glied aus Kondensator  $C = 100 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 0,5 \text{ M}\Omega$ .

#### 4.1.3.3 Der frequenzreduzierte Admittanz- oder Kapazitäts-Plot

Die Admittanz  $Y$  (Gl. 4-30) stellt lediglich die Umkehrfunktion der Impedanz  $Z$  dar. Sie ist ein Maß für die komplexe Leitfähigkeit. Durch Auftragen des frequenzreduzierten imaginären Anteils der Admittanz ( $Y''/\omega$ ) gegen den ebenfalls frequenzreduzierten Realteil der Admittanz ( $Y'/\omega$ ) erhält man den Admittanz-Plot.

$$Y = \frac{I}{E} = \frac{I}{Z} = Y' + jY'' \quad \text{Gl. 4-30}$$

### A) Ohmscher Widerstand (R):

Für einen reinen ohmschen Widerstand  $R$  kann die Admittanz  $Y'$ , bzw. die frequenzreduzierte Admittanz  $Y'/\omega$  mit Gl. 4-31 und Gl. 4-32 wiedergegeben werden.

$$Y' = \frac{I}{R} \quad \text{Gl. 4-31}$$

$$Y'/\omega = \frac{I/R}{\omega} \quad \text{Gl. 4-32}$$

Aus Gl. 4-32 wird ersichtlich, dass der frequenzreduzierte Admittanz-Plot (Abb. 4.23) für einen reinen Widerstand eine Gerade entlang der x-Achse sein muss, da Gl. 4-32 eine Abhängigkeit von der Frequenz zeigt. Der Plot schneidet die y-Achse nur in Null, da ein Widerstand keinen Imaginärteil besitzt.

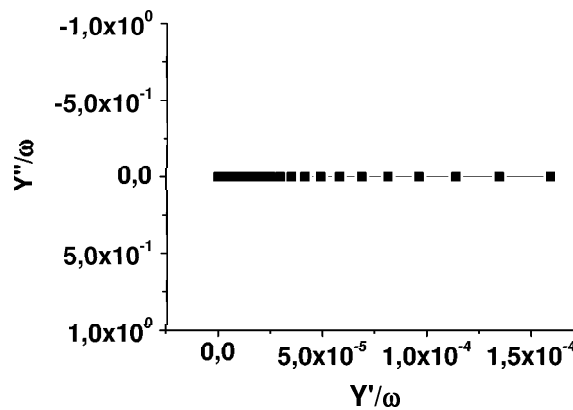


Abb. 4.23: Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen ohmschen Widerstand von  $R = 1 \text{ M}\Omega$ .

### B) Kondensator (C):

Die Admittanz eines reinen Kondensators lässt sich mit Gl. 4-33 und Gl. 4-34 darstellen.

$$Y'' = j\omega C \quad \text{Gl. 4-31}$$

$$Y''/\omega = jC \quad \text{Gl. 4-32}$$

Gl. 4-32 zeigt, dass der frequenzreduzierte Admittanz-Plot von der Frequenz unabhängig ist. Der Admittanz-Plot (Abb. 4.24) zeigt nur einen Wert an, nämlich den des Kondensators, da nur ein reiner Kondensator einen Imaginärteil besitzt.

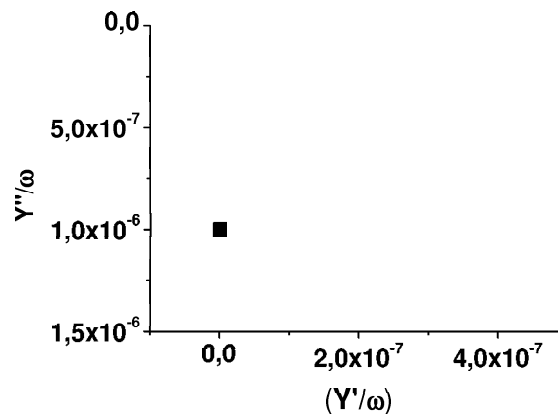
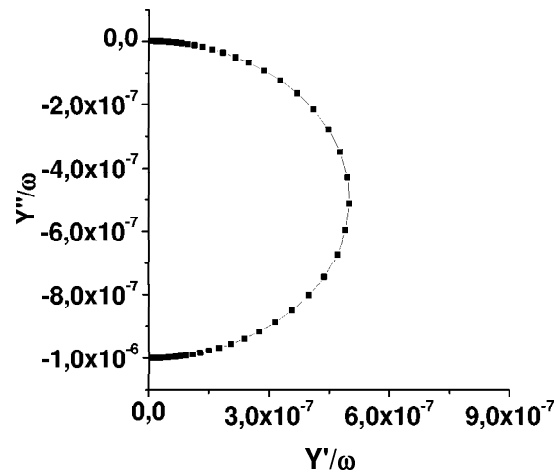


Abb. 4.24: Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen reinen Kondensator mit einer Kapazität von  $C = 1 \mu\text{F}$ .

### C) Serienschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):

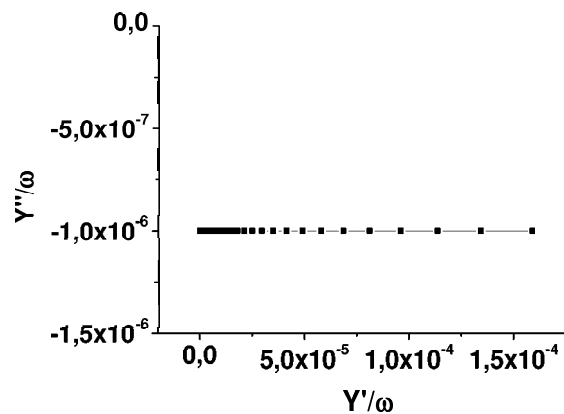
Ein solches System verhält sich bei hohen Frequenzen wie ein reiner Widerstand und bei niedrigen Frequenzen wie ein Kondensator. Daher liegt der Schnittpunkt mit der y-Achse im frequenzreduzierten Admittanz-Plot (Abb. 4.25) bei hohen Frequenzen bei Null und bei niedrigen Frequenzen im Wert für den Kondensator. Dies ist auch dadurch begründet, dass der Widerstand keinen Imaginärteil besitzt und der Kondensator keinen Realteil.



**Abb. 4.25:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen reinen ohmschen Widerstand ( $1 \mu\Omega$ ) in Serie mit einem Kondensator ( $1 \mu\text{F}$ ).

**D) Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C):**

Für ein solches System stellt der frequenzreduzierte Admittanz-Plot die Summe der Impedanzen des Kondensators und des Widerstandes dar. Dieses System verhält sich bei hohen Frequenzen wie ein Kondensator und bei niedrigen Frequenzen wie ein Widerstand. Der Plot (Abb. 4.26) stellt daher eine Gerade entlang der x-Achse dar, wobei sie ihren Ursprung auf der y-Achse im Wert des Kondensators hat.

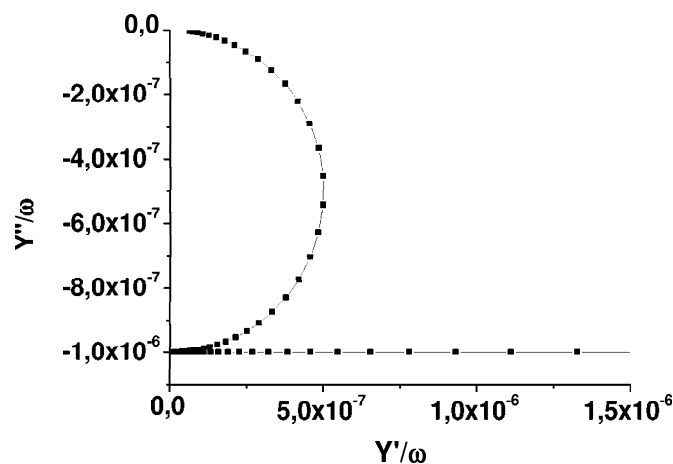


**Abb. 4.26:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \mu\text{F}$ ) in Parallelschaltung.



**E) Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kondensator (C) mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}}$ ):**

Für dieses System ergibt sich eine Kombination aus Punkt C und D.

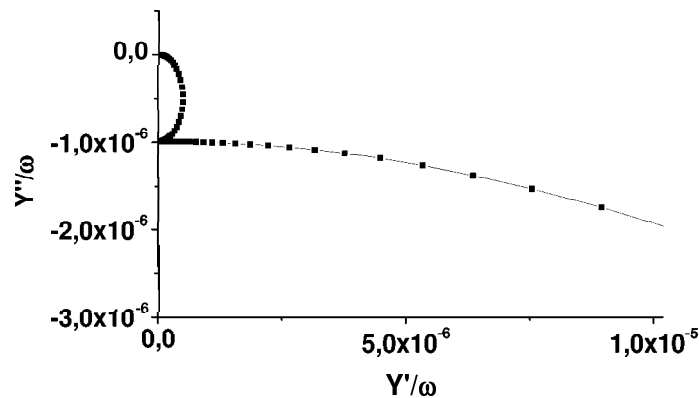


**Abb. 4.27:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ ) und einem Kondensator ( $C = 1 \text{ }\mu\text{F}$ ) in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}} = 50 \text{ }\Omega$ ).

Der resultierende Plot (Abb. 4.27) zeigt zunächst einen Halbkreis wie bei einer Serienschaltung aus Widerstand und Kondensator (wie unter C), und geht dann in eine Gerade über, die der eines Widerstandes und eines Kondensators in Parallelschaltung entspricht.

**F) Serienschaltung zweier parallelgeschalteter RC-Glieder mit einem Vorwiderstand:**

Der frequenzreduzierte Admittanz-Plot (Abb. 4.28) eines solchen Systems verläuft zunächst im hohen Frequenzbereich wie ein Widerstand in Serie mit einem Kondensator. Die Kurve schneidet die y-Achse am Wert für den Kondensator des ersten RC-Gliedes, sofern sich die Zeitkonstanten der beiden RC-Glieder nicht überschneiden. Mit Abnahme der Frequenz zeigt sich dann der Ansatz eines zweiten Halbkreises, der für das zweite RC-Glied steht. Bei sehr niedrigen Frequenzen würde der Plot, ähnlich wie unter Punkt E gezeigt, in eine Gerade übergehen (nicht gezeigt).



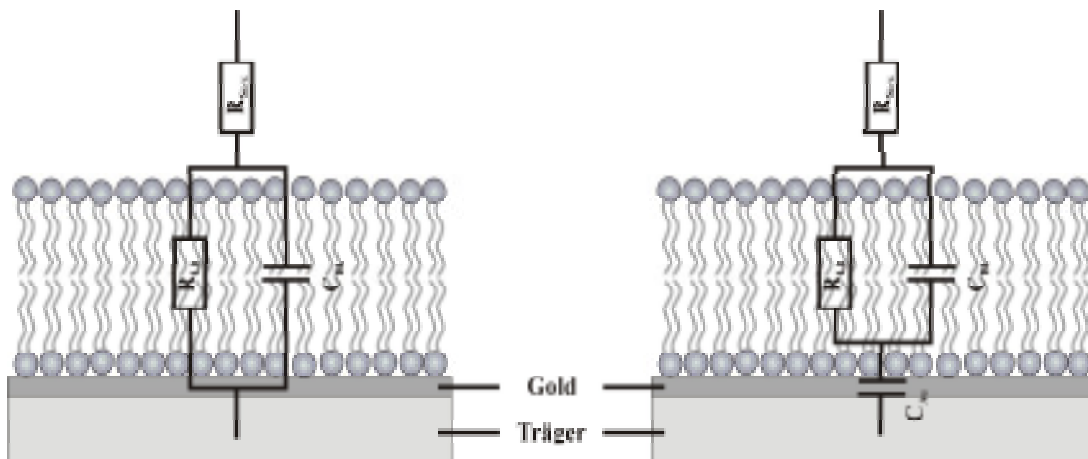
**Abb. 4.28:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand ( $R_{\text{vor}} = 50 \Omega$ ). Erstes RC-Glied aus Kondensator  $C = 1 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 1 \text{M}\Omega$ , zweites RC-Glied aus Kondensator  $C = 100 \mu\text{F}$  und Widerstand  $R = 0,5 \text{M}\Omega$ .

Als weiterführende Literatur siehe [153-155].

#### 4.1.4 Ersatzschaltkreise für Modellmembransysteme

Je nach Art des Modellsystems, d.h. Modellmembranen ohne (sBLM's) oder mit einem Submembranraum (tBLM's), finden für die Auswertung der Impedanzspektren verschiedene Ersatzschaltkreise Anwendung. Dabei wird die Anzahl der Elemente eines Schaltkreises möglichst klein gehalten, damit die gemessenen Daten einer Auswertungs-Routine unterworfen werden können.

Lipid-Doppelmembranen besitzen auf Grund ihrer Impermeabilität für Ionen einen hohen Widerstand im  $\text{M}\Omega$ -Bereich, [10,99,156-159]. Hieraus begründet sich ihr Vermögen, Konzentrationsgradienten und damit Potentialdifferenzen über die Membran aufrecht zu erhalten. Die Membran ist also in der Lage Ladungen zu separieren, weswegen sie auch kapazitive Eigenschaften besitzt. Für eine solche Membran finden sich Kapazitäten zwischen  $0,5\text{-}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [10,99,157,158]. Die einfachsten Ersatzschaltkreise, die Modellmembranen beschreiben, stellen die beiden Ersatzschaltkreise in Abb. 4.29 dar.

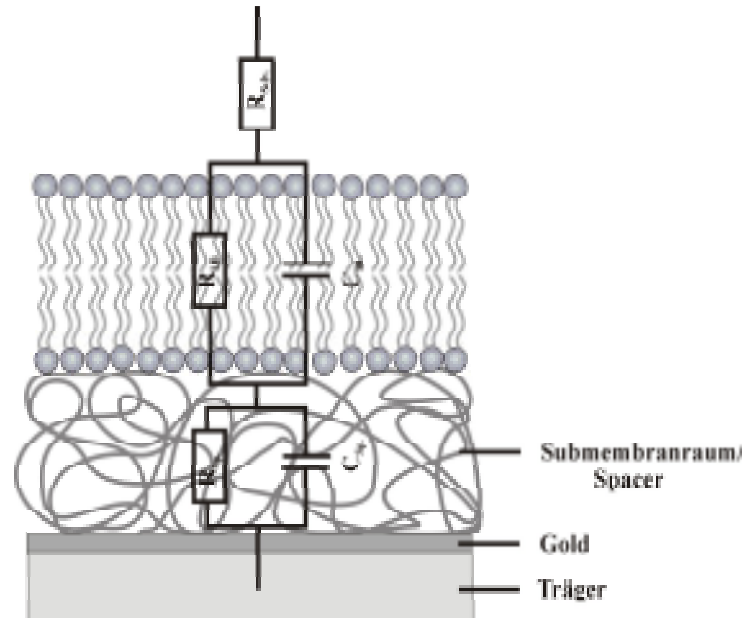


**Abb. 4.29:** Ersatzschaltkreise für eine Lipidmodellmembran ohne Submembranraum. Vorwiderstand Elektrolyt/Kabel  $R_{\text{Solv.}}$ , Widerstand der Membran  $R_{\text{LB}}$ , Kapazität  $C_{\text{LB}}$  der Membran, Kapazität  $C_{\text{Au}}$  der elektrischen Doppelschicht.

Die Ersatzschaltkreise setzen sich aus einem Vorwiderstand ( $R_{\text{Solv.}}$ ), der für den Widerstand des Elektrolyten und der Messkabel steht, einem Widerstand ( $R_{\text{LB}}$ ), der für den Widerstand der Lipidmembran steht und einem Kondensator ( $C_{\text{LB}}$ ), der für die Kapazität der Lipidmembran angegeben wird, zusammen. Widerstand und Kondensator der Lipidmembran sind parallel und in Serie mit dem Vorwiderstand geschaltet [68,77,157,160]. Zusätzlich kann eine weitere, in Serie geschaltete Kapazität angenommen werden [58,68,69,73,80,132,161]. Sie steht für die elektrische Doppelschicht, bestehend aus der Helmholtz-Schicht an der Elektrode (hier Gold) und der diffusen Schicht im Submembranraum [73]. Die Kapazität der elektrischen Doppelschicht ist mit  $30\text{-}33 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  verhältnismäßig groß gegenüber der Kapazität der Membran ( $\sim 0,5\text{-}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Die Gesamtkapazität berechnet sich gemäß Gl. 4-2, wobei ersichtlich wird, dass die kleinste Einzelkapazität den größten Einfluss auf die Gesamtkapazität hat. Aus diesem Grund wird bei der Erstellung von Ersatzschaltkreisen häufig auf die Kapazität der elektrischen Doppelschicht verzichtet [68,77,160], auch dann, wenn die Messdaten keine zweite Zeitkonstante zeigen.

Es können auch kompliziertere Ersatzschaltkreise zur Anwendung kommen, wenn die Messdaten eine zweite Zeitkonstante zeigen und diese auch physikalisch begründbar ist

(z. B. beim Vorliegen eines Submembranraums/Spacer oder bei Inhomogenitäten durch binäre Monolagen).



**Abb. 4.30:** Ersatzschaltkreise für eine Lipidmodellmembran mit Submembranraum/Spacer. Vorwiderstand des Elektrolyten  $R_{\text{Solv}}$ , Widerstand der Membran  $R_{\text{LB}}$ , Kapazität  $C_{\text{LB}}$  der Membran, Kapazität  $C_{\text{Au}}$  der elektrischen Doppelschicht.

Oft findet man eine zweite Zeitkonstante bei Modellmembranen, deren Lipiddoppelschicht von der Elektrode durch einen Abstandshalter entkoppelt ist, d.h. ein Submembranraum vorliegt. Als Ersatzschaltkreis werden hier zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand verwendet (Abb. 4.30) [142,156,157]. Um den Ersatzschaltkreis nicht zu komplizieren, wird oftmals auf die Kapazität für die elektrische Doppelschicht verzichtet. Das erste RC-Glied repräsentiert die Membran.

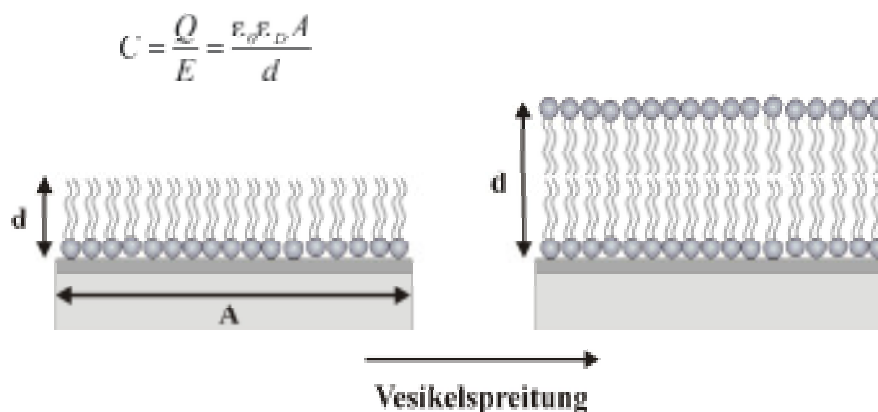
#### 4.1.5 Kapazität und Widerstand zur Kontrolle des Architekturaufbaus und als Qualitätsmerkmal biomimetischer Membransysteme

Für viele membrangebundene physiologische Prozesse stellt die Integrität der Lipidmembran ein entscheidendes Kriterium dar (siehe Kapitel 1.1). Die Anforderungen,

die natürliche Lipidmembranen erfüllen müssen, werden auch an die Lipidmodellmembranen gestellt. Die Integrität, aber auch der Aufbau von Modellmembranen kann über ihr elektrochemisches Verhalten (Kapazität und Widerstand) geprüft werden.

### A) Kapazität

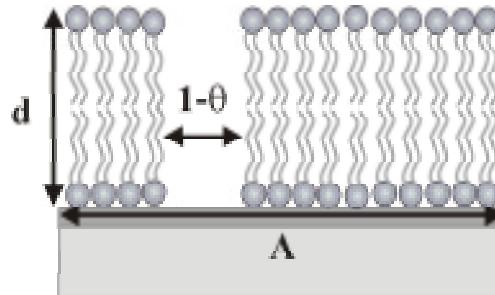
Der Architekturaufbau von Modellmembranen kann anhand der Kapazität verfolgt werden.



**Abb. 4.31:** Änderung der Schichtdicke  $d$  während des Bilayer-Aufbaus, z. B. durch Vesikelspreitung.  $A$  = Elektrodenfläche.

Während des schrittweise erfolgenden Aufbaus solcher Systeme ändert sich die Dicke der auf die Elektrode aufgetragenen Schichten (Abb. 4.31). Aus Gl. 4-1 wird ersichtlich, dass durch die Zunahme der Schichtdicke während des Architekturaufbaus die Kapazität des Systems abnimmt (siehe hierzu auch Tabelle 4-1). Für eine Lipidmonoschicht mit einer Dicke  $d$  von 25 Å und einer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_D$  von 2,25 [77] beträgt die theoretische Kapazität 0,8  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Durch die Komplettierung dieser Schicht zu einer Lipiddoppelschicht mit einer Schichtdicke von 50 Å, wobei die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_D$  und die Fläche  $A$  konstant bleiben, verringert sich die theoretische Kapazität auf 0,4  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Es wird hier eine 100 % defektfreie Schicht angenommen. Diese Werte, bzw. die Werte, die für natürliche Membranen [10] und für BLM's [158], [159] gefunden wurden, gelten als Richtwerte für die Entwicklung von Modellmembranen.

Neben der Dicke hat auch der Bedeckungsgrad  $\Theta$  einen großen Einfluss auf die Qualität der Membran (Abb. 4.32).



**Abb. 4.32:** Defekt in Lipiddoppelmembran.  $\Theta$  = Bedeckungsgrad,  $A$  = Fläche,  $d$  = Dicke.

Durch die Bindung von Molekülen (z.B. Lipide) an die Elektrode verändert sich der Bedeckungsgrad und damit auch die Impedanz, bzw. die Kapazität der Gouy-Chapman-Stern Schicht (elektrische Doppelschicht,  $C_{GCS}$ ). Unter Verwendung von Gl. 4-33 kann der Bedeckungsgrad, bzw. die effektive Membrankapazität  $C_{LB}$  bestimmt werden ( $C_{(0)LB}$  ist die Membrankapazität bei einem Bedeckungsgrad der Elektrode von 100%), wodurch der Einfluss von Defekten auf die Kapazität der Membran abgeschätzt werden kann (siehe Tabelle 4-1) [29,67,77,162].

$$C_{LB.} = \Theta \cdot C_{(0)LB} + (1 - \Theta) \cdot C_{GCS} \quad \text{Gl. 4-33}$$

Bedeckungsgrad %	eff. Membrankapazität $C_{LB}$ [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]		Kapazität $C_{GCS}$ [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]	Defekte %
	d = 2,5 nm	d = 5,0 nm		
100	0,80	0,40	0,00	0
99,8	0,86	0,46	0,06	0,2
99,6	0,91	0,52	0,12	0,4
99,4	0,97	0,58	0,18	0,6
99,2	1,03	0,64	0,24	0,8
99	1,09	0,69	0,30	1
98	1,38	0,99	0,60	2
97	1,67	1,29	0,90	3
96	1,96	1,58	1,20	4
95	2,26	1,88	1,50	5
94	2,55	2,17	1,80	6
93	2,84	2,47	2,10	7
92	3,13	2,77	2,40	8
91	3,43	3,06	2,70	9
90	3,72	3,36	3,00	10
85	5,18	4,84	4,50	15
80	6,64	6,32	6,00	20
75	8,10	7,80	7,50	25
70	9,56	9,28	9,00	30
65	11,02	10,76	10,50	35
60	12,48	12,24	12,00	40
50	15,40	15,20	15,00	50
40	18,32	18,16	18,00	60
30	21,24	21,12	21,00	70
20	24,16	24,08	24,00	80
10	27,08	27,04	27,00	90
0	30,00	30,00	30,00	100

**Tab. 4-1:** Einfluss des Bedeckungsgrades, bzw. der Defekte, auf die Gesamtkapazität von Lipidfilmen (d = 2,5 nm der Monolage und d = 5,0 nm Doppelschichte).

Betrachtet man die Werte aus Tabelle 4-1, ist zu erkennen, dass schon geringe Defektraten einen immensen Einfluss auf die Kapazität der Membran haben. Die Membrankapazität wird bei einem Bedeckungsgrad  $< 0,97$  von der Kapazität der Defekte ( $C_{GCS}$ ) bestimmt [29]. Die Kapazität der Membran und der Defekte sind parallel zu einander angeordnet.

## B) Widerstand

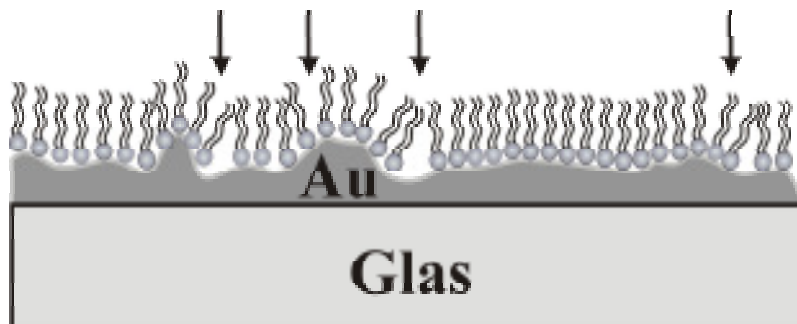
Wie die Kapazität, ist auch der Widerstand ein wichtiges Qualitätsmerkmal, da von der Membran gefordert wird, Ladungsgradienten über die Membran aufrecht zu erhalten. Ein hoher Widerstand bedeutet hohe elektrische Isolierung.

Durch den schrittweise erfolgenden Aufbau der Lipidmembran werden nacheinander isolierende Lipidschichten aufgebracht. Der Widerstand des Gesamtsystems erhöht sich also durch Komplettierung der Lipidmonolage zur Lipiddoppellage.

Da aber der Widerstand der perfekt dichten Membran sehr viel größer ist als der Widerstand etwaiger Defekte, wird der gemessene Gesamtwiderstand  $R$  von der Defektrate  $(1-\Theta)$  bestimmt (Gl. 4-34) [67]. Der Widerstand des Gesamtsystems ist umso kleiner, je defektreicher die Membran ist.

$$R = \frac{R_0}{(1-\Theta)} \quad \text{Gl. 4-34}$$

Schon sehr kleine Defektraten können eine erhebliche Erniedrigung des Widerstandes einer Membran bewirken. Eine hohe Rauigkeit der Elektrodenoberfläche begünstigt die Ausprägung von Defekten (Abb. 4.33) und erschwert so den Aufbau von Modellmembranen mit niedrigen Kapazitäten und hohen Widerständen.



**Abb. 4.33:** Einfluss der Rauigkeit der Elektrode auf die Defektrate (Pfeile). Die Lipidmoleküle sind hier aus sterischen Gründen nicht in der Lage, einen geschlossenen Film auszubilden.



## 4.2 Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)

Unter Zuhilfenahme der Oberflächenplasmonenspektroskopie (*Surface Plasmon Spectroscopy, SPS*) können die Dicken ultradünner dielektrischer Schichten in Luft oder Flüssigkeiten bestimmt werden [163], [164]. Eine Kontrolle des angestrebten Architekturaufbaus ist mit dieser Methode möglich, da der schrittweise erfolgende Aufbau eines Systems beobachtet werden kann. Ein weiterer Vorteil stellt die in Echtzeit erfolgende zeitaufgelöste Messung von Adsorptionsprozessen an Oberflächen dar.

In der vorliegenden Arbeit wird diese Meßmethode überwiegend zur Kontrolle des erfolgenden Architekturaufbaus über die Schichtdicke genutzt, sowie zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des erfolgenden Aufbaus.

### 4.2.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)

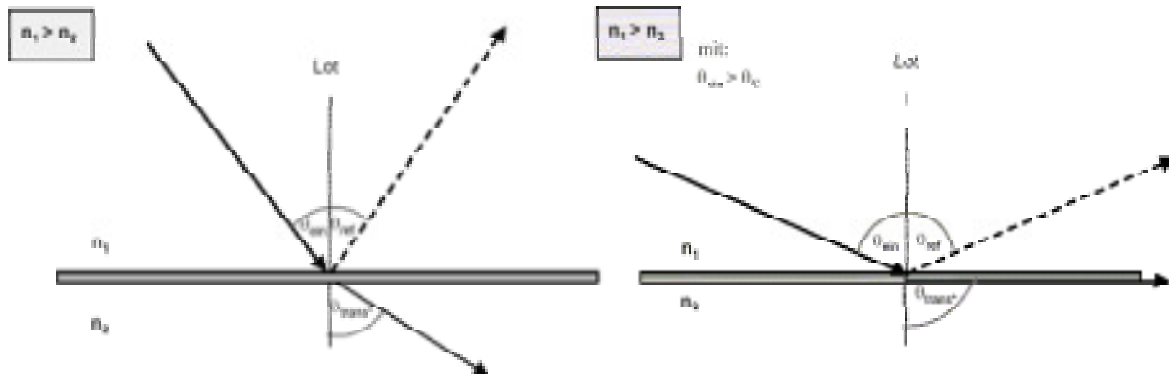
Durchschreitet ein Lichtstrahl die Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher Brechungsindizes  $n_1$  und  $n_2$ , so wird ein Teil des Strahls an der Grenzfläche gebrochen, der andere Teil reflektiert. Für den reflektierten Strahl gilt das Reflexionsgesetz, das besagt, dass der Einfallswinkel  $\Theta_{ein}$  des eingestrahlt Lichts gleich dem Reflexionswinkel  $\Theta_{ref}$  des ausfallenden Strahls ist.

Die Winkelverhältnisse für den transmittierten Strahl ergeben sich aus dem *Snellius'schen Brechungsgesetz* (Gl. 4-35).

$$\sin \Theta_{trans} = \frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \Theta_{ein} \quad \text{Gl. 4-35}$$

Hierbei wird wie in Abb. 4.34 gezeigt, ein Lichtstrahl, der von einem optisch dichteren Medium ( $n_1$ ) in ein optisch weniger dichtes Medium ( $n_2$ ) fällt, vom Lot weg gebrochen. Der Brechungswinkel  $\Theta_{trans}$  des transmittierten Strahls ist in diesem Fall größer als der

Einfallswinkel  $\Theta_{ein}$  des eingestrahlt Lichts. Mit zunehmendem Einfallswinkel  $\Theta_{ein}$  steigt auch der Brechungswinkel  $\Theta_{trans}$ . Bei einem bestimmten Einfallswinkel, der als Grenzwinkel der Totalreflexion  $\Theta_c$  bezeichnet wird, erreicht der Brechungswinkel  $90^\circ$  (Abb. 4.34).

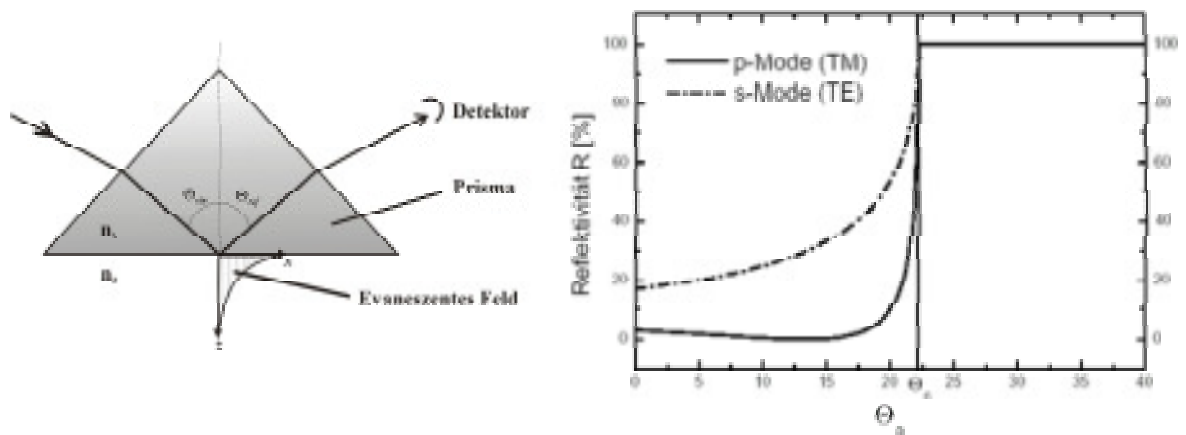


**Abb. 4.34:** Schematische Darstellung des Strahlengangs durch zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes ( $n_1 > n_2$ ) bei unterschiedlichen Einfallswinkeln  $\Theta_{ein}$ . Der einfallende Strahl wird an der Grenzfläche der beiden Medien teilweise reflektiert und gebrochen (links). Bei Erreichen eines bestimmten Einfallswinkels  $\Theta_c$  (Grenzwinkel der Totalreflexion) beträgt der Winkel  $\Theta_{trans}$  des transmittierten Strahls  $90^\circ$  (rechts). Wird der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel der Totalreflexion ( $\Theta_{ein} > \Theta_c$ ), so tritt Totalreflexion auf.

Oberhalb dieses Winkels erfolgt keine Brechung des Strahls, d. h. der Lichtstrahl wird komplett reflektiert. Der Grenzwinkel der Totalreflexion  $\Theta_c$  kann mit Hilfe des Snellius'schen Brechungsgesetzes für unterschiedliche Medien berechnet werden (Gl. 4-36).

$$\Theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Gl. 4-36}$$

Würde man die Lichtintensität über den gesamten oben beschriebenen Prozess messen, so würde sich der in Abb. 4.35 gezeigte Verlauf der Reflektion ergeben, wobei für Winkel größer  $\Theta_c$  die Reflektivität  $R = I_{ref}/I_{ein} = 1$  angegeben werden kann.



**Abb. 4.35:** Schematische Darstellung des Strahlengangs durch ein Glasprisma. Der Strahl wird an der Grenzfläche Glas ( $n_1$ )/Dielektrikum ( $n_2$ , z. B. Luft) reflektiert, bzw. gebrochen, wobei sich für den reflektierten Strahl in Abhängigkeit des Einfallswinkels  $\Theta_{\text{ein}}$  die gezeigte berechnete Intensitätskurve für p- und s-polarisiertes Licht darstellen lässt.

Am Grenzwinkel der Totalreflektion  $\Theta_c$  nimmt der transmittierte Strahl die Form einer Oberflächenwelle an, welche sich entlang der Grenzflächen fortbewegt (Abb. 4.35). Dabei nimmt die Feldintensität und die Amplitude einer solchen *evaneszenten Welle* sowohl in Ausbreitungsrichtung (*x-Richtung*) als auch senkrecht zur Grenzfläche (*z-Richtung*) exponentiell ab (*evaneszentes Feld*, Abb. 4.35). Die z-Komponente dieses elektrischen Feldes dringt dabei gemäß Gl. 4-37 in das optisch dünnere Medium ein.

$$E(z) = E = E_0 e^{-z/d_p} \quad \text{Gl. 4-37}$$

Die Eindringtiefe  $d_p$ , bei der die Amplitude des evaneszenten Feldes im optisch dünneren Medium auf den  $e$ -ten Teil abgeklungen ist, kann mittels Gl. 4-38 berechnet werden.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi} \left( \frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2 \Theta_{\text{ein}} - 1 \right)^{\frac{1}{2}}, \quad \text{wobei } \Theta_{\text{ein}} > \Theta_c \quad \text{Gl. 4-38}$$

Die Eindringtiefe  $d_p$  liegt in der Größenordnung der Wellenlänge  $\lambda$  des eingestrahnten Lichts. Die daraus resultierende Feldstärke an der Grenzfläche führt zu starken

Wechselwirkungen mit der unmittelbaren Umgebung der Grenzfläche. Änderungen der optischen Eigenschaften innerhalb der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes führen zu Änderungen der Intensität des reflektierten Lichts. Unter ATR-Methode (*attenuated total reflection*) fasst man alle auf diesem Prinzip basierenden Messverfahren zusammen.

#### 4.2.2 Oberflächenplasmonen

Oberflächenplasmonen (*plasmon surface polarisations, PSP*) stellen kollektive Oszillationen des quasi-freien Elektronengases eines Metalls dar, die entlang der Grenzfläche Metall/Dielektrikum propagieren. Diese Oszillationen bzw. Oberflächenwellen können durch das Einkoppeln von Licht unter bestimmten experimentellen Bedingungen angeregt werden.

Auch an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum kommt es, wie unter Kapitel 4.2.1 beschrieben, zur Reflektion und Transmission eines Lichtstrahls. Unter bestimmten Bedingungen, die nachfolgend erläutert werden, kann es zur resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen durch die Photonen des eingestrahlt Lichts kommen. Die Oberflächenplasmonen weisen ebenfalls ein evaneszentes Feld auf, das sowohl in Ausbreitungsrichtung ( $x$ ) als auch in  $z$ -Richtung der elektromagnetischen Welle in beide Medien exponentiell abfällt (Abb. 4.36).

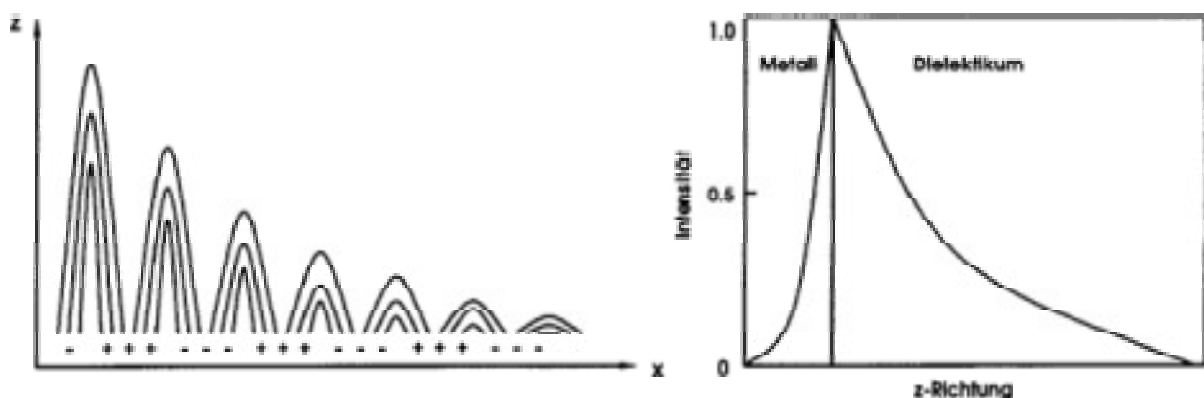


Abb. 4.36: Abfall der Feldintensität an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum

Das Plasmon erfährt also eine Dämpfung in Ausbreitungsrichtung (innere Dämpfung). Dies geschieht, da die Dielektrizitätskonstante von Metallen ( $\epsilon_M = \epsilon'_M + i\epsilon''_M$ ) für optische Frequenzen infolge ohmscher Verluste einen imaginären Anteil ( $i\epsilon''_M$ ) besitzen und der Wellenvektor  $k$  dadurch komplex wird. Die Propagationslänge  $L_x$  des Plasmons entlang  $x$  ist abhängig von dem Imaginäranteil und wird umso kürzer, je größer der Imaginäranteil wird. Sie lässt sich mit Gl. 4-39 berechnen, wobei  $\epsilon_D$  die Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums ist und in der Regel keinen imaginären Anteil aufweist, es sei denn, das Dielektrikum hätte absorbierende Eigenschaften. Die Propagationslänge ist entscheidend für die laterale Auflösung.

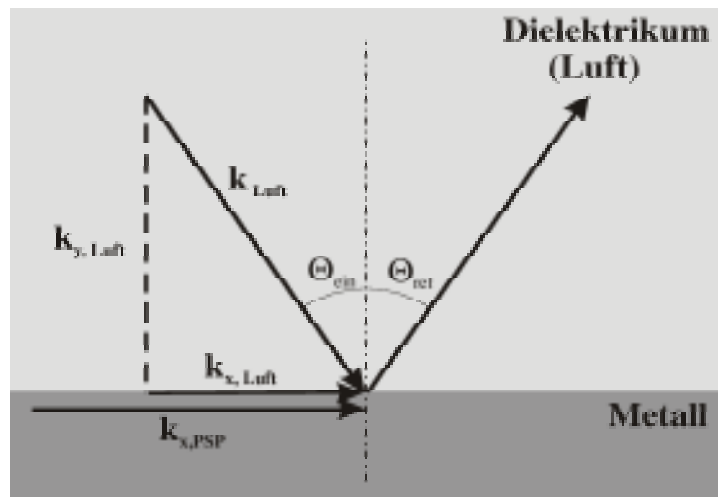
$$L_x = \frac{1}{2k_x''} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{\epsilon'_M (\epsilon_D + \epsilon'_M)^3}{\epsilon_M''^2 \epsilon_D^3}} \quad \text{Gl. 4-39}$$

Zur Anregung kann nur p-polarisiertes Licht verwendet werden, da der Feldvektor des s-polarisierten Lichts keine Komponente senkrecht zur Oberfläche besitzt.

Die resonante Anregung der Plasmonen durch monochromatisches, p-polarisiertes Licht erfolgt nur, wenn die beiden Wellen des Oberflächenplasmons und der Lichtwelle in ihrer Energie ( $E = h\nu$ ) und ihrem Impuls ( $p = h/\lambda$ ) übereinstimmen. Durch den Vergleich der Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons (Gl. 4-40) und von Licht (Gl. 4-41) an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum wird ersichtlich, dass es an glatten Metallfilmen, bei allen Frequenzen zu keiner Anregung eines Oberflächenplasmons an der Grenzfläche Metall/Luft kommen kann, da der Lichtwellenvektor  $k_{x,D}$  in Luft kleiner ist, als der Wellenvektor  $k_{x,PSP}$  des Plasmons (Abb. 4.37).

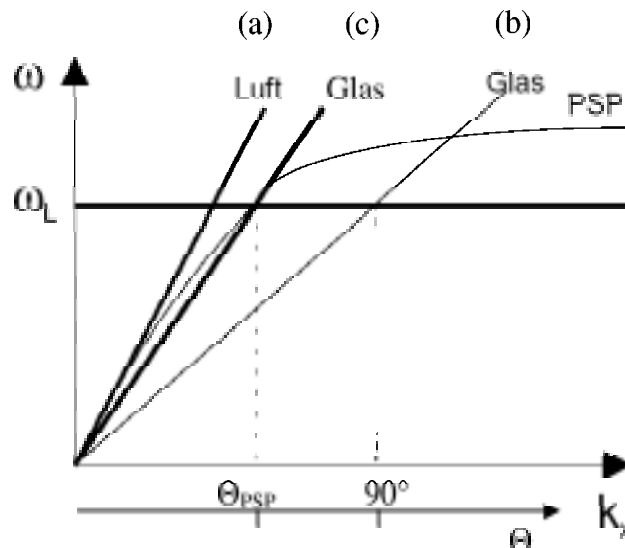
$$k_{x,PSP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad \text{Gl. 4-40}$$

$$k_{x,D} = \frac{\omega \sqrt{\epsilon_D}}{c} \cdot \sin \Theta_{ein} \quad \text{Gl. 4-41}$$



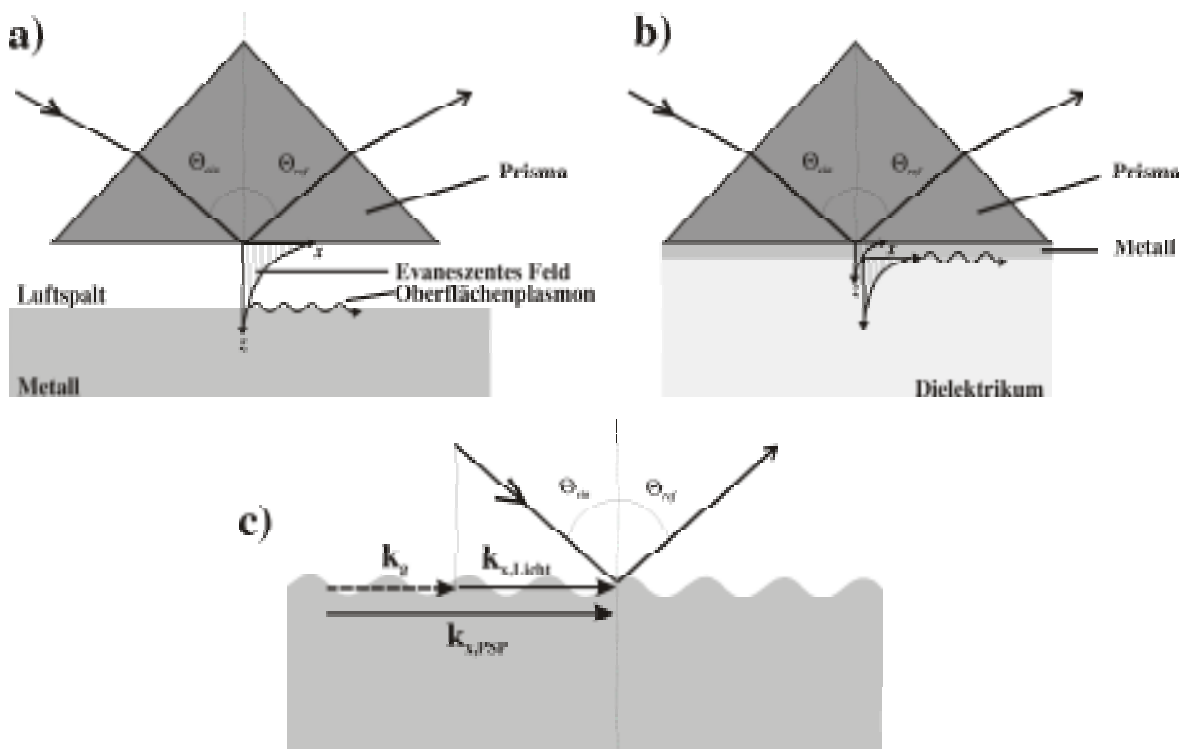
**Abb. 4.37:** Der Wellenvektor  $k_{x,Luft}$  in Ausbreitungsrichtung  $x$  ist zu klein, um ein Oberflächenplasmon anregen zu können. Er muß dem Wellenvektor des Oberflächenplasmons ( $k_{x,PSP}$ ) angepasst werden, damit es zur resonanten Anregung eines Oberflächenplasmons kommen kann.

Daraus resultiert wie in Abb. 4.38 gezeigt, dass die Dispersionslinie des Photons in Luft keinen Schnittpunkt mit der Dispersionskurve des Oberflächenplasmons aufweist (a).



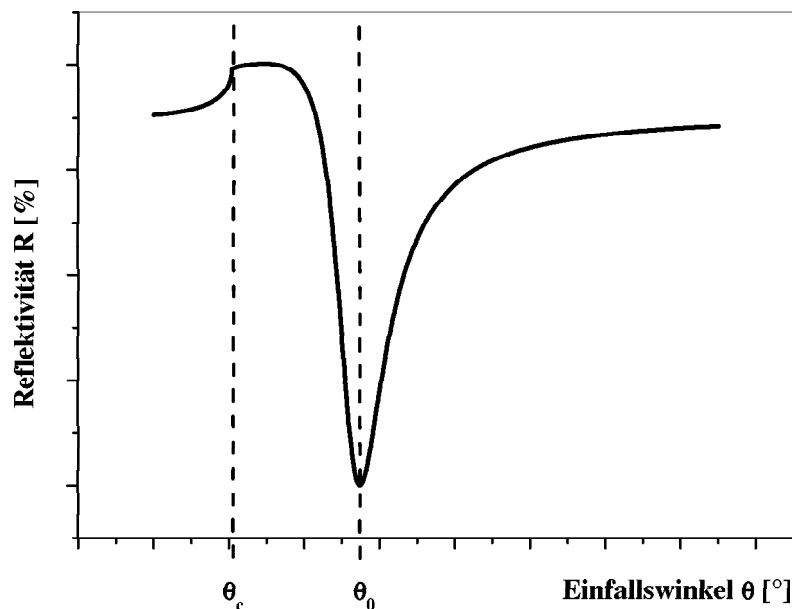
**Abb. 4.38:** Die Dispersionslinie eines Photons in Luft besitzt bei allen Frequenzen keinen gemeinsamen Schnittpunkt mit der Dispersionskurve des Oberflächenplasmons (a). Erst durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_D$  des Dielektrikums, z. B. durch Verwendung von Glas, kommt es zu einem gemeinsamen Schnittpunkt (b). Jedoch liegt der Schnittpunkt noch nicht zusammen mit der verwendeten Frequenz des eingestrahelten Lichts ( $\omega_L$ ). Durch Variation des Einfallswinkels  $\theta_{ein}$  liegt der Schnittpunkt auf der Lichtfrequenz (c) und es kommt zu einer resonanten Anregung des Oberflächenplasmons.

Der Wellenvektor des Photons muss in Ausbreitungsrichtung angepasst werden. Um aber bei konstanter Laserfrequenz  $\omega_L$  ein Oberflächenplasmon anregen zu können, muss der Impuls des Photons erhöht werden. Dies kann durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_D$ , d. h. durch Verwendung eines höheren Brechungsindex  $n_i$  des Dielektrikums, erfolgen. Eine Möglichkeit stellt hier die *Prismenkopplung* (Abb. 4.39) in Otto- [165] (a) oder Kretschmann-Konfiguration [166] (b) dar. Eine weitere Möglichkeit der Angleichung der Wellenvektoren kann durch *Gitterkopplung* (Abb. 4.39) erfolgen (als weiterführende Literatur siehe auch [167]).



**Abb. 4.39:** Anregung von Oberflächenplasmonen durch unterschiedliche experimentelle Anordnungen. Bei der *Otto-Konfiguration* (a) befindet sich ein Luftspalt zwischen Prisma und Metallschicht. Der direkte Kontakt zwischen Prisma und Metallfilm führt zur *Kretschmann-Konfiguration* (b). Die Anpassung des Wellenvektors  $k_{x,Licht}$  an den Vektor des Oberflächenplasmons kann auch durch *Gitterkopplung* (c), d. h. die Oberfläche des Metallfilms ist periodisch strukturiert, erfolgen. Hierbei erfolgt eine Erhöhung des Photonen-Lateralimpulses um ein Vielfaches des reziproken Gittervektors, umso dem Wellenvektor zu entsprechen.

Die Dispersionslinie des Photons schneidet die Dispersionskurve des Plasmons (Abb. 4.38, b), jedoch liegt der Schnittpunkt nicht auf der Frequenz des verwendeten (Laser-)Lichts. Wie aus Gl. 4-41 ersichtlich, ist der Wellenvektor  $k_{x,D}$  nunmehr nur noch vom Einfallswinkel  $\theta_{ein}$  abhängig, der oberhalb des Grenzwinkels der Totalreflektion  $\theta_c$  liegt. Der Wellenvektor  $k_{x,D}$  kann durch Veränderung des Einfallswinkels des eingestrahlt Lichts dem Wellenvektor  $k_{x,PSP}$  des Oberflächenplasmons angepasst werden (Abb. 4.39). An dem Winkel, an dem  $k_{x,D} = k_{x,PSP}$  ist, kommt es zur resonanten Anregung des Oberflächenplasmons. Aufgrund der Energiedissipation durch das Oberflächenplasmon, zeigt die Reflexionskurve des zur Anregung verwendeten Lichtes bei maximaler Resonanz am Winkel  $\theta_0$  ein Minimum (Abb. 4.40).



**Abb. 4.40:** Reflexionskurve des zur Plasmonenanregung verwendeten Lichts in Abhängigkeit vom äußeren Einfallswinkel (Kretschmann-Konfiguration am Prisma/Gold/Luft-System). Die Intensität des reflektierten Strahls nimmt zunächst zu, bis sie bei  $\theta_c$  ihr Maximum erreicht. Mit zunehmendem Einfallswinkel kommt es schließlich bei einem bestimmten Winkel  $\theta_0$  zur Resonanz und die Intensität des reflektierten Lichts fällt auf ein Minimum ab.

Dieser Resonanzwinkel kann mittels Gl. 4-42 berechnet werden, wobei für das Verhältnis von Brechungsindex ( $n$ ) zur Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) die Gleichung  $(n+ik)^2 = \epsilon' + i\epsilon'' = \epsilon$  gilt.



$$\Theta_o = \arcsin \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{(\epsilon_M + \epsilon_D) \cdot \epsilon_{Prisma}}} \quad \text{Gl. 4-42}$$

Die Breite der Reflexionskurve wird von der inneren Dämpfung beeinflusst, d. h. je größer der imaginäre Anteil der Dielektrizitätskonstanten des Metalls ist, umso breiter wird die Reflexionskurve.

#### 4.2.2.1 Otto-Konfiguration

In der Otto-Konfiguration [165] (Abb. 4.39 (a)) hat das evaneszente Feld des eingestrahnten Lichts einen mit einem Dielektrikum gefüllten Spalt zwischen Prisma und Metall zu überbrücken, um dann ein Oberflächenplasmon an der Grenzfläche Dielektrikum/Metall anregen zu können. Der Spalt muss dabei in der Größenordnung des evaneszenten Feldes in z-Richtung sein, da das evaneszente Feld sonst nicht die Metalloberfläche erreichen würde. Das Dielektrikum ist zumeist Luft, kann aber auch eine andere Materie sein, die jedoch eine geringere optische Dichte als das verwendete Prisma aufweisen muss. Der Nachteil der Otto-Konfiguration besteht in dem schwer einzustellenden Luftspalt.

#### 4.2.2.2 Kretschmann-Konfiguration

Durch Aufdampfen einer dünnen Metallschicht auf die Prismenbasis wird die Kretschmann-Konfiguration realisiert [166] (Abb. 4.39 (b)). Es erfolgt eine Anregung eines Plasmons an beiden Seiten des Metallfilms, wobei für die analytische Anwendung nur das Plasmon an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum eine Rolle spielt, da dieses sensitiver für die Änderungen der Dielektrizitätskonstante an der Grenzfläche ist. Dadurch ist auch die Dicke des Metallfilms limitiert. Bei zu dicken Metallfilmen erfolgt eine Dämpfung des an der Grenzfläche Prisma/Metall erzeugten evaneszenten Feldes, so dass dieses Feld nicht mehr in der Lage ist, das für die Analytik erforderliche Plasmon an der Grenzfläche

Metall/Dielektrikum anzuregen. Der Metallfilm muss eine optimale Dicke zur effizienten Anregung des Oberflächenplasmons aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Kretschmann-Konfiguration benutzt. Als Metall wurde Gold verwendet, da es verglichen mit Silber, oxidationsunempfindlich ist.

### 4.2.3 Einfluss dünner dielektrischer Schichten auf die Anregung des Oberflächenplasmons

Durch das Aufbringen einer dünnen dielektrischen Grenzsicht auf die Metalloberfläche durch Physi- oder Chemisorption ändert sich die Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon_D$ ) an der Grenzsicht und damit auch die Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons. Die daraus resultierende Impulsänderung des Oberflächenplasmons bedingt eine Verschiebung des Resonanzwinkels. Die Größenordnung der Verschiebung des Resonanzwinkels ( $\Delta\Theta$ , Gl. 4-43) ist dabei proportional zu der Änderung des Brechungsindex ( $\Delta n$ ) und der Filmdicke (Gl. 4-44). Dies gilt für Schichtdicken bis ca.  $\lambda/2$ .

$$\Delta\Theta = \Theta_1 - \Theta_0 \quad \text{Gl. 4-43}$$

$$\Delta\Theta \propto (N_{\text{Film}} - N_{\text{Dielektrikum}}) \cdot d \quad \text{Gl. 4-44}$$

In Gl. 4-45 wird der Zusammenhang zwischen der komplexen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  und dem komplexen Brechungsindex  $N$  verdeutlicht.

$$\epsilon = N^2 = (n + ik)^2 = n^2 + 2ikn - k^2 = \epsilon' + i\epsilon'' \quad \text{Gl. 4-45}$$

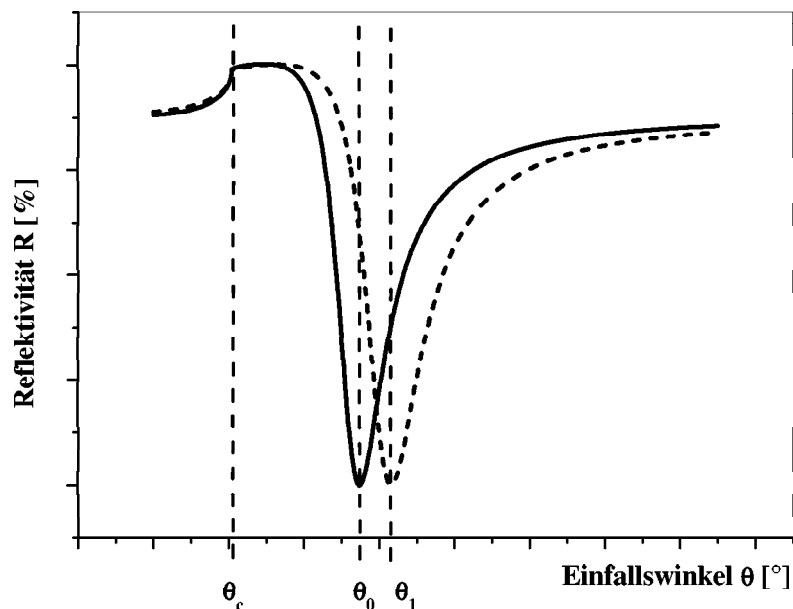
Wobei

- $\epsilon$  = komplexe Dielektrizitätskonstante
- $\epsilon'$  = Realteil der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon' = n^2 - k^2$ )
- $\epsilon''$  = Imaginärteil der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon'' = 2kn$ )
- $k$  = Imaginärteil des Brechungsindex (entspricht der Absorption)
- $N$  = komplexer Brechungsindex

$n$  = Realteil des Brechungsindex

Besteht der aufgetragene Film aus einem nichtabsorbierenden Material, so besitzen der Brechungsindex und die Dielektrizitätskonstante keinen imaginären Anteil. Für die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  gilt dann  $\epsilon' = n^2$ .

Das Aufbringen einer dielektrischen Schicht mit z. B. einem höheren Brechungsindex bedingt dann eine Vergrößerung des gesamten, von dem evaneszenten Feld des Plasmons gesehenen Brechungsindex.



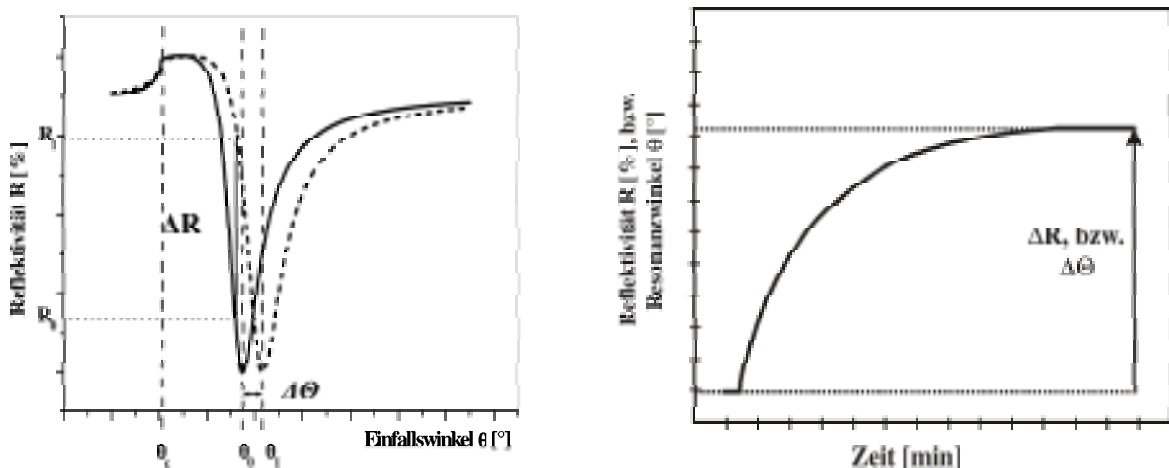
**Abb. 4.41:** Reflexionskurve vor (—) und nach (- - -) Aufbringen eines dünnen dielektrischen Films auf die Goldoberfläche mit einem Brechungsindex  $n_1 > n_0$ .

Hieraus resultiert eine Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Winkeln (Abb. 4.41). Eine Verkleinerung des Brechungsindex würde dementsprechend eine Verschiebung zu kleineren Winkeln bedeuten.

Die in Gl. 4-44 gezeigte Proportionalität stellt den zentralen Punkt der Oberflächenplasmonenspektroskopie (*Surface Plasmon Spectroscopy, SPS*) dar. Diese Proportionalität wird für die Bestimmung der Schichtdicke oder des Brechungsindex eines absorbierten Films ausgenutzt. Unter Zuhilfenahme der Fresnel-Gleichung kann aus der

Winkelverschiebung  $\Delta\theta$  die Schichtdicke  $d$  bestimmt werden. Hierfür muss aber der Brechungsindex des aufgetragenen Materials bekannt sein, da laut Gl. 4-44 unendlich viele Kombinationen aus Filmdicke und Brechungsindex für den experimentell bestimmten Resonanzwinkel existieren. Hierin ist auch die Leistungsfähigkeit dieser Methode beschränkt.

Neben der Aufzeichnung der Reflexionskurve in Abhängigkeit des Einfallswinkels (Abb. 4.41) und die daraus erfolgende Bestimmung der Dickenänderung, kann auch die Änderung des Resonanzwinkels zeitaufgelöst verfolgt werden. Die daraus resultierende *Kinetikkurve* (Abb. 4.42) gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit mit der bestimmte Prozesse, z. B. Adsorptionsvorgänge, an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum ablaufen.



**Abb. 4.42:** Reflexionskurve und dazu gehörige Kinetikkurve. Es kann die zeitliche Änderung der Reflektivität ( $\Delta R$ ) bei festem Winkel oder die zeitliche Änderung des Resonanzwinkels ( $\Delta\theta$ ) beobachtet werden.

Bei der **Kinetikmessung** lassen sich zwei Methoden der Kinetikverfolgung unterscheiden:

- A) Verfolgung der Intensitätsänderung des reflektierten Lichts bei einem konstanten Einfallswinkel in der linear abfallenden Flanke der Reflexionskurve. Einen Nachteil stellen hier etwaige Änderungen in der Breite der Reflexionskurve dar, die dann eine falsche Interpretation bezüglich der Schichtdickenänderung zulassen.

- B) Durch Verfolgung der zeitlichen Änderung des Resonanzminimums. Diese Methode ist unempfindlicher gegenüber Änderungen in der Breite der Reflexionskurve.

Unter der Annahme einer idealen Oberfläche sind die beiden oben genannten Methoden gleichwertig.

Die Durchführung der Oberflächenplasmonenspektroskopie erfolgte an im Max Planck-Institut für Polymerforschung entwickelten und dort aufgebauten Apparaturen (siehe Kapitel 6). Die ebenfalls im Max Planck-Institut für Polymerforschung entwickelte dazugehörige Steuer- und Mess-Software WasPlas [168] und die Auswertungs-Software WinSpall [169] wurde für die Durchführung der Messungen und Auswertungen verwendet.

### **4.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Durch Strukturuntersuchungen mittels der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) können direkte Abbildungen von Oberflächenstrukturen in atomarer, bzw. molekularer Dimension erreicht werden [170-172]. Dabei ist es möglich Nichtleiter und leitfähige Materialien in unterschiedlichster Umgebung (Vakuum, Luft oder Flüssigkeiten) zu untersuchen [172]. Die Möglichkeit, auch in Flüssigkeiten messen zu können, macht die Rasterkraftmikroskopie zu einem unerlässlichen Werkzeug für die Untersuchung biologischer Materialien.

Neben der Abbildung von Oberflächenstrukturen und Topographien, können auch die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Oberflächen und/oder Molekülen gemessen werden [173-175]. Zumeist finden hier funktionalisierte AFM-Spitzen Anwendung [173-175]. Über die Messung der Wechselwirkungen können so Informationen z. B. über biologische Prozesse wie Zell-Zell-Interaktionen, Protein-Membraninteraktionen oder den Aufbau biologischer Membranen gewonnen werden.

### 4.3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie misst extrem kleine Kräfte, die an der Oberfläche eines jeden Materials auftreten. Hierzu wird eine sehr feine Spitze (*engl. tip*) (Abb. 4.43, [176]) aus Si, SiO<sub>2</sub> oder Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> in x- und y-Richtung mittels eines Piezoelements über die Oberfläche der zu untersuchenden Probe geführt (es kann auch die Probe bewegt werden), wodurch es zu einer Abtastung der Oberfläche kommt. Der Kontaktradius der Spitze beträgt normalerweise nur wenige nm bis 100 nm. Durch Anziehungs- oder Abstoßungskräfte [171], die zwischen der AFM-Spitze und der Probenoberfläche auftreten, erfolgt eine Auslenkung der Spitze in z-Richtung. Die Kräfte, die hierbei auftreten, sind u. a. Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, spezifische intermolekulare Wechselwirkungen und sterisch bedingte Abstoßungskräfte.



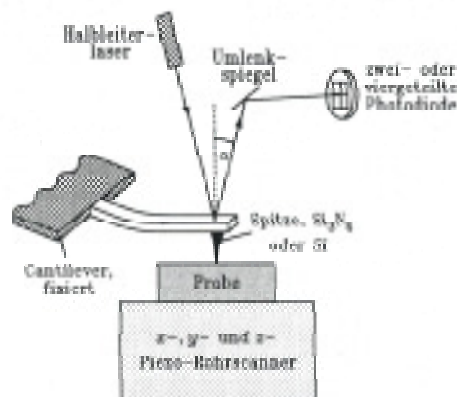
**Abb. 4.43:** AFM-Spitze aus einem Si-Einkristall: Die eigentliche AFM-Spitze (Bild unten rechts und Mitte) wird von einer mikroskopischen Blattfeder (*Cantilever*) getragen (Bild oben). Der Cantilever ist wiederum an einem sogenannten AFM-Chip angebracht, der der Anbringung am Messinstrument dient (Bild unten links). Bild: Nanoscience Instruments, Inc.

Die Ablenkung der AFM-Spitze biegt dabei den Cantilever. Dieser Vorgang wird mit einem auf das freie Ende des Cantilevers fokussierten Laserstrahles detektiert (Abb. 4.44). Durch die Bewegung des Cantilevers erfolgt eine Ablenkung des reflektierten Laserstrahls, d. h. der Reflexionswinkel  $\alpha$  ändert sich. Eine zwei- oder viergeteilte Photodiode misst dabei die Abweichungen des Reflexionswinkels, indem der reflektierte Laserstrahl auf der Photodiode durch die Bewegung der AFM-Spitze und somit des Cantilevers wandert. Die

auf tretenden Kräfte  $F$  werden hier nicht direkt bestimmt, sondern können unter zur Hilfenahme des *Hook'schen Gesetzes* (Gl. 4-46) berechnet werden.

$$F = -k \cdot z \quad \text{Gl. 4-46}$$

Der Cantilever verhält sich dabei wie eine Blattfeder, die eine bestimmte Federkonstante  $k$  besitzt. Die Ablenkung in z-Richtung kann durch die Veränderung des Reflexionswinkels bestimmt werden. Dadurch ist es möglich, eine Oberflächentopographie von der Probe zu erstellen.



**Abb. 4.44:** Prinzip AFM. Die AFM-Spitze wird über die Probe geführt (entweder wird die Probe mittels Piezoelement in x- und y-Richtung bewegt oder die AFM-Spitze). Die Ablenkung, die die Spitze erfährt, wird mittels eines auf den Cantilever fokussierten Laserstrahls detektiert.

Die Auflösung der Oberflächentopographie ist besonders von der Messmethode und der Feinheit der Spitze abhängig (Abb. 4.45).



**Abb. 4.45:** Die sehr feine AFM-Spitze ist in der Lage auch sehr feine Oberflächenstrukturen zu erkennen, wo hingegen die stumpfe AFM-Spitze wegen ihres erhöhten Kontaktradius, nur gröbere Strukturen erkennen kann.

### 4.3.2 Messmethode

Für die Untersuchung unterschiedlicher Probenmaterialien (weiches oder hartes Material) muss nicht nur eine gründliche Auswahl der AFM-Spitzen (Material, Kontaktradius) und Cantilever (bzgl. Federkonstante) und der äußeren Parameter wie z. B. die Geschwindigkeit der Messung (Scanrate) und der angewendeten Kräften (Anpresskraft der AFM-Spitze) erfolgen, auch das Messverfahren muss gründlich ausgewählt werden. Durch Auswahl der falschen Messparameter oder des falschen Messverfahrens kann die Oberfläche der Probe zerstört werden. Auch kann die AFM-Spitze in das Probenmaterial eindringen, so dass keine Messung an der Oberfläche mehr stattfinden. Es kommt dann zu Messung von Artefakten.

#### 4.3.2.1 Kontakt-Modus (engl. *contact mode*)

Dieser Mess-Modus beinhaltet, dass die AFM-Spitze in permanenten Kontakt mit der zu untersuchenden Oberfläche steht. Die Kräfte, die zwischen der Probenoberfläche und der AFM-Spitze auftreten, führen zur Auslenkung (*engl. deflection*) der AFM-Spitze, bzw. des Cantilevers in z-Richtung. In diesem Fall führt also die Auslenkung der AFM-Spitze zum Mess-Signal, bzw. zur Oberflächentopographie. Diese Variante des Kontakt-Modus (*contact mode*) wird auch als *variable-deflection mode* bezeichnet. Eine häufig genutzte Variante des Kontakt-Modus stellt die Messung bei konstant gehaltenen Kräften (*constant force mode*) zwischen AFM-Spitze und Probe dar und wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Über einen Rückkopplungsmechanismus wird mittels z-Piezo die Auflagekraft der AFM-Spitze konstant gehalten. Die AFM-Spitze wird also so justiert, dass die Auslenkung des Cantilevers immer konstant ist. Die Information über die Oberflächentopographie kommt hier von dem Steuersignal für den z-Piezo.

Der Kontakt-Modus liefert im Allgemeinen sehr hohe Auflösungen. Er eignet sich aber wegen der hohen lateralen Scherkräfte oft weniger zur Untersuchung von weichen Materialien. Zu leicht kann die AFM-Spitze das zu untersuchende Material penetrieren, bzw. zerstören.



#### 4.3.2.2 Kontaktfreier Modus (engl. non-contact mode)

Ein oszillierender, relativ unflexibler Cantilever wird bei dieser Methode über die Probenoberfläche geführt, wobei die AFM-Spitze die Probenoberfläche nicht berührt. Die AFM-Spitze befindet sich zwar in einem bestimmten Abstand von 2-20 nm [103] zur Probenoberfläche, aber immer noch in einem Bereich, wo Anziehungskräfte (Van-der-Waals-Kräfte) auftreten. Die hier auftretenden Kräfte zwischen AFM-Spitze und Probe sind sehr klein und liegen in der Größenordnung von pN. Die Schwingungsamplitude eines mit einer Eigenfrequenz  $\omega_0$  zur Oszillation angeregten Cantilevers ergibt sich aus der Federkonstante des Cantilevers und der Anregungsenergie der Biegefeder. Wird die Spitze nun der Oberfläche in dem oben beschriebenen Bereich genähert, so wird die Eigenfrequenz  $\omega_0$  des Cantilevers von dem Van-der-Waals-Potential überlagert. Dies führt zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz  $\delta\omega = \omega - \omega_0$ . Die Amplitude der Schwingung bei  $\omega_0$  nimmt ebenfalls ab. Die Schwingungsamplitude des Cantilevers stellt somit ein Maß für den Abstand der AFM-Spitze zur Oberfläche dar. Die Messung der Amplitude erfolgt ebenfalls über die Änderung des Reflexionswinkels des Laserstrahls. Über einen Regelkreis (*Feed-back loop*) wird ein konstanter Abstand der AFM-Spitze zur Oberfläche eingestellt. Wegen des relativ großen Abstands der AFM-Spitze zur Probenoberfläche ist die Auflösung geringer als in anderen Modi. Die Methode eignet sich jedoch besser zur Untersuchung von sehr weichen Proben.

#### 4.3.2.3 Periodischer Kontakt-Modus (engl. intermittent-contact mode, tapping mode)

Diese Methode verbindet die Vorteile der beiden oben genannten Messmethoden. Wie in der kontaktfreien Messmethode wird hier ein oszillierender, sehr steifer Cantilever verwendet, da sonst die AFM-Spitze die Adhäsionskräfte, die z. B. durch einen adsorbierten Wasserfilm auf der Probe verursacht sein können, nicht überwinden kann. Dieser wird aber, anders wie bei der kontaktfreien Methode, sehr nahe an die Probenoberfläche herangeführt, so dass die AFM-Spitze periodisch die Oberfläche berührt, bzw. abklopft. Die Oszillation der Spitze reicht hier bis in den oberflächennahen Bereich, indem auch Abstoßungskräfte auftreten. Das Messprinzip entspricht der kontaktfreien

Methode. Die Oberflächentopographie wird durch eine Messung bei einer konstanten Amplitude (*constant amplitude scan*) von dem Steuersignal für den z-Piezo abgeleitet.

Vorteil dieser Methode ist die verbesserte Auflösung im Vergleich zur kontaktfreien Methode. Sie ist aufgrund praktisch vollständig abwesender lateraler Kräfte weniger oder gar nicht destruktiv und eignet sich daher im Gegensatz zum Kontakt-Modus besser zur Untersuchung von weichen Proben und schlecht an der Oberfläche des Probenträgers haftenden Materials.

#### 4.3.2.4 Aufzeichnung der Phase (engl. Phase Imaging)

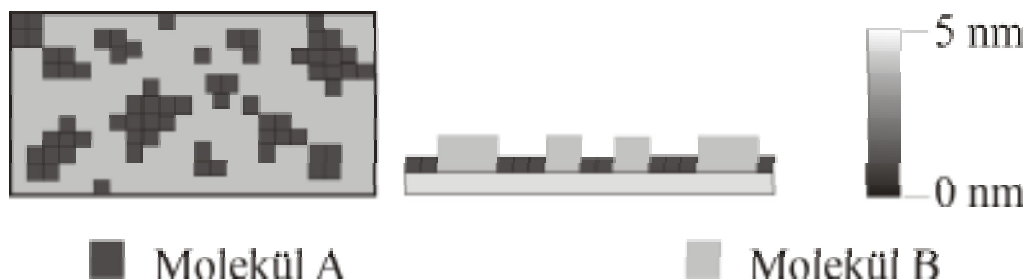
Diese Methode kann simultan mit der *tapping mode* Technik angewendet werden, wobei ein oszillierender Cantilever über die Probe geführt wird. Durch Wechselwirkungen zwischen AFM-Spitze und Oberfläche kann es hierbei nicht nur zu einer Veränderung der Amplitude (siehe oben) kommen, sondern die Amplitude kann in ihrer Phase verschoben sein (z. B. durch Adhäsion oder (Visko-) Elastizität). Die entsprechende Phasenverschiebung wird im *phase imaging* gemessen. Die Phasenverschiebung kann mit spezifischen Materialeigenschaften, die die Wechselwirkungen zwischen Probe und AFM-Spitze beeinflussen, in Korrelation gesetzt werden. Dadurch können auf der Probenoberfläche Gebiete mit unterschiedlichen Materialeigenschaften detektiert werden. Da diese Methode simultan mit der *tapping mode* Technik angewendet werden kann, wird auch die Oberflächentopographie bestimmt.

#### 4.3.2.4 Bestimmung der relativen Oberflächenbelegung mittels Bildanalyse

Die oben genannten Messmethoden können auch zur Auswertung des relativen Oberflächenanteils verschiedener Molekülspezies zueinander verwendet werden, sofern sich die unterschiedlichen Molekülspezies in ihrer Höhe oder in ihren Materialeigenschaften unterscheiden. Die Darstellung der Oberflächentopographie erfolgt in einer Farbcodierung, wobei verschiedene Hell- und Dunkeltöne für verschiedene Höhen oder Materialeigenschaften stehen (Abb. 4.46). Die Unterschiede können dann anhand der

Farbpixel ausgezählt und in einem Histogramm dargestellt werden. Die Flächen der sich ergebenden Gaußverteilungen der Höhen- oder Materialunterschied [177] können dann zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Das Verfahren eignet sich für Systeme, die eine Phasenseparation, d.h. eine Anordnung der verschiedenen Molekülspezies in Domänen aufweisen, bzw. scharf von einander abgegrenzt sind.



**Abb. 4.46:** Schematische (AFM-)Aufsicht und Seitenansicht auf eine mit zwei unterschiedlichen Molekülen assemblierte Oberfläche. Mittels Bildanalyseverfahren kann das Verhältnis von Molekül A zu Molekül B auf der Oberfläche analysiert werden. Das Höhenprofil (rechts) zeigt die Höhe der unterschiedlichen Bereiche an. Für eine solche Probe ergibt sich ein Anteil an Molekül A von 28,5 % und folglich ein Anteil von 71,5 % für Molekül B.

## 4.4 Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (FRAP)

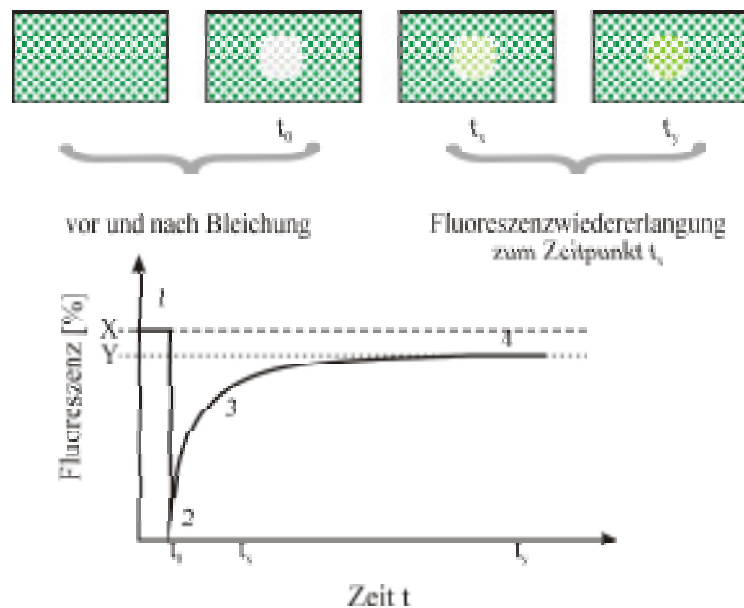
Diese Methode, auch bezeichnet als *fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)*, wurde entwickelt, um die laterale Diffusion, bzw. laterale Beweglichkeit von Molekülen (Lipide, Proteinen), eingebettet in einen dünnen Film (Lipidmembran), zu untersuchen [178]. FRAP stellt somit ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der Fluidität biologischer und biomimetischer Membranen dar.

### 4.4.1 Grundlagen FRAP

Die Grundlage dieser Methode bildet die Tatsache, dass Fluoreszenzfarbstoffe durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden

können. Gleichzeitig findet aber auch eine irreversible Zerstörung (Photolyse) des chromophoren Zentrums des Farbstoffmoleküls statt. Es kommt so zur Löschung der Fluoreszenz. Dieser Mechanismus kann durch intensive Bestrahlung beschleunigt werden.

Die Zielstruktur (Lipidmolekül, Protein), dessen laterale Mobilität untersucht werden soll, wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent gekoppelt. Normalerweise ist die fluoreszenzmarkierte Zielstruktur in einen dünnen Film (z. B. eine Lipidmembran) eingebettet. Eine bestimmte Fläche der Probe wird kurzzeitig mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge und hoher Intensität bestrahlt. Hierdurch kommt es zur Fluoreszenzlöschung in diesem Bereich. Durch Diffusion erfolgt eine Vermischung von ungebleichten Molekülen der Umgebung mit den gebleichten Molekülen in diesem Gebiet, sofern die fluoreszenzmarkierten Moleküle über eine gewisse laterale Mobilität verfügen. Mit der Zeit nimmt die Fluoreszenzintensität in dem gebleichten Gebiet wieder zu, bis das System ein Gleichgewicht erreicht (Abb. 4.47).



**Abb. 4.47:** FRAP-Messung: (1) Die Intensität der fluoreszierenden Probe wird über einen kurzen Zeitraum gemessen, um eine Basislinie zu erhalten. (2) Danach erfolgt eine kurze Belichtung einer bestimmten Fläche mit hoher Intensität (Laser). Es kommt so zur Fluoreszenzlöschung in diesem Bereich ( $t_0$ ). (3) In Abhängigkeit von der Zeit nimmt die Fluoreszenzintensität im gebleichten Bereich durch Diffusion wieder zu ( $t_x$ ). (4) Die Probe kehrt in ein Gleichgewicht zurück, wo die Fluoreszenzintensität der gebleichten Fläche sich nicht mehr ändert ( $t_y$ ). Die prozentuale Fluoreszenzwiedererlangung  $R$  kann mit  $(Y/X) \cdot 100$  wiedergegeben werden.

Durch die Auswertung der Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzwiedererlangung kann der Diffusionskoeffizient  $D$  und die relative Fluoreszenzwiedererlangung  $R$  ermittelt werden. Vor der Bleichung besitzt die Fluoreszenzintensität den Wert  $I_0$ . Nach der Bestrahlung nimmt dieser Wert auf  $I_{FP}$  ab, um dann mit der Zeit wieder anzusteigen, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Die Auswertung einer solchen Kinetik liefert den lateralen Diffusionskoeffizienten  $D$  der Moleküle (Gl. 4-47).

$$D = \frac{w}{4\tau_{1/2}} \cdot \gamma \quad \text{Gl. 4-47}$$

Dabei muss der Radius  $w$  des Laserstrahls bzw. der gebleichten Fläche sowie der Parameter  $\gamma$  berücksichtigt werden, in den der Grad der Fluoreszenzlöschung und das Strahlprofil mit einfließen.  $\tau_{1/2}$  stellt die Diffusionszeit dar, in der die Fluoreszenz ihre halbmaximale Intensität erreicht hat [103]. Der Diffusionskoeffizient gibt die laterale Mobilität der Moleküle wieder. Für Lipidmoleküle in Biomembranen wird ein Diffusionskoeffizient im Bereich von  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  [8,10,57] angegeben. Dieser Wert steht für eine fluide biologische Membran. Die relative Fluoreszenzwiedererlangung  $R$  gibt die prozentuale Menge an beweglichen Molekülen an.

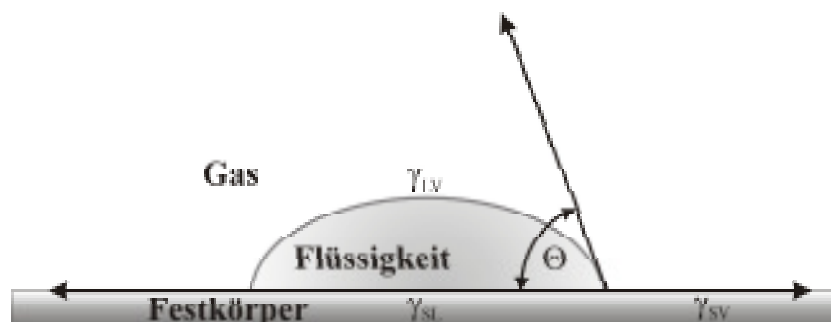
## 4.5 Kontaktwinkel-Messung

Die Oberflächenspannung, bzw. die Grenzflächenspannung stellt ein wichtiges Phänomen für die Beurteilung von Oberflächen und Materialeigenschaften dar. Eine Methode, die zur Messung der Oberflächenspannung bzw. Grenzflächenspannung benutzt werden kann, ist die Kontaktwinkel-Messung. Mit dieser Methode kann die Benetzbarkeit von Oberflächen beurteilt werden und es können so Rückschlüsse auf die Qualität einer Oberfläche bzw. auf die Oberflächenmorphologie gezogen werden. Die Kontaktwinkelmessung findet so eine verbreitete Anwendung in der Beurteilung von Oberflächen bzw. von Materialien, die mit anderen Oberflächen in Kontakt gebracht werden. Beispiele finden sich u. a. in der Beurteilung der Benetzbarkeit von Arzneistoff/Hilfsstoff-Kompositen (beeinflusst die

Löslichkeit und damit die Wirkstoff-Freisetzung), Stabilitätsbeurteilung von Emulsionen, des Spreitungsverhaltens von Insektiziden/Herbiziden und Anstrichen, Reinheit von Si-Waferoberflächen. In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften der in dieser Arbeit erzeugten Oberflächen zu beurteilen. Die Kontaktwinkel-Messung wurde somit als weitere Methode zur Beurteilung des Architekturaufbaus des submembranen Raums bzw. der Submonolage verwendet.

#### 4.5.1 Grundlagen Kontaktwinkel

Wird ein Tropfen einer Flüssigkeit auf einer waagerechten Festkörperoberfläche platziert, ergeben sich zwei Möglichkeiten. Entweder der Tropfen zerfließt und spreitet auf der Oberfläche (Kontaktwinkel  $\Theta = 0^\circ$ ) oder er behält seine Tropfenform und der Kontaktwinkel nimmt eine endliche Größe an. Unter Vernachlässigung der rheologischen Eigenschaft der Flüssigkeit und der Gravitation, ist die Tropfenform und damit der Kontaktwinkel (Abb. 4.48) nur Abhängig von den Kohäsionskräften innerhalb des Tropfens und den Adhäsionskräften die zwischen der Festkörperoberfläche und der Flüssigkeit herrschen [59]. Die freie Energie der Festkörperoberfläche beeinflusst die Tropfenform (abgeflachte oder sphärische Form), wobei die Tropfenbildung allein schon von der freien Energie der Flüssigkeit abhängt.



**Abb. 4.48:** Flüssigkeitstropfen auf einer Festkörperoberfläche. Kontaktwinkel  $\Theta$ , Grenzflächenspannung  $\gamma$  zwischen den Oberflächen Festkörper (S), Flüssigkeit (L) und Gas (V).

Die Kräfte, die an einer Oberfläche oder Grenzfläche auftreten, entsprechen der Grenzflächenspannung in diesem System. Durch das Aufbringen eines Flüssigkeitstropfens auf eine Oberfläche, stehen drei verschiedene Phasen (Festkörper (S)/Flüssigkeit (L)/Gas (V)) in Kontakt mit einander. Vergrößert man nun die Grenzfläche Flüssigkeit/Festkörper durch Erhöhung des Tropfenvolumens, so hat das folgenden Einfluss auf die freie Energie, und somit auf die Grenzflächenspannung der beteiligten Oberflächen:

- ✧ Zunahme der freien Energie an der Grenzfläche Festkörper  $S \leftrightarrow$  Flüssigkeit  $L = \gamma_{SL}$
- ✧ Abnahme der freien Energie an der Grenzfläche Festkörper  $S \leftrightarrow$  Gas  $V = \gamma_{SV}$
- ✧ Zunahme der freien Energie an der Grenzfläche Flüssigkeit  $L \leftrightarrow$  Gas  $V = \gamma_{LV}$

Aus dieser Überlegung ergibt sich die Young'sche Gleichung (Gl. 4-48) für ein ideales System im Gleichgewicht. Die Young'sche Gleichung beschreibt das Verhältnis zwischen freier Energie  $\gamma$  einer Oberfläche und des resultierenden Kontaktwinkels  $\Theta$  [59].

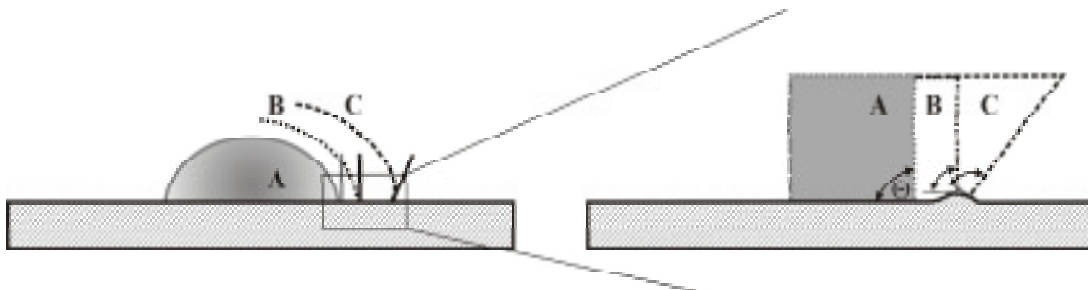
$$\gamma_{LV} \cdot \cos \Theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \qquad \text{Gl. 4-48}$$

Bestehen keine Wechselwirkungen zwischen Festkörperoberfläche und Flüssigkeit, so würde der Kontaktwinkel  $180^\circ$  betragen. Findet hingegen komplette Benetzung statt, so beträgt der Kontaktwinkel  $0^\circ$ . Von Benetzen wird dann gesprochen, wenn ein Kontaktwinkel  $\Theta < 90^\circ$  vorliegt. Eine solche Oberfläche wird als hydrophil bezeichnet, wenn die verwendete Flüssigkeit sehr polar ist (Bsp. Wasser). Bei Kontaktwinkeln  $> 90^\circ$  hingegen spricht man von Unbenetzbarkeit [179]. Ist die verwendete Flüssigkeit auch hier polar (z. B. Wasser), so spricht man von einer hydrophoben Oberfläche. Es wird ersichtlich, dass zur Beurteilung der Oberfläche auch die Art der verwendeten Flüssigkeit eine wichtige Rolle spielt. Auch darf die Flüssigkeit die Oberfläche in keiner Weise angreifen, d. h. die Flüssigkeit darf die Oberfläche nicht lösen, korrodieren oder irgendwelche anderen chemischen Veränderungen an ihr vornehmen.

### 4.5.2 Hysterese in Kontaktwinkelmessungen

Bisher wurde nur ein ideales System betrachtet. Misst man aber den Kontaktwinkel einer realen Oberfläche bevor und nach dem das Flüssigkeitsvolumen des Tropfens verringert wurde, so ergeben sich für nicht ideale Oberflächen unterschiedliche Kontaktwinkel für die beiden Situationen. Der Kontaktwinkel, der nach Zugabe (aber vor der Bewegung der 3-Phasengrenzlinie) eines bestimmten Flüssigkeitsvolumens gemessen wird (als fortschreitender Kontaktwinkel, engl. *advancing contact angle*  $\Theta_{adv.}$  bezeichnet), ist bei einer nicht idealen Oberfläche in der Regel signifikant größer als der Kontaktwinkel, der nach Verringerung des Tropfenvolumens und vor der Bewegung der 3-Phasengrenzlinie gemessen wird (auch als rückschreitender Kontaktwinkel, engl. *receding contact angle*  $\Theta_{rec.}$  bezeichnet). Die Differenz aus  $\Theta_{adv.} - \Theta_{rec.}$  ergibt die Hysterese des Kontaktwinkels. Der Grund für das Auftreten einer Kontaktwinkelhysterese  $\Delta\Theta$  ist mannigfaltig und wird nachfolgend diskutiert:

- ✧ *Oberflächenrauigkeit.* Viele Oberflächen weisen eine raue Oberflächenstruktur im submikroskopischen Bereich auf. Die Grenzfläche des Tropfens folgt der Struktur der Oberflächenrauigkeit. Makroskopisch erscheint der Kontaktwinkel des Tropfens an einer rauhen Oberfläche anders, als dies im submikroskopischen Bereich der Fall ist (Abb. 4.49). Betrachtet man den in Abb. 4.49 gezeigten Fall, so erscheint der Kontaktwinkel nach Überschreiten der Kuppe der Oberflächenunebenheit als  $> 90^\circ$ . Der tatsächliche Kontaktwinkel würde bei genauer Betrachtung der Grenzfläche Tropfen/Oberfläche weiterhin  $90^\circ$  betragen.



**Abb. 4.49:** Expansion eines Tropfens auf einer unebenen Oberfläche. Die linke Abb. verdeutlicht die makroskopische Situation, wohingegen rechts die submikroskopische Situation wiedergegeben ist. Der unter C (links) gezeigte Tropfen weist scheinbar einen Kontaktwinkel  $> 90^\circ$  auf, der aber bei genauer Betrachtung ebenfalls  $90^\circ$  (Fall A u. B) beträgt [43].



- ✧ *Heterogenität.* Befinden sich auf der Oberfläche chemisch unterschiedliche Substanzen oder Verunreinigungen, die unterschiedliche Oberflächenspannungen bedingen, spiegelt sich dies auch im Kontaktwinkel wider. Der expandierende (advancing), bzw. zurückschreitende (receding) Flüssigkeitstropfen würde unterschiedlich hydrophobe und hydrophile Bereiche sehen. Der Tropfen wird während der Expansion an den hydrophoben Bereichen festgehalten und umgekehrt bei Zurückschreiten an den hydrophilen Bereichen.
- ✧ *Neuorientierung.* Treten die oberflächlichen Moleküle in Kontakt mit dem Tropfen, so können sich die Moleküle neu orientieren. Z. B. finden Neuorientierungen von polaren Gruppen in apolaren Flüssigkeiten und umgekehrt statt.
- ✧ *Löslichkeit.* Lösen sich Bestandteile der Oberfläche auf, treten ebenfalls Heterogenitäten der Oberfläche auf. Es können auch gelöste Stoffe an der Grenzfläche adsorbieren und das Expandieren oder Zurückschreiten des Tropfens behindern.
- ✧ *Grenzflächenspannung.* Die auftretenden Grenzflächenspannungen können große Kräfte auf die betreffende Oberfläche ausüben. Diese Kräfte können an der Benetzungslinie, besonders bei weichen Oberflächen, bestehend z. B. aus Polymeren, zu mechanischen Deformationen der Oberfläche führen.
- ✧ *Adsorption und Desorption von Flüssigkeitsmolekülen.* Durch Desorption oder Adsorption von Flüssigkeitsmolekülen tritt Energieverlust auf, was sich im fortschreitenden bzw. zurückschreitenden Kontaktwinkel widerspiegelt.



## **5 Ergebnisse und Diskussion**

### **5.1 Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembran (sBLM's)**

Wie schon in Kapitel 2 erläutert, ist das erste Teilziel dieser Arbeit die Entwicklung einer festkörperunterstützten Membran mit lateraler Verdünnung der Submonolage. Daran soll die reversible Hemmung der Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten (siehe Kapitel 1.4.2.1) untersucht werden. Vorausgegangene Arbeiten von H. Wieder [60] konnten die Reversibilität der Annexin-Hemmung nicht zeigen, obwohl es möglich war, das Streptavidin kompetitiv durch das D-Desthiobiotin von seiner Bindungsstelle am Annexin V zu verdrängen (siehe Kapitel 3). Als Grund für die fehlende Reversibilität wird die geringe Mobilität der Lipide in der Membran diskutiert [60]. Außerdem konnte der Anteil an kovalent gebundenem Lipid bisher praktisch nicht kontrolliert werden (siehe Kapitel 3). Für eine bessere Kontrolle der Ankerdichte werden sBLM's auf Basis binärer Submonolagen aus 2-Mercaptoethanol und DPPTE untersucht (vgl. Kapitel 3). Bezüglich des Aufbaus der Submonolage und der sBLM werden die bereits in Kapitel 3 vorgestellten beiden Präparationstechniken (Einschritt-Methode (*Koadsorption*), bzw. Zwei-Schritt-Methode [145-147,180-184] (*2-step self-assembly*)) untersucht und diskutiert.

#### **5.1.1 Aufbau der binären Submonolage aus 2-Mercaptoethanol/DPPTE, 2-step self-assembly versus Koadsorption**

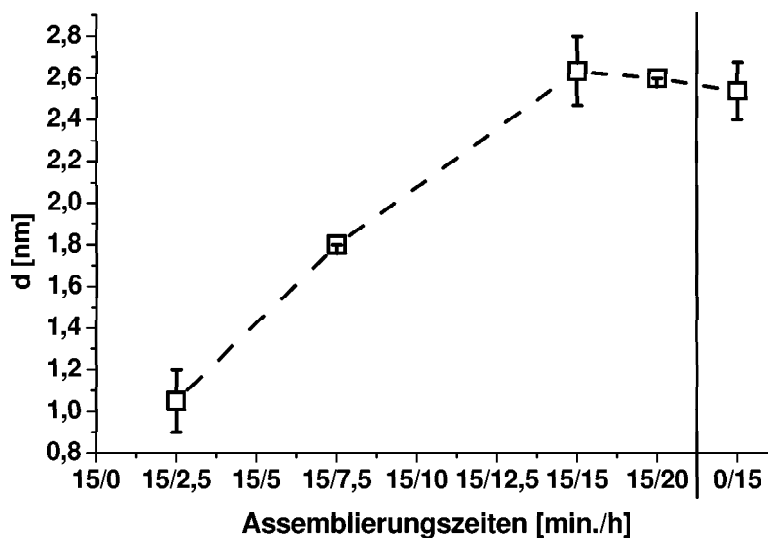
Orientierende Untersuchungen zur Herstellung von sBLM's auf der Basis von binären Submonolagen zeigten, dass die Einschritt- gegenüber der Zweischritt-Methode deutliche Nachteile besitzt. Die Nachteile bestehen erstens in der schlechteren Kontrolle des

Submonolagenaufbaus (siehe AFM-Messungen, Kapitel 5.1.1.3) und zweitens in schlechteren elektrischen Eigenschaften (Kapitel 5.1.2.2) der fertigen sBLM. Deshalb wurde vornehmlich die Zweischritt-Methode (*2-step self-assembly*) näher untersucht.

### 5.1.1.1 Optische Schichtdicken der binären Submonolagen

Die Präparation der Submonolage erfolgte in einem zweistufigen Prozess (*2-step self-assembly*, siehe Kapitel 3). Zunächst wurde hierbei eine Monolage aus 2-Mercaptoethanol auf die zuvor frisch präparierte, auf LaSFN9-Glas thermisch aufgedampfte Goldschicht aufgebracht, indem das Goldsubstrat in eine 2,8 mM Lösung von 2-Mercaptoethanol in Chloroform für 15 Minuten aufbewahrt und anschließend gründlich mit Chloroform gespült wurde. Anschließend erfolgt ein zweiter Präparationsschritt in einer 1 mM DPPTE-Lösung in Chloroform. Der Träger wurde dann ebenfalls gründlich mit Chloroform gespült, in einem leichten Stickstoffstrom getrocknet und sofort verwendet. Alle SPS-Messungen erfolgten in einer 0,1 M NaCl-Lösung bei 37° C.

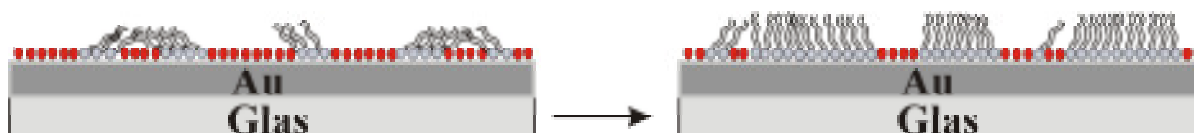
In Abb. 5.1 ist die optische Dickenzunahme der Submonolage als Funktion der Zeit für den zweiten Assemblierungsschritt gezeigt.



**Abb. 5.1:** Optische Schichtdickenzunahme der binären Submonolage aus 2-Mercaptoethanol und DPPTE (15 min./diverse Zeiten in Stunden). Zum Vergleich wurde eine monomolekulare Submonolage aus DPPTE (15 h) assembliert (0/15).

Die relativ kurze Assemblierungszeit des ersten Präparationsschritts wurde gewählt, um geringe Defekte in der 2-Mercaptoethanol-Schicht zu erhalten, die dem DPPTE quasi als Keimbildungszentrum für den Austausch dienen [180,184]. Die Assemblierungszeit des zweiten Schritts wurde zwischen 2,5 h (15/2,5-Probe) und 20 h (15/20-Probe) variiert. Als Vergleich diente eine Probe, die in einer 1mM DPPTE-Lösung 15 h lang assembliert wurde (0/15-Probe). Alle SPS-Messungen erfolgten in einer 0,1 M NaCl-Lösung bei 37° C. Die in den Ergebnissen angegebenen Fehlergrenzen beziehen sich auf die maximale Abweichung der Messwerte (mindestens 3 verschiedene Proben) vom Mittelwert. Mit Zunahme der Assemblierungszeit erfolgt eine Zunahme der optischen Schichtdicke. Mit der zeitabhängigen Zunahme der DPPTE-Moleküle auf der Oberfläche werden die Moleküle gezwungen, sich stärker auszurichten, was in Abb. 5.2 schematisch dargestellt ist. Die Schichtdicken der 15/15-, der 15/20-Proben bzw. die der monomolekularen Schicht (0/15-Probe) unterscheiden sich kaum und liegen innerhalb der Fehlergrenze. Daraus lässt sich schließen, dass die Verdrängung des 2-Mercaptoethanols durch das DPPTE nach 15 h ( $\Delta d = 2,6 \pm 0,2$  nm ( $n = 1,5$ ; [105], [59], [60],)) praktisch abgeschlossen ist.

Für eine ebenfalls reine DPPTE-Submonolage wird von H. Wieder [60] eine optische Schichtdicke von 2,4 – 2,6 nm ( $n = 1,5$ ) angegeben. Diese Werte konnten hier für die längeren Assemblierungszeiten bestätigt werden.

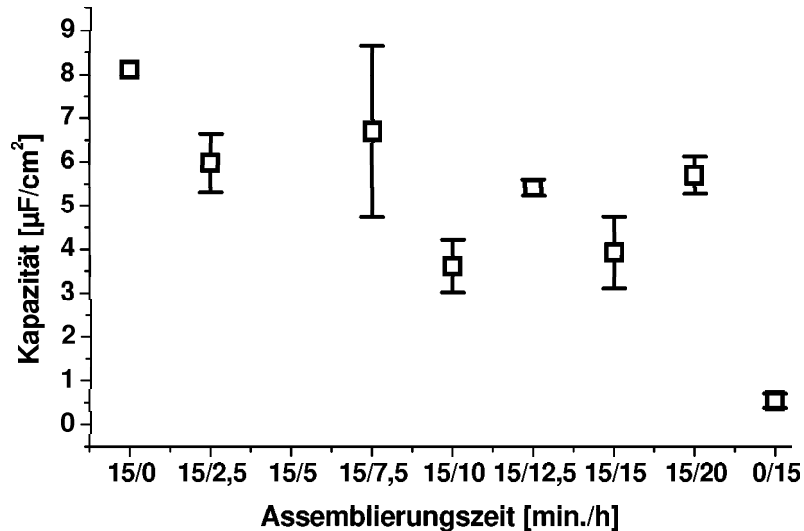


**Abb. 5.2:** Schematische Darstellung der Schichtdickenzunahme durch Erhöhung der Oberflächenkonzentration an DPPTE (längerkettige Moleküle) durch Verlängerung der Assemblierungszeit im zweiten Schritt. Rot dargestellt ist das 2-Mercaptoethanol.

### 5.1.1.2 Elektrochemische Eigenschaften der binären Submonolagen

EIS-Untersuchung erfolgten ebenfalls an den durch 2-step self-assembly präparierten Submonolagen unter den gleichen wie oben beschriebenen Versuchsbedingungen in 0,1 M NaCl-Lösung bei 37 °C.

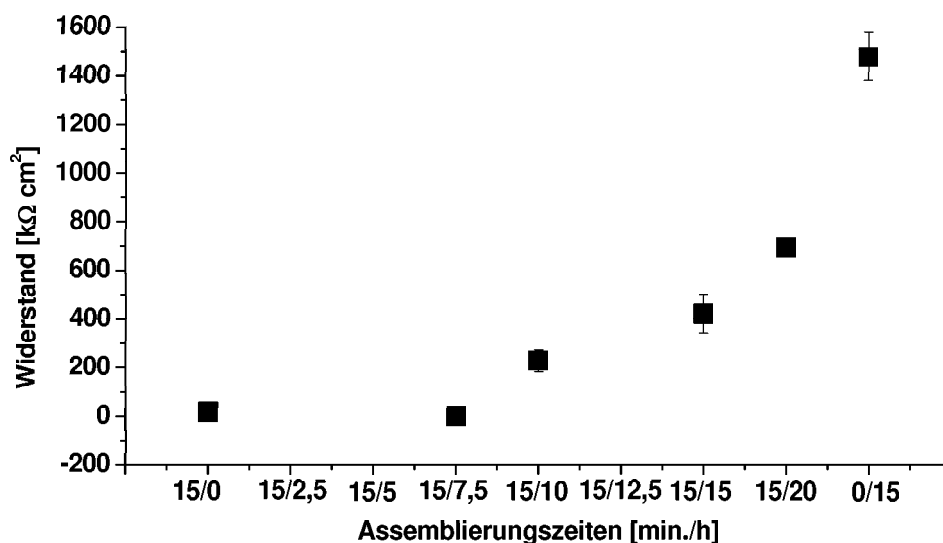
Abb. 5.3 zeigt die Kapazität der Submonolage als Funktion der Zeit für den zweiten Assemblierungsschritt.



**Abb. 5.3:** Kapazitäten verschiedener binärer Submonolagen bestehend aus 2-Mercaptoethanol und DPPTE (15 min./diverse Zeiten in Stunden). Zum Vergleich wurde eine monomolekulare Submonolage aus DPPTE (15 h) assembliert (0/15).

Die Kapazitäten der binären Submonolagen zeigen keinen sichtbaren Trend. Alle Werte liegen jedoch deutlich oberhalb der Kapazitäten der reinen DPPTE-Monolage. Dies zeigt, dass selbst bei den längeren Assemblierungszeiten noch kein vollständiger Austausch des 2-Mercaptoethanols gegen das DPPTE stattgefunden hat, obwohl wie in Kapitel 5.1.1.1 gezeigt, die Schichtdickenzunahme bereits nach einer Assemblierungszeit von 15 h stagnierte.

Eindeutiger ist der Einfluss der Assemblierungszeit auf den Widerstand der Monolage. Abb. 5.4 (unten) zeigt die Zunahme des Widerstandes als Funktion der Assemblierungszeit. Diese weist auf eine Zunahme der oberflächlich gebundenen DPPTE-Moleküle und der damit einhergehenden Verdrängung der 2-Mercaptoethanolmoleküle von der Oberfläche hin, denn höhere Oberflächenbelegungen mit DPPTE führen zu besseren isolierenden Eigenschaften (vergleiche Kapazitäts- und Widerstandswerte der reinen monomolekularen Schichten).



**Abb. 5.4:** Einfluss der Assemblierungszeit der zweiten Präparationsstufe auf den Widerstand der Thiolmonolage.

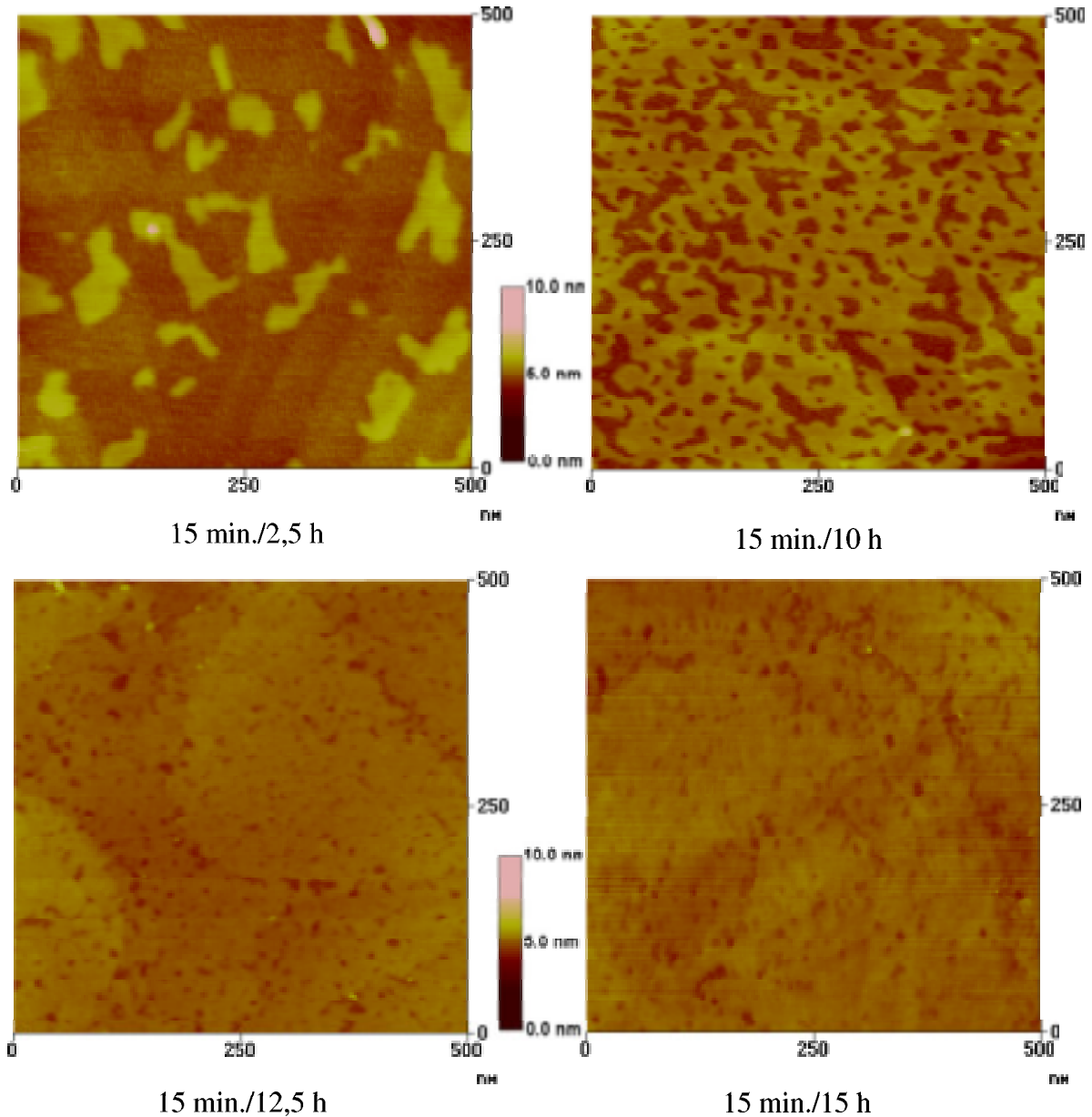
Da die Widerstände der binären Schichtsysteme auch nach einer Assemblierungszeit von 20 h noch nicht die Werte für eine reine DPPTE-Schicht erreicht haben, zeigt sich auch hier deutlich, dass der Austausch der 2-Mercaptoethanole gegen das DPPTE noch nicht abgeschlossen ist.

### 5.1.1.3 Untersuchung der Oberflächentopographie (AFM) und der Kontaktwinkel der Submonolage

Um die Unterschiede in der Belegungsdichte, bzw. die Oberflächenmorphologie zu verschiedenen Assemblierungszeiten der zweiten Präparationsstufe genauer zu klären, wurden AFM- und Kontaktwinkel-Messungen an den jeweiligen Proben durchgeführt. Dazu wurden Proben mit Gold der Kristallmodifikation (111) (Au (111)) auf Mica (Glimmer) (siehe Kapitel 6) angefertigt und wie oben beschrieben mit der 2-step self-assembly Technik präpariert. Gold (111) bietet den Vorteil, größere terrassenförmige atomar flache Areale auszubilden.

Abb. 5.5 zeigt AFM-Aufnahmen (Höhenbilder, tapping-mode in Luft) der mit der 2-step self-assembly Technik präparierten binären Thiolschichten zu verschiedenen

Assemblierungszeiten im zweiten Präparationsschritt (2,5 (15/2,5 Probe), 10 (15/10 Probe), 12,5 (15/12,5 Probe) und 15 Stunden (15/15 Probe)).



**Abb. 5.5:** AFM-Aufnahmen (tapping-mode in Luft) der Oberflächentopographie nach 15 minütiger Assemblierung in 2-Mercaptoethanol und danach erfolgter zweiter Assemblierung zu unterschiedlichen Zeiten mit DPPTE. Deutlich ist eine zeitabhängige Zunahme an DPPTE (hellere Areale) zu sehen. Die Assemblierung erfolgte auf Mica/Au (111) Proben.



Deutlich ist mit Verlängerung der Assemblierungszeiten der zweiten Präparationsstufe auch eine Zunahme an DPSTE (hellere Areale) auf Kosten des Mercaptoethanol-Anteils zu erkennen (hierzu siehe auch die schematische Abb. 5.2). Die zunächst isolierten DPSTE-Areale wachsen mit zunehmender Assemblierungszeit zusammen und umschließen schließlich einzelne 2-Mercaptoethanol-Domänen. Bereits die 15/12,5 Proben weisen eine fast vollständige Bedeckung mit DPSTE auf. Die 15/12,5- und die 15/15-Proben besitzen jedoch auch nach einer Assemblierungszeit von 15-20 h noch einen geringen Mercaptoethanol-Anteil (dunkle Areale). Eine laterale Verdünnung der DPSTE-Submonolage mit 2-Mercaptoethanol liegt also auch bei langen Assemblierungszeiten vor. EIS-Daten und Untersuchungen zum Oberflächenanteil der DPSTE-Moleküle (siehe EIS der Submonolage, Kapitel 5.1.1.2, bzw. siehe AFM-Bildanalyse weiter unten) bestätigen dies ebenfalls.

Zum Aufbau binärer Systeme wurde bisher hauptsächlich die Koadsorption verwendet [60,78,142,143,145,185-189], z. B. untersuchte Wieder die Oberflächeneigenschaften binärer Monolagen aus  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$  und  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{OH}$  in Abhängigkeit vom Molenbruch. Für dieses System wurde keine Phasenseparation beobachtet [60]. Für ein ähnliches System wurde hingegen von Brewer et al [188] Phasenseparation vermutet, wobei die Domänengröße dann nur  $\leq 15 \text{ nm}^2$  betragen sollte. Sie diskutierten, dass die H-Brückenbindungen zwischen den terminalen OH-Gruppen groß genug sein kann, um Phasenseparation zu bedingen. Phasenseparation wurde jedoch bei Koadsorption von 1-Hexadecanthiol und 3-Mercaptopropionsäure [189] und bei Koadsorption von 1-Butanthiol und 1-Octadecanthiol beobachtet. Folkers et al [190] untersuchten die Bildung binärer Monolagen aus gemischten Lösungen von einem kurzkettigen Alkanthiol mit endständiger OH-Gruppe ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ ) und einem langkettigen Alkanthiol ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}_3$ ). Sie studierten das Austauschverhalten des einen Thiols gegen das andere und stellten fest, dass das Molekül mit der größeren intermolekularen Wechselwirkung die übrigen verdrängt und schließlich auf der Goldoberfläche kumuliert. Die Ausbildung von Domänen wurde dabei nicht beobachtet. Sie äußerten jedoch die Vermutung, dass bei Verwendung zweier Thiolkomponenten mit sehr unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften (z. B. hydrophob  $\leftrightarrow$  hydrophil) Phasenseparation wahrscheinlich sind. Sie postulierten ferner, dass nur solange Domänenbildung zu beobachten ist, so lange ein binäres System,

bestehend aus physikalisch sehr unterschiedlichen Molekülen, sich noch nicht im Gleichgewicht befindet. Im Gleichgewichtszustand wird die Monolage dann nur noch aus der Molekülspezies bestehen, die in der Lage ist, eine stabile Monolage auszubilden (z. B. aufgrund von molekularen Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte oder H-Brücken). Jedoch wird in der Arbeit von Folkers et al ebenfalls darauf hingewiesen, dass in einem Beobachtungszeitraum von einem Tag kein 100 %iger Austausch zu beobachten war. Etwa 10 % der zu erst assemblierten Molekülspezies konnten in diesem Beobachtungsrahmen nicht gegen die zweite längerkettige Molekülspezies ausgetauscht werden [190]. Nishida et al [146] fand durch STM (scanning tunneling microscope)-Messungen heraus, dass es Gebiete auf der Oberfläche gibt, in denen kein Austausch stattfand. Ein vollständiger Austausch ist demnach unwahrscheinlich, da die Thiole an hochenergetischen Flächen wie Störstellen in den Goldterrassen oder dort, wo zwei Goldterrassen aufeinander stoßen, sehr fest gebunden (*trapped*) sind.

Die Zweistufenmethode (2-step self-assembly) zum Aufbau binärer Monolagen wurde bisher lediglich von Nishida et al [146], Bain et al [147], Bumm et al [191] und Lewis et al [192] untersucht, wobei die letzten beiden Arbeitsgruppen die zuerst adsorbierte Thiolschicht durch Erhitzen teilweise desorbierten und in einem zweiten Präparationsschritt die entstandenen Fehlstellen mit einem anderen Thiol auffüllten. Bain et al zeigte lediglich, dass der Austausch eines kurzkettigen Thiols durch ein längerkettiges möglich ist, charakterisierte aber die entstandene Thiolschicht nicht näher. Nishida et al untersuchte vor allem den Austauschprozess der Thiole. Er schlussfolgerte aus Desorptionsversuchen dass der Austausch der Thiole über Dimerisierung abläuft. Es konnten verschiedenen Dimere nachgewiesen werden. Sie besitzen eine weniger stabile Thiolbindung und desorbieren leichter. Anwendung fand die Zweischrittmethode bisher auch bei der Funktionalisierung von Oberflächen mit einzelnen Dendrimern [181-184]. Hierzu wurden Moleküle einer zuvor adsorbierten Dialkylthiolschicht in einem zweiten Assemblierungsschritt gegen ein mit einem Dendrimer funktionalisiertes gleichlanges Dialkylthiol ausgetauscht.

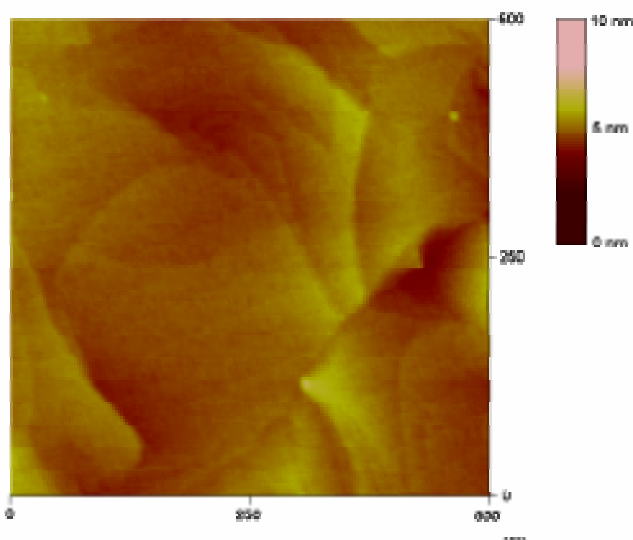
Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Systemen, besteht das in dieser Arbeit beschriebene System aus Komponenten mit sehr viel größeren Unterschieden in den

physikalischen Eigenschaften. 2-Mercaptoethanol ist ein stark hydrophiles Molekül (kurzes aliphatisches Molekül mit endständiger OH-Gruppe). DPPTE hingegen ist ein amphiphiles Molekül mit zwei großen aliphatischen C<sub>16</sub>-Ketten, die dem Molekül endständige starke hydrophobe Eigenschaften verleihen, besonders, wenn es auf einer Oberfläche mittels der Thiolgruppe kovalent gebunden ist und somit der hydrophobe Molekülteil in die Bulkphase orientiert ist. Daher ist eine Domänenbildung, d. h. eine inselartige Anreicherung der gleichen Molekülspezies auf der Oberfläche, zu erwarten und zu beobachten. Der Austausch des kovalent an das Gold gebundenen 2-Mercaptoethanol (erste Präparationsstufe) gegen das DPPTE (zweite Präparationsstufe) erfolgt dadurch, dass einerseits das 2-Mercaptoethanol von der Oberfläche desorbiert wird (erfolgt bereits in reinem Lösungsmittel [180,181]), während andererseits das DPPTE aufgrund seiner endständigen Thiolgruppe an das Gold bindet, und aufgrund hoher Van-der-Waals-Wechselwirkungen stabile Monolagen auszubilden vermag [192], [193]. DPPTE ist bestrebt, die freie Oberflächenenergie zu verringern, weswegen die Ausbildung von Domänen zu erwarten ist (hierzu siehe auch [192], [146]). Nishida et al [146] zeigte in einem Austauschexperiment, dass die zuerst chemisorbierte kürzerkettige aliphatische Molekülspezies zunächst Disulfide auf der Goldoberfläche ausbildet, was in einer schwächeren Bindung zum Gold resultiert. Die längerkettige aliphatische Molekülspezies im zweiten Assemblierungsschritt kann dann nach Desorption des kurzgekettigen Disulfids dessen Position einnehmen. Aufgrund der hohen Van-der-Waals-Wechselwirkungen der längerkettigen Spezies, die sich stabilisierend auf die Monolage auswirkt, kommt es so zu einer zeitabhängigen Anreicherung dieser Spezies auf der Oberfläche und zu Domänenbildung. Hierzu siehe auch Bain et al [147].

Die bereits auf Seite 151 erwähnten Austausch- und Funktionalisierungsexperimente von Alkylthiolmonoschichten auf Goldoberflächen mit Dendrimeren, die eine Dialkylsulfid-Kette der gleichen Kettenlänge wie die der bereits chemisorbierten Thiolschicht als Ankergruppe tragen, zeigten eine wesentlich geringere Austauschrate der bereits gebundenen Thiole gegen die Dendrimere [181-184]. Selbst nach sehr langen Assemblierungszeiten (20 h) konnten noch einzelne Dendrimermoleküle ausgezählt werden [184]. Offensichtlich führten in den Dendrimer-Experimenten die geringere Affinität der Dialkylsulfide zum Gold, sowie die Gleichartigkeit der Anker-moleküle der Dendrimere

und der Moleküle der zuvor gebundenen Thiolschicht dazu, dass nur wenige Moleküle ausgetauscht werden. Es ist anzunehmen, dass die Van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb der zuvor oberflächlich gebundenen Thiolschicht die gleichen sind, wie diejenigen zwischen den Dendrimer-Ankern und der zweiten Molekülspezies. Durch den Einbau der Dendrimerer kann demnach also kein Stabilitätsgewinn der Schicht erfolgen, da die intermolekularen Wechselwirkungen durch den Austausch nicht zunehmen können, also keine weitere Abnahme der freien Oberflächenenergie erfolgt. Der Oberflächenzuwachs an Dendrimeren ist evtl. aufgrund der Molekülgröße verlangsamt Diffusion zur Oberfläche zusätzlich verzögert. Die Unterschiede zwischen dem in dieser Arbeit benutzten 2-Mercaptoethanol und DPPTe sind im Vergleich weitaus größer. Die Thiol-Oberfläche kann einen Stabilitätsgewinn erfahren, indem der Anteil an oberflächlich gebundenem DPPTe steigt, da hier aufgrund der wesentlich höheren Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den DPPTe-Molekülen eine wesentlich deutlichere Abnahme der freien Oberflächenenergie auftreten kann, als dies bei der 2-Mercaptoethanol-Schicht der Fall ist, die wesentlich geringere intermolekulare Wechselwirkungen besitzt. Somit scheint die treibende Kraft für die Zunahme der oberflächlich gebundenen DPPTe-Moleküle die hohen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den DPPTe-Molekülen zu sein. Die Wechselwirkungen der Mercaptoethanolmoleküle untereinander begünstigen die Phasenseparation gegenüber einer homogenen Mischung zusätzlich.

Reine monomolekulare Schichten, bestehend aus DPPTe (0/15 Probe: 15 h assembliert in einer 1 mM DPPTe-Lösung in Chloroform) (Abb. 5.6) zeigten eine homogene, defektfreie Bedeckung mit DPPTe.



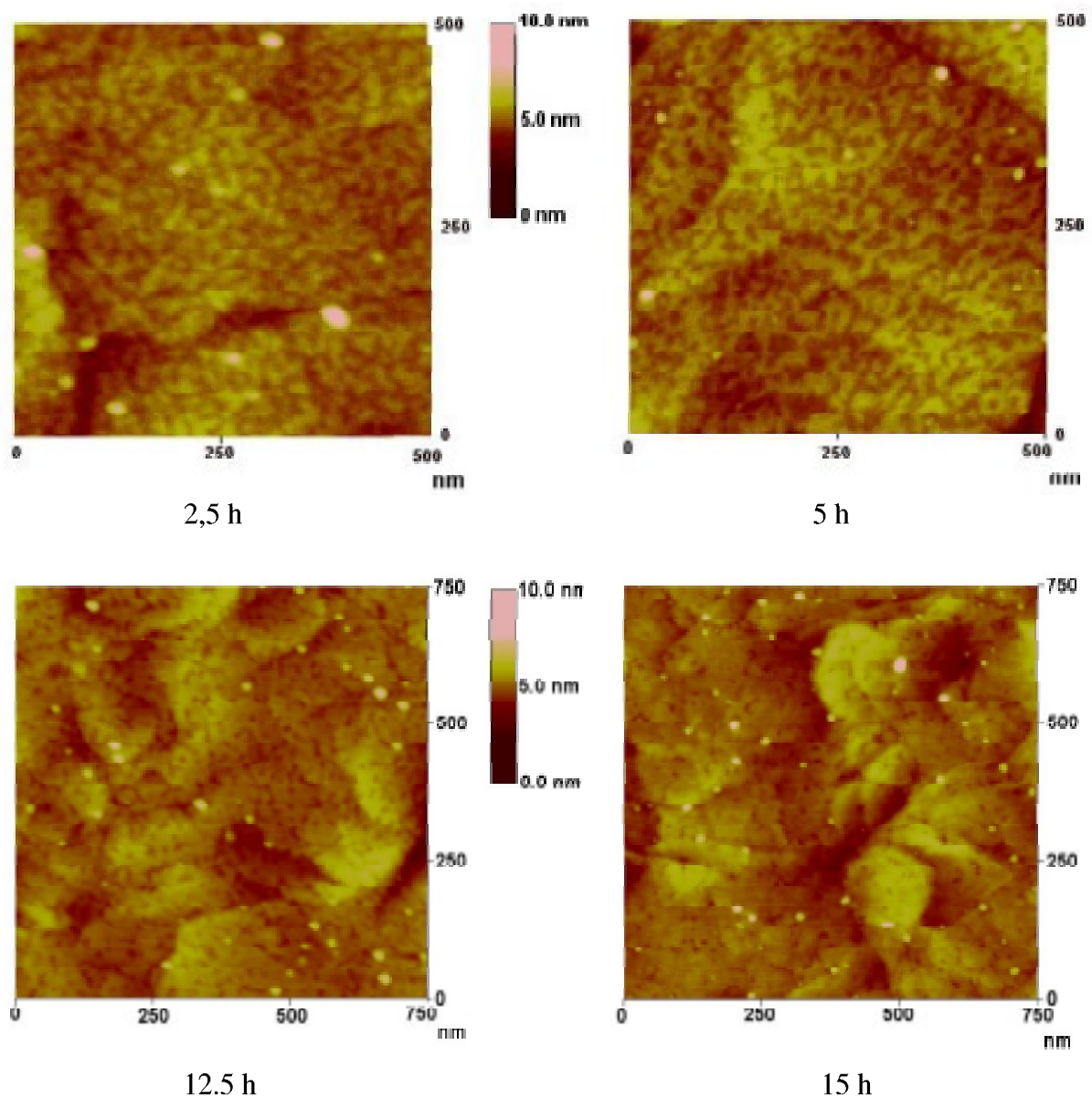
*Abb. 5.6:* AFM-Aufnahme (tapping-mode in Luft) der Oberflächen-topographie einer reinen DPPTe-Monolage auf Mica/Au (111). Deutlich ist eine homogene, vollständige, defektfreie Bedeckung der Goldterrassen (abgegrenzte Areale) mit DPPTe zu erkennen.

EIS-Messungen bestätigen diesen Befund, da die gemessene Kapazität von  $0,55 \pm 0,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  einen errechneten Bedeckungsgrad von 100 % ausweist (siehe oben). Die Berechnung erfolgt unter Verwendung von Gl. 4-1 und 4-33 (Kapitel 4) und einer Schichtdicke  $d$  des DPPTE von 2,5 nm und einer Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon_{\text{DPPTE}}$  von 2,25 [194]. Des Weiteren wurde für die Berechnung eine Kapazität der unbedeckten Goldelektrode von  $30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  angenommen.

Vergleicht man die in Abb. 5.5 gezeigte Oberfläche der 15/15 Probe mit der in Abb. 5.6 gezeigten monomolekularen DPPTE-Schicht, so wird nochmals deutlich, dass es sich bei den binären 15/15-Oberflächen um einen unvollständigen Austausch des 2-Mercaptoethanols durch das DPPTE handelt und somit noch immer eine laterale Verdünnung der Submonolage vorliegt. Dies wird besonders unter der Berücksichtigung der elektrochemischen Eigenschaften dieser Oberfläche (siehe oben) von  $3,9 \pm 0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  deutlich.

Zur Klärung der Frage welchen Vorteil die 2-step self-assembly Technik zur Präparierung von selbstorganisierten Submonolagen (self-assembled monolayers, SAMs) gegenüber der herkömmlichen Präparation durch die Koadsorption bietet, wurden auch hier AFM-Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Goldelektroden in einer Mischung aus DPPTE (1 mM) und Mercaptoethanol (2,8 mM) der gleichen wie für die zweistufige Präparation verwendeten Konzentrationen, gelöst in Chloroform, assembliert. Frisch präparierte Goldelektroden (Mica/Au (111), siehe Kapitel 6) wurden für 2,5; 5; 12,5 und 15 Stunden in dieser Lösung belassen, anschließend gründlich mit Chloroform gespült und in einem Stickstoffstrom getrocknet. AFM-Messungen erfolgten ebenfalls in Luft und in tapping-mode.

Abb. 5.7 zeigt die Oberflächentopographie der durch Koadsorption gewonnenen monomolekularen Oberflächen (gemessen in tapping-mode gegen Luft).



**Abb. 5.7:** AFM-Aufnahmen (tapping-mode in Luft) der Oberflächentopographie nach Koadsorption mit 2-Mercaptoethanol und DPPTE zu verschiedenen Assemblierungszeiten. Bereits nach einer kurzen Assemblierungszeit von 2,5 h ist eine hohe Bedeckung mit DPPTE (hellere Areale) zu erkennen. Die Assemblierung erfolgte auf Mica/Au (111) Proben.

Im Vergleich zu dem 2-step self-assembly (Abb. 5.5) ist bereits nach 2,5stündiger Assemblierungszeit ein deutlich höherer Anteil an DPPTE (hellere Areale) zu erkennen. Die in Abb. 5.7 dargestellten Oberflächen zeigen bei längeren Assemblierungszeiten dann nur noch eine geringfügige Zunahme an DPPTE. Ein deutlicher Unterschied ist auch in der Domänenstruktur zu erkennen. Die koadsorbierten Oberflächen zeigen im Gegensatz zu

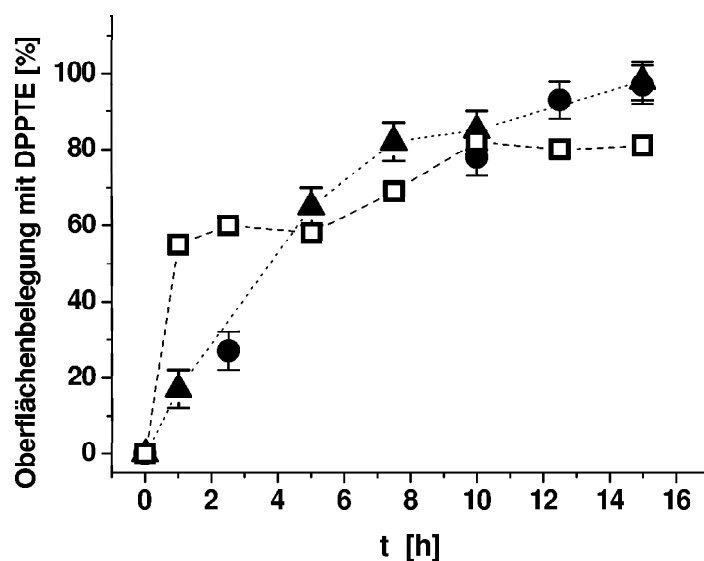
den durch 2-step self-assembly präparierten Oberflächen (besonders deutlich bei kürzeren Assemblierungszeiten) eine Vielzahl kleinerer Domänen. Das DPPTE weist hier eine wesentlich größere, bzw. zufällige Verteilung der DPPTE-Moleküle in der Mercaptoethanol-Schicht auf. Die Domänen sind im Gegensatz zum 2-step self-assembly weniger scharf begrenzt. Die ebenfalls bei den länger assemblierten Oberflächen vorhandenen Mercaptoethanol-Domänen (dunkle Areale) zeigen, dass hier ebenfalls noch kein 100 %iger Austausch von 2-Mercaptoethanol durch DPPTE erfolgt ist.

Wie in der Literatur beschrieben, findet die Spreitung von Vesikeln zum Membranaufbau entweder auf stark hydrophilen Oberflächen [29,195-200] wie z. B. gereinigtem Glas oder Glimmer oder auf stark hydrophoben Oberflächen [68,105,160,196,201-204] wie z. B. selbstorganisierten Alkanthiol- oder Thiolipid-Schichten statt. Auf Oberflächen mit unspezifischen hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften findet dagegen zumeist nur Vesikeladsorption statt. Uncharakteristische Oberflächen bezüglich der Hydrophobizität entstehen oft durch die laterale Verdünnung der Membranankermoleküle der Thiolschicht, wenn die Molekülspezies dieser Schicht homogene Filme ausbilden. Phasenseparierte Submonolagen mit eindeutig begrenzten Bereichen, die entweder hydrophobe oder hydrophile Eigenschaften besitzen, sollten daher bessere Eigenschaften hinsichtlich der Vesikelspreitung und der Membranbildung erwarten lassen, als homogen gemischte binäre Submonolagen. Demnach ist zu erwarten, dass die Zweistufen-Methode (2-step self-assembly) deutliche Vorteile gegenüber der Koadsorption bietet.

Die Betrachtung der Oberflächentopographie der binären Oberflächen mittels AFM zeigen zwar eine eindeutig Zunahme des Thiolipids DPPTE auf der Goldoberfläche, jedoch sind keine direkten quantitativen Aussagen aus den topographischen Aufnahmen hinsichtlich des molekularen Anteils der verschiedenen Molekülspezies auf der Oberfläche möglich. Hierzu wurde ein auf AFM-Messungen basierendes bildanalytisches Verfahren angewendet (siehe Kapitel 5 und [189]). Hobara et al [189] zeigte, dass die Bildanalyse der elektrochemischen Analyse durch reduktive Desorption (RD) in nichts nachsteht und durchaus für diese Zwecke geeignet ist. Die reduktive Desorption wurde in dieser Arbeit nicht angewendet, da diese Messungen in KOH durchgeführt werden, was zu einer Verseifung der Lipide führt. Durch die Verseifung kann keine Zuordnung der

Desorptionspeaks zu den sich auf der Oberfläche befindlichen Molekülspezies erfolgen [60].

In Abb. 5.8 sind die Ergebnisse des bildanalytischen Messverfahrens, in % DPPTE als Funktion der Assemblierungszeit, für beide Präparationsmethoden, zusammengefasst. Für die Auswertung wurde davon ausgegangen, dass die gebildeten Domänen nur aus einer Molekülspezies bestehen.



**Abb. 5.8:** Prozentuale Oberflächenbelegung mit DPPTE zu verschiedenen Assemblierungszeiten. Koadsorbierte binäre Monolagen (-□-) zeigen einen wesentlich höheren DPPTE-Anteil besonders bei den kurzen Assemblierungszeiten als dies für die durch die 2-step self-assembly erzeugten Oberflächen (-●- und -▲-) der Fall ist. Hingegen wird ein höherer Anteil an DPPTE bei längeren Assemblierungszeiten durch das 2-step self-assembly erreicht.

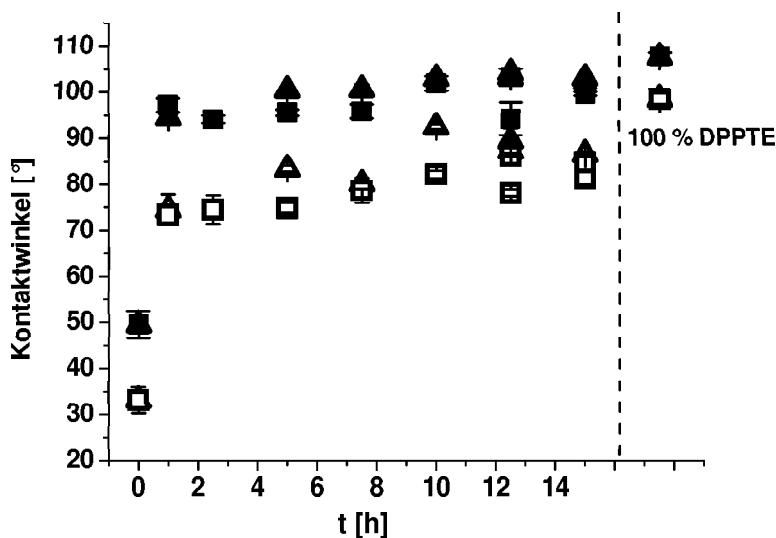
Deutlich ist eine langsamere Zunahme des hydrophoben Anteils (DPPTE) durch die 2-step self-assembly Technik (-●- und -▲-) besonders bei den kürzeren Assemblierungszeiten zu erkennen, als dies für die Koadsorption (-□-) der Fall ist. Ein Großteil an DPPTE ist durch die Koadsorption bereits schon nach einer Stunde auf dem Gold adsorbiert. Generell lässt sich sagen, dass die zweistufige Präparationstechnik (2-step self-assembly) gegenüber der einstufigen Koadsorption eine bessere Kontrolle der Oberflächenmorphologie (Domänengröße und Oberflächenverteilung des DPPTE) bietet.



Die bessere Kontrollierbarkeit der Oberflächenmorphologie durch das 2-step self-assembly lässt sich wie folgt erklären: Im ersten Schritt der zweistufigen Präparationsmethode erfolgt zunächst eine relativ rasche Physisorption von 2-Mercaptoethanol auf Gold, die dann unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Schwefel- und Goldatomen (Thiolat-Bildung) in die Chemisorption übergeht. Dieser Schritt wird im Vergleich zur Physisorption als relativ langsam angesehen. Durch den nachfolgenden zweiten Assemblierungsschritt erfolgt dann ein Austausch des zuvor gebundenen 2-Mercaptoethanols gegen das DPPTE. Hierzu siehe auch Folkers et al [190] für andere Systeme. Dieser Austausch dürfte erschwert und damit verzögert vonstatten gehen, da der Austausch des 2-Mercaptoethanols gegen DPPTE die Lösung der Schwefel-Gold-Bindung und die schrittweise erfolgende Desorption der 2-Mercaptoethanolmoleküle beinhaltet, vermutlich als Disulfide [180,181]. Der Angriff des DPPTE am Gold ist erschwert, da bereits ein Großteil der Bindungsstellen auf dem Gold durch das 2-Mercaptoethanol besetzt sind. Mögliche erste Angriffspunkte für das DPPTE stellen hier Defekte in der 2-Mercaptoethanolschicht da [180,184], die sozusagen Keimbildungszentren für das Wachstum der DPPTE-Domänen darstellen. Die Generierung von Defekten in der Thiolschicht erfolgt bereits durch Desorption auch in reinem Lösungsmittel [180,181]. Das langsame Anwachsen der DPPTE-Domänen bei der 2-step self-assembly Technik führt so zu einer größeren Ordnung der DPPTE-Moleküle auf der Oberfläche. Anders ist die Situation bei der Koadsorption. Es werden gleichzeitig beide Molekülspezies auf der Oberfläche gebunden. Vermutlich erfolgt hier eine schnellere Adsorption des 2-Mercaptoethanols, da es sich hier um ein wesentlich kleineres und damit beweglicheres Molekül handelt, obwohl aufgrund der hohen Konzentrationen keine Diffusionskontrolle zu erwarten ist. Wegen der wesentlich geringer ausgeprägten intermolekularen Wechselwirkungen der Mercaptoethanol-Moleküle ist nicht zu erwarten, dass deren Wechselwirkungen wesentlich zu einer Stabilisierung einer solchen Monolage aus 2-Mercaptoethanol beitragen können. Große Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind hingegen bei den DPPTE-Molekülen aufgrund der zwei C<sub>16</sub>-Ketten pro Molekül zu erwarten. Die physisorbierten 2-Mercaptoethanolmoleküle werden wahrscheinlich noch bevor sie eine kovalente Bindung zum Gold ausbilden können, teilweise durch das DPPTE auf der Oberfläche verdrängt. Zusätzlich wird der gleiche Mechanismus wie bei der 2-step self-assembly Technik beschrieben ablaufen. Unter dieser Betrachtung wird klar,

weshalb es bei der Koadsorption schon bei sehr kurzen Assemblierungszeiten von 2-Mercaptoethanol und DPPTE zu einer höheren Oberflächenbelegung mit DPPTE kommt. Die mechanistische Betrachtung der beiden Präparationstechniken sollte auch auf andere Systeme übertragbar sein [143], sofern die physikalischen Eigenschaften der ausgewählten Moleküle ähnlich gelagert sind wie in diesem Fall.

Die binären Monolagen wurden weiterhin hinsichtlich ihres Kontaktwinkels untersucht. Abb. 5.9 zeigt die Kontaktwinkel (advancing und receding angle) in Abhängigkeit der Assemblierungszeit für beide Präparationsmethoden.



**Abb. 5.9:** Kontaktwinkel zu verschiedenen Assemblierungszeiten. Der advancing (ausgefüllte Zeichen) als auch der receding angle (leere Zeichen) weisen keinen Unterschied in der Präparationstechnik (-▲- bzw. -△- 2-step self-assembly und -■- bzw. -□- Koadsorption) auf. Lediglich eine zu erwartende Zunahme des Kontaktwinkels mit Zunahme der Assemblierungszeit ist für beide Methoden ersichtlich. Mit aufgetragen ist der Wert einer 15 min. assemblierten 2-Mercaptoethanol- und einer 15 h assemblierten DPPTE-Schicht.

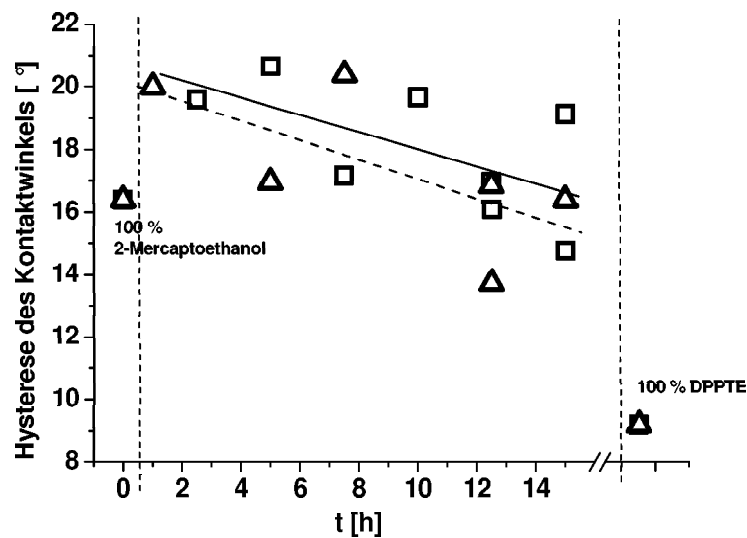
Die beiden verwendeten Präparationsmethoden zeigen keine Unterschiede im Kontaktwinkel sowohl zueinander als auch zu den verschiedenen Assemblierungszeiten. Die Werte des advancing angle der binären Monolagen weisen zu allen Assemblierungszeiten Kontaktwinkel  $> 90^\circ$  auf und liegen damit deutlich über dem Kontaktwinkel einer reinen 2-Mercaptoethanol-Schicht, aber noch etwas unter dem Wert einer reinen DPPTE-Schicht. Die Kontaktwinkel der beiden Präparationsmethoden sprechen lediglich für eine Dominanz

der DPPTE-Moleküle auf der Oberfläche. Kontaktwinkel  $\geq 100^\circ$  werden erst bei längeren Assemblierungszeiten beobachtet. Der untypische sprunghafte Anstieg des Kontaktwinkels, also der sprunghafte Wechsel der Oberfläche von hydrophil zu hydrophob wurde auch bei durch Koadsorption präparierten binären Thiolipopeptid/Thiopeptid-Schichten beobachtet [143] und steht damit im Kontrast zum homogenen Übergang von hydrophil zu hydrophob während der Fusion von gemischten DPPTE/DMPC-Vesikeln auf Gold (siehe Kapitel 3 bzw. [60]), bzw. von koadsorbierten binären Thioethylglykol-Oligomer/Thioethylglykol-Cholesterin Monoschichten [205].

Der Kontaktwinkel der reinen 2-Mercaptoethanol-schichten ist mit etwa  $50^\circ$  (advancing angle) zu hoch. In Anbetracht der kurzen Assemblierungszeiten ist von einer unvollständigen Bedeckung der Goldoberfläche mit 2-Mercaptoethanol auszugehen. Etwaige Kontaminationen können hier ebenfalls zu höheren Kontaktwinkeln führen.

Aus der Hysterese der Kontaktwinkel ( $\Delta^\circ = \text{advancing angle} - \text{receding angle}$ ) (siehe Abb. 5.10) der beiden Präparationstechniken zu unterschiedlichen Assemblierungszeiten, ist mit Zunahme der Assemblierungszeit eine leichte Abnahme der Hysterese zu erkennen, was eine Zunahme der Homogenität der adsorbierten Monolagen signalisiert.

Die Werte liegen jedoch deutlich über den Werten für eine reine DPPTE-Monolage, bzw. über denen einer reinen Mercaptoethanol-Schicht, was die Heterogenität der binären Schichten ausweist. Erst der lineare Fit der Hysteresewerte lässt eine geringfügige Unterscheidung zwischen der zweistufigen Präparationstechnik (---) und der Koadsorption (—) erkennen. Der Fit der zweistufigen Präparationstechnik liegen etwas unterhalb des Fits für eine koadsorbierte Schicht, damit ist die Heterogenität der koadsorbierten Schicht etwas größer. Mechanistisch kann dies durch den bereits diskutierten schneller erfolgenden Aufbau der binären Monolagen durch Koadsorption präparierten Oberflächen erklärt werden (siehe oben).



**Abb. 5.10:** Hysterese des Kontaktwinkels zu unterschiedlichen Assemblierungszeiten der zwei verschiedenen Präparationstechniken. Die beiden Präparationstechniken unterscheiden sich hierbei kaum, zeigen aber beide mit Zunahme der Assemblierungszeit eine Abnahme in der Hysterese. (- $\Delta$ - 2-step self-assembly, - $\square$ - Koadsorption). (— Fit Koadsorption, ---- Fit 2-step self-assembly).

#### 5.1.1.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.1

EIS-, SPS und AFM-Messungen haben gezeigt, dass der Austausch von kovalent an das Gold gebundenem 2-Mercaptoethanol durch das DPPTE möglich ist und dass es zu einer zeitabhängigen Kumulation von DPPTE auf der Goldoberfläche kommt. AFM-Messungen zeigten ebenfalls, dass die Oberflächenmorphologie der auf dem Gold kovalent gebundenen binären Thioischiicht mit 2-step self-assembly Technik wesentlich besser zu kontrollieren ist, als durch die kompetitive Koadsorption. Die Oberflächenbelegung mit DPPTE ist bei Anwendung der Koadsorption bereits schon bei sehr kurzen Assemblierungszeiten wesentlich höher, als dies bei der 2-step self-assembly Technik der Fall ist. So liegt nach einer Assemblierungszeit von nur einer Stunde bereits ein Oberflächenanteil an DPPTE von  $\sim 55\%$  vor. Die durch 2-step self-assembly präparierten Schichten weisen hingegen nur einen Oberflächenanteil an DPPTE von  $\sim 17\%$  auf. Vor allem aber sind nur die Monolagen der zweistufigen Präparation besonders bei den niedrigen Assemblierungszeiten durch deutlich begrenzte Domänen gekennzeichnet.

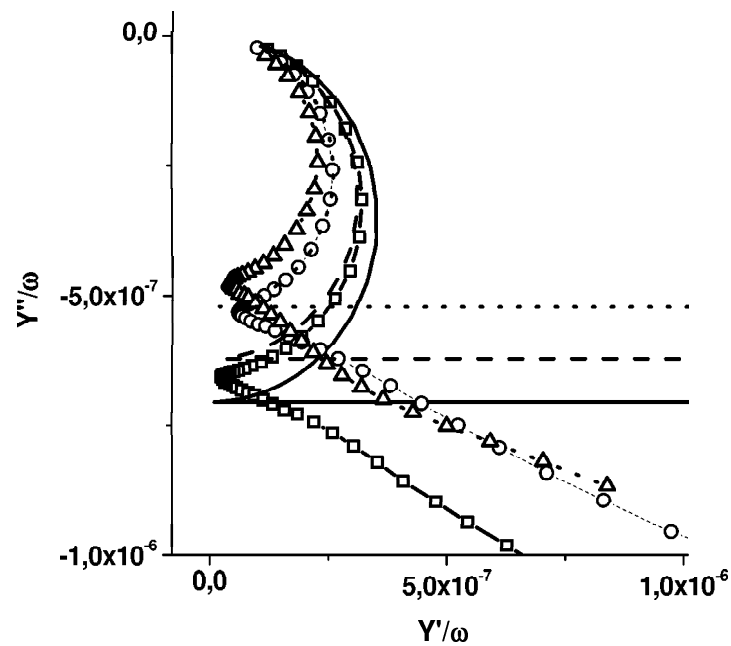
Die koadsorbierten Submonolagen zeigen hingegen eine eher zufällige Verteilung der DPPTE-Moleküle in der 2-Mercaptoethanolschicht.

### 5.1.2 Membranaufbau durch Vesikelspreitung

Die Komplettierung der oben beschriebenen Submonolagen zur Membran erfolgte durch Vesikelspreitung gemischter Lipide (DMPC/DMPS, bzw. DMPC/DPhytPS im Verhältnis 9:1 gemischt, Herstellung siehe Kapitel 6). Die in 0,1 M NaCl-Lösung präparierten Vesikel (Lipid-Endkonzentration in der Messzelle 200  $\mu\text{M}$ ) wurden zunächst in 0,1 M NaCl gespreitet und anschließend erfolgte Wechsel auf den für die Annexinbindung notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Trizma (HCl), 0,02 %  $\text{NaN}_3$  in MilliQ-Wasser, pH 8). Alle Elektrolytlösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Die Messungen erfolgten bei einer Elektrolyt-Temperatur von 37° C. Die reinen impedanzspektroskopischen Messungen erfolgten auf Goldelektroden mit einer Fläche < 0,3  $\text{cm}^2$ , die SPS-Messungen erfolgten auf Elektroden mit einer Fläche von 0,7  $\text{cm}^2$  (siehe Kapitel 6 und Anhang).

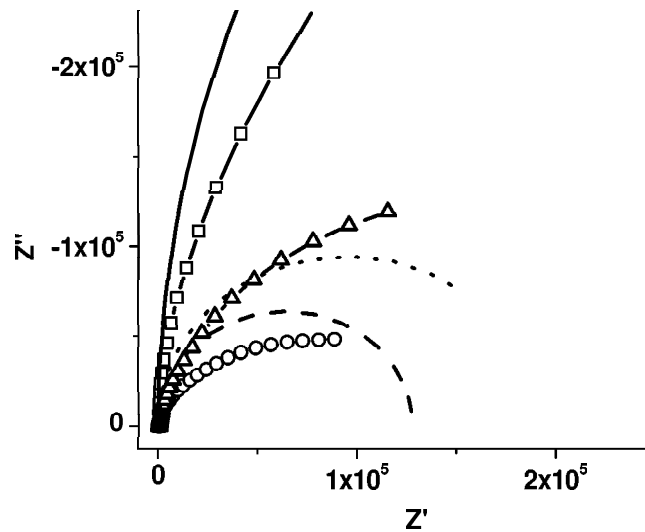
#### 5.1.2.1 Vesikelspreitung auf reinen DPPTE-Monolagen

Die Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln wurde zuerst auf reinen DPPTE-Monolagen (15 h in einer 1 mM Lösung in Chlorform assembliert, Elektrode: Mica/Au (111)) durch die Impedanzspektroskopie verfolgt. Abb. 5.11 zeigt den frequenzreduzierten Admittanz-Plot vor und nach erfolgter Vesikelspreitung in 0,1 M NaCl, sowie nach dem Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Die Kapazität der Submonolage nimmt von 0,7  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  (in NaCl) auf 0,52  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  (in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer) ab. Die Kapazität dieser Membran liegt somit im Bereich der Werte (0,35 - 0,46  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  [206], [207]), die für schwarze Lipidmembranen (black lipid membranes (BLM's)) angegeben werden. Aus Abb. 5.11 wird ferner deutlich, dass eine weitere Abnahme der Kapazität durch das Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer auftritt.



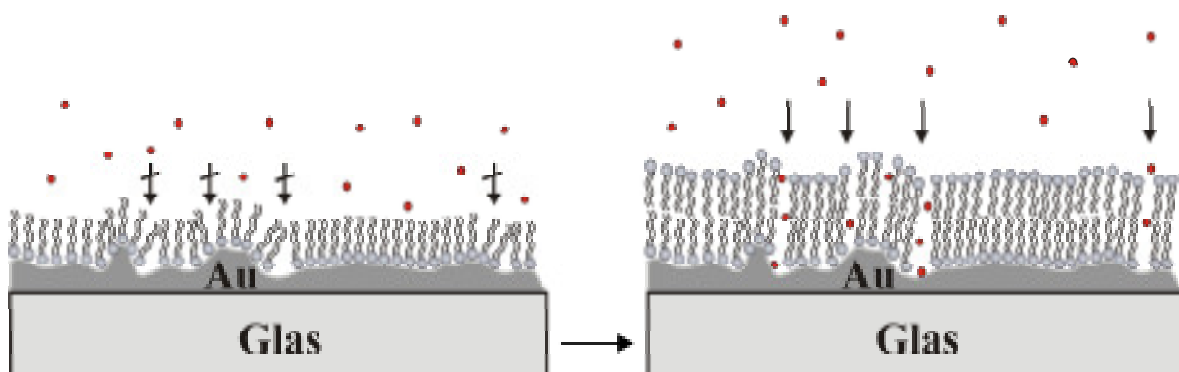
**Abb. 5.11:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor (-□-) und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer reinen DPPTE-Schicht in 0,1 M NaCl (-○-) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (-Δ-). Deutlich ist eine Abnahme der Kapazität durch die Vesikelspreitung zu erkennen (Schnittpunkt des Halbkreises mit der y-Achse). Eine weitere Abnahme der Kapazität erfolgt durch den Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Kurven ohne Symbol geben die Fitts, unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC), der jeweiligen Messkurve wieder.

Abb. 5.12 zeigt den Nyquist-Plot vor (-□-) und nach (-○-) der Vesikelspreitung, bzw. nach der Überführung in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (-Δ-). Die Vesikelspreitung resultierte in einer Erniedrigung des Widerstands, obwohl infolge der Ausbildung einer Lipiddoppelschicht eine Zunahme des Widerstandes zu erwarten wäre. Eine leichte Erholung des Widerstandes trat durch das Spülen der Membran mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ein, der aber noch unter dem der Submonolage lag. Für das in Abb. 5.12 gezeigte Beispiel wurden  $1,6 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$  für die Submonolage und  $0,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$  für die Lipiddoppelmembran nach Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (Messbereichen 20 - 0,08 kHz) errechnet.



**Abb. 5.12:** Nyquist-Plot vor (-□-) und nach der Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) in 0,1 M NaCl (-○-) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (-△-). Deutlich ist eine Abnahme des Widerstandes durch die Vesikelspreitung zu erkennen (Schnittpunkt des Halbkreises mit der x-Achse). Eine gewisse Erholung des Widerstandes erfolgt durch den Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, jedoch bleibt der Widerstand der Lipiddoppelmembran kleiner als der der Monolage. Kurven ohne Symbol geben die Fits, unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC), der jeweiligen Messkurve wieder.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Vesikelspreitung hinsichtlich Kapazität und Widerstand können anhand von Abb. 5.13 erklärt werden.



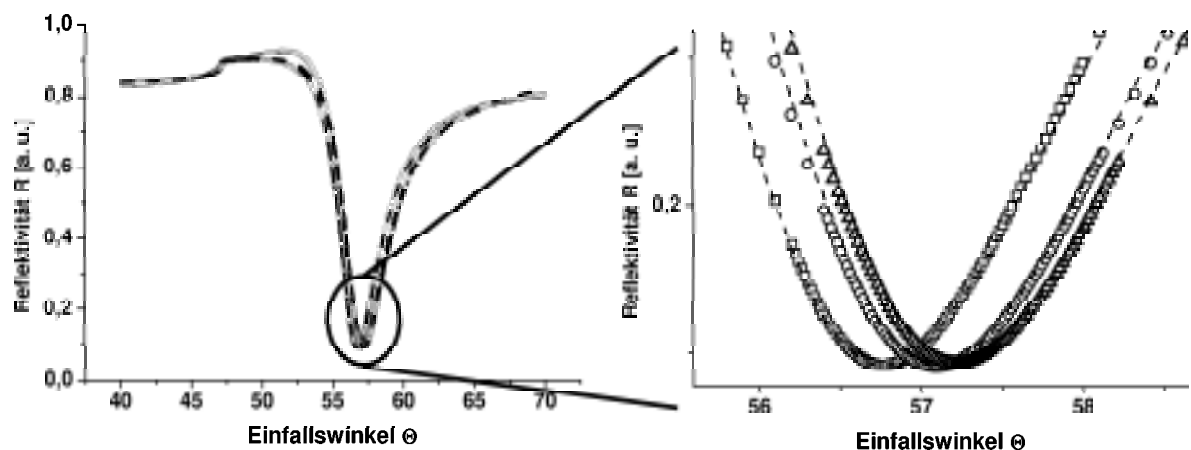
**Abb. 5.13:** Auswirkungen der Elektrodenrauigkeit und Defekten in der Submonolage auf den Widerstand vor und nach Vesikelspreitung. Eine Diffusion von Ionen (rot) durch Defekte der Submonolage kann wie in der Abb. links dargestellt behindert sein. Durch Vesikelspreitung kann es zu einer Ausrichtung der Submonolage kommen (rechts), was in einer Freigabe der Defekte resultieren kann. Ionen können nun ungehindert die Elektrode erreichen. Der Widerstand der Lipiddoppelmembran würde somit, trotz erfolgter Vesikelspreitung, unter dem der Submonsicht liegen.

Die Moleküle der Submonoschicht bedecken aufgrund ihrer Flexibilität Defekte in dieser Schicht. Durch die Vesikelspreitung und den Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zu einer Umorientierung und Ausrichtung der Moleküle der Submonolage, was zur Freigabe der unbedeckten Goldflächen führt. Ladungen können nun leichter zur Elektrode diffundieren. Aus diesem Grund weisen die Submonolagen einen höheren Widerstand als die Lipiddoppelschicht auf, denn der Gesamtwiderstand der Membran wird stark von den Widerständen der Defekte bestimmt (siehe Kapitel 4 und [201]).

Der Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Kapazität kann wie folgt erklärt werden: Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zur Ruptur von teilgespreiteten und/oder adsorbierten Vesikeln, zumal  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen direkten Einfluss auf die Membran, bzw. auf die Spreitung von Vesikeln haben können [108,109,208-215]. Ferner führt die Komplexbildung zwischen DMPS und  $\text{Ca}^{2+}$  zur Verringerung der Abstoßungskräfte der geladenen DMPS-Lipiden, wodurch eine dichtere laterale Packung der Lipide erreicht wird [35], [216]. Die dichtere Packung bedingt eine Abnahme des Flächenbedarfs pro Lipidmolekül (surface area per molecule) und eine vertikale Streckung der Lipide [216]. Es kommt so zu einer  $\text{Ca}^{2+}$  bedingten Dehydratisierung der Phospholipide, was zu einer Zunahme der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Lipidmembran [211] führt.

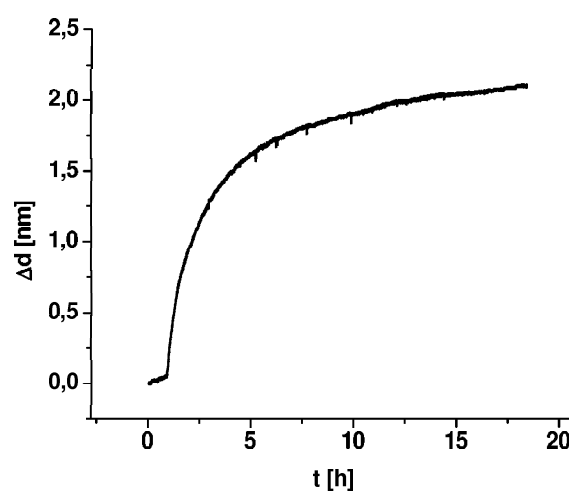
SPS-Messungen (Abb. 5.14) der Vesikelspreitung an reinen DPPTE-Schichten zeigten eine Zunahme der optischen Schichtdicke (gleichbedeutend mit einer Zunahme des Resonanzwinkels  $\Theta$ , siehe Kapitel 4) um  $1,7 \pm 0,5$  nm in 0,1 M NaCl ( $-\Delta-$ ), bzw. von  $2,48 \pm 0,5$  nm ( $n = 1,5$  [59]) nach Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ( $-\circ-$ ). Dieser Effekt kann, wie oben bereits diskutiert, mit einer forcierten Vesikelspreitung und durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte vertikale Streckung der Lipide erklärt werden. Die Zunahme der Schichtdicke liegt mit  $2,48 \pm 0,5$  nm im zu erwartenden Bereich (2,5 - 3 nm) für eine aus DMPC/DMPS bestehende Monolage.





**Abb. 5.14:** SPS-Messungen vor (-□-) und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer reinen DPPTE-Monolage (15 h assembliert) in 0,1 M NaCl (-○-) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (-△-). Deutlich ist eine Zunahme des Resonanzwinkels  $\Theta$  (gleichbedeutend einer Schichtdickenzunahme in Folge der Vesikelspreitung zu erkennen. Eine weitere Zunahme erfolgt durch den Wechsel auf Ca-Puffer. (--- Fitt der Kurven).

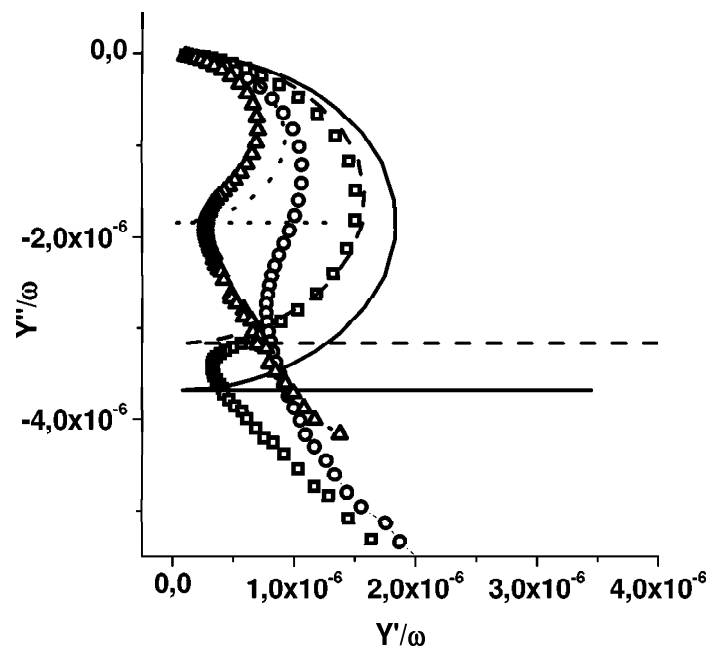
In Abb. 5.15 ist die Kinetik der Vesikelspreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln auf 15 Stunden assemblierten DPPTE-Monolagen gezeigt. Die Kinetik zeigt den für hydrophobe Oberflächen typischen Kinetikverlauf: Schnelle oberflächliche Anlagerung und Spreitung der Vesikel und langsamer Übergang in die Sättigung.



**Abb. 5.15:** SPS-Kinetikkurven der Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer reinen DPPTE-Monolage (15 h assembliert) in 0,1 M NaCl. Deutlich ist eine Zunahme der optischen Schichtdicke zu erkennen.

### 5.1.2.2 Vesikelspreitung auf durch Koadsorption präparierten binären Monolagen

Die Vesikelspreitung von DMPC/DMPS-Lipiden (200  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) auf koadsorbierten 2-Mercaptoethanol/DPPE-Schichten (in 2,8 mM 2-Mercaptoethanol/1 mM DPPE-Chloroform-Lösung, 15 h assembliert) äußerte sich ebenfalls in einer Abnahme der Kapazität (siehe Abb. 5.16). Sie nahm in dem hier gezeigten Beispiel von 3,4  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  der Submonolagen zunächst in 0,1 M NaCl, 37° C nur geringfügig ab. Durch das Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, 37° C, trat eine weitere Abnahme der Kapazität auf 1,8  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  der Lipiddoppelmembran ein (Begründung siehe Kapitel 5.1.2.1).



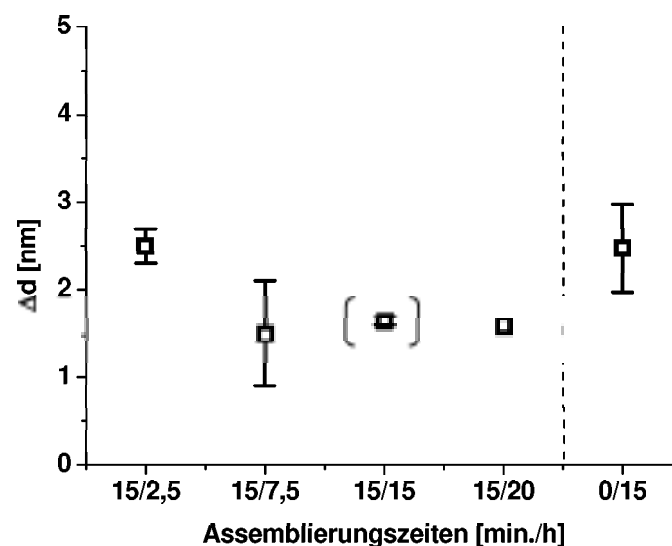
**Abb. 5.16:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor ( $\square$ ) und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer 15 h koadsorbierten binären Monolage (2-Mercaptoethanol/DPPE) in 0,1 M NaCl ( $\circ$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ( $\Delta$ ). Deutlich ist eine Abnahme der Kapazität durch die Vesikelspreitung zu erkennen (Schnittpunkt des Halbkreises mit der y-Achse). Eine weitere Abnahme der Kapazität erfolgt durch den Wechsel auf Ca-Puffer. Kurven ohne Symbol geben die Fits, unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC), der jeweiligen Messkurve wieder.

Der hydrophobe Anteil der koadsorbierten Monolage ist bereits mit einem Bedeckungsgrad von 81 % (AFM-Bildanalyse) sehr hoch, was auch aus dem Kontaktwinkel von  $103^\circ$  dieser Schicht hervorgeht. Demnach sollte hier eine im Vergleich zu den reinen DPPE-Schichten ähnliche Kapazität für die Lipiddoppelmembran zu erwarten sein, da hydrophobe Oberflächen attraktive Oberflächen für die Vesikelspreitung darstellen

[101,196,217]. Für die Membrankapazität von  $1,84 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ergibt sich rechnerisch ein Bedeckungsgrad von 81 % (unter Berücksichtigung einer theoretischen Schichtdicke von 5 nm und einem  $\epsilon_{\text{Lipid}}$  von 2,25 [194], sowie der Kapazität von  $8,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (experimentell ermittelt) für eine mit Mercaptoethanol bedeckten Elektrode, siehe Kapitel 4). Die Qualität der Membran ist anhand der Kapazität als qualitativ unzureichend einzuschätzen, denn die Kapazität der Membran wird bei einem Bedeckungsgrad  $< 97 \%$  von den Membrandefekten dominiert [29]. Aus diesem Grund und des schlechter zu kontrollierenden Aufbaus der Submonolage (siehe AFM-Daten) durch die Koadsorption wurde dieser Weg der Präparation nicht weiter verfolgt.

### 5.1.2.3 Vesikelspreitung auf zweistufig präparierten (2-step self-assembly) binären Submonolagen

Die Präparation der Submonolage erfolgt wie bereits beschrieben. Auf dieser Schicht wurden DMPC/DMPS Vesikel ( $200 \mu\text{M}$ ) in  $0,1 \text{ M}$  NaCl-Lösung, bei  $37^\circ \text{C}$  Puffertemperatur fusioniert und mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ( $37^\circ \text{C}$ ) gespült.



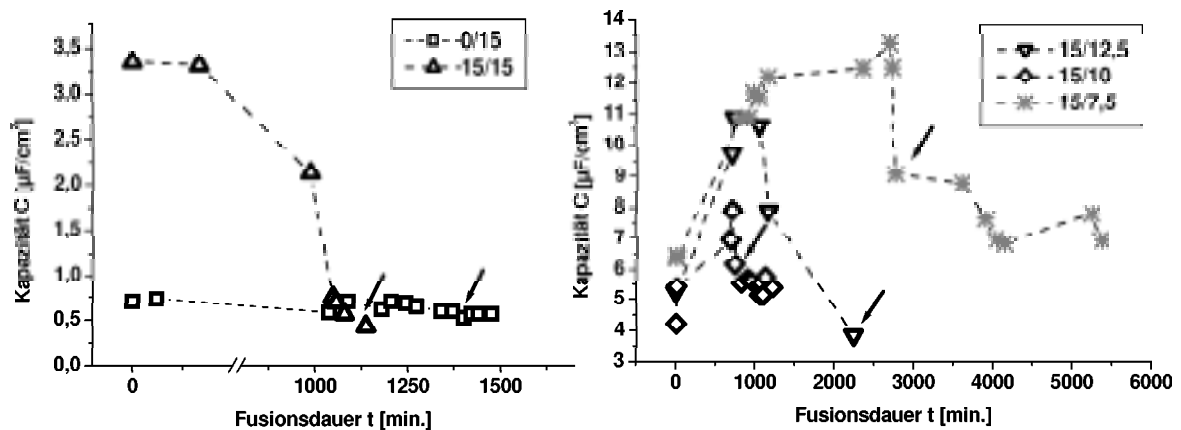
**Abb. 5.17:** Optische Schichtdickenzunahme  $\Delta d$  durch Spreitung von DMPC/DMPS- bzw. DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf binären Submonolagen aus 2-Mercaptoethanol und DPTE unterschiedlicher Assemblierungszeiten der zweiten Präparationsstufe (gemessen nach dem Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer bei  $37^\circ \text{C}$ ). Zum Vergleich wurde die durch die Vesikelspreitung von DMPC/DMPS-Lipiden auf reinen DPTE-Submonolage (15 h assembliert) erreichte Schichtdickenzunahme  $\Delta d$  mit aufgeführt.

SPS-Messungen wurden vor und nach der Vesikelspreitung angefertigt, sowie nach Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Auch hier zeigte sich eine weitere Schichtdickenzunahme infolge des Wechsels zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Die Schichtdickenzunahme ( $\Delta d$ ) infolge Vesikelspreitung und nach Überführung der Membran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ist in Abb. 5.17 (oben) in Abhängigkeit der verschiedenen Assemblierungszeiten gezeigt.

In allen Fällen liegt die Dickenänderung der binären Monolagen unter denen der reinen DPPTE-Submonolagen. Für die drei Präparationen 15/20, 15/15 und 15/7,5 liegt die Schichtdickenzunahme mit 1,5 nm (15/7,5-Probe) bis 1,65 nm (15/15-Probe) im unteren Bereich der Schichtdicken die H. Wieder unter der Verwendung gleicher Vesikelzusammensetzung auf reinen DPPTE-Schichten angibt (1,5 - 2,0 nm [60]) bzw. unterhalb der Schichtdicken, die Lingler et al für die Spreitung reiner DMPC-Vesikel auf reinen DPPTE, bzw. auf reinen Alkanthiolschichten unterschiedlicher Kettenlänge findet (1,8 - 2,3 nm [105]). Trotzdem sprechen die Schichtdickenzunahmen in allen Fällen eher für eine Vesikelfusion als für eine Vesikeladsorption. Für letztere wären wesentlich größere Schichtdickenänderungen zu erwarten. Die etwas zu geringen Schichtdickenänderungen lassen eher auf eine unvollständige Bedeckung mit Lipid schließen. Um einen eindeutigen Aufschluss über Qualität der entstandenen Lipiddoppelmembranen zu bekommen wurden hierzu EIS-Messungen vorgenommen.

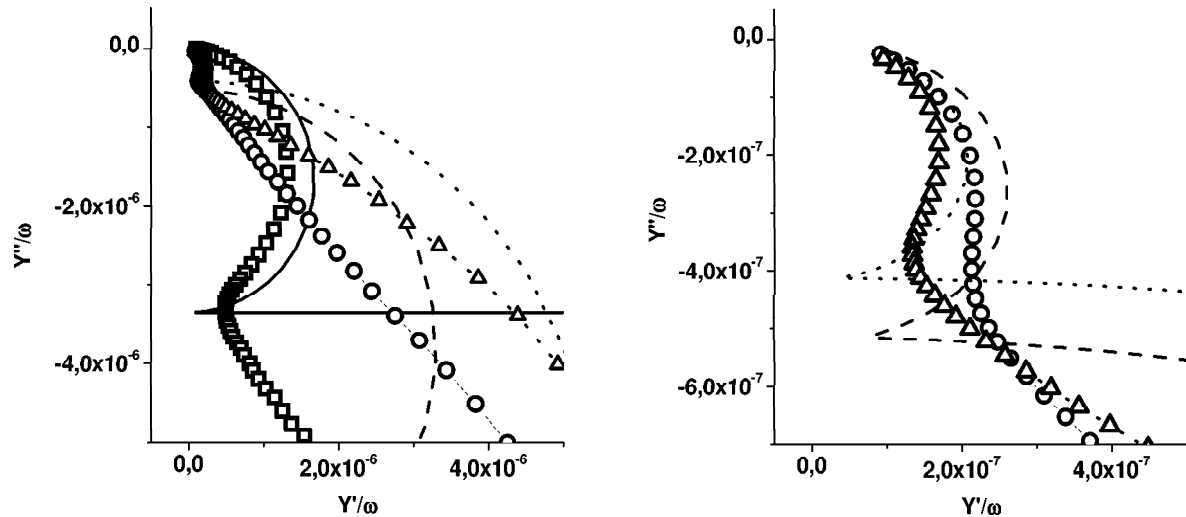
Der Kapazitätsverlauf infolge der Vesikelspreitung ist in Abb. 5.18 für verschiedene Assemblierungszeiten gezeigt. Da für Assemblierungszeiten  $\leq 10$  h keine Abnahme der Kapazität infolge der Vesikelspreitung in der EIS beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die beobachtete Schichtdickenänderung (Abb. 5.17) bei der 15/2,5- und der 15/7,5-Submonolage durch die Adsorption von teilgespreiteten Vesikeln bedingt sein muss (Abb. 5.18). Die Kapazitätsabnahme durch die Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln (Konzentration  $200\mu\text{M}$ ) auf Schichten längerer Assemblierungszeiten (15/12,5 und 15/15) zeigen jedoch eine deutliche Spreitung an. Infolge der Vesikelspreitung erreicht die 15/15-Oberfläche ( $-\Delta$ ) als einzige eine Kapazität unter  $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Im Mittel werden für diesen Oberflächentyp Kapazitäten von  $0,6 \pm 0,18 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  erreicht. Alle anderen Assemblierungszeiten zeigen wesentlich höhere Kapazitäten für eine Lipiddoppelmembran auf, bzw. zeigten durch die Vesikelspreitung nur eine Kapazitätserhöhung. Daher sind

diese Assemblierungszeiten für den Aufbau von Membranmodellen nicht geeignet (gilt nur für die hier verwendeten Versuchsparemeter). Das Optimum für den Aufbau einer aus 2-Mercaptoethanol/DPPTE und DMPC/DMPS bestehenden Modellmembran liegt somit bei einer Assemblierungszeit von 15 h im zweiten Präparationschritt.



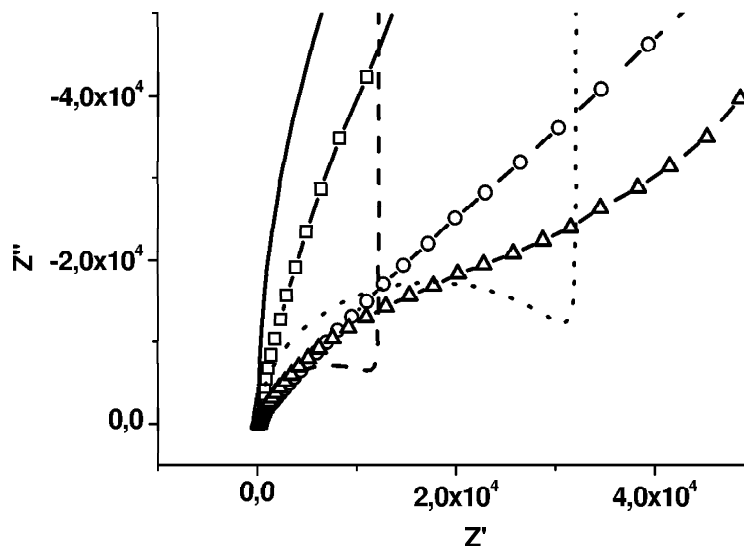
**Abb. 5.18:** Kapazität als Funktion der Zeit bei Vesikelspreitung auf verschiedenen Monolagen. Die Abnahme der Kapazität infolge der Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln hat ihr Optimum für eine Assemblierungszeit von 15 h im zweiten Präparationsschritt des 2-step self-assemblings (15/15 Probe,  $\Delta$ -). Als Vergleich ist die Vesikelspreitung auf einer reinen DPPTE-Schicht ( $\square$ -) mit aufgetragen. Die Pfeile signalisieren den Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

Die Pfeile in Abb. 5.18 signalisieren den Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, d. h. der markierte Datenpunkt wurde nach dem Pufferwechsel gemessen. Die Kapazität nimmt erst nach dem Pufferwechsel ab. Eine Ausnahme stellt die 15/15-Oberfläche dar. Das vorliegende Beispiel weist bereits eine Abnahme der Kapazität von  $3,35 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  auf  $0,57 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  infolge der Vesikelspreitung in 0.1 M NaCl auf und nimmt nur noch geringfügig auf  $0,43 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  durch den Pufferwechsel ab (siehe Abb. 5.19). Die Vesikelspreitung ist durch den hohen hydrophoben Charakter dieser Oberfläche zu erklären (Kontaktwinkel  $\sim 100\text{-}103^\circ$  (advancing angle), bzw. ein Bedeckungsgrad mit DPPTE von  $\sim 97\%$  (Wert aus AFM-Bildanalysen)). Die Kapazität dieser sBLM entspricht der der black lipid membranes (BLM's).



**Abb. 5.19:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor ( $\square$ -) und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer zweistufig präparierten binären Monolage (aus 2-Mercaptoethanol/DPPTE, 15/15-Probe) in 0,1 M NaCl ( $\circ$ -) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ( $\Delta$ -). Deutlich ist eine Abnahme der Kapazität (Schnittpunkt des Halbkreises mit der y-Achse) zu erkennen. Eine weitere geringfügige Abnahme der Kapazität erfolgt durch den Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Kurven ohne Symbol geben die Fits, unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC)C wieder. Rechts ist ein vergrößerter Ausschnitt der Graphen für die Lipiddoppelschicht dargestellt.

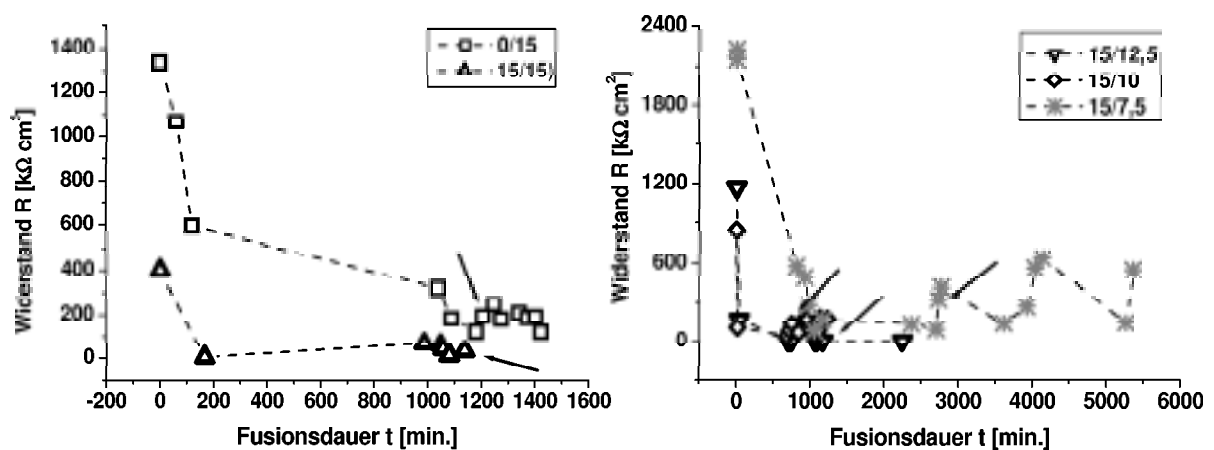
In Abb. 5.19 und 5.20 sind die Admittanz- und Nyquist-Plots während der Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln auf die 15/15-Oberflächen gezeigt.



**Abb. 5.20:** Nyquist-Plot vor ( $\square$ - bzw.  $\text{---}$ ) und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer 15/15-Submonolage in 0,1 M NaCl ( $\circ$ - bzw.  $\text{---}$ ) und Ca-Puffer ( $\Delta$ - bzw.  $\text{---}$ ). Deutlich ist eine Widerstandsabnahme zu erkennen (Schnittpunkt des Halbkreises mit der x-Achse). Eine geringfügige Erholung des Widerstandes erfolgt durch den Wechsel auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, jedoch bleibt der Widerstand der Lipiddoppelmembran insgesamt kleiner als der der Monolage. Kurven ohne Symbol geben die Fits unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC)C wieder.

Die niedrigen Kapazitäten der auf den 15/15-Oberflächen präparierten Lipiddoppelmembranen müssten einen hohen Widerstand der Membran erwarten lassen. Leider liegt der Widerstand der Membran (- $\Delta$ - und - $\circ$ -) ebenso wie bei der oben diskutierte reinen DPPTE-Monolage unter dem Wert der Submonolage (- $\square$ -) (Abb. 5.20). Jedoch nimmt der Widerstand durch das Spülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer geringfügig wieder zu, bleibt aber mit  $32 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  weit unter dem Widerstand von  $399 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  der Submonolage (ausgewerteter Messbereich: 20000 Hz bis 0,0796 Hz).

Abb. 5.21 zeigt den zeitlichen Verlauf der Widerstandsänderung während der Vesikelspreitung von DMPC/DMPS-Lipiden auf den zweistufig präparierten binären 15/15-Oberflächen unterschiedlicher Assemblierungszeiten an.



**Abb. 5.21:** Zeitliche Widerstandsänderung durch die Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln auf durch 2-step self-assembly präparierten binären Monolagen unterschiedlicher Assemblierungszeiten. Die Pfeile signalisieren die erste Messung nach dem Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

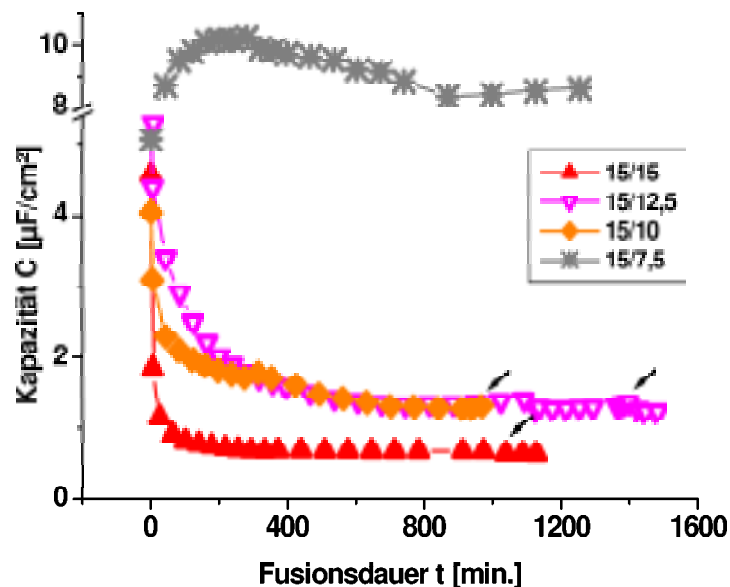
Alle in Abb. 5.21 gezeigten Oberflächen weisen eine Abnahme des Widerstands infolge der Vesikelspreitung auf. Die Pfeile zeigen die erste Messung in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer an. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer weist einen wesentlich geringeren Effekt auf die Widerstände aus, als auf die in Abb. 5.18 gezeigten Kapazitätswerte.

Der Verlauf der Kapazitätsänderung (Abb. 5.18) zeigt, dass die Fusion recht langsam ist. Aus diesem Grund wurden für die kommenden Experimente DMPC/DPhytPS-Lipide

verwendet. Das DPhytPS-Lipid besitzt aufgrund reduzierter Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine niedrigere Phasenübergangstemperatur als das DMPS und sollte somit bei 37° C beweglicher (fluid) als das DMPS sein.

Es ist anzumerken, dass die Kapazitäten der Lipiddoppelmembranen sehr gut reproduzierbar sind, die Widerstände jedoch einen großen Streubereich aufweisen.

Abb. 5.22 zeigt die Kapazität als Funktion der Zeit während der Fusion von DMPC/DPhytPS-Lipiden (gleicher Konzentration) auf den durch 2-step self-assembly präparierten Monolagen. Wie bei der Vesikelspreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln lag das Optimum bezüglich des Spreitungsverhaltens bei den 15/15-Proben. Die Kapazitäten der 15/15-Oberflächen erreichen dabei schneller deutlich kleinere Werte als die der kürzeren Assemblierungszeiten.



**Abb. 5.22:** Kapazitätsänderung als Funktion der Zeit während der Vesikelspreitung auf zweistufig präparierten binären Submonolagen. Die 15/15-Probe (-▲-) zeigt das beste Spreitungsverhalten von DMPC/ DPhytPS-Vesikeln. Ab einer Assemblierungszeit  $\leq 7,5$  h (-\*) im zweiten Präparationsschritt findet keine Vesikelspreitung mehr statt. Die Pfeile signalisieren die erste Messung nach dem Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.



Die 15/15-Oberflächen erreichen hier Kapazitäten von  $0,58 \pm 0,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , wohingegen die Kapazitäten der anderen Oberflächen (15/12,5 und 15/10) bei  $> 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bleiben. Ab Präparationszeiten  $\leq 7,5$  Stunden im zweiten Präparationsschritt (15/7,5-Probe) findet nur noch eine Zunahme der Kapazität infolge der Vesikelspreitung statt, was auf Vesikeladsorption hinweist. Der Wechsel auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer forciert keine weitere Abnahme der Kapazität wie es bei der Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln der Fall ist (siehe Abb. 5.18, oben).

Es wird deutlich, dass erst mit einem relativ hohen hydrophoben Anteil ( $\sim 97\%$  aus der AFM-Bildanalyse) in der Submonolage mit einem sehr guten Spreitungsverhalten (Kapazitäten  $< 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) gerechnet werden kann (hierzu siehe auch Versuche mit DMPC/DPhytPS). Steinem et al [68] findet für die durch direkte Vesikelspreitung von DPPTE/DMPC-Vesikeln auf Gold hergestellten Membranen (siehe Kapitel 3) mit  $0,63 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ähnliche Werte für die Kapazität der Modellmembran, tatsächlich gemessene Widerstände werden dort nicht angegeben. Jedoch benötigt die von Steinem et al verwendete Präparationstechnik mit 6 h Fusionsdauer relativ lange für die Ausbildung der Lipiddoppelmembran. Des Weiteren wird in der Arbeit von Steinem angegeben, das mindestens ein Anteil von 50 % an DPPTE für das Erreichen niedriger Kapazitäten nötig ist. Es ist anzunehmen, dass auf Grund von Austauschvorgängen ein wesentlich höherer hydrophober Anteil nach einer Fusionszeit von 6 h oberflächlich gebunden vorliegt, als dies der Molenbruch der Vesikelzusammensetzung widerspiegelt. Letzteres wurde von Wieder [60] unter Verwendung der gleichen Präparationstechnik und den gleichen Lipiden (DPPTE und DMPC) wie bei Steinem et al, berichtet. H. Wieder fand, dass unabhängig vom Molenbruch, bei Verwendung von sehr langen Fusionszeiten (15 - 20 h) ein Bedeckungsgrad von 80 % - 85 % mit DPPTE vorliegt. In der Arbeit v. H. Wieder werden Kapazitäten von etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für eine DPPTE/DMPC-Membran, bzw.  $0,9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für DPPTE/DMPC/DMPS-Membranen angegeben.

Im Vergleich erreichen die Oberflächen der 15/15-Proben, die durch die 2-step self-assembly Technik hergestellt wurden, bei Verwendung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln, bereits nach einer Fusionsdauer von 60 Minuten Kapazitäten deutlich unter  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , die

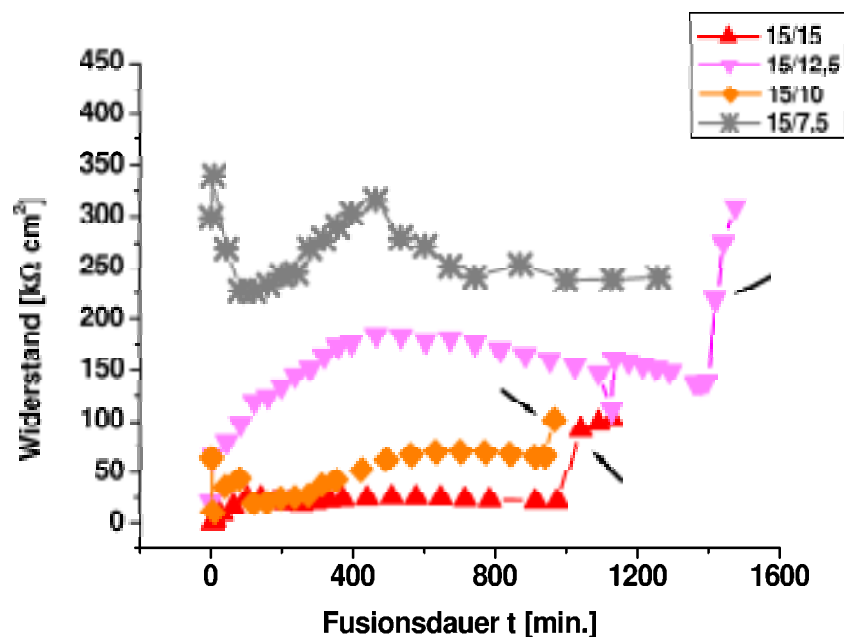
dann aber noch weiter auf die in der Tabelle 5-1 zusammengefassten Werte ( $\leq 0,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) absinken.

Präparationsmethode	Vesikel	$C_{\text{sBLM}} [\mu\text{F}/\text{cm}^2]$
Zweistufen-Methode (2-step self-assembly)	15/15-DMPC/DMPS	$0,6 \pm 0,18$
15 min. Mercaptoethanol/ 15 h DPPTE	15/15-DMPC/DPhytPS	$0,58 \pm 0,1$
Koadsorption 15 h Mischung aus Mercaptoethanol/DPPTE	DMPC/DMPS	1,84
100 % DPPTE 15 h assembliert	DMPC/DMPS	$0,52 \pm 0,03$
Direkte Vesikelspreitung auf Gold (H. Wieder [1])	DPPTTE-DMPC DPPTTE-DMPC/DMPS	1 0,9
Direkte Vesikelspreitung auf Gold (Steinem et al [4])	DPPTTE-DMPC	$0,63 \pm 0,02$

**Tab. 5-1:** Übersicht über die durch verschiedene Präparationstechniken erreichten Membrankapazitäten.

Die Ergebnisse der verschiedenen Membranpräparationstechniken der vorliegenden sowie aus vorangegangenen Arbeiten sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Sie zeigt deutlich die Überlegenheit der sBLM's auf Basis der durch die Zweischnitt-Methode hergestellten binären Submonolagen. Die Kapazitäten entsprechen durchaus den für BLM's gemessenen Werten. Lediglich das System von Steinem et al zeigte vergleichbare Kapazitäten.

Weniger günstig fällt der Vergleich mit der BLM im Fall der Widerstände aus. Abb. 5.23 zeigt die zeitabhängige Widerstandsänderung infolge der Spreitung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf den durch 2-step self-assembly präparierten binären Submonolagen nach verschiedenen Assemblierungszeiten (selben Proben wie bereits in Abb. 5.22 gezeigt).



**Abb. 5.23:** Widerstandsänderung durch die Spreitung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf durch 2-step self-assembling präparierten binären Monolagen zu unterschiedlichen Assemblierungszeiten. Die Pfeile signalisieren die erste Messung nach dem Wechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

Eine Zunahme des Widerstandes infolge der Vesikelspreitung ist für fast alle Oberflächen zu beobachten. Lediglich die 15/7,5-Probe zeigt ein anderes Bild. Hier sinkt der Widerstand durch die Vesikelspreitung, beginnt jedoch bei vergleichsweise hohen Werten. Bei allen anderen Assemblierungszeiten ist eine weitere Zunahme des Widerstands infolge des Pufferwechsels zu beobachten, jedoch hat der Pufferwechsel hier kaum einen Einfluss auf die Kapazität (siehe Abb. 5.22). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, dass die Vesikelspreitung auch mit einer Zunahme des Widerstandes einhergeht. Aufgrund der höheren Beweglichkeit (Fluidität) der DPhytPS-Lipide und den Ergebnissen aus der EIS kann auf ein besseres Spreitungsverhalten der DMPC/DPhytPS-Lipidmischung geschlossen werden. Daraus lässt sich auch erklären, warum der Pufferwechsel keinen Einfluss auf die Kapazität, aber einen deutlichen auf den Widerstand hat. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer führt lediglich nur noch zu einer stärkeren Ordnung innerhalb der Membran (Widerstandszunahme) aber nicht mehr zu einem höheren Bedeckungsgrad. Wieder erreicht ähnlich hohe Widerstände (im Bereich von  $100 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  [60]), wie sie in dem vorliegenden System erreicht werden. Im Vergleich zu BLM's (Widerstände im Mega-

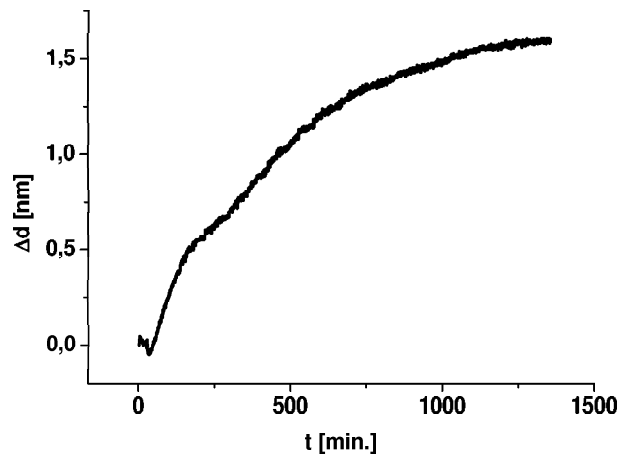
und Giga-Ohm Bereich [207]) sind die Widerstände relativ niedrig ( $10^4$ - $10^5 \Omega\text{cm}^2$ ). Dazu ist zu beachten, dass selbst geringe Defektraten große Auswirkungen auf die Membranwiderstände besitzen, was durch Gl 5-1 [181] verdeutlicht wird, wobei  $\Theta$  den Grad der Bedeckung angibt. Die Defekte und damit die Widerstände der Defekte  $R_{\text{Defekte}}$  sind dabei parallel zu der Membran, bzw. dem Membranwiderstand  $R_{\text{Membran}}$  angeordnet. Die Membrandefekte dürfen dabei nicht als statische Defekte, bzw. als lochartig angesehen werden.

$$\frac{1}{R_{\text{gesamt}}} = \frac{\Theta}{R_{\text{Membran}}} + \frac{1-\Theta}{R_{\text{Defekte}}} \quad \text{Gl. 5-1}$$

Unter Annahme eines idealen Membranwiderstands von  $1 \text{ G}\Omega\text{cm}^2$  [207] und einer Defektrate von nur 0,1 %, ergibt sich unter der Verwendung von  $60 \Omega\text{cm}^2$  für die Widerstände der Defekte (entspricht dem Elektrolytwiderstand) bereits nur noch ein theoretischer Gesamtwiderstand  $R_{\text{gesamt}}$  von knapp  $20 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ .

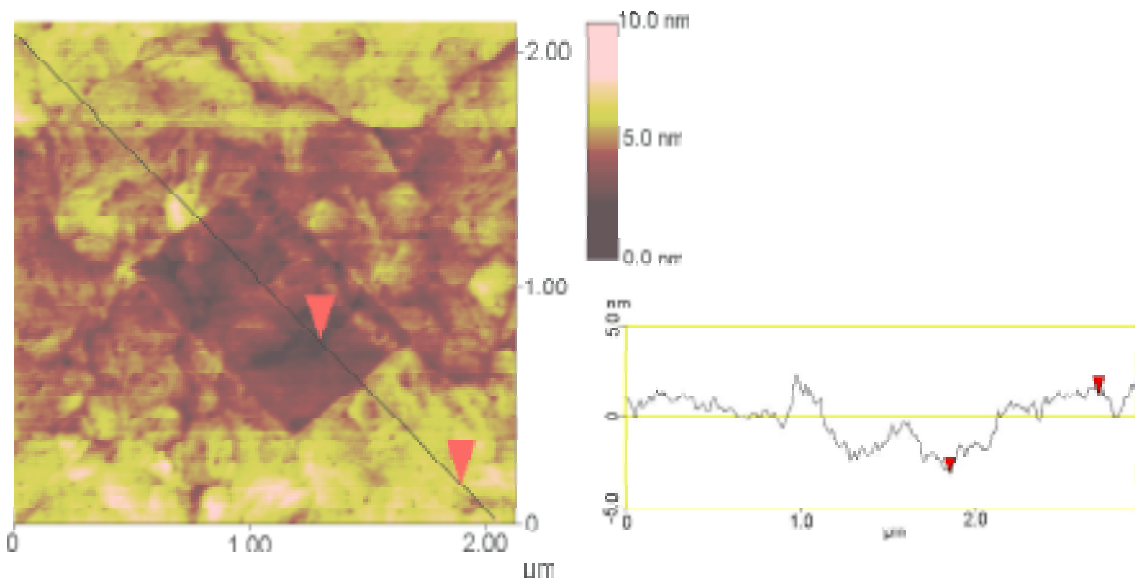
Durch die Spreitung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf den binären 15/15-Submonolagen werden höhere Widerstände erreicht als durch die Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln. Durch die größere Beweglichkeit der DPhytPS-Lipide gegenüber den DMPS-Lipiden können Defekte in der Lipidmembran leichter ausheilen, was zu höheren Widerständen führt.

Abb. 5.24 zeigt die Kinetik (SPS) der Vesikelspreitung (DMPC/DPhytPS) auf einer 15/15-Probe in 0,1 M NaCl bei  $37^\circ \text{C}$ . Deutlich ist eine stetige Zunahme der Filmdicke zu erkennen, die schließlich einen Gleichgewichtszustand erreicht. Die relativ lange Fusionszeit des in Abb. 5.24 gezeigten Beispiels im Vergleich zu Abb. 5.22 ist dadurch zu erklären, dass die Submonolagen für die SPS-Messungen auf polykristallinem Gold präpariert wurden. Eine thermische Nachbehandlung der Goldelektrode zur Ausbildung monokristalliner Goldterrassen wie bei den Mica/Au(111)-Elektroden (siehe Kapitel 6) mit einer geringeren Rauigkeit [132], ist bei der Verwendung von LaSFN9-Glas nicht möglich, da dieses Spezialglas den benötigten Temperaturen von  $650^\circ \text{C}$  nicht standhält.



**Abb. 5.24:** SPS-Kinetikkurve der Vesikelspreitung (DMPC/DPhytPS) auf einer 15/15-Monolage in 0,1 M NaCl, 37° C.

Das Vorhandensein einer Lipidmembran konnte auch durch AFM-Messungen bestätigt werden, in dem nach der erfolgten Vesikelspreitung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf einer 15/15-Monolage, die Lipidmembran mit der AFM-Spitze entfernt werden konnte (Abb. 5.25).



**Abb. 5.25:** AFM-Aufnahme einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran (contact mode, NaCl). Durch Anwendung höherer Scan-Kräfte konnte die gesamte Lipiddoppelmembran (binäre 2-Mercaptoethanol/DPPTE-Schicht und DMPC/DPhytPS-Schicht) innerhalb des Rechtecks entfernt werden. Durch eine Sektionsanalyse (line scan, rechts) ergibt sich eine Höhendifferenz zwischen den beiden Zeigern von  $\sim 4,4$  nm.

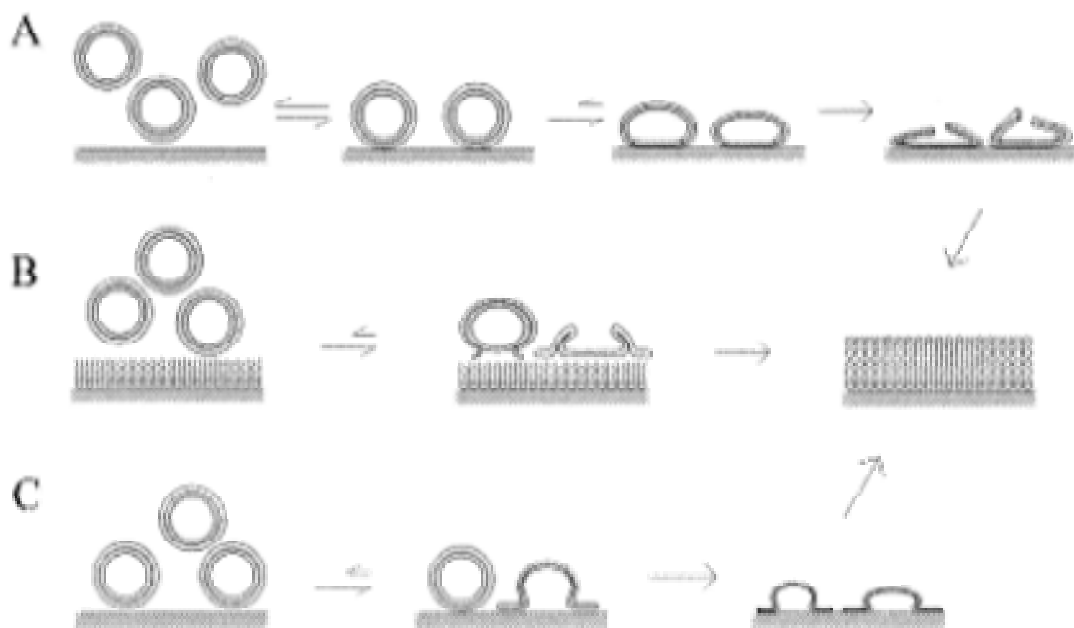
Das Ausmessen der Höhendifferenz (durch Erstellen eines Querschnittsprofils (line scans)) zwischen der kompletten Schicht und der entfernten Schicht ergab eine Differenz von ~ 3,7 bis 4,1 nm. Die Höhendifferenz für eine DMPC/DMPS-Membran ebenfalls auf einer 15/15-Monolage ergab mit etwa 5 nm etwas höhere Schichtdicken (Daten nicht gezeigt).

Die sich in den AFM-Messungen ergebenden Gesamtschichtdicken für eine solche Lipidmembran stimmen recht gut mit denen durch SPS-Messungen bestimmten Schichtdicken überein: 15/15-Monoschicht =  $2,6 \pm 0,16$  nm, DMPC/DPhytPS-Schicht =  $1,65 \pm 0,05$  nm  $\Rightarrow$  ~ 4,25 nm. Die geringen Abweichungen zwischen den Ergebnissen aus den SPS-Messungen und den AFM-Messungen können durch die etwaige Kompression der Membran durch den AFM-Tip bedingt sein, die bei den DMPC/DPhytPS-haltigen Membranen stärker zu erwarten ist als bei den DMPC/DMPS-haltigen, da das DPhytPS eine höhere Beweglichkeit in der Membran besitzt als das DMPS (aufgrund verringerter Van-der-Waals-Wechselwirkungen).

### **Zusammenfassende Diskussion zum Mechanismus der Vesikelspreitung:**

Das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Submonolagen hinsichtlich der Vesikelspreitung wird wie folgt erklärt: Für die Vesikelspreitung auf hydrophoben, bzw. hydrophilen Oberflächen werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Abb. 5.26 (unten) [211] zeigt die derzeit diskutierten Spreitungsmodelle auf hydrophilen (A u. C), bzw. auf einer hydrophoben Oberfläche (B). Allen diskutierten Mechanismen ist die zuerst erfolgende Adsorption intakter Vesikel gemeinsam. Freie Oberflächenenergien führen schließlich zur Destabilisierung der Vesikel, was schließlich die Ruptur und Spreitung der Vesikel bedingt [211], [199], [105]. Bei binären Monolagen muss zwischen homogen gemischten und phasenseparierten Monolagen unterschieden werden. Letztere weisen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche auf. Jeder Oberflächenbereich gibt für sich Anlass zur Vesikelspreitung [196] gemäß den oben erwähnten Mechanismen. Gemischte Monolagen dagegen sind zumeist weder eindeutig hydrophil noch eindeutig hydrophob. Solche Oberflächen führen lediglich zur Adsorption von ganzen oder teilgespreiteten Vesikeln [60,143]. Domänenbildung sollte daher die Vesikelspreitung

begünstigen. Das erklärt, warum die Zweischnitt-Methode bessere Ergebnisse als die Einschnitt-Methode liefert. Für die Vesikelspreitung auf binären Monolagen muss besonders in den Grenzbereichen hydrophob/hydrophil ein komplexer Mechanismus angenommen werden. Jenkins et al [217] untersucht das Spreitungsverhalten von Vesikeln auf gestempelten binären Monolagen, mit einem definierten Verhältnis von hydrophob zu hydrophil, wobei die Domänengröße der gestempelten hydrophilen und hydrophoben Domänen zueinander variiert wurden, jedoch nicht das Gesamtverhältnis hydrophob zu hydrophil. Er stellte ein besseres Spreitungsverhalten der Vesikel auf Monolagen mit kleinen hydrophilen Domänen als auf solchen mit großen hydrophilen Domänen fest. Er schloss daraus, dass die Grenzbereiche zwischen hydrophoben und hydrophilen Flächen besonders destabilisierend auf die Vesikel wirken und/oder die Grenzbereiche als Keimbildungszentren der Membranbildung angesehen werden können.



**Abb. 5.26:** Modellvorstellung der Vesikelspreitung auf hydrophilen (A u. C), bzw. hydrophoben (B) Oberflächen.

Auf der anderen Seite stellen aber hydrophobe Oberflächen sehr attraktive Oberflächen für die Vesikelspreitung dar [101,196,217], weswegen ein Großteil der treibenden Kraft für die Vesikelspreitung dem hydrophoben Charakter zugesprochen werden muss. Versucht man

die in der Literatur diskutierten Mechanismen der Vesikelspreitung auf das in diesem Kapitel verwendete System zu übertragen, so kann unter der Berücksichtigung des zunehmenden hydrophoben Anteils mit fortschreitender Assemblierungszeit der hydrophobe Effekt auch hier als Hauptauslöser für die Vesikelspreitung angesehen werden. Der von Jenkins et al diskutierte Grenzflächeneffekt (edge effect) kann hier ebenfalls als weiter treibende Kraft für die Vesikelfusion diskutiert werden. Offensichtlich liegt bei den zweistufig präparierten 15/15-Oberflächen (2-step self-assembling) ein optimales Verhältnis aus hydrophob zu hydrophil vor. Die hydrophilen Domänen sind ausreichend klein, um nicht zu einer ausschließlichen Vesikeladsorption zu führen, so dass die vorherrschenden Oberflächenenergien genügend Stress auf die zunächst adsorbierten Vesikel ausüben um sie zu destabilisieren und zu fusionieren.

#### **5.1.2.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.2**

Koadsorbierte Oberflächen zeigten aufgrund der uncharakteristisch hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften in der EIS nur eine geringe Tendenz zur Vesikelspreitung. Die Kapazität der koadsorbierten binären Submonolagen nahm durch die Vesikelspreitung nur geringfügig ab. Deutlich bessere Ergebnisse konnten auf den zweistufig präparierten DPPE/Mercaptoethanol-Submonolagen erreicht werden, wobei sich eine 15stündige Assemblierungszeit im zweiten Präparationsschritt für den Membranaufbau als optimal erwies. Die Domänenstruktur der Submonolage begünstigt die Spreitung, da die Vesikelspreitung bevorzugt auf eindeutig hydrophilen oder hydrophoben Oberflächen abläuft. Als Hauptauslöser der Vesikelspreitung werden die hydrophoben Domänen der zweistufig präparierten Oberflächen angesehen, wobei die Grenzflächen der Domänen vermutlich unterstützend auf die Spreitung wirken. Durch die Verwendung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln konnte aufgrund der im Gegensatz zum DMPS-Lipiden höheren Fluidität der DPhytPS-Lipiden eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige, spontane und schnelle Spreitung der Vesikel erreicht werden. Unterschiede zeigten sich auch in den Widerständen der Membranen unterschiedlicher Lipidmischungen. DMPC/DPhytPS-haltige Membranen zeigten höhere Widerstände als die DMPC/DMPS-haltigen Membranen.



Die zweistufige Präparationsmethode (2-step self-assembly) stellt damit eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem bisher üblichen Präparationsverfahren der Thiol-Submonolage durch Koadsorption dar und wurde deshalb unter Verwendung einer 15stündigen Assemblierungszeit im zweiten Präparationsschritt zum Aufbau von Membranen zur Untersuchung der Annexin V-Mutanten angewendet.

### **5.1.3 Anwendung der sBLM zur Untersuchung der in vitro-Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten und deren Hemmung**

Die Kanaleigenschaften eines gentechnisch veränderten Annexin V (Fusionsprotein aus Wildtyp Annexin V und *Strep*-tag II [130], [218]) und dessen reversible Hemmung durch Streptavidinbindung wurde an dem oben beschriebenen optimierten sBLM-System untersucht.

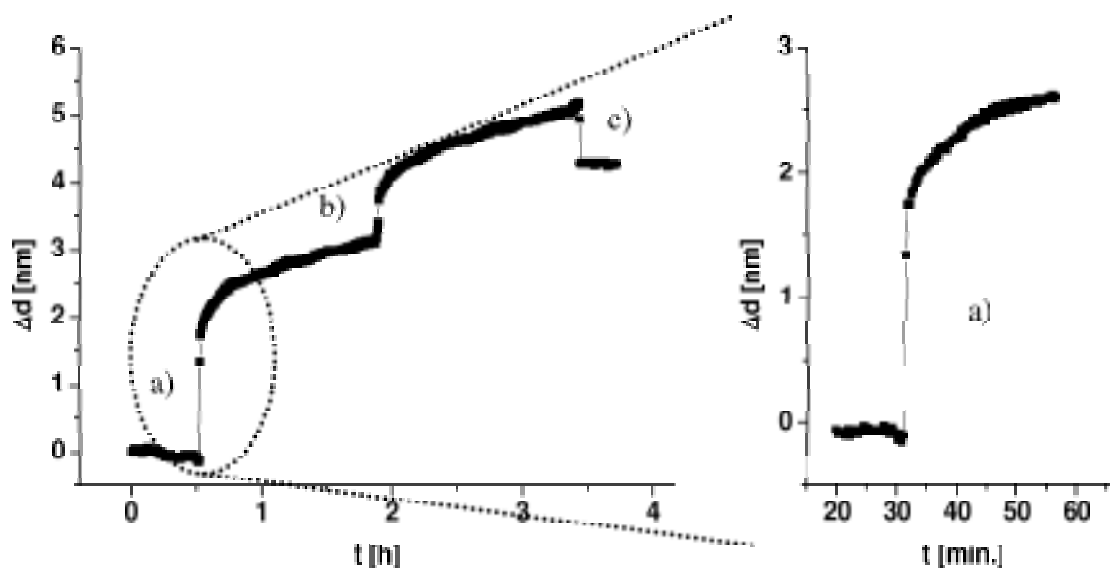
#### **5.1.3.1 Proteinbindung**

Zunächst wurde das Bindungsverhalten der Annexin V-Mutante (in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer) an die Membran, bzw. der Streptavidin-Mutante 1 and die Annexin V-Mutante, sowie deren kompetitive Verdrängung durch das D-Desthiobiotin untersucht. Hierfür wurde eine auf einer reinen DPPTE-Monolage aufgebauten DMPC/DMPS-Membran verwendet.

In Abb. 5.27 (unten) ist die Kinetik der Membranbindung von Annexin V (a), der Streptavidinbindung (b) und dessen kompetitive Verdrängung (c) gezeigt.

Die sprunghafte Zunahme der Schichtdicke infolge der Proteinbindung (a und b) zeigt dass die Bindung der Proteine sehr schnell ist. Die Bindung von Annexin V (Endkonzentration von  $0,385 \mu\text{M}$  [60]) ist nach ca. 30 Minuten weitestgehend abgeschlossen, wobei der größte Anstieg in der Schichtdicke innerhalb von ca. 4 Minuten stattfindet. Titrationsexperimente (SPS-Messungen) zeigten, dass unter der Verwendung einer  $0,385 \mu\text{M}$  Annexin V-Konzentration eine maximale Belegung der Membran mit Annexin

vorliegt. Durch SPS-Messungen vor und nach der Annexinbindung konnte eine optische Schichtdickenzunahme von  $3,2 \pm 0,2$  nm verzeichnet werden, was gut mit dem theoretischen Wert der vertikalen Proteinabmessung (ermittelt mit RasMol an dem Annexin V-Typ 1A8A) von 3 nm übereinstimmt. Die Bindung der Streptavidin-Mutante 1 ( $K_d$  von  $\sim 1 \mu\text{M}$  [130]) an die Annexin V-Mutante resultiert ebenfalls in einer sehr schnellen Zunahme der optischen Schichtdicke, was auf eine schnelle Bindung schließen lässt. Die Schichtdickenzunahme durch die Streptavidinbindung (Endkonzentration von  $0,985 \mu\text{M}$ ) sollte auf Grund der Proteinabmessungen des Streptavidins (Streptavidin-Mutante 1: 53,3 kDa (Tetramer), Dicke 4 nm [219]) im Vergleich zum Annexin V (Annexin V-Mutante: 35,9 kDa, Dicke 3 nm, ermittelt mit RasMol an dem Annexin V-Typ 1A8A) größer ausfallen.



**Abb. 2.27:** Kinetik (SPS) der Annexin V-Membranbindung (a). Daran schließt sich die Bindung der Streptavidin-Mutante 1 an das Annexin V an (b). Durch die Zugabe von Desthiobiotin findet eine kompetitive Verdrängung des Streptavidins von seiner Bindungsstelle statt (c). Rechts ist die Annexin V-Membran Bindung nochmals vergrößert dargestellt. Die Messung fand in Ca-Puffer statt.

Als Grund für die etwas zu gering ausfallende Schichtdickenzunahme wird eine gegenseitige sterische Behinderung der Streptavidine infolge ihrer Abmessungen angenommen, da das Streptavidin-Tetramer deutlich größer ist als das Annexin V. Auch kann die Zugänglichkeit der Bindungsstellen infolge von Oberflächenrauigkeiten des hier verwendeten thermisch aufgedampften Goldes [132] verringert sein. Die Zugabe von

D-Desthiobiotin (Endkonzentration von 0,125 mM) zeigt keinen vollständigen Rückgang der Schichtdicke auf den ursprünglichen Wert. Vermutlich kann das Streptavidin nur teilweise von seiner Bindungsstelle kompetitiv verdrängt werden. Eigentlich ist auf Grund der hohen Dissoziationskonstanten  $K_d$  von  $\sim 1 \mu\text{M}$  [130] (gemessen unter Verwendung des freien *Strep*-tag II-Proteins und der Streptavidin-Mutanten 1) eine vollständige Verdrängung zu erwarten. Jedoch kann auch hier die Zugänglichkeit der Bindungsstelle sterisch bedingt erschwert sein. Die erniedrigte Affinität kann ebenfalls auch der Grund für etwas gering ausfallende Schichtdickenzunahme durch die Bindung von Streptavidin sein.

### 5.1.3.2 Proteinaktivität

Unter Annexin V-Einwirkung ist eine Abnahme des Membranwiderstands und eine Zunahme der Membrankapazität zu erwarten, da das Annexin V die Membranintegrität stört und gleichzeitig Kanaleigenschaften aufweist. Durch die Streptavidinbindung soll die zentrale Pore im Annexin V (verantwortlich für die Leitfähigkeit) mechanisch blockiert werden. Die Membrankapazität und der Membranwiderstand müssten sich dann wieder erholen und zu ihrem Ursprungswert vor der Annexinbindung an die Membran zurückkehren [60]. Dieser Mechanismus soll durch die Zugabe von D-Desthiobiotin und der kompetitiven Verdrängung des Streptavidins von seiner Bindungsstelle reversibel sein. H. Wieder [60] konnte zwar die Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten, sowie die Hemmung an dem von ihm verwendeten Membransystem nachweisen, beobachtete jedoch keine Reversibilität, obwohl es möglich war, das Streptavidin zu verdrängen.

Die Untersuchung der Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten erfolgt zunächst unter Verwendung einer auf einer reinen DPPE-Submonolage aufgebauten DMPC/DMPS-Membran, sowie auf Membranen, die durch die Spreitung von DMPC/DMPS-, bzw. DMPC/DPhytPS-Lipiden auf zweistufig präparierten binären 15/15-Monolagen hergestellt wurden. Der Aufbau der Membranen erfolgte unter Beibehaltung der oben genannten Versuchsbedingungen. Für die Durchführung der EIS wurden die in Abschnitt 5.1.2.3 genannten Konzentrationen verwendet.

In Abb. 5.28 ist die zeitliche Änderung der elektrischen Eigenschaften unter dem Einfluss der Annexin V-Mutanten auf unterschiedliche sBLM's gezeigt. Vergleicht man die Kapazitäts- und Widerstandsänderung (siehe Abb. 5.28), so zeigt sich, dass die Annexin V-Mutante auf Lipidmembranen, die auf einer binären zweistufig präparierten 15/15-Monolage (DMPC/DPhytPS -●-, DMPC/MMPS -▲-) aufgebaut wurden, schneller Aktivität zeigt, als auf einer reinen DPPE-Monolage (-■-) aufgebauten DMPC/DMPS-Membran.

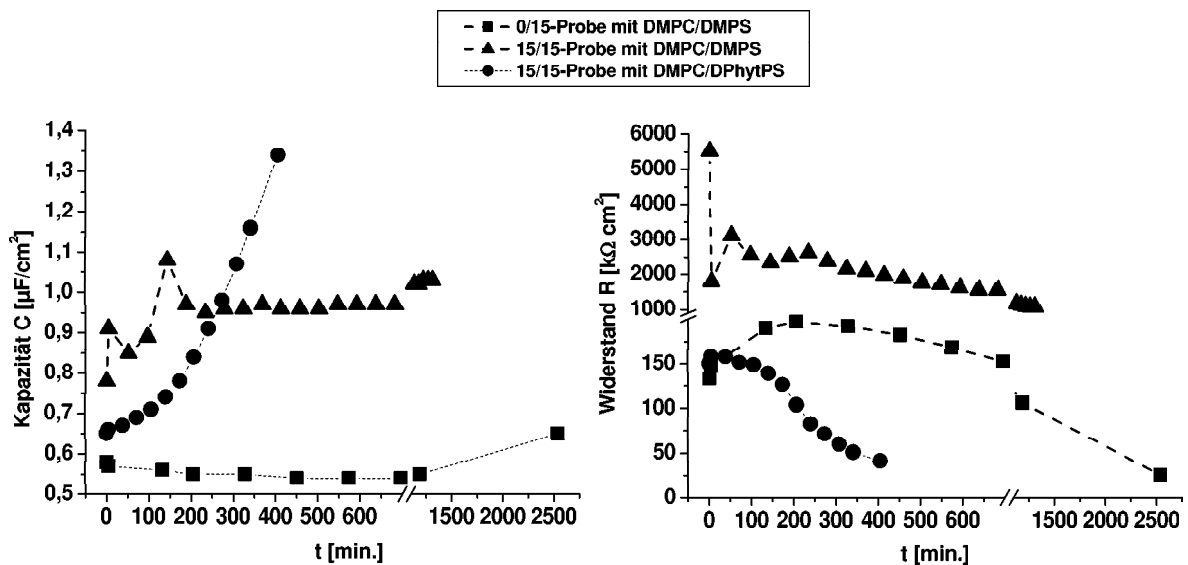
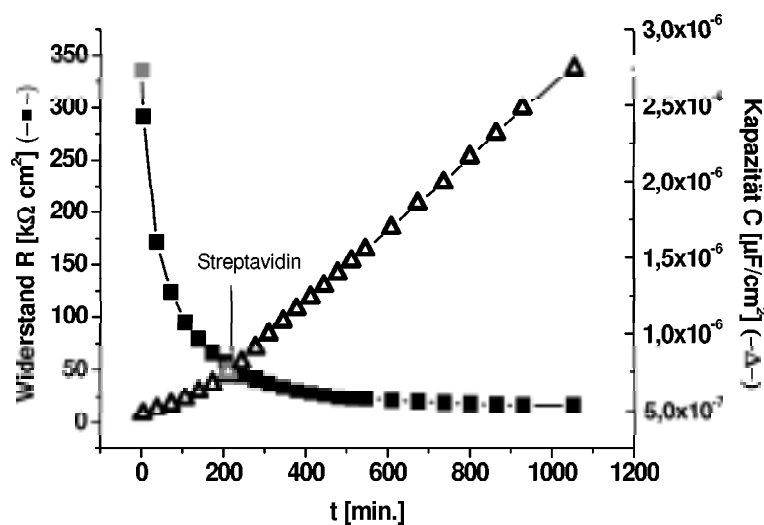


Abb. 5.28: Zeitliche Änderung der elektrochemischen Eigenschaften unterschiedlicher Modellmembranen unter dem Einfluss der Annexin V-Mutanten.

Der deutlich schnellere Eintritt der Annexin V-Wirkung auf die 15/15-Proben (-●-, -▲-) lässt unter der Berücksichtigung des Wirkmechanismus des Annexin V (siehe Kapitel 1) auf eine bessere Beweglichkeit der Lipidmoleküle innerhalb der Membran schließen, da das Annexin auf die Membranintegrität störend einwirkt. Bei weniger rigiden Membranen ist eine leichtere Störung der Membranintegrität durch das Annexin V zu erwarten. Die Bestimmung der Fluidität der in dieser Arbeit aufgebauten sBLM's durch FRAP-Messungen konnte nicht durchgeführt werden. In solchen Systemen tritt wegen des geringen Abstands der Membran zur Goldelektrode Fluoreszenzlöschung infolge eines Energietransfers vom Fluorophor zum Gold (quenching) auf.

Die Verwendung von DPhytPS anstelle von DMPS in der Lipidmischung zeigt bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Proteinaktivität keine signifikanten Unterschiede, jedoch im Ausmaß der Widerstands- und Kapazitätsänderung. Bei den DMPC/DPhytPS-haltigen Membranen nimmt die Kapazität unter Annexin V-Einfluss mit einem steilen Anstieg stetig zu, wohingegen sich die Kapazität der DMPC/DMPS-haltigen Membranen zu Anfang stark ändert, aber mit zunehmender Zeit fast stagniert.

Die sich in der Spreitung von DMPC/DPhytPC gezeigten Vorteile auf einer durch 2-step self-assembly präparierten binären 15/15-Monolage (15 min. 2-Mercaptoethanol/15 h DPPTE, siehe oben) und der relativ schnellen Ausprägung der Leitfähigkeit durch das Annexin V (Membranwiderstand sinkt, Membrankapazität steigt), sprechen für die Verwendung dieser Modellmembran zur Untersuchung der reversiblen Hemmung der Annexin V-Mutanten. Die Zunahme der Membrankapazität unter dem Einfluss des Annexin V konnte jedoch durch die Zugabe von Streptavidin nicht unterbrochen werden (siehe Abb. 5.29).

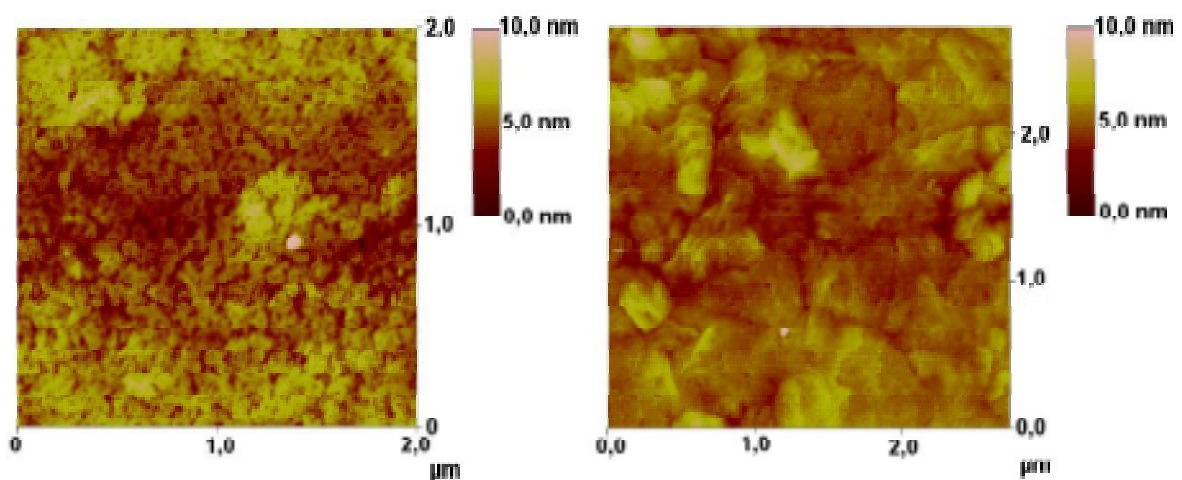


**Abb. 5.29:** Zeitliche Änderung der Kapazität unter Annexin V-Einfluss auf eine auf einer binären 15/15-Monolage (2-Mercaptoethanol /DPPTE, 2-step self-assembly) aufgebauten DMPC/DPhytPS-Modellmembran und der Versuch der Hemmung durch Streptavidinzugabe.

Hierfür sind zunächst zwei mögliche Gründe anzunehmen: a) Das Annexin V kann nicht durch die Bindung von Streptavidin gehemmt werden oder b) es findet eine irreversible Schädigung der Membran durch das Annexin V statt. Ersteres wurde bereits von H. Wieder

widerlegt [60], der eindeutig die Hemmung der Kanaleigenschaften durch das Streptavidin zeigen konnte. Dies kann auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (siehe unten). Unter der Einbeziehung des Wirkmechanismus des Annexin V ist die irreversible Schädigung der Membran wie folgt denkbar: Es ist zu erwarten, dass die Störung der Membranintegrität durch das Annexin V bei weniger rigiden Membranen erleichtert ist. Die laterale Beweglichkeit DPhytPS-Lipide sollten infolge der im Vergleich zum DMPS reduzierten Van-der-Waals-Wechselwirkungen etwas erleichtert sein. Aufgrund der geringeren Van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb einer DPhytPS-haltigen Membran, ist auch eine geringere Stabilität der Membran denkbar, die dann dem Einfluss des Annexins nicht standhält.

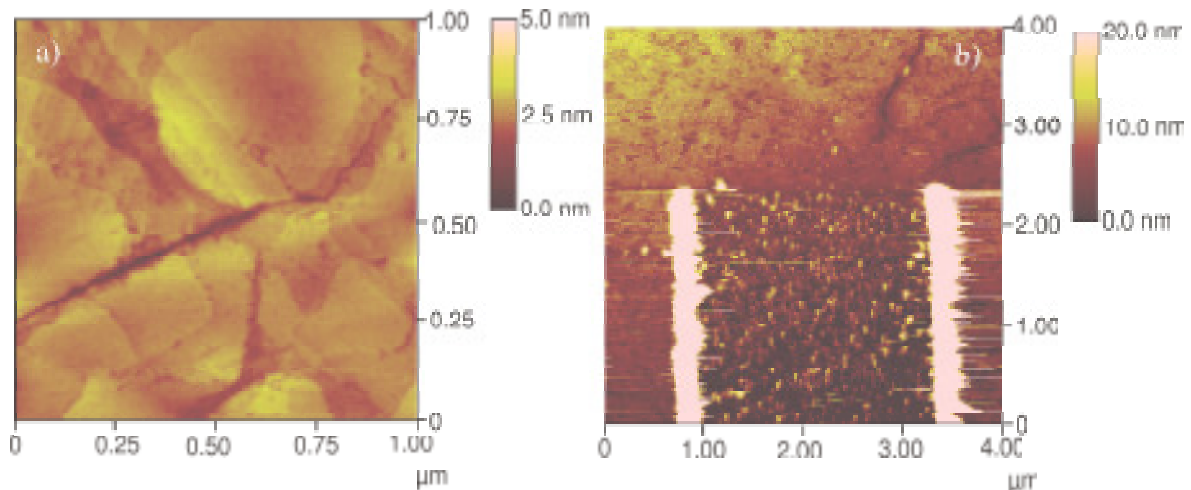
AFM-Aufnahmen einer mit Annexin V ( $0,385 \mu\text{M}$ ) belegten DMPC/DMPS- bzw. einer DMPC/DPhytPS-Membran (beide auf einer 15/15-Monolage aufgebaut) zeigen deutliche Unterschiede in der Oberflächentopographie (Abb. 5.30).



**Abb. 5.30:** AFM-Aufnahmen der Oberflächenbelegung einer DMPC/DPhytPS- (linkes Bild) bzw. einer DMPC/DMPS-Membran (rechtes Bild) mit Annexin V, aufgebaut auf einer 15/15-Monolage (2-step self-assembly) unter gleichen Versuchsbedingungen.

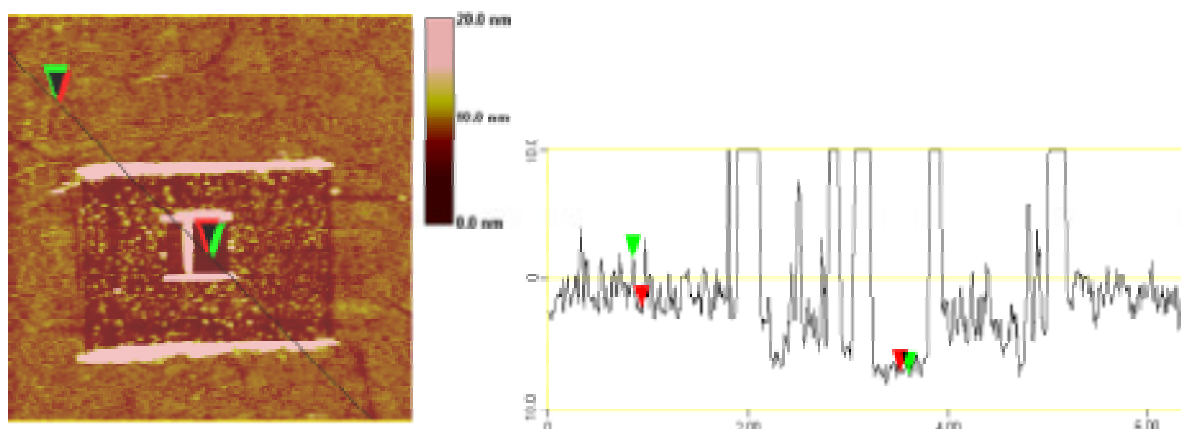
Eine wesentlich deutlichere Strukturierung der Oberfläche durch das Annexin V wird auf den DMPC/DPhytPS-Membranen beobachtet. Als Ursache wird hier, wie bereits diskutiert, eine Veränderung der Membran unter dem Einfluss des Annexin V angenommen.

Durch das Entfernen der Annexin-Schicht mit dem AFM-Tip (Abb. 5.31 b) kommt die darunter liegende Membran zum Vorschein. Die beobachtete Strukturierung ist bei einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran vor der Annexinbindung nicht zu erkennen (Abb. 5.31 a), sie kann jedoch auch durch Annexincluster verursacht sein.



**Abb. 5.31:** AFM-Aufnahme (contact mode) einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ohne Annexin V-Mutante (a) und mit partiell abgeschabter Annexin-Schicht (Quadrat) (b).

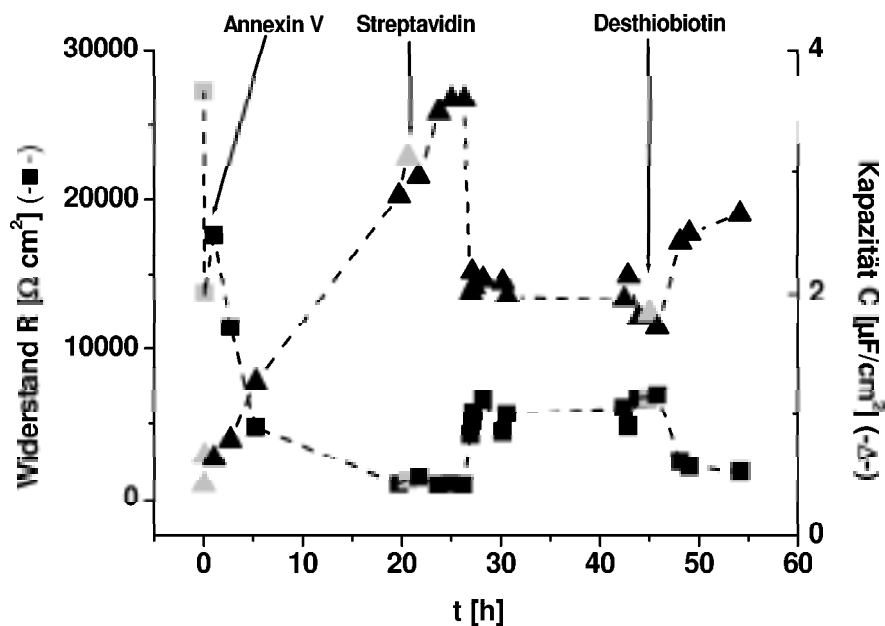
Die darunter liegende Membran lässt sich mit der AFM-Spitze entfernen (Abb. 5.32, unten). Hieraus ergibt sich ebenfalls eine Höhendifferenz zwischen der Annexin-Schicht und der membranfreien Fläche von  $\sim 7$  nm.



**Abb. 5.32:** AFM-Aufnahme (contact mode) einer mit Annexin V-Mutanten bedeckten 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer mit partiell entfernter Annexinschicht (großes Rechteck) und ebenfalls partiell entfernter Membran (kleines Quadrat). Rechts ist die Sektionsanalyse (line scan) dieser Schicht dargestellt.

Unter der Berücksichtigung, dass AFM-Messungen auf reine 15/15-DMPC/DPhytPS-Membranen eine Schichtdicke von 3,7 nm bis 4,1 nm ergaben (siehe oben) und für das Annexin V eine optische Schichtdicke von  $3,2 \pm 0,2$  nm, bzw. von  $2,9 \pm 0,4$  nm (siehe unten) angegeben werden kann, wurde tatsächlich der unter der Proteinschicht liegende Membranbereich freigelegt. Die sichtbaren Strukturen können Cluster oder einzelne Annexine darstellen, allerdings lässt sich dies nicht zweifelsfrei nachweisen. Die Strukturierung könnte daher auch dem Einfluss des Annexins auf die Membran zugeschrieben werden. Trotz der relativ niedrigen Annexin-Konzentration in der Messzelle von  $0,385 \mu\text{M}$  zeigen die AFM-Bilder eine hohe Belegungsichte der Membran mit der Annexin V-Mutanten.

Aus den bereits erwähnten Stabilitätsgründen musste zur Untersuchung der reversiblen Hemmung des Annexin V mit Streptavidin auf eine 15/15-DMPC/DMPS-Membran zurückgegriffen werden. In Abb. 5.33 ist zeitliche Änderung der elektrochemischen Membraneigenschaften unter Annexin V-Einfluss, sowie die reversible Hemmung der Kanaleigenschaften durch das Streptavidin (Endkonzentration in der Zelle  $0,985 \mu\text{M}$ ) auf einer 15/15-DMPC/DPMS-Membran gezeigt.



**Abb. 5.33:** Kinetik (EIS) der reversiblen Hemmung der Kanaleigenschaften von Annexin V mittels Streptavidin. Pfeile, bzw. grau markierte Datenpunkte zeigen die erste Messung nach Zugabe von Annexin V, Streptavidin oder Desthiobiotin an. Gemessen auf einer 15/15-DMPC/DMPS-Membran.

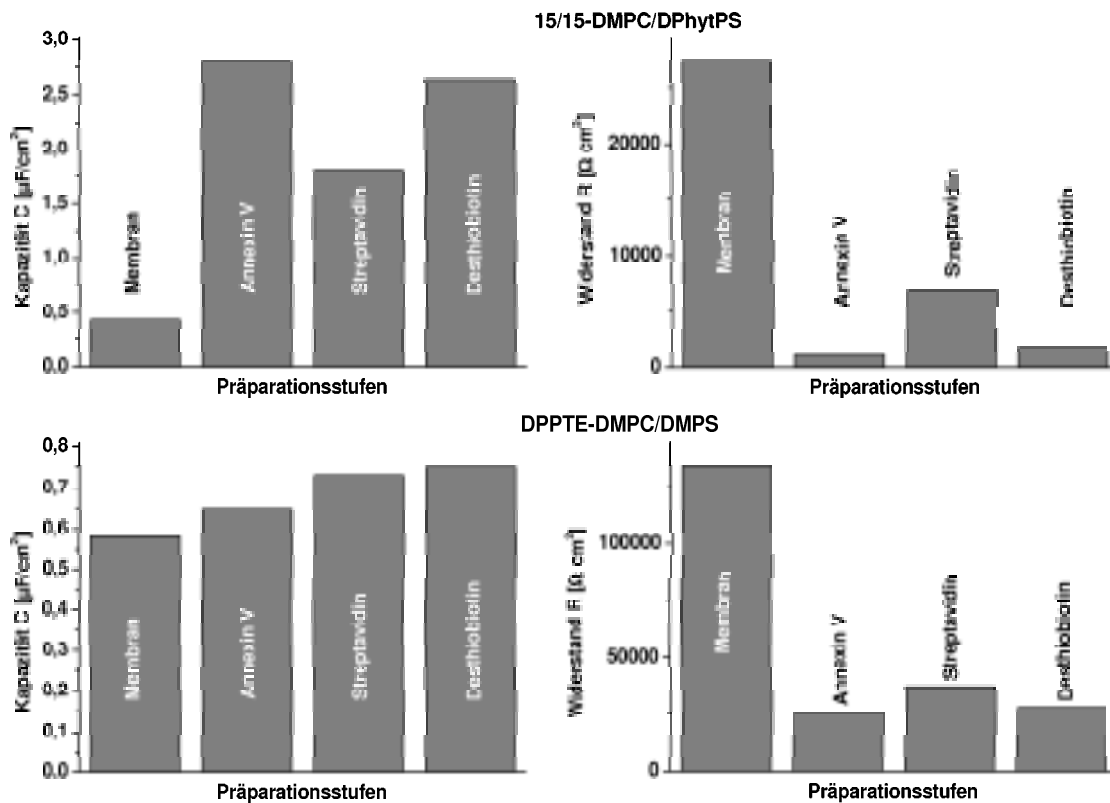


Es kann gezeigt werden, dass die Inhibierung der Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten mittels Streptavidin, sowie die kompetitive Verdrängung durch D-Desthiobiotin (Endkonzentration in der Zelle 0,125 mM) möglich ist. Das von Skerra entwickelte Konzept, das Annexin mit einer Regulierungseinheit für die Kanaleigenschaften zu versehen (siehe Kapitel 1), konnte somit experimentell bestätigt werden.

In Abb. 5.33 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Hemmung der Annexin V-Mutanten erst verzögert erfolgt, obwohl, wie in der Bindungsstudie gezeigt (siehe Abb. 2.27), eine recht schnelle Bindung stattfindet. Der verzögerter Wirkungseintritt der Proteinhemmung kann durch die geringe Beweglichkeit der Membranlipide bedingt sein, da anzunehmen ist, dass die Wiederherstellung der durch das Annexin V gestörten Membranintegrität sehr lange dauert, bzw. die Störung der Membran noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Die Rigidität der Membran ist vermutlich auch für den sehr spät eintretenden maximalen Annexin V-Effekt verantwortlich. Eine vollständige Hemmung des Annexin V ist hier nicht möglich, da weder der Widerstand noch die Kapazität ihre Ursprungswerte erreichen. Grund hierfür kann die bereits oben diskutierte unvollständige Belegung aller membrangebundenen Annexine mit Streptavidin sein (siehe Bindungskinetik), bzw. dass eine 100 %ige mechanische Blockade der zentralen Pore im Annexin ausbleibt. Lediglich von den Größenabmessungen der zentralen Pore im Annexin V von 0,1 nm im inaktiven Zustand und 1,7 nm im aktiven leitfähigen Zustand [220] betrachtet, sollte ein Verschluss der Pore durch das Streptavidin möglich sein (Abmessungen: 5,6 nm x 4,2 nm x 4,2 nm [221]). Gleichfalls ist eine vollständige Reaktivierung des Annexins durch die kompetitive Verdrängung des Streptavidins nicht möglich. Auch hier ist, wie bereits oben diskutiert, eine unvollständige Verdrängung des Streptavidins von seiner Bindungsstelle am Annexin V anzunehmen, was bereits in der SPS-Kinetik der Proteinbindung gezeigt wurde. Grund kann ebenfalls eine schlechte (sterisch bedingte) Zugänglichkeit der Bindungstaschen im Streptavidin sein, die das Biotinanalogen des *Strep*-tag II aufnimmt. Des Weiteren ist die Affinität des hier verwendeten *Strep*-tag II zur Streptavidin Mutanten 1 nicht besonders hoch [130].

Vergleicht man die Proteinaktivität auf einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran mit der auf einer DPPE-DMPC/DMPS-Membran, so wird deutlich, dass nur eine schwach

ausgeprägte Reversibilität auf der zuletzt genannten Modellmembran zu beobachten ist (Abb. 5.34). Die anzunehmende höhere Rigidität der DPSTE-DMPC/DMPS-Membran auf Grund der unverdünnten DPSTE-Submonolage, erschwert die Wiederherstellung der Membranordnung durch die Hemmung des Annexins.



**Abb. 5.34:** Vergleich der Annexin V-Aktivität und der Möglichkeit der reversiblen Hemmung durch die Streptavidin-Mutante 1 auf verschiedenen Membransystemen.

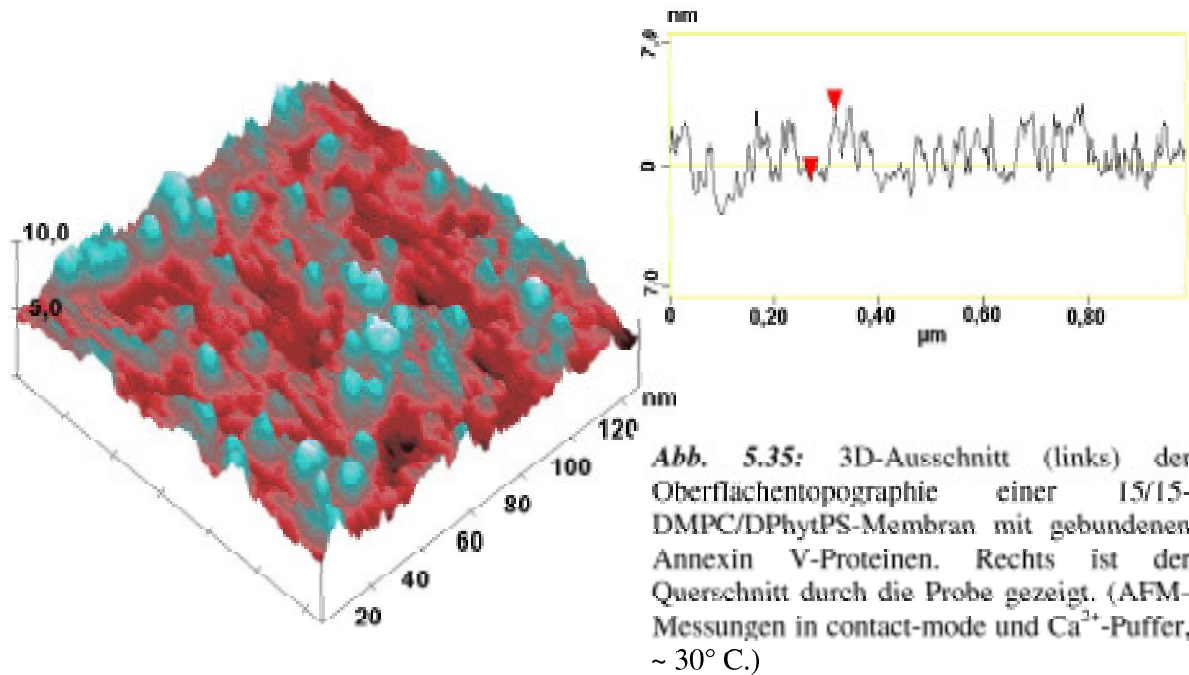
Im Falle der 15/15-DMPC/DMPS-Membran wird deutlich, dass der Mechanismus der Proteinhemmung komplexer sein muss, als dass es sich nur um eine mechanische Verstopfung der zentralen Pore im Annexin V handelt. Unter der Berücksichtigung, dass das Annexin peripher an die Membran bindet und durch die Bindung die Membranintegrität stört, ist eine Vergrößerung der Membrankapazität unter dem Annexin V-Einfluss verständlich. Die Störung der Membranintegrität und die dadurch hervorgerufene lokale Ionendurchlässigkeit bleibt lange erhalten [119], weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die durch das Annexin hervorgerufene Kapazitätsänderung

ebenfalls lange bestehen bleiben sollte. Mechanistisch ist daher zu erwarten, dass durch die Bindung des Streptavidins keine erneute Änderung der Membrankapazität auftritt, sondern lediglich eine Erhöhung des Widerstands durch die Blockade der zentralen Pore stattfindet. Abb. 5.33 und 5.34 zeigen jedoch, dass durch die Streptavidinbindung die Membrankapazität abnimmt. Die Verringerung der Kapazität ist jedoch nur dann denkbar, wenn die Wechselwirkungen des Annexins mit der Membran abnehmen und so eine Reorganisation der Membranlipide eintreten kann. Da die Abnahme der Membrankapazität durch die Streptavidinbindung hervorgerufen wird, muss das Streptavidin einen Einfluss auf die Interaktion des Annexins mit der Membran besitzen. Möglicherweise bedingt die Streptavidinbindung eine Konformationsänderung des Annexins, was dann in einer weniger ausgeprägten Interaktion mit der Membran resultiert.

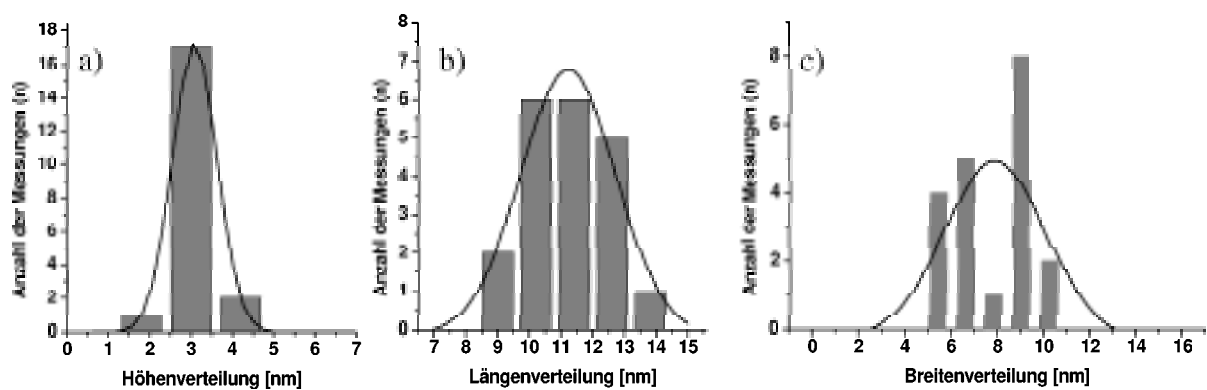
### 5.1.3.3 AFM-Messungen an der Annexin V-Schicht

Neben der peripheren Membranbindung wird auch die Membranintegration des Annexin V unter Ausbildung von trimeren oder hexameren Proteinkomplexen als weiterer Mechanismus zur Ausprägung der Ionenleitfähigkeit diskutiert [117,222-224]. Die Integration der Annexine in die Membran sollte dann auch einen Einfluss auf die Proteinhemmung durch das Streptavidin besitzen. Daher soll durch AFM-Messungen geklärt werden, ob eine solche Integration in die in dieser Arbeit entwickelte sBLM stattfindet. Hierzu wurden AFM-Messungen in contact mode und bei  $\sim 30^\circ \text{C}$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer durchgeführt.

Abb. 5.35 zeigt das 3-D Oberflächenrelief von membrangebundenen (15/15-DMPC/DPhytPS-Membran) Annexin V-Mutanten ( $c = 0,289 \mu\text{M}$ ). Deutlich sind einzelne Erhebungen zu erkennen (blau-grün gefärbt), die einzelnen Annexin V-Mutanten entsprechen.

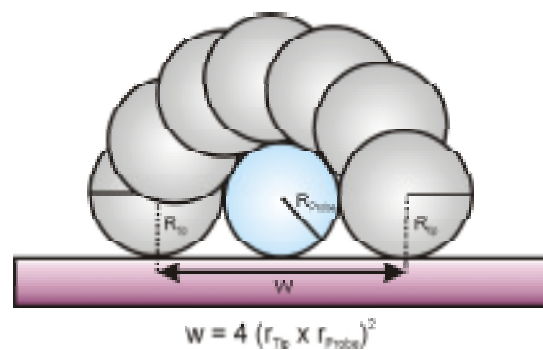


Die Auswertung der vertikalen Abmessung ergab in z-Richtung  $2,9 \pm 0,4$  (Abb. 5.36 (a)) nm, die gemessene Länge, bzw. Breite betrug  $11,1 \pm 1,1$  (Abb. 5.36 (b)) bzw.  $7,6 \pm 1,5$  nm (Abb. 5.36 (c))



**Abb. 5.36:** Gaußverteilung der Größenverhältnisse einzelner Annexin V-Proteine auf einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran. AFM-Messungen in contact-mode und  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer,  $\sim 30^\circ \text{C}$ .

Durch das Ausmessen der Annexinbänderstruktur unter Zuhilfenahme des Programms RasMol an der Proteinstruktur des Annexin V-Typ 1A8A (Annexin V der Ratte) findet man für die Proteinhöhe 2,8 nm, für die Länge 6,7 nm und für die Breite 3,2 nm (Messung der jeweils längsten Distanz). Die durch AFM-Messungen ermittelte Proteinhöhe in z-Richtung von  $2,9 \pm 0,4$  nm stimmt innerhalb des Messfehlers, unter der Annahme, dass keine Deformation des Proteins durch die AFM-Spitze auftritt, gut mit der theoretischen (2,8 nm), bzw. mit der optischen Schichtdicke (siehe SPS-Daten) von  $3,2 \pm 0,2$  nm überein. Die in den AFM-Messungen ermittelten lateralen Abmessungen liegen etwas über den theoretischen Werten, da der Radius der AFM-Spitze hier noch nicht berücksichtigt wurde (Abb. 5.37).



**Abb 5.37:** Auflösung kleiner Strukturen durch die AFM-Spitze.

Unter Berücksichtigung des Radius der AFM-Spitze (wurde hier nicht charakterisiert), der zweimal zum Tragen kommt (Abb. 5.37), und der Beobachtung, dass die gemessenen lateralen Abmessungen kleiner sind als die doppelten theoretischen Werte, wird davon ausgegangen, dass tatsächlich einzelne Annexine auf der Oberfläche abgebildet werden konnten. Die Annahme, dass die gemessene Länge der tatsächlichen Proteinhöhe plus dem Beitrag der AFM-Spitze entspricht und dass die beobachtete Breite im gleichen Maße konvolviert ist, ergibt sich eine errechnete Breite von etwa 3,2 nm und eine Länge von 6,7 nm, die den theoretisch ermittelten Werten entsprechen. Es ändert sich also das Längen- und Breitenverhältnis nicht. Dieses müsste sich jedoch ändern, wenn zwei Proteine längsseitig dicht nebeneinander lägen. Die Proteinhöhe würde konstant bleiben, während sich die Breite verdoppelt. Rechnerisch müsste dann eine Breite von über 10 nm gemessen werden (Radius der AFM-Spitze mit berücksichtigt).

Wie bereits erwähnt, beschreiben verschiedene Arbeitsgruppen neben der oberflächlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membranbindung des Annexin V einen Einbau des Proteins in die Membran und die auf diese Weise erfolgende Ausprägung der Kanaleigenschaften [224], [117], [223], [222]. Neumann et al [222] beschreibt die Ausprägung zweier unterschiedlicher Kanaltypen (Typ I und Typ II) durch das Annexin V. Der von dieser Arbeitsgruppe beschriebene Annexin Typ I-Kanal wird bei sehr hohen Proteinkonzentrationen von einem trimeren oder hexameren membrandurchspannenden Annexinkomplex gebildet, wo hingegen der Annexin Typ II-Kanal durch einzelne, peripher an die Membran gebundene Annexine gebildet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden trotz der Verwendung sehr hoher Proteinkonzentrationen keine Hinweise auf die Integration des Annexins in die Lipidmembran gefunden (siehe Abb. 5.35), zumal die Wahrscheinlichkeit hierfür, infolge der anzunehmenden geringen Beweglichkeit der Lipide, als sehr gering einzuschätzen ist. Für den Fall, dass es eventuell doch zu einem geringfügigen Einbau weniger Annexinkomplexe gekommen ist, ist auch hier die nicht 100 %ig erfolgende Hemmung des Annexins durch eine sterische Behinderung der Streptavidinbindung denkbar. Die Bindungsstelle für das Streptavidin wäre somit ebenfalls nicht frei zugänglich, da die Bindungsstelle im Innern des trimeren oder hexameren Annexinkomplex liegen würde.

#### **5.1.3.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.3**

Die reversible Hemmung der Annexin V-Mutanten durch das Streptavidin konnte eindeutig experimentell gezeigt werden. Damit konnte das von Skerra entwickelte Konzept, das Annexin V mit einer Einheit zur Regulation der Kanaleigenschaften zu versehen, erstmals bestätigt werden.

Die Annexin V-Mutante zeigte nur einen geringfügigen Einfluss auf eine auf einer unverdünnten Submonolage aufgebauten DMPC/DMPS-haltige Membran. Auf den zweistufig präparierten binären sBLM's wurde jedoch eine wesentlich schnellere Änderung der elektrochemischen Eigenschaften der Membranen durch das Annexin V beobachtet als auf sBLM's mit einer unverdünnten Submonolage. Dabei erwies sich die DMPC/DMPS-

haltige Membran als optimal, da die DMPC/DPhytPS-haltige Membran durch das Annexin irreversibel geschädigt wurde. Die Proteinhemmung und deren Reversibilität konnte deshalb auf einer DMPC/DPhytPS-Membran nicht untersucht werden. AFM-Aufnahmen der Annexin-Schicht auf einer DMPC/DPhytPS-haltigen Membran wiesen eine deutlich stärkere Strukturierung der Oberfläche auf, als eine Annexin-Schicht auf einer DMPC/DMPS-haltigen Membran. Es wird angenommen, dass diese Strukturierung durch das Annexin hervorgerufen wurde.

In AFM-Untersuchungen konnten einzelne Annexine unter Verwendung einer geringen Proteinkonzentration auf der Membran abgebildet werden. Die in den AFM-Messungen gefundenen Proteinabmessungen stimmen dabei gut mit den theoretischen Werten überein. Zugleich wurden keine Anzeichen für die in jüngerer Zeit in der Literatur diskutierte Membranintegration der Annexine gefunden.

Die Untersuchung der Annexin V-Mutanten stellt damit ein Anwendungsbeispiel der im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zweistufig präparierten binären sBLM dar.

## **5.2 Die Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer (MAH-PP) unterstützte Modellmembran (tBLM)**

Das zweite Teilziel der Arbeit bestand in dem Aufbau einer oberflächenverankerten Membran mit einem großen Submembranraum. Quellfähige Polymere können für den Aufbau des Submembranraums genutzt werden und übernehmen so Reservoirfunktionen [29]. Kapitel 3 verweist bereits auf die Bedeutung eines solchen wassergefüllten großen Reservoirs zwischen Elektrode und Membran für den Einbau [71,72,89,98,100] komplexer Transmembranproteine. Ebenso hat auch der Submembranraum [58,73] und die Fluidität [225,226] der Membran einen großen Einfluss auf die Funktionalität der Proteine. Die Mannigfaltigkeit der Plasmapolymere im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung, das Quellverhalten, die Funktionalität und die Variabilität der Schichtdicke prädestiniert diese Polymere zur Funktionalisierung von Oberflächen [87,141], besonders im Hinblick auf die Bereitstellung eines wassergefüllten Reservoirs. Daher soll aufbauend auf einer vorausgegangenen Arbeit von Jenkins et al [87] die dort beschriebene (siehe auch Kapitel 3) Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer (MAH-PP) unterstützte Membran weiterentwickelt werden. Dabei sollen die Nachteile der von Jenkins et al verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Anbindung der Membran an ein Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Elektrolytschwankungen (Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) vermieden werden. Hierzu werden zwei Strategien verfolgt: A) die Anbindung der Lipidmembran über positiv geladene Lipide an die hydrolysierten, deprotonierten Carbonylgruppen des MAH-PP. B) die kovalente Anbindung einer Pseudolipidmonolage durch Aminolyse der Anhydridgruppen mit Decylamin (1-Aminodecan) und der danach erfolgenden Komplettierung der Membran durch Vesikelspreitung (siehe Kapitel 3).

Die Herstellung der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymere (MAH-PP) erfolgt auf thermisch aufgedampften Goldelektroden auf Glas (LaSFN9- oder BK7-Glas). Als Adhäsionsvermittler für das Polymer wird in einem 30minütigen Assemblierungsschritt auf das Gold eine Monolage aus Allylmercaptan [141] (Verwendung einer 6 mM ethanolischen Allylmercaptan-Lösung) aufgebracht. Nach erfolgter Assemblierung und gründlichem Spülen der Proben mit wasserfreiem Ethanol und Trocknen mit einem leichten Stickstoffstrom werden die Proben direkt in den Plasma-Reaktor überführt. Bei einem



Basisdruck von  $< 10^{-3}$  mbar wurde mit der Polymerisation begonnen, wobei während der Polymerisation ein Druck von  $5 \times 10^{-2}$  mbar infolge des Monomerstroms herrschte. Für die Polymerisation wurde eine Spitzenleistung ( $P_{\max}$ ) von 50 W in das System eingespeist, wobei eine An- und Auszeit des gepulsten Plasmas von 1 ms bzw. 20 ms (duty cycle (DC) =  $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} + t_{\text{off}}$ ) für die Durchführung der Polymerisation gewählt wurde. Die äquivalent eingespeiste Leistung ( $P_{\text{äquiv.}}$ ) beträgt demnach 2,4 W ( $P_{\text{äquiv.}} = P_{\max} \text{ DC}$ ). Die Polymerisation wurde 3 bis 4 Minuten lang durchgeführt, wobei Filmdicken von  $24,7 \pm 0,05$  nm erreicht wurden. Die verwendeten Reaktionsparameter sind mit denen in vorausgegangenen Arbeiten vergleichbar [141], [87]. Die so hergestellten Polymerfilme wurden direkt für den Aufbau der Lipidmembran verwendet, wobei zu allen Zeiten auf Schutzgasatmosphäre und Wasserfreiheit geachtet wurde, um eine vorzeitige Hydrolyse und Hydratisierung des Polymers zu vermeiden.

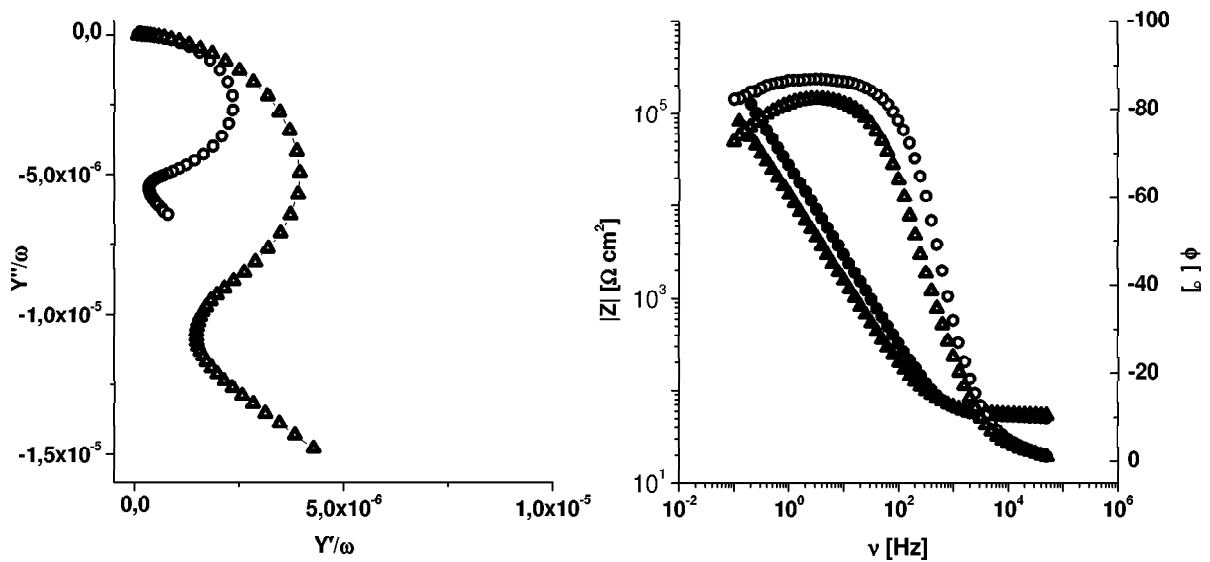
### 5.2.1 Quellbarkeit des Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymers (MAH-PP)

Die Wasseraufnahmefähigkeit des unter den oben genannten Parametern hergestellten MAH-PP wird nachfolgend untersucht.

#### 5.2.1.1 Wasseraufnahmefähigkeit des MAH-PP

Das Quellverhalten eines unter Verwendung der gleichen wie in dieser Arbeit verwendeten äquivalenten Leistung ( $P_{\text{äquiv.}}$ ) von 2,4 W hergestellten und daher vergleichbaren MAH-PP wurde bereits von Schiller et al [141] untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Quellung des Polymers sehr schnell erfolgt (innerhalb von ca. 30 Minuten). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass direkt nach Überführung des trockenen Polymers in Puffer eine starke Zunahme der optischen Schichtdicke eintrat ( $24,7 \pm 0,05$  nm in Luft,  $32,5 \pm 4,2$  nm direkt nach der Überführung in Puffer,  $n = 1,5$ ). Gleichfalls konnte, wie erwartet, eine Zunahme der Kapazität und eine Abnahme des Widerstandes beobachtet werden (Abb. 5.38). Die Änderung der elektrochemischen Eigenschaften kann durch die Einlagerung von

Elektrolyt und der einsetzenden Hydrolyse der Anhydridgruppen erklärt werden. Durch die Quellung wird die Diffusion von Ionen zur Elektrode erleichtert, was zu einer Abnahme des Widerstands führt. Die Hydrolyse der Anhydridgruppen und die Einwanderung von Ladungsträgern in das Polymer bewirken die Vergrößerung der Kapazität.



**Abb. 5.38:** EIS-Spektrum eines MAH-PP Films vor (-○-) und nach (-Δ-) der Quellung in HEPES-Puffer, pH 8, 37° C.

### 5.2.1.2 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.1

In der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) ist eine Abnahme des Widerstands und eine Zunahme der Kapazität durch die Benetzung des Polymers mit Elektrolyt (pH 8) zu beobachten. Die Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften des Polymers wird durch die Quellung des Polymers hervorgerufenen Hydrolyse der Anhydridgruppen im MAH-PP und der erleichterten Diffusion der Ionen zur Elektrode zugeschrieben.

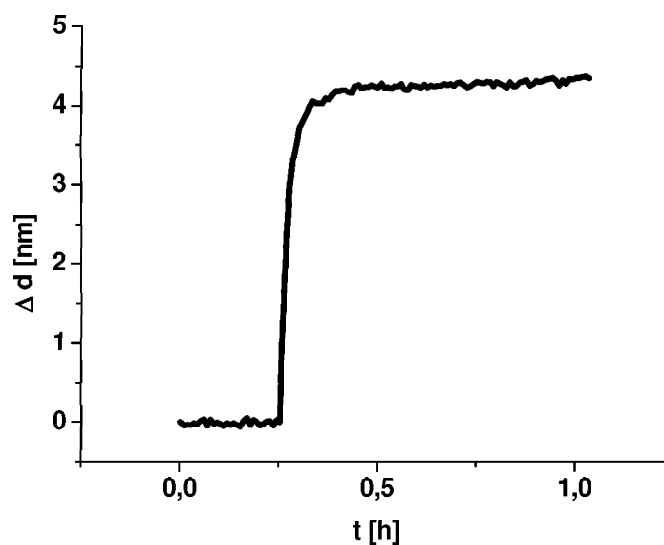
## 5.2.2 Membranaufbau auf plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid-Filmen

In den nachfolgenden Kapiteln werden verschiedene MAH-PP unterstützte Membranen vorgestellt. Dabei wird zwischen der direkten elektrostatischen und der kovalenten Anbindung der Membran an das Polymer unterschieden.

### 5.2.2.1 Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid-Filmen

Für den Membranaufbau wurden zunächst die gleichen, wie oben beschriebenen MAH-PP hergestellt. Die Vesikelspreitung wurde auf zuvor gequollenen oder gequollenen und wieder getrockneten Polymerfilmen durchgeführt.

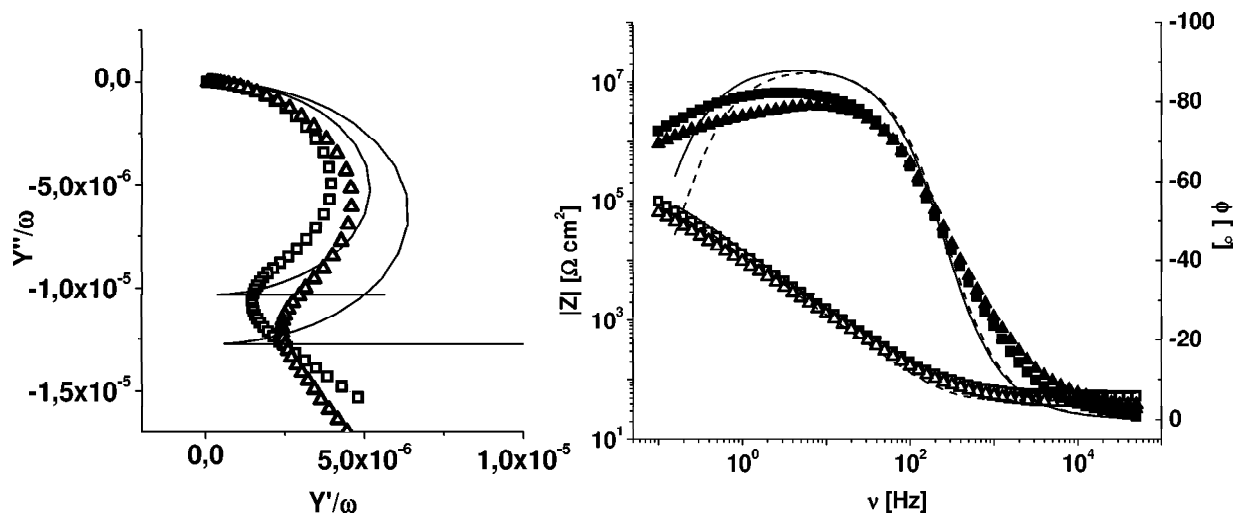
Die Spreitung von positiv geladenen DMEPC-Vesikeln (Endkonzentration in der Zelle  $200\mu\text{M}$ ) in verschiedenen Puffern (HEPES-Puffer (siehe oben) oder Trizma-Puffer (0,1 M Trizma, 0,05 M oder 0,1 M NaCl, pH 8) auf zuvor über Nacht gequollenen MAH-PP zeigten eine Zunahme der optischen Schichtdicke von  $4,6\pm 0,4$  nm (nach Spülen mit Puffer) an (gemessen mit der SPS und unter Verwendung von  $n = 1,5$  für das Polymer).



**Abb. 5.39:** Vesikelspreitung von DMEPC-Vesikeln auf einem zuvor gequollenen plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid-Film in HEPES-Puffer, pH 8,  $37^\circ\text{C}$ .

Der gemessene Wert der optischen Schichtdicke entspricht gut dem theoretischen Wert der Dicke einer Lipiddoppelmembran von  $\sim 5$  nm (Abb. 5.39). Die Vesikelspreitung ist bereits nach ca. 12 Minuten weitestgehend abgeschlossen.

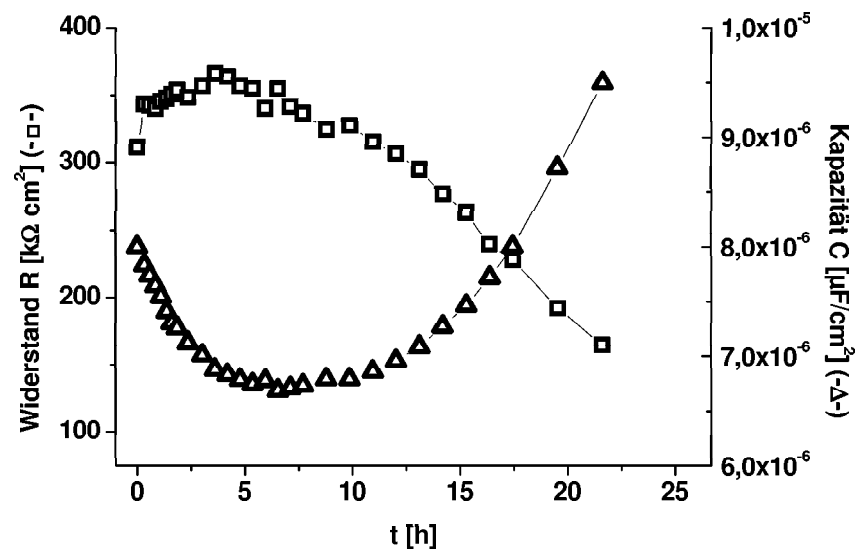
Leider zeigen die EIS-Messungen, wie in Abb. 5.40 zu sehen, eine Vergrößerung der Kapazität und eine Verringerung des Widerstandes durch die Vesikelspreitung. Zusammen mit den Ergebnissen aus den SPS-Messungen ist darauf zu schließen, dass nur eine aus Fragmenten bestehende Lipidmembran ausgebildet wird.



**Abb. 5.40:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot (links) und Bode-Plot vor ( $\square$ ) und nach ( $\Delta$ ) der Vesikelspreitung (DMEPC) auf einem gequollenen MAH-PP Film in HEPES-Puffer, pH 8, 37° C. Kurven ohne Symbole repräsentieren die gefitteten Daten.

Auch die Verwendung unterschiedlicher Puffer mit unterschiedlichen Ionenstärken zeigten keine besseren Ergebnisse.

Der Versuch der Vesikelspreitung auf gequollenen (hydratisierten und hydrolysierten) und wieder getrockneten (50° C und Vakuum ( $\sim 10^{-2}$  mbar)) plasmapolymersierten Maleinsäureanhydridfilmen zeigte jedoch in der Impedanzspektroskopie (EIS) zunächst eine geringfügige Verringerung der Kapazität, sowie eine geringe Zunahme des Widerstandes (Abb. 5.41).



**Abb. 5.41:** Kinetik (EIS-Messung) der Spreitung von DMEPC-Vesikeln auf einem ungequollenen plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Film in HEPES-Puffer, pH 8, 37 ° C.

Mit fortschreitender Zeit nimmt der Gesamtwiderstand des Systems jedoch wieder ab. Gleichzeitig tritt eine Zunahme der Kapazität auf. Mechanistisch kann dies durch eine Überlagerung zweier Effekte, der Quellung und der Vesikelspreitung, diskutiert werden. Die oberflächliche Adsorption von Vesikeln und ihre Spreitung überkompensiert anfänglich die gleichzeitig auftretende Quellung des Polymerfilms. Aus diesem Grund beobachtet man zunächst eine Abnahme der Kapazität und eine Zunahme des Widerstandes. Die Effekte, die aus der Vesikelspreitung herrühren, werden zunehmend von der Quellung des Polymers kompensiert, bis schließlich der Effekt der Quellung überwiegt. Es tritt dann infolge der Einwanderung von Ladungsträgern in das Polymer während der Quellung eine Zunahme der Kapazität und eine Abnahme des Widerstandes ein.

Der Vergleich der Vesikelspreitung auf ungequollenen Filmen mit der auf gequollenen Filmen zeigt deutlich, dass auf gequollenen Filmen keine Spreitung stattfindet. Jenkins et al [87] erreichte mit der Anbindung negativ geladener Lipide über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an ein vergleichbares Maleinsäureanhydridpolymer (gequollen) deutlich niedrigere Kapazitäten ( $0,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Offensichtlich sind die elektrostatischen Wechselwirkungen im Vergleich zu der Anbindung der Lipide über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in dem hier gesuchten Ansatz zu gering, um

eine ausreichende Vesikelspreitung zu forcieren. Aus diesem Grund wurde dieses Konzept nicht weiter verfolgt.

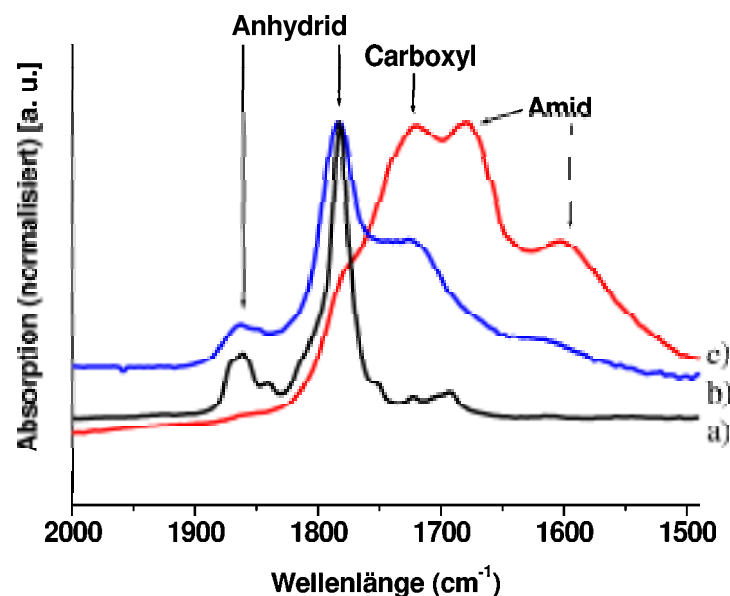
### **5.2.2.2 Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen**

Der zweite verfolgte Ansatz zum Aufbau einer MAH-PP unterstützten Modellmembran bestand in der Funktionalisierung des Polymers mit einem primären Amine, das mit den Säureanhydridgruppen des Polymers unter Ausbildung einer Amidbindung reagieren kann. Die Aminolyse der Maleinsäureanhydridgruppen eines oberflächengebundenen MAH-PP unter Verwendung von Decylamin (1-Aminodecan) wurde bereits von Schiller et al [141] nachgewiesen. Jedoch wurde dieser Ansatz bisher nicht zum Aufbau einer Modellmembran herangezogen.

#### **5.2.2.2.1 Funktionalisierung mit Decylamin**

Schiller et al [141] verwendete für die Aminolyse eine Reaktionszeit von 40 Minuten. In Kapitel 5.1.2 konnte gezeigt werden, dass nur auf sehr hydrophoben Oberflächen mit einem hydrophoben Anteil der binären Submonolage von mindestens 80 % (aus AFM-Bildanalyse), bzw. einem Kontaktwinkel ( $H_2O$ ) von  $> 100^\circ$  mit einer Vesikelspreitung zu rechnen ist. Daher sollten durch die Funktionalisierung des Polymers ebenfalls hydrophobe Oberflächen generiert werden. Um eine möglichst vollständige Überführung der oberflächlichen Anhydridgruppen in das entsprechende Amid zu erreichen, wurde die Reaktionszeit auf 15 Stunden ausgedehnt. Hierzu wurden die MAH-PP Filme direkt nach der Plasmapolymerisation in reines wasserfreies Decylamin, versetzt mit etwas Triethylamin (1 %) als Protonenfänger, überführt und dort für 15 Stunden belassen. Danach wurde die Probe mit wasserfreiem Aceton und Ethanol mehrfach gespült und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Dabei wurde zu allen Zeiten auf eine möglichst wasserfreie Umgebung geachtet, um einerseits die Hydrolyse der Anhydridgruppen zu verhindern, bzw. der vorzeitigen Wasseraufnahme des Polymers vorzubeugen. Abb. 5.42 zeigt die

FTIR-Spektren von Bernsteinsäureanhydrid (a) und MAH-PP Filmen, die unter Verwendung der gleichen  $P_{\text{äquiv.}}$  hergestellt wurden. Spektrum (b) repräsentiert ein unfunktionalisiertes MAH-PP, während das Spektrum (c) einen MAH-PP Film nach einer 15stündigen Reaktionszeit mit Decylamin zeigt.



**Abb. 5. 42:** FTIR-Spektrum des Bernsteinsäureanhydrids (a), eines unmodifizierten MAH-PP Films (b) und eines Decylamin modifizierten MAH-PP Films (c).

Das FTIR-Spektrum des modifizierten MAH-PP zeigt bei einer Wellenlänge von  $1730\text{ cm}^{-1}$  und bei  $1680\text{ cm}^{-1}$  jeweils einen Peak, der den durch die Aminolyse entstandenen Carboxylgruppen (C=O-Bindung) und Amid-Bindungen (C-N-Bindung) zugeordnet werden kann. Bei einer Wellenlänge von  $1600\text{ cm}^{-1}$  tritt ein weiterer Amid-Peak auf. Die Anwesenheit der Amid-Peaks im Spektrum (c) zeigt deutlich den Erfolg der Aminolyse an. Die Schulter bei  $1780\text{ cm}^{-1}$  und der Peak bei einer Wellenlänge von und  $1860\text{ cm}^{-1}$  (C=O-Bindung) des modifizierten Polymers zeigen das Vorhandensein von Anhydridgruppen im modifizierten Polymer an. Auch nach einer Reaktionszeit von 15 h findet nur eine Funktionalisierung der oberen Polymerschicht mit Decylamin statt. Die Funktionalisierung mit Decylamin und die sich daraus ergebende Zunahme der hydrophoben Eigenschaften, konnte durch Kontaktwinkelmessungen bestätigt werden. Für unbehandelte MAH-PP Filme beträgt der Kontaktwinkel  $62\pm 2^\circ$  (advancing angle) bzw.  $47\pm 2^\circ$  (receding angle),

wohingegen nach der Reaktion mit Decylamin Kontaktwinkel ( $\text{H}_2\text{O}$ ) von  $93 \pm 2^\circ$  (advancing angle) bzw.  $81 \pm 6^\circ$  (receding angle) gefunden werden.

#### **5.2.2.2.2 SPS- und EIS-Messungen der Vesikelspreitung**

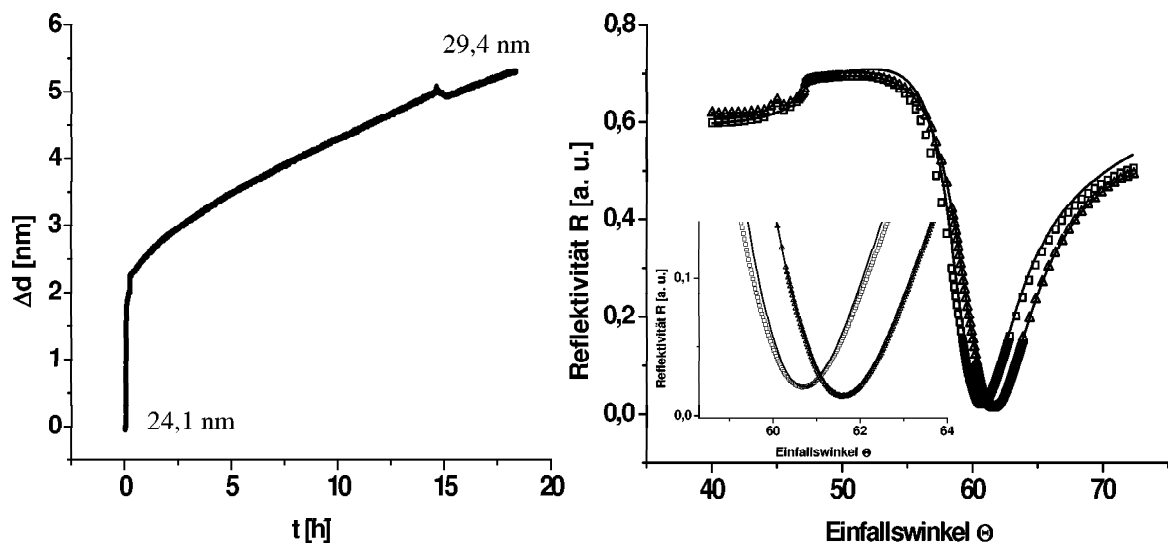
Im nachfolgenden Abschnitt wird die Vesikelspreitung unterschiedlicher Lipide beschrieben. Dabei werden zwei Varianten unterschieden. A) Spreitung von zwitterionischen DPhytPC-Lipiden und B) Spreitung von gemischten Vesikeln, bestehend aus dem negativ geladenen DPhytPG und dem zwitterionischen DPhytPC.

##### **A) Spreitung von zwitterionischen DPhytPC-Lipiden**

Abb. 5.43 zeigt die Vesikelspreitung von DPhytPC (Endkonzentration  $200 \mu\text{M}$ ) auf Decylamin modifizierten ungequollenen MAH-PP Filmen in  $0,1 \text{ M NaCl}$  bei  $37^\circ \text{ C}$ . Durch die Vesikelspreitung wurde eine optische Schichtdickenzunahme von  $\sim 5,3 \text{ nm}$  ( $n = 1,5$ ) verzeichnet. Durch das Spülen konnte loses adsorbiertes Material (Oligomere oder kurzkettige Polymerfragmente, bzw. adsorbierte Vesikel) entfernt werden, was in einer Abnahme der optische Schichtdicke auf  $4,7 \text{ nm}$  resultierte. Für die Spreitung von reinen DPhytPC-Vesikeln ist eine theoretische Schichtdickenzunahme von  $3,4 \text{ nm}$  zu erwarten [99], was der Dicke einer reinen DPhytPC-Monolage entspricht. Der Unterschied zwischen theoretischer Schichtdicke und gemessener optischer Schichtdicke wird dem Quellen des Polymers zugeordnet, da die Vesikelspreitung direkt auf dem ungequollenen Polymer erfolgt. In Abb. 5.43 ist ebenfalls die Kinetik (SPS) der Vesikelspreitung gezeigt. Der erste Teil der Kurve, der einen steilen Anstieg der optischen Schichtdicke zeigt, wird aufgrund der erreichten Schichtdicke überwiegend der Vesikelspreitung zugeordnet ( $\sim 2,25 \text{ nm}$ , entspricht ungefähr der Dicke einer Lipidmonoschicht). Daran anschließend zeigt der Kurvenverlauf eine verzögerte Zunahme der Schichtdicke, die keine Sättigung erreicht. Dieser Kurvenabschnitt kann der ebenfalls einsetzenden Quellung zugeordnet werden. Aufgrund der einsetzenden Quellung können keine genauen Aussagen über die Vesikelspreitung und die erreichte Schichtdicke getroffen werden, da anzunehmen ist, dass

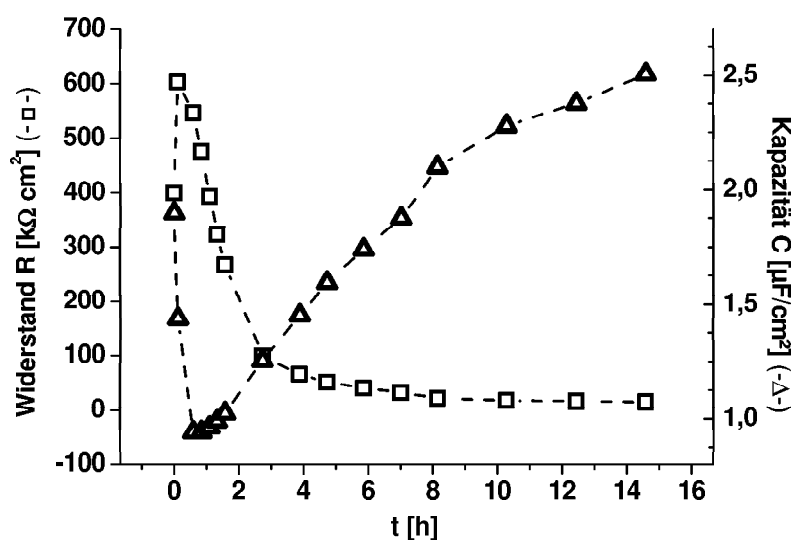


eine Abnahme des Brechungsindex mit der Quellung des Polymers einsetzt. Der Brechungsindex geht jedoch in die Berechnung der Schichtdicke mit ein (siehe Kapitel 4) und muss für eine genaue Angabe der Schichtdicke bekannt sein. Abb. 5.43 zeigt ebenfalls, dass für die gleichzeitige Quellung und Vesikelspreitung nur eine relativ geringe Schichtdickenzunahme auftritt, was auf eine Änderung des Brechungsindex hinweist.



**Abb. 5.43:** Vesikelspreitung auf Decylamin modifiziertem MAH-PP in 0.1 M NaCl, 37° C. Kinetik (SPS) der Vesikelspreitung (links) und SPS-Messung vor ( $-\square-$ ) und nach der Vesikelspreitung und Spülen ( $-\Delta-$ ). Kurven ohne Symbol repräsentieren die gefitteten Daten.

Um hier eine bessere Aussage treffen zu können ist die Anwendung der EIS von besonderer Wichtigkeit. In Abb. 5.44 ist die impedanzspektroskopisch gemessene Kinetik der Vesikelspreitung gezeigt. Hierzu wurden Einzelspektren zu verschiedenen Zeiten aufgezeichnet und mit Hilfe eines Ersatzschaltkreises angefitet (hierzu siehe Kapitel 4). Die sich daraus ergebenden Kapazitäten und die Widerstände der Decylamin-Schicht, bzw. der Hybridmembran (aus Alkylketten des Decylamids und des DPhytPC) wurden gegen die Zeit aufgetragen.



**Abb. 5.44:** Kinetik (EIS) der Vesikelspreitung auf Decylamin modifiziertem MAH-PP in 0.1 M NaCl, 37° C. Widerstands- (-□-) und Kapazitätsänderung (-Δ-) während der Vesikelspreitung auf einem ungequollenen Film. (Verwendeter Ersatzschaltkreis R(RC)).

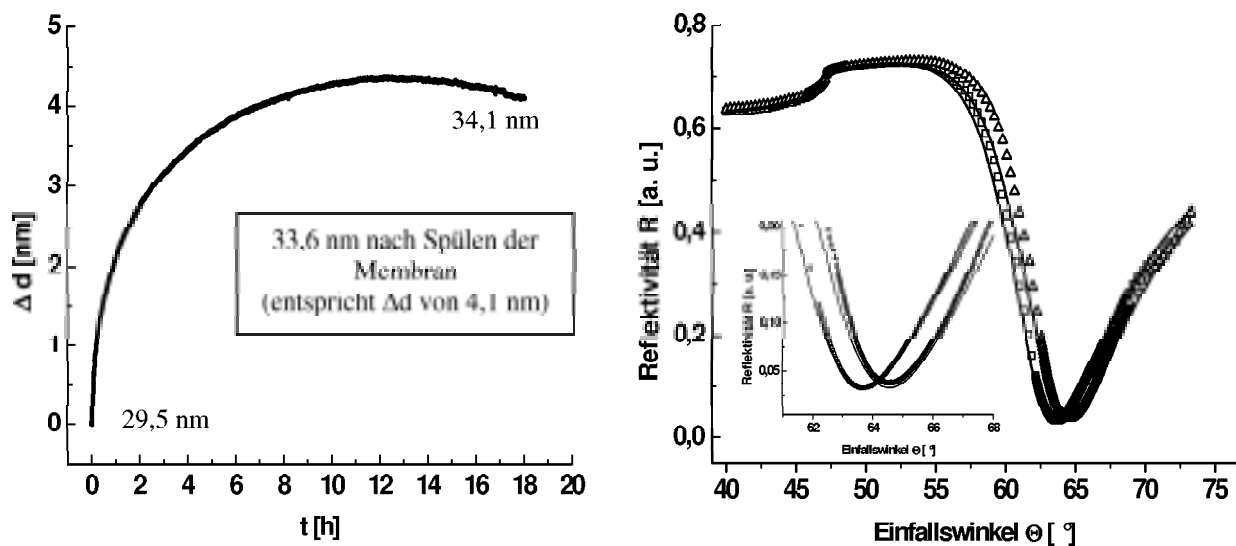
Deutlich ist zunächst eine Abnahme der Kapazität (-Δ-) auf  $0,94 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und eine Zunahme des Widerstandes (-□-) auf  $600 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  durch die Vesikelspreitung im ersten Teil der Kurven (innerhalb 1 Stunde) zu sehen. Mit fortschreitender Fusionsdauer setzt jedoch eine Zunahme der Kapazität ein, die dann deutlich die Ausgangskapazität der Polymer/Decylamid-Schicht übersteigt. Etwas früher als die Zunahme der Kapazität setzt die Abnahme des Widerstandes ein. Es werden ebenfalls Werte deutlich unter denen der ungequollenen Polymer/Decylamid-Schicht erreicht. Dies zeigt an, dass bereits zu Beginn der Vesikelspreitung die Quellung der Polymerschicht einsetzt und schließlich die Spreitung dominiert. Wie bereits oben diskutiert, ist davon auszugehen, dass es auch hier infolge der Quellung zur Zerreißung der ausgebildeten Lipidmembran kommt, was letztendlich die geringe Stabilität dieses Membransystems bedingt.

## B) Spreitung von negativ geladenen DPhytPG und zwitterionischen DPhytPC-Lipidmischungen

Um die Stabilität der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten MAH-PP Filmen zu verbessern, wurde eine Kombination aus Komplexierung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [87] und

kovalenten Anbindung der Membran durch die Funktionalisierung der Membran mit Decylamin wie unter A) beschrieben, gewählt. Dazu wurden Vesikel aus zwitterionischen DPhytPC- und negativ geladenen DPhytPG-Lipiden im Mischungsverhältnis 7:3 hergestellt. Die in basischen Puffern negativ geladenen DPhytPG-Lipide sollen hierbei die Aufgabe übernehmen, die Fusion der Vesikel während der Quellung weiter voranzutreiben und die durch die Quellung entstehenden Lücken innerhalb der Membran aufzufüllen.

In Abb. 5.45 ist die Zunahme der optischen Schichtdicke infolge der Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden (Endkonzentration 200  $\mu\text{M}$ ) in Ca-Puffer (10 mM Trizma, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8) gezeigt.

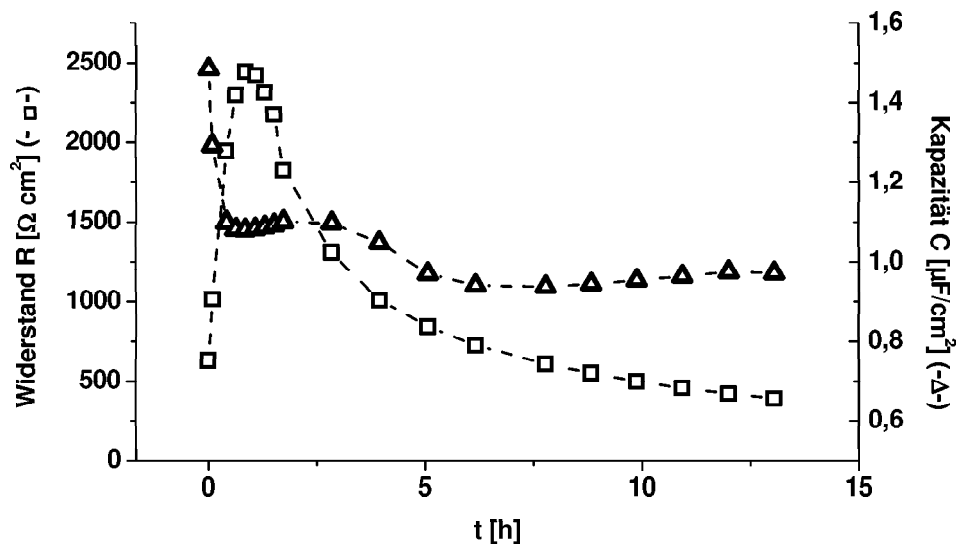


**Abb. 5.45:** Vesikelspreitung auf ungequollenem Decylamin modifiziertem MAH-PP in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, 37° C. Kinetik (SPS) der Vesikelspreitung (links) und SPS-Plot vor (-□-), bzw. nach der Vesikelspreitung und Spülen (-△-). Kurve ohne Symbol repräsentieren die gefitteten Daten.

Durch die Vesikelspreitung wird eine optische Schichtdickenzunahme von  $3,8 \pm 0,3$  nm ( $n = 1,5$ ) verzeichnet (nach dem Spülen der Membran). Auch hier konnte loses adsorbiertes Material (Oligomere oder kurzkettige Polymerfragmente, bzw. adsorbierte Vesikel) durch Spülen entfernt werden, was in einer Abnahme der optischen Schichtdicke resultierte. Für die Spreitung von reinen DPhytPC-Vesikeln ist eine theoretische Schichtdickenzunahme von 3,4 nm zu erwarten [99], was der Dicke einer reinen DPhytPC-Monolage entspricht.

Die etwas über diesem Wert gemessene optische Schichtdicke ist auch hier durch das gleichzeitige Einsetzen der Quellung zu deuten. Wie oben bereits angeführt, fällt die Schichtdickenänderung für die gleichzeitige Vesikelspreitung und Quellung verhältnismäßig gering aus. Dies kann jedoch mit einer Abnahme des Brechungsindex während der Quellung erklärt werden. Der Vergleich der beiden Systeme zeigt eine Beschleunigung der Vesikelspreitung durch die zusätzliche Komplexierung der Lipide. Auch in diesem Versuch wird keine Gleichgewichtseinstellung erreicht. Vielmehr nimmt zum Versuchsende die optische Schichtdicke wieder ab, was ebenfalls der Abnahme des Brechungsindex infolge der Quellung zugeordnet wird. Um genauere Informationen über den Verlauf der Vesikelspreitung zu erhalten ist auch hier die EIS die Methode der Wahl.

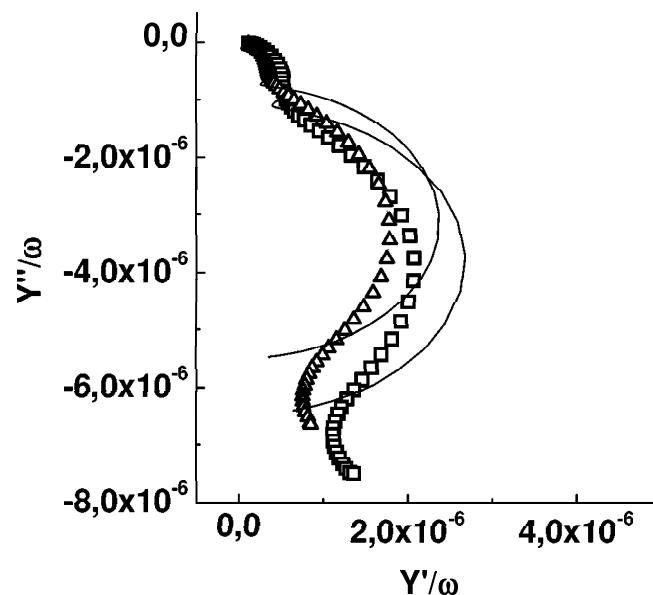
Abb. 5.46 zeigt die EIS-Kinetik der Vesikelspreitung.



**Abb. 5.46:** Kinetik (EIS) der Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden auf Decylamin modifiziertem MAH-PP in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer,  $37^\circ\text{C}$ . Widerstands- (-□-) und Kapazitätsänderung (-Δ-) während der Vesikelspreitung auf einem ungequollenen Film. (Verwendeter Ersatzschaltkreis R(RC)(RC), wobei hier nur das erste RC-Glied gezeigt ist).

Wie auch in Abb. 5.44 gezeigt, nimmt hier ebenfalls der Widerstand infolge der Vesikelspreitung zunächst zu, gefolgt von einer sehr früh einsetzenden Widerstandsabnahme. Die Widerstandsabnahme wird auch hier der Quellung der

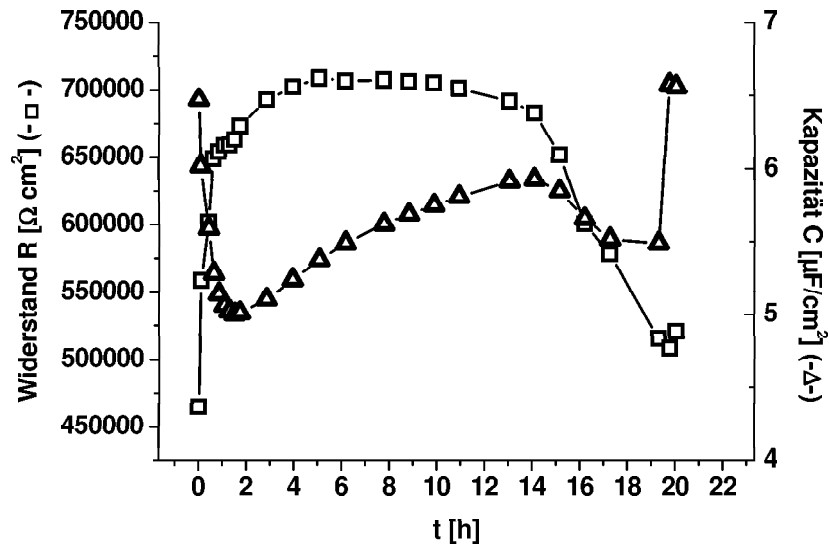
Polymerschicht zugeschrieben. Insgesamt fällt auf, dass auch bei Verwendung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers und der negativen Lipide keine Verbesserung des Membranwiderstandes zu erreichen ist. Vielmehr sind die gemessenen Widerstände selten höher als  $2,5 \pm 0,8 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  (Widerstand der Decylamid-Monolage =  $0,4 \pm 0,2 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ ). Es ist anzumerken, dass das hier beschriebene System im Gegensatz zu dem unter A) beschriebenen System zwei Zeitkonstanten, also zwei Halbkreise im frequenzreduzierten Admittanz-Plot aufweist (Abb. 5.47). Dadurch ist kein direkter Vergleich der Absolutwerte der Widerstände möglich, sondern nur die zeitabhängige Änderung der Widerstände.



**Abb. 5.47:** Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor (-□-) und nach (-Δ-) erfolgter Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Kurven ohne Symbol repräsentieren die gefitteten Daten unter Verwendung des Ersatzschaltkreises R(RC)(RC).

Die Kapazität nimmt während der Vesikelspreitung jedoch noch über einen längeren Zeitraum ab (siehe Abb. 5.46), was dem durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erzwungenen zusätzlichen Einbau an Lipiden zugeschrieben wird. Deutlich ist eine wesentlich längere Stabilität der Kapazität zu erkennen, als dies für das  $\text{Ca}^{2+}$ -freie System der Fall ist (siehe Punkt A). Infolge der Vesikelspreitung wird eine Abnahme der Kapazität von  $1,57 \pm 0,73 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$  auf  $0,95 \pm 0,03 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$  erreicht.

Trägt man hingegen die Kapazität und den Widerstand der Polymerschicht gegen die Zeit auf (2. RC-Glied des Ersatzschaltkreises) so ist zunächst eine Zunahme des Polymerwiderstandes infolge der Vesikelspreitung in Ca-Puffer zu erkennen, gefolgt von einer spät einsetzenden Abnahme des Widerstandes (Abb. 5.48).



**Abb. 5.48:** Zeitliche Änderung des Polymerwiderstandes und der Polymerkapazität infolge der Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

Ebenfalls zu beobachten ist eine Abnahme der Polymerkapazität, die später jedoch wieder zunimmt (Abb. 5.48). Da es sich bei dem MAH-PP um einen Polyelektrolyten handelt, ist anzunehmen, dass während des Quellvorgangs  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Polymer eindringen und dort zu einer elektrostatischen Vernetzung des Polymers über die durch Hydrolyse entstehenden Carboxylfunktionen (aus den Anhydridgruppen des trockenen Polymers) kommt. Dadurch ist eine Behinderung der Diffusion von Ionen zur Elektrode denkbar, die erst mit fortschreitender Quellung erleichtert wird, dann wenn das Polymernetzwerk durch Wassereinlagerungen maximal "aufgebläht" ist. Dies führt dann zur Abnahme des Polymerwiderstandes. Es ist anzunehmen, dass zunächst eine Absättigung der Ladungen im Polymer durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stattfindet, bzw. eine Immobilisierung von Ladungsträgern erfolgt. Dadurch bedingt findet eine Reduzierung freier Ladungen an der

Elektrodenoberfläche statt, was eine Abnahme der Polymerkapazität bewirkt. Mit fortschreitender Quellung treten weitere Ionen in die Polymerschicht ein, die nicht mehr fixiert werden können. Diese können schließlich die Elektrode erreichen, was in einer Zunahme der Polymerkapazität resultiert.

Tabelle 5-2 fasst noch einmal die wesentlichen Daten des hier beschriebenen Systems zusammen.

	$C_m/\mu\text{Fcm}^{-2}$	$R_m/k\Omega\text{cm}^2$	$C_{\text{Poly.}}/\mu\text{Fcm}^{-2}$	d/nm
vor Spreitung	$1,57\pm 0,73$	$0,4\pm 0,2$	$4,1\pm 1,9$	24,7 $\pm$ 0,05 (Luft) 32,5 $\pm$ 4,2 (Puffer)
nach Spreitung	$0,95\pm 0,03$	$2,5\pm 0,8$	$5,1\pm 1,0$	36,3 $\pm$ 3,8 (gesamt)

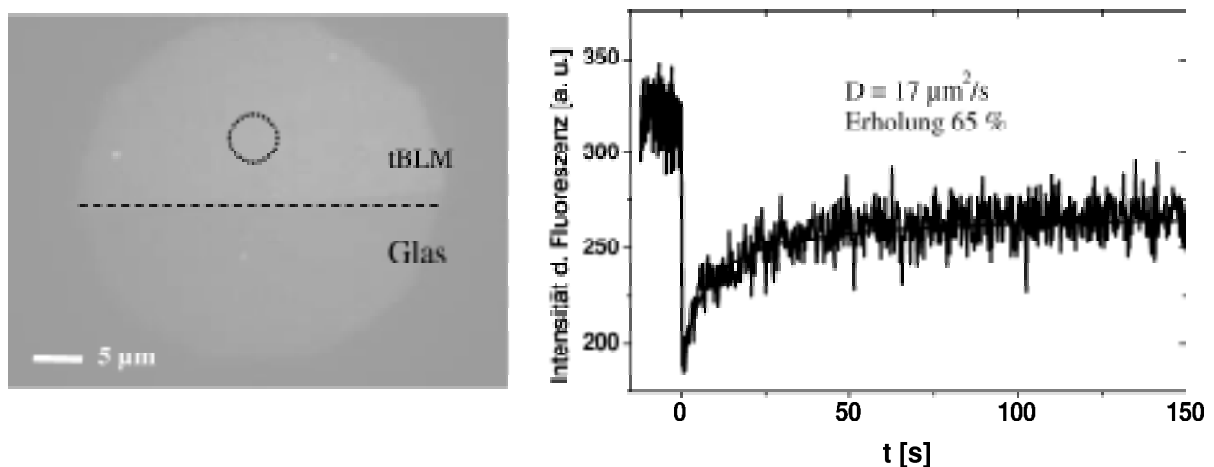
**Tab. 5-2:** EIS- und SPS-Daten des mit Decylamin funktionalisierten MAH-PP vor und nach der Spreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden.  $C_m$  und  $R_m$  = Kapazität und Widerstand der Membran,  $C_{\text{Poly.}}$  = Kapazität der Polymerschicht,  $d$  = optische Schichtdicke.

### 5.2.2.2.3 FRAP-Messungen an auf Decylamin modifizierten MAH-PP aufgebauten Lipidmembranen

Die Fluidität wurde an den gleichen wie oben beschriebenen Decylamin modifizierten MAH-PP unterstützen Membranen untersucht. Der Lipidmischung wurde lediglich ein fluoreszenzmarkiertes Lipid (NBD-PC, siehe Kapitel 1) zugesetzt (1 mol%), wobei die Gesamtkonzentration an Lipid konstant gehalten wurde. Zur Anwendung kam die in Kapitel 4 erläuterte Methode der Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (FRAP).

### A) FRAP-Messungen an einer auf einem Decylamin modifizierten MAH-PP Film aufgebauten $\text{Ca}^{2+}$ -freien Membran

Die Vesikelspreitung von DPhytPC/NBD-PC erfolgte direkt nach der Überführung der Proben in 0,1 M NaCl bei RT. Nach einer Fusionszeit von 10 Minuten wurden die FRAP-Messungen durchgeführt. Abb. 5.49 zeigt Aufsicht auf die Membran (links), bzw. Zunahme der Intensität (rechts) nach erfolgter Bleichung.



**Abb. 5.49:** Aufsicht auf die fluoreszenzmarkierte Membran (links) mit angedeutetem Bleichungsfeld (Kreis), bzw. der zeitabhängigen Veränderung der Intensität (rechts) nach erfolgter Bleichung.

Nach erfolgter Bleichung des Fluorophors tritt eine sofortige Erholung der Fluoreszenz im gebleichten Gebiet auf, so dass mit bloßem Auge kein Unterschied zwischen ungebleichtem und gebleichtem Gebiet festzustellen ist (Abb. 5.49, links). Die zeitabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität ergibt einen Diffusionskoeffizienten  $D$  der fluoreszenzmarkierten Lipide innerhalb der Lipidmembran von etwa  $17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dabei findet eine Erholung (recovery) der Fluoreszenzintensität um  $\sim 65\%$  statt. Übertragen bedeutet das, dass  $65\%$  der Lipide in der Membran frei beweglich sind. Der sehr hohe Diffusionskoeffizient weist auf eine sehr hohe Fluidität dieser Modellmembran hin. Unter Anwendung von Gleichung 4-33 (Kapitel 4) und Berücksichtigung der Kapazitäten in Tabelle 5-1 für die Polymer-/Au-Schicht ( $4,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ), der Decylamidschicht ( $1,57 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) und einer Annahme der Schichtdicke für die Decylamidschicht von 2 nm

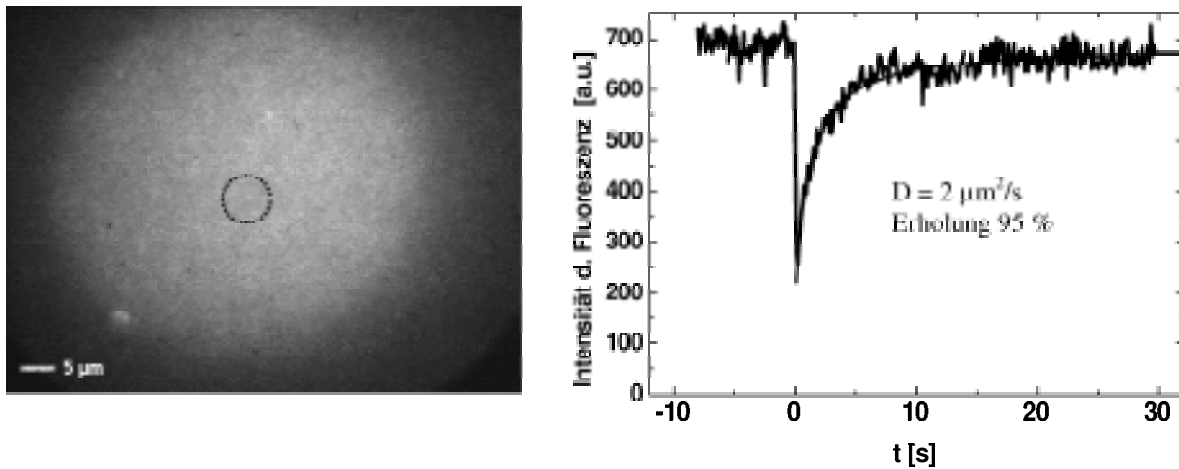


und der idealen Kapazität dieser Schicht von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bei Annahme einer 100 % Bedeckung mit Decylamid, ergibt sich aus der EIS ein Bedeckungsgrad des Polymers mit Decylamid von 81 %. D. h. 81 % der proximalen (Pseudo-) Lipidschicht sind kovalent an das Polymer gebunden. Umso erstaunlicher ist die hohe Fluidität dieses Systems, vor allem im Vergleich zu anderen Modellmembranen, die auf Lipopolymeren aufgebaut wurden. Naumann et al [26], [74] gibt einen Diffusionskoeffizienten von  $17 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (bei  $40^\circ \text{C}$ ) für eine auf einem Lipopolymer (1,2-Dioctadecylamin-[poly(ethylloxazolin)]) aufgebauten DMPC/NBD-DMPE-Modellmembran an, die jedoch nur über eine Ankerdichte der proximalen Lipidschicht von 5 % verfügt. Für höhere Ankerdichten von 30 % werden für das gleiche System nur noch Diffusionskoeffizienten von  $1,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  angegeben. Ströve et al [150] erreichten auf einer an ein Thiol-Polymer-Sandwich-System elektrostatisch angebondenen Lipidmembran Diffusionskoeffizienten von  $0,12\text{-}0,21 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Der Submembranraum dieses Membransystems bestand aus einer an das Gold gebundenen 11-Mercaptoundecansäure-Schicht an die eine alternierende Polyion-Schicht bestehend aus Polydiallyldimethylammoniumchlorid, Polystyrensulfonat und einer abschließenden Polydiallyldimethylammoniumchlorid-Schicht elektrostatisch angebonden wurde. Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die auf dem MAH-PP-System aufgebauten Membranen im Bezug auf die Fluidität den bisher beschriebenen polymerunterstützten Membransystemen weit überlegen sind. Zumal, da elektrochemische Eigenschaften dieser Systeme noch nicht untersucht worden sind. Somit liegen über dieses System bisher keine Erkenntnisse bezüglich der elektrochemischen Qualität vor, was hier als ein weiterer Nachteil dieser Systeme angesehen wird.

Abb. 5.49 (links) zeigt eine sehr gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzintensität, was auf einen sehr homogenen Lipidfilm schließen lässt. Zum Vergleich ist der Grenzbereich Glas/Membran gezeigt (gestichelte Linie), was die Homogenität der Membran nochmals unterstreicht.

## B) FRAP-Messungen an einer auf Decylamin modifizierten MAH-PP Filmen aufgebauten $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Membran

In Abb. 5.50 ist die Aufsicht auf die Membran (links), bzw. Zunahme der Intensität (rechts) nach erfolgter Bleichung gezeigt. Für die Versuchsdurchführung wurden hier die gleichen Versuchsparameter wie oben beschrieben gewählt.



**Abb. 5.50:** Aufsicht auf die fluoreszenzmarkierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membran (links), bzw. der zeitabhängigen Veränderung Intensität (rechts) nach erfolgter Bleichung.

Die in Abb. 5.50 gezeigte Aufsicht auf die Membran zeigt im Vergleich zu der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Methode eine geringe Strukturierung. Möglicherweise erfolgt durch die Verwendung negativ geladener Lipide (DPhytPG), gemischt mit zwitterionischen Lipiden (DPhytPC), durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (siehe oben oder Kapitel 6) eine Phasenseparation der Lipide. Es ist ebenfalls kein Unterschied zwischen dem gebleichten Gebiet und dem umliegenden ungebleichten Gebiet zu erkennen, was auf eine hohe Fluidität der Membran schließen lässt. Durch die Aufzeichnung der zeitabhängigen Zunahme der Fluoreszenz nach Bleichung ergibt sich ein Diffusionskoeffizient  $D$  für diesen Membrantyp von  $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dieser ist zwar bedeutend geringer als der der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Membran (siehe unter A) jedoch unter der Berücksichtigung der Ankerdichte der Decylamidschicht von 81 % immer noch doppelt so hoch wie der angegebenen Diffusionskoeffizienten der oben unter (A)

diskutierten, auf einem Lipopolymer aufgebauten, Membransystem mit einer Ankerdichte von 30 % [26,74]. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige MAH-PP-Membransystem weist im Vergleich zu dem unter (A) beschriebenen Sandwichsystem [150] einen um das Zehnfache größeren Diffusionskoeffizienten auf.

Im Gegensatz zu der unter (A) beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Membranvarianten zeigt das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige System mit 95 % eine deutlich höhere Erholung (recovery) der Fluoreszenzintensität. D. h. 95 % der Lipide in der Membran sind frei beweglich. Der im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Methode höhere Anteil an frei beweglichen Lipiden zeigt, dass durch das Kalzium ein größerer Lipidanteil in die Decylamidschicht eingebaut wird und dass die komplexierten Lipide ebenfalls über eine laterale Beweglichkeit verfügen. Die elektrochemischen Daten der Vesikelspreitung auf diesem System bestätigen den erhöhten Einbau an Lipiden in die sich ausbildenden Membran, da die Kapazitätswerte der Membran wesentlich länger stabil blieben. Der deutlich niedrigere Diffusionskoeffizient dieses Systems wird dem Einfluss der Kalziumionen auf das Polymer zugeschrieben. Es wird angenommen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu einer Vernetzung des Polymers führen, und somit die Mobilität der Polymerketten stark eingeschränkt wird. Der in den FRAP-Messungen beobachtete Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stützt somit den in Abb. 5.48 gezeigten und dort erläuterten Effekt der zunächst erfolgenden Zunahme des Polymerwiderstandes und der Abnahme der Polymerkapazität zu Beginn der Quellung.

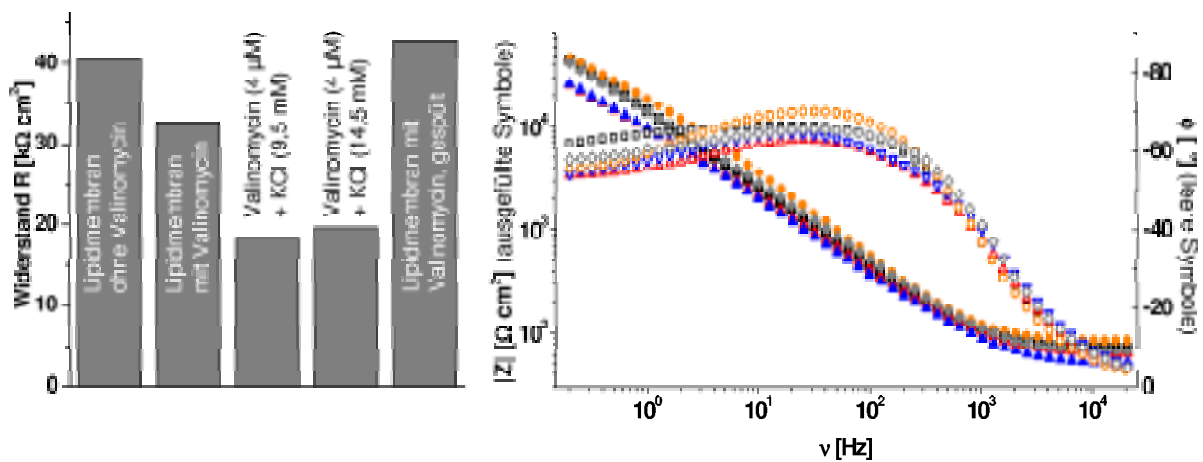
Die Diffusionskoeffizienten der beiden oben beschriebenen Systeme entsprechen denen von natürlichen Membranen (vgl. Kapitel 1).

#### **5.2.2.2.4 Einbau und Aktivität von Membranproteinen**

Wegen der längeren Stabilität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, auf Decylamin modifizierten MAH-PP aufgebauten Membran wurde dieses System auf seine Fähigkeit zur Inkorporation von Membranproteinen unter Erhalt ihrer Funktionalität untersucht. Hierzu wurden zwei Proteine verwendet: A) Valinomycin und B) Cytochrom-c-Oxidase (CcOX)

## A) Valinomycin

Nach erfolgreichem Membranaufbau wurde der in Ethanol gelöste Ionencarrier Valinomycin (aus *Streptomyces fulvissimus*) (Zellkonzentration 4  $\mu\text{M}$ ) direkt in die Messzelle injiziert. Abb. 5.51 zeigt die Wirkung des Proteins auf den Membranwiderstand der DPhytPC/DPhytPG-Membran vor (-□-) und nach dem Einbau des Proteins in die Membran (-◇-) bzw. nach der Zugabe von  $\text{K}^+$ -Ionen (-△- und -▽-). Es tritt bereits eine geringfügige Abnahme des Widerstandes nach der Zugabe des Valinomycins ein, ohne das  $\text{K}^+$ -Ionen zugesetzt wurden. Vermutlich kommt es durch den Einbau des Valinomycins in die Membran zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität [99]. Nach der Zugabe von  $\text{K}^+$ -Ionen tritt eine Halbierung des Membranwiderstandes (-△- = 9,5 mM, bzw. -▽- = 14,5 mM) auf, die dem valinomycinvermittelten  $\text{K}^+$ -Transport durch die Membran zugeschrieben wird. Nachdem die  $\text{K}^+$ -Ionen durch das mehrfache Spülen mit  $\text{K}^+$  freien Puffer entfernt wurden, trat eine Erholung des Membranwiderstand ein (-◇-). Das System erwies sich als vollkommen reversibel.



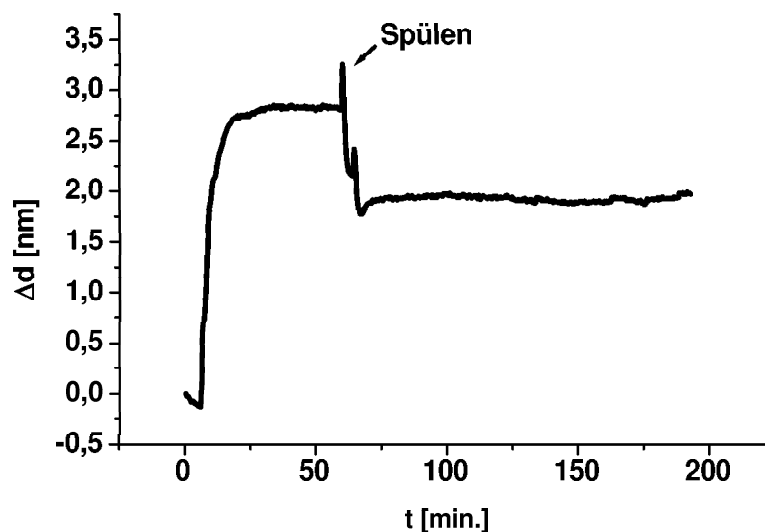
**Abb. 5.51:** Widerstandsänderung durch den Ionencarrier Valinomycin. Eine Widerstandsabnahme tritt durch den valinomycinvermittelten  $\text{K}^+$ -Transport auf. Die Membran zeigt nach dem Entfernen der  $\text{K}^+$ -Ionen ihren ursprünglichen Widerstand. Rechts: Bode-Plot: Lipidmembran ohne (-□-) und mit Valinomycin (-◇-), bzw. nach der Zugabe von  $\text{K}^+$ -Ionen (-△-, -▽-) durch die Membran. Eine Erholung des Membranwiderstandes findet nach Austausch des  $\text{K}^+$ -haltigen Puffers gegen  $\text{K}^+$ -freien Puffer (-○-) statt. Leere Symbole repräsentieren die Phase, ausgefüllte die Impedanz.

Abb. 5.51 zeigt ebenfalls den Verlauf des Phasenwinkels. Nach der Injektion des Valinomycins in die Messzelle ändert sich die Zeitkonstante  $\tau = R \cdot C$  der Membran, was den Einbau des Proteins in die Membran signalisiert.

### B) Cytochrom-c-Oxidase (CcOX)

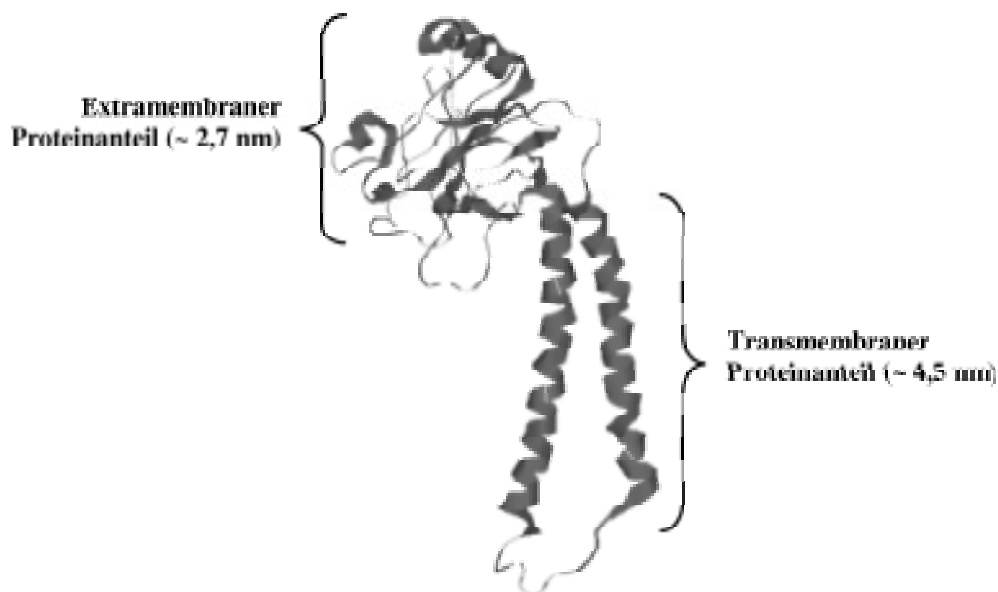
Der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, Decylamin modifizierte MAH-PP unterstützten Membran wurde der solubilisierte terminale Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase (CcOX) aus *Paracoccus denitrificans*) zugesetzt [98]. In der Messzelle erfolgt die Verdünnung unterhalb der kritischen Mizellkonzentration, wodurch die Inkorporation der CcOX (Konzentration in der Messzelle 0,48 nM) in die Membran erfolgt.

Abb. 5.52 zeigt die Zunahme der optischen Schichtdicke infolge der Membraninkorporation der CcOX um ca. 2 nm ( $n = 1,45$ ).



**Abb. 5.52:** Einbau der Cytochrom-c-Oxidase (CcOX) in eine Decylamin modifizierte MAH-PP unterstützte DPhytPC/DPhytPG-Membran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

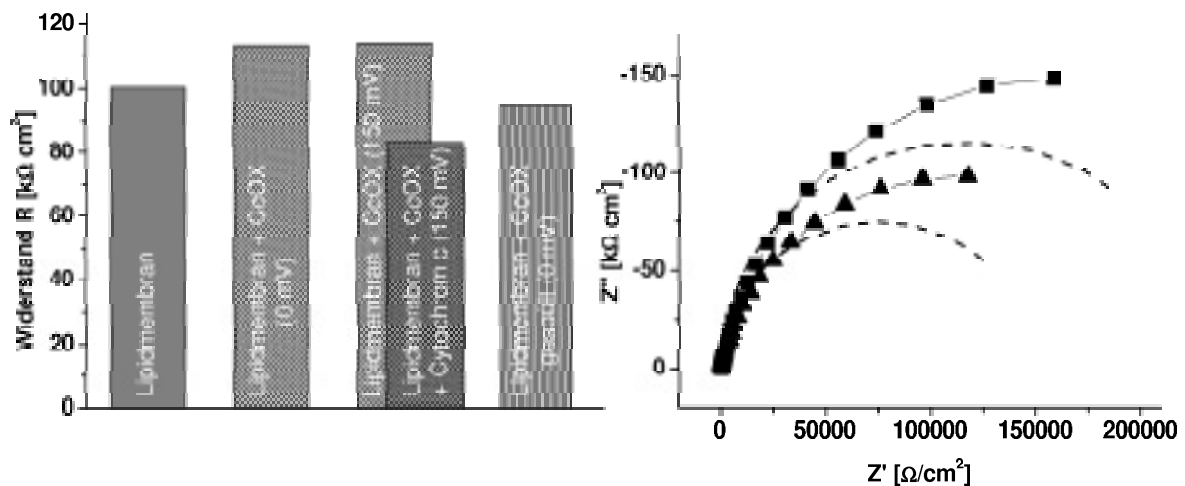
Im Vergleich dazu ergaben die Abmessungen aus der 2. Untereinheit (siehe Abb. 5.53) der CcOX (PDB ID: 1QLE) unter Anwendung des Programms RasMol eine vertikale Länge des extramembranen Proteinanteils von ca. 2,7 nm (transmembraner Anteil 4,5 nm [227]). Die Schichtdicke weist auf einen Einbau der CcOX in die Membran hin, da bei einer unspezifischen Adsorption des Proteins eine wesentlich größere Schichtdicke zu erwarten wäre.



**Abb. 5.53:** Bänderstruktur der zweiten Untereinheit der CcOX (PDB ID: 1QLE) aus *Paracoccus denitrificans*.

Das Substrat der CcOX ist Cytochrom c in reduzierter Form (siehe Kapitel 6). Die Proteinaktivität (0,96 nM) wurde mittels der EIS durch Zugabe des Substrats und bei einer angelegten Spannung von  $-150$  mV getestet. Es wurde dabei so vorgegangen, dass zunächst vor und nach dem Einbau der CcOX, ohne Anlegen einer äußeren Spannung gemessen wurde. Danach wurde das System nach Anlegen der negativen Spannungen ebenfalls vor und nach der Zugabe von Cytochrom c (0,08 M) gemessen. Die Membran wurde gespült, um das Substrat aus der Messzelle zu entfernen. Eine erneute Messung wurden bei  $0$  mV am Ende des Experiments durchgeführt, um einen möglichen destruktiven Einfluss der Spannung auf die Membran auszuschließen und die Reversibilität der Proteinaktivität zu überprüfen.

Abb. 5.54 zeigt die durch CcOX hervorgerufene Widerstandsänderung der Membran.



**Abb. 5.54:** Aktivität der CcOX. Rechts ist der Nyquist-Plot vor (-■-) und nach (-▲-) der Zugabe von Cytochrom c und bei einer Spannung von  $-150 \text{ mV}$ . Kurven ohne Symbol repräsentieren die gefitteten Daten.

Eine Abnahme des Widerstandes erfolgt erst nach der Substratzugabe und dem Anlegen einer negativen Spannung, was die Inkorporation der CcOX in die Membran unter Erhalt ihrer Aktivität anzeigt. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Sauerstoff, wobei gleichzeitig ein Protonentransport über die Membran erfolgt. Die Widerstandsänderung ist demnach dem Protonentransport über die Membran durch die CcOX zuzuschreiben.

Die geringfügige Widerstandszunahme der Membran nach Anlegen einer negativen Spannung ist durch eine Reorientierung der Lipide erklärbar.

### 5.2.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.2

Die elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf gequollenen MAH-PP Filmen zeigte nur bezüglich der optischen Schichtdickenzunahme einen Erfolg. Die elektrischen Eigenschaften der Membran blieben hinter den Erwartungen weit zurück. Lediglich die Vesikelspreitung auf zuvor hydratisierten und wieder getrockneten Filmen zeigte eine geringfügige Abnahme der Kapazität, sowie eine geringe Zunahme des Widerstands.

Infolge der einsetzenden Quellung erwiesen sich diese Membranen als wenig stabil. Die direkten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Lipiden und dem negativ geladenen hydratisierten und hydrolysierten MAH-PP Film reichen offensichtlich nicht aus, um stabile Lipidmembranen ausbilden zu können. Des Weiteren tritt keine Kapazitätsabnahme und keine Widerstandserhöhung in der EIS durch die Vesikelspreitung auf zuvor gequollenen Polymerfilmen auf. Für den Membranaufbau ist es daher unabdingbar, dass die Vesikelspreitung auf ungequollenen Filmen durchgeführt wird.

Versuche zum Aufbau einer Lipidmembran auf binären Submonolagen (siehe Kapitel 5.1) haben gezeigt, dass erst auf Oberflächen mit überwiegend hydrophobem Charakter Vesikelspreitung zu beobachten ist. Um MAH-PP unterstützte Membranen mit verbesserten elektrochemischen Eigenschaften zu erhalten, wurde das Plasmapolymere in einer wasserfreien Reaktion mit Decylamin peripher modifiziert. Die resultierende Decylamidschicht dient als proximale (Pseudo-) Lipidschicht zum Aufbau der Lipidmembran durch Vesikelspreitung. Der Membranaufbau erfolgte aus den bereits genannten Gründen ebenfalls auf dem ungequollenen Polymer. Auf einem Decylamin modifiziertes trockenes Plasmapolymere konnte infolge der Vesikelspreitung zunächst eine deutliche Abnahme der Kapazität sowie eine deutlich Widerstandszunahme beobachtet werden. Mit dem Einsetzen der Quellung verschlechterten sich jedoch wieder die elektrischen Eigenschaften dieses Membrantyps. Die erreichten Membrankapazitäten lagen weit unter denen, die bei den elektrostatisch angebondenen Membranen erreicht wurden.

Um die Stabilität der Membranen zu verbessern wurde eine Kombination aus Komplexierung und kovalenter Anbindung der proximalen Lipidschicht gewählt, indem in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer eine Lipidmischung aus zwitterionischen und anionischen Lipiden auf einem Decylamin funktionalisierten MAH-PP Film fusioniert wurden. Hierdurch wurden ähnliche Kapazitätswerte wie auf der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Membran erreicht, jedoch blieben die Kapazitätswerte wesentlich länger stabil.

FRAP-Messungen haben gezeigt, dass auf den Decylamin funktionalisierten Plasmapolymere Membranen mit einer sehr hohen Fluidität aufgebaut werden können. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Membran zeigte dabei mit einem Diffusionskoeffizienten  $D$  von  $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  eine geringere Fluidität, jedoch eine wesentlich höhere Erholung (95 %) der



Fluoreszenz als die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Membran ( $D = 17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , Erholung 65 %). Die insgesamt sehr hohe Fluidität der Membranen deutet auf eine sehr hohe Flexibilität der Polymerketten hin, denn ca. 81 % der proximalen (Pseudo-) Lipidschicht liegen kovalent gebunden vor.

Die Anwendung der MAH-PP unterstützten Lipidmembran zur Untersuchung von Membranproteinen wurde anhand des Ionencarriers Valinomycin und des terminalen Komplexes der Atmungskette, der Cytochrom c Oxidase (CcOX) getestet. Beide Proteine konnten erfolgreich unter Erhalt ihrer Proteinaktivität in die Membran inkorporiert werden.



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien

- **Lipide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lipide (DPPTE, DMPC, DPhytPC, DMPS, DPhytPS, DMEPC, DPhytPG, NBD-PC) wurden von der Firma Avanti Polar Lipids, Inc., USA, bezogen. Lagerung bei - 30° C.

- **Salze**

Natriumchlorid (NaCl), Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA·2Na), Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), Trizma Hydrochlorid (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>·HCL), Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), HEPES wurden von der Firma Sigma-Aldrich in der Qualität Ultra bezogen.

- **Thiole**

2-Mercaptoethanol und Allylmercaptan wurden ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

- **Amine**

Triethylamin wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen, Decylamin von der Firma Fluca. Dem Decylamin wurde 1 V% an getrocknetem und frisch destilliertem Triethylamin zugesetzt.

- **Lösungsmittel**

Ethanol (wasserfrei), Chloroform, Methanol und Aceton wurden von der Firma Riedel de Haen in Chromasolv-Qualität geliefert. Für die Reinigungsschritte und für die Herstellung der Puffer wurde gereinigtes Wasser (Aqua purificata, syn. Milli-Q) (Lösungsmittelwiderstand von 18 M $\Omega$ ) mit einer Anlage der Firma Millipore frisch hergestellt.

- **Sonstiges**

D-Desthiobiotin und Maleinsäureanhydrid wurden von der Firma Sigma-Aldrich erhalten.

## 6.2 Pufferherstellung

- **Ca<sup>2+</sup>-Puffer (Kapitel 5.1)**

Substanz	Konzentration [mM]
Trizma	20
NaCl	100
CaCl <sub>2</sub>	5
MgCl <sub>2</sub>	3
NaN <sub>3</sub>	0,02 % (V/M %)

- **Trizma-Puffer I (Kapitel 5.2)**

Substanz	Konzentration [mM]
Trizma/HCl	100
NaCl	50

- **Trizma/Ca<sup>2+</sup>-Puffer (Kapitel 5.2)**

Substanz	Konzentration [mM]
Trizma/HCl	10
NaCl	100
CaCl <sub>2</sub>	5

- **Trizma-Puffer II (Kapitel 5.2)**

Substanz	Konzentration [mM]
Trizma/HCl	10
NaCl	100

- **HEPES-Puffer (Kapitel 5.2)**

Substanz	Konzentration [mM]
HEPES	100
KCl	0,04

Die den Puffern entsprechenden Substanzen wurden in Milli-Q-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH auf 8,0 (RT) eingestellt.

## 6.3 Substrat-Lösungen

- **D-Desthiobiotin-Lösung**

D-Desthiobiotin (0,125 M) wurden in dem oben beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (Kapitel 5.1) gelöst. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der pH-Wert bei 8 blieb (Einstellung des pH-Wertes wie oben).

- **Reduzierte Cytochrom c-Lösung**

40 mg Cytochrom c (extrahiert aus Pferdeherzen, Fa. Sigma-Aldrich) wurde in 1 ml Trizma II-Puffer (Kapitel 5.2) gelöst und mit Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Firma Merck KGaA) reduziert. Ein Farbumschlag von dunkelrot nach hellrot zeigt die Reaktion an. Das reduzierte Cytochrom c wird auf eine zuvor mit Puffer äquilibriert Sephadex PD10 Säule (Fa. Pharmacia) gegeben. Die das Cytochrom c enthaltende hellrote Fraktion wird gesammelt und auf 10 ml mit Puffer aufgefüllt (entspricht einer Konzentration von 0,3 M).

## 6.4 Proteine

- **Annexin V-Mutante**

Die Annexin V-Mutante (M = 35935 Da) wurde von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Skerra, TU München, gentechnisch hergestellt, wobei ein Fusionsprotein aus Wildtyp Annexin V und einem *Strep*-tag II hergestellt wurde. Die Mutante wurde in PBS-Puffer (enthält 1mM EDTA) gelöst.

- **Streptavidin-Mutante 1**

Die Streptavidin-Mutante 1 (M (Monomer) = 13331 Da) wurde ebenfalls von Herrn Prof. Skerra, TU München, bereitgestellt. Die Streptavidin-Mutante 1 besitzt eine geringere

Affinität zu *Strep*-tag II als zu D-Desthiobiotin. Hierdurch ist es möglich, das *Strep*-tag II aus seiner Bindungsstelle an der Streptavidin-Mutanten 1 kompetitiv durch D-Desthiobiotin zu verdrängen. Dissoziationskonstante  $K_d$  von *Strp*-tag II beträgt  $\sim 1 \mu\text{M}$ .

- **Cytochrom-c-Oxidase (CcOX)**

Cytochrom-c-Oxidase (CcOX) wurde von Herrn Prof. Ludwig, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die CcOX liegt in solubiliert Form (Dodecylmaltosid) in einer Konzentration von  $9,6 \times 10^{-4} \text{ M}$  vor.

## 6.5 Vesikelpräparation

Für die Präparation wurden Stammlösungen der entsprechenden Lipide oder Lipidmischungen in Chloroform hergestellt. Der DMPC/DMPS-Mischung wurde wegen Methanol beigemischt, um die Löslichkeit zu verbessern. DMPC/DMPS bzw. DMPC/DPhytPS wurde in einem Verhältnis 9:1 gemischt. DPhytPC/DPhytPG wurde in einem Verhältnis 7:3 gemischt. Die Stammlösung wurde bei  $-30^\circ \text{ C}$  gelagert. Die entsprechende Menge (volumendosiert) wurde mit einer Glasspritze entnommen (Firma Hamilton) und in Glasvials überführt. Das Lösungsmittel wurde dann mit einem feinen Stickstoffstrom abgedampft und für eine Stunde an einer Vakuumlinie (mindestens  $3 \times 10^{-2} \text{ mbar}$ ) belassen, um verbliebene Lösungsmittelsuren zu entfernen. Danach wurde der Lipidkuchen in dem entsprechenden ( $\text{Ca}^{2+}$ -freien) Puffer bei  $45^\circ \text{ C}$  auf dem Wasserbad für 1h hydratisiert. Für die Herstellung der Lipidmischungen für die Annexinbindung (Kapitel 5.1) wurde ausschließlich 0,1 M NaCl-Lösung genommen und für die Herstellung der Lipidmischungen für das MAH-PP-Projekt (Kapitel 5.2) ausschließlich Trizma-Puffer II angewendet. Dabei wurde die Suspension mehrmals durchmischt (Vortexer der Firma Heidolph, Modell Reax 2000). Die Lipidsuspension wurde anschließend in einem Mini-Extruder (Firma Avanti Polar Lipids, Inc.) unter der Verwendung eines Heizblocks durch einen Polycarbonatfilter (Firma Avanti Polar Lipids,

Inc., Porendurchmesser 50 nm) extrudiert (15mal). Die Vesikelsuspension wurde jedes Mal frisch hergestellt.

## 6.6 Assemblierungslösungen

Für die Präparation der Thiol-Monoschichten auf Gold wurden die nachfolgend aufgelisteten Substanzen in Chloroform gelöst. Dabei wurden Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- 2-Mercaptoethanol: 2,8 mM
- DPPTE : 1,0 mM
- DPPTE / 2-Mercaptoethanol: 1,0 mM / 2,8 mM

Für die Präparation der Allylmercaptanschicht als Adhäsionsvermittler für das MAH-PP wurde eine 6 mM Lösung in Ethanol hergestellt.

## 6.7 Probenpräparation

- **Reinigung der Gläser**

BK7-Glas (Firma Berliner Glas, B 270) und LaSFN9-Glas (Firma Hellma,  $n = 1,845$ ), halber Objektträgergröße, wurden vor der thermischen Bedampfung mit Gold nach folgendem Standardverfahren gereinigt:

- 15 Minuten im Ultraschallbad (Fa. Sonorex, Model Super RK510 H) in einer 2 %igen alkalischen Detergenzlösung (Firma Helma, Hellmanex II)
- wiederholtes Spülen mit Milli-Q-Wasser, bis keine Schaumbildung mehr zu beobachten ist



- 15 Minuten in Milli-Q-Wasser im Ultraschallbad
- mehrfaches Spülen mit Milli-Q-Wasser
- zweimaliges Wiederholen der Milli-Q-Spülphase mit 15minütiger Behandlung im Ultraschallbad
- gründliches Spülen mit Ethanol (Chromasolv-Qualität, Fa. Riedel de Haen) und anschließende Reinigung im Ultraschallbad für 15 Minuten
- Abschließendes gründlich Spülen mit Ethanol

Die gereinigten Gläser wurden in einem Stickstoffstrom getrocknet und direkt verwendet.

- **Goldelektroden auf Glas (BK7, LaSFN9)**

2 nm Chrom als Adhäsionsvermittler für das Gold wurden zunächst mit einer Aufdampfanlage (Firma Edwards, Model FL 400 mit Auto 306) bei einem Druck von  $< 1 \times 10^{-6}$  mbar und einer Aufdampftrate von 0,1 nm/s auf die entsprechenden Substrate aufgebracht. Anschließend wurde im selben Präparationsschritt ohne Zeitverzögerung eine 48-50 nm (für SPS-Messungen), bzw. 100 nm (für reine EIS-Messungen) dicke Goldschicht mit der gleichen Aufdampftrate aufgebracht. Nach einer Abkühlzeit von 15 Minuten und dem Belüften der Anlage mit Stickstoff, wurden die Goldelektroden direkt in die entsprechende Thiollösung überführt.

Für die Anfertigung von kleinen Elektroden (siehe Anhang) mit einer Fläche von  $0,28 \text{ cm}^2$  wurden auf die Gläser spezielle Schablonen (gefertigt von der Feinmechanischen Werkstatt des MPI-P, aus Messing) gepresst und aufeinander liegend in die Aufdampfanlage eingebaut.

- **Goldelektroden auf Glimmer (Mica)**

Das Schichtsilikat Glimmer (Muskovit-Glimmer (Mica) der Firma Mica New York, Inc.) wurde vor der Bedampfung mit Gold (50 oder 100 nm) auf die Größe eines halben Objektträgers zurechtgeschnitten. Anschließend wurde die oberste und unterste Glimmerschicht abgespalten und die so entstandene saubere Glimmer-Platte in einem Röhrenofen (Fa. Heraeus Instruments, Ro 7/50 mit der Temperatursteuereinheit thermicon)

bei 650° C in Stickstoffatmosphäre vorbehandelt, um eingeschlossenes Wasser zu entfernen. Die Probe wurde langsam (15 s) in die heißeste Zone des Ofens geschoben, dort für 30 s belassen und langsam wieder heraus gezogen (15 s). Die Glimmerplatten wurden anschließend direkt in die Aufdampfanlage (Firma Edwards, Model FL 400 mit Auto 306) eingebaut und bei einem Druck von  $< 1 \times 10^{-6}$  mbar und einer Aufdampftrate von 0,1 nm/s bedampft. Nach einer 15minütigen Abkühlzeit, wurde die Behandlung zur Ausbildung von Au(111)-Terrassen im Ofen wiederholt. Im Anschluss erfolgte sofort die Beschichtung mit den entsprechenden Thiolen.

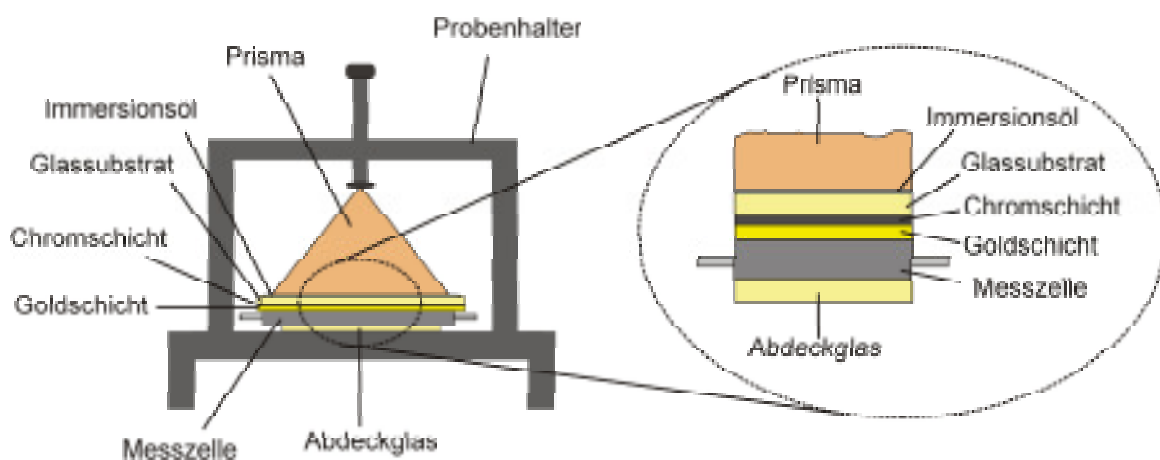
## 6.8 Untersuchungsmethoden

- **Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)**

Für die Durchführung der SPS-Messungen wurde ein 5 mW He-Ne-Laser (Fa. Uniphase, Modell 1105P,  $\lambda = 632,8$  nm) verwendet, wobei das Laserlicht mittels eines Choppers (Fa. EG&G, Modell 197) frequenzmoduliert und durch Polarisatoren (Firma Halle) p-polarisiert wurde. Mit einem zweiten Polarisator (Firma Halle) wurde die Laserintensität eingestellt. Der Laserstrahl wurde dabei auf die Drehachse eines Zweikreisgoniometers (Firma Huber) mit 5-Phasen-Schrittmotoren (Firma Huber,  $\Delta\theta = 1/1000^\circ$ ) gelenkt. Auf dem x-y-Probenstisch wurde der Probenreiter (Firma Physik Instrumente (PI) GmbH & Co, Modell B-011.30, modifiziert mit einem Heizelement (siehe Abb. 6.1, bzw. Anhang) mit der für die Messungen extra angefertigten Durchfluss-Teflonzelle (siehe Anhang, 2 ml Zellvolumen, Abmessungen unter [60]), montiert. Dabei wurde die Goldelektrode (Goldseite ins Zellinnere orientiert) so in die Messzelle eingebaut, dass das für die Messungen erforderliche LaSFN9-Prisma (Firma Hellma,  $n = 1,845$ ) auf einen dünnen Immersionsöl-Film (Firma Cargille Laboratories, Inc.,  $n = 1,8$ ) auf die Glasseite der Elektrode gepresst wurde. Die Arbeitselektrode (Glas/Au-Träger) konnte so in der Messzelle fixiert werden. Die Zellrückwand, die auf dem Reiter aufliegt, bildet ein BK7-Objekträger.

Abb. 6.1. zeigt den Reiter mit eingebauter Zelle (hierzu siehe auch Anhang). Die Abdichtung zwischen Glas und Zelle erfolgt über Dichtringe aus einem lösungsmittelresistenten Perfluorelastomer (Firma Greene & Tweed, CHEMRAZ). Die Dichtringe dienen gleichzeitig als Elektrodenbegrenzung. Die Intensität des von der Goldelektrode reflektierten Laserlichtes wird mit einer Photodiode, unter Zuhilfenahme eines Lock-In Verstärkers (Firma EG&G, Modell 5210) gemessen. Die Steuerung der gesamten Anlage (siehe Abb. 6.2) erfolgte mit der Steuer- und Mess-Software WasPlas [168]. Die Auswertung wurde unter Zuhilfenahme des Programms WinSpall [169] durchgeführt.

Alle Messungen wurden bei einer Puffertemperatur von 37° C durchgeführt, wobei die Puffertemperatur mit einem Temperaturfühler (Firma Klara Rügenberg, Pt-100) ermittelt wurde und über die äußere Heizplatte eingestellt wurde.



**Abb. 6.1:** Schematische Zeichnung des Reiters (Probenhalter) mit eingebauter Messzelle [4].

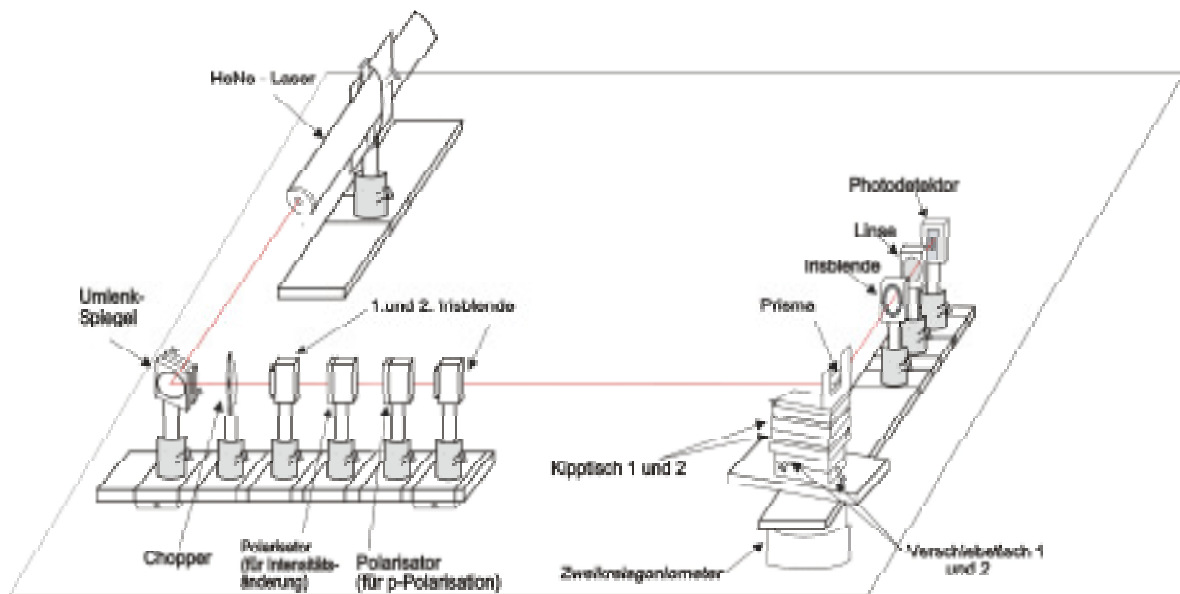


Abb. 6.2: Aufbau des Oberflächenplasmonenspektroskops [4]

- **Impedanzspektroskopie (EIS)**

Für die impedanzspektroskopischen Messungen in Kombination mit der SPS wurde ein Potentiostat (Firma EG&G, Typ273 A) in Kombination mit einem Frequenz-Generator-Analysator (Firma Solartron, SI 1269) verwendet. Die Steuerung erfolgte mit dem Programm Zplot (Firma Scribner Associates, Inc., Version 2.7). Für reine EIS-Messungen kam ein Kombi-Gerät (Firma Solartron, Modell 1280B electrochemical measurement system) zum Einsatz. Die Steuerung dieses Gerätes erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Software Zplot (Firma Scribner Associates, Inc., Version 2.4a). Alle Messungen erfolgten in einer Drei-Elektroden-Anordnung, die aus einer Arbeitselektrode (entspricht der aufgedampften Goldschicht), einer Gegenelektrode aus Platin-Draht (das in den Elektrolyten eintauchenden Ende wurde spiralig aufgedreht) und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (Firma Bioanalytical Systems, Modell Re-5) bestand. Für die Ausführung der Impedanzspektroskopie wurde eine Wechselspannung mit einer Amplitude von 15 mV angelegt.

- **AFM**

Alle AFM-Messungen wurden sowohl in Luft als auch in Puffer durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem NanoScope III (Firma Digital Instruments/ Veeco (DI)) im tapping oder contact mode. Für die Messungen im contact mode wurden V-förmige Cantilever aus Siliziumnitrit ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) (Firma DI, Nanoprobes, Federkonstante  $k_c = 0,1 \text{ N/m}$ , Kalibrierung nach der Referenzmethode (reference lever method [228])) verwendet. Für die Messungen im tapping mode wurden Single Beam Si-Cantilever mit einer Resonanzfrequenz  $f_0 = 280\text{-}320 \text{ kHz}$  (Firma Nanosensors, Modell TESP) eingesetzt. Alle AFM-Messungen wurden zusammen mit Herrn Dr. Holger Schönherr, University of Twente, Niederlande, durchgeführt, dem hier mein besonderer Dank gilt. Wichtige Voruntersuchungen wurden von Herrn Dr. Bernd Grohe am MPI-P, Mainz, durchgeführt.

Alle Messungen in Luft (tapping mode) erfolgten bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $\sim 30 - 40 \%$ . Die Messungen in Puffer (contact mode) wurden bei einer Puffertemperatur von  $\sim 30^\circ \text{ C}$  durchgeführt.

Contact mode: Eine Äquilibration der AFM-Spitzen wurde vor der Durchführung der eigentlichen Messung vorgenommen, um thermisch und instrumentell bedingte Verschiebungen (drift) zu vermeiden. Die Messungen wurden so durchgeführt, dass die Kräfte, die auf die Spitzen wirkten, konstant gehalten wurden. Die Scan-Rate betrug  $3 - 5 \text{ Hz}$ .

Tapping mode: Die Amplitude der frei oszillierenden AFM-Spitze wurde bei allen Messungen konstant gehalten ( $1,0 \text{ V}$ ), wobei die Dämpfung der Amplitude auf  $0,9 \text{ V}$  eingestellt wurde. Für die Messungen wurde eine Äquilibrationsphase von mehreren Stunden eingehalten, um thermisch bedingte Verschiebungen (drift) zu minimieren. Die Scan-Rate betrug  $1 - 2 \text{ Hz}$ .

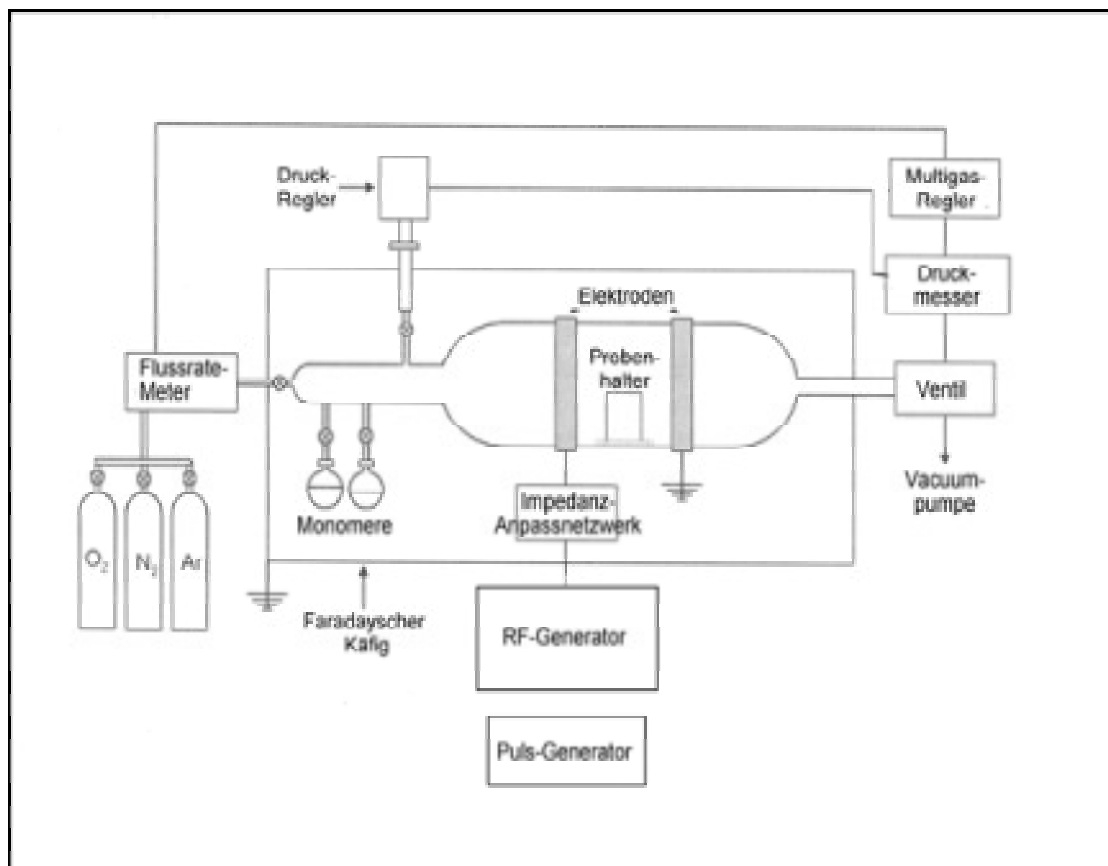
Alle Bilder wurden einer Fit-Prozedur (*first order planefitting* oder *zeroth order flattening*) unterzogen, um gegebenenfalls den Neigungswinkel der Probe auszugleichen.

- **Plasmareaktor und Polymerisation**

Alle Plasmapolymerisationen wurden in dem in Abb. 6.3 gezeigten Plasmareaktor durchgeführt. Den Reaktionsraum bildet eine 300 mm lange und im Querschnitt 100 mm betragende Pyrex-Röhre. Das Reaktionsgas wurde nach der Passage des Reaktors vor dem Austritt aus dem Reaktor durch zwei Kühlfallen geleitet, um überschüssiges Reaktionsgas abzufangen. Für die Evakuierung des Reaktionsraumes wurde eine Leybold Trivac D16BCS/PFPE Vakuumpumpe verwendet. Über seitlich an dem Reaktionsraum angebrachte Einlässe können die nicht-polymerisierbaren Gase wie Argon, Sauerstoff oder Stickstoff, sowie das Monomer Maleinsäureanhydrid (polymerisierbares Gas) eingespeist werden. Die Steuerung der Flussrate der Reinigungsgase erfolgt mittels eines MKS Flussrate-Meters (Modell 1259C) und dem MKS Kontrollgerät (Modell 647 B). Für die Überwachung des Reaktordrucks wurde ein MKS-Baratron (Modell 122) verwendet. Ein Schmetterlingsventil am anderen Ende des Reaktors wurde in Verbindung mit dem Baratron eingesetzt, um den Prozessdruck im Reaktor genau kontrollieren zu können. Flussraten-Meter, Druckmesser und das Schmetterlingsventil wurden über einen zentralen Multigas-Regler (Firma MKS, Modell 647B) angesteuert. Das 13,56 MHz-Radiofrequenz-Signal wurde von einem 150 W Radiofrequenz (Rf)- Funktionsgenerator (Coaxial Power Systems Ltd.) erzeugt und mit einem manuellen Rf-Impedanzanpassnetzwerk (matching network, Coaxial Power Systems Ltd.) in die außen am Reaktor spiralig angebrachten Elektroden eingespeist.

Vor der Polymerisation wurde in einem 30minütigen Assemblierungsschritt auf die frisch präparierte Goldoberfläche eine Monoschicht aus Allylmercaptan [141] als Adhäsionsvermittler für das Plasmapolymer aufgebracht. Hierzu wurde eine 6 mM ethanolische Lösung hergestellt. Für die Ausführung der Polymerisation wurde jedes Mal frisches Maleinsäureanhydrid (2 g) in einem 50 ml Rundkolben an einem seitlichen Einlass am Reaktor angeflanscht und das System sofort evakuiert (Basisdruck  $< 10^{-3}$  mbar). Die Überführung des Maleinsäureanhydridmonomers in die Gasphase erfolgt durch Sublimation im Vakuum. Die Polymerisation wurde dann unter der Einhaltung eines Reaktordrucks von  $5 \times 10^{-2}$  mbar, einer eingespeisten Spitzenleistung ( $P_{\max}$ ) von 50 W und einem duty cycle (DC) von 1/20 ms/ms (entspricht einer äquivalenten Leistung von 2,4 W) 3-4 Minuten lang ausgeführt, wobei Filmdicken von  $24,7 \pm 0,05$  nm erreicht wurden.

Alle Plasmapolymere wurden zum Aufbau der Membran immer frisch hergestellt und für den Transportweg vom Reaktor zum Messaufbau in einem evakuierten Exsikkator, gefüllt mit trockenem Silicagel, aufbewahrt. Anschließend fand in einem aus Glas gefertigten Beschichtungsgefäß unter Schutzgasatmosphäre (Argon) die Aminolyse der Anhydridgruppen in trockenem Decylamin, versetzt mit 1 % getrocknetem Triethylamin, statt. Die Proben wurden zunächst mit wasserfreiem Aceton gründlich gespült, dann mit wasserfreiem Ethanol und zuletzt wieder mit wasserfreiem Aceton. Die mit einem Stickstoffstrom getrockneten Proben wurden sofort für den Aufbau der Lipidmembran verwendet.



**Abb. 6.3:** Schematische Darstellung des Plasmareaktors und der elektronischen Komponenten.

- **Kontaktwinkelmessungen**

Kontaktwinkelmessungen an den MAH-PP-Filmen:

Der Kontaktwinkel wurde mit einem Krüss Drop Shape Analysis System DSA 10-Mk2 bestimmt. Der fortschreitende- bzw. zurückschreitende Kontaktwinkel wurde programmgesteuert kontinuierlich während der Zuführung, bzw. Abführung von Wasser (6,32  $\mu\text{l}/\text{min.}$ , 8  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen) gemessen (ca. 30 Messungen an einer Probenstelle), wobei die Messung erst nach der Ausformung eines Tropfens (1 $\mu\text{l}$  Volumen) gestartet wurde (vor der Bewegung der 3-Phasengrenzlinie). Die Messungen wurden an mindestens 5 Stellen der Probe wiederholt. Für die Ermittlung des Kontaktwinkels wurde die Tangentenmethode verwendet, die auf beiden Seiten der Tropfenkontur eine Tangente anlegt und den für beide Seiten erhaltenen Wert mittelt. Bei dieser Methode wurde während der gesamten Messzeit die Nadel des Dosiersystems im Tropfen belassen.

Kontaktwinkelmessungen an den binären Thiolschichten:

Die Durchführung der Kontaktwinkelmessungen erfolgten unter der Verwendung eines Kontaktwinkelmikroskops (Data Physics, OCA 15plus). Dabei wurde ein Wassertropfen mit einem Volumen von 1  $\mu\text{l}$  auf die Probe gegeben. Die Kontaktwinkel wurden nach der Zuführung (advancing angle), bzw. Abführung (receding angle) von Wasser (aber vor der Bewegung der 3-Phasengrenzlinie) an mindestens drei verschiedenen Stellen einer Probe und für 3 verschiedene Proben der jeweiligen Präparationsbedingungen gemessen. Während der Messungen wurde die Nadel des Dosiersystems in dem Tropfen belassen.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30 – 40 % durchgeführt.

- **FRAP-Messungen**

Ein im MPI-P erstellter Aufbau wurde für die Messungen verwendet. Die Fluoreszenzabbildungen wurden mit einem inversen optischen Mikroskop (Firma Olympus, Modell IX 70) aufgenommen. Mit Hilfe einer Hochdruck-Quecksilberdampflampe (Firma Olympus, HBO 100) in Kombination mit einem



Bandpassfilter (470-490 nm) wurde die Probe ausgeleuchtet und das emittierte Licht mit einem Barrierefilter (BA 515 nm) ausgefiltert, mit einer lichtverstärkenden Kamera (Firma Photonic Sciences) gesammelt und mit einer Framegrabber-Karte (Frame Grabber Card der Firma Scion) digitalisiert. So konnte eine Probenfläche von ca. 8 mm<sup>2</sup> beobachtet werden. Für die FARAP-Messung wurde nur eine kleine Fläche auf der Probe ( $\varnothing$  4,2  $\mu\text{m}^2$ ) mit einem Argon-Laser (Firma Innova,  $\lambda = 488$  nm) bestrahlt, dessen Intensität durch eine Serie von Pockelzellen und linearen Polarisatoren (Firma Gsänger) reduziert wurde, um das Ausbleichen der Probe zu reduzieren. Das emittierte Licht wurde mit einem Photomultiplier (Firma Thorn EMI) gesammelt. Zum Bleichen wurde für einen kurzen Laserpuls (60 ms) die volle Laserleistung (typischerweise 1 Watt) auf die Probe gestrahlt. Während dieses Pulses wurde der Photomultiplier geschlossen. Für weitere Informationen siehe [178] und [229].

- **Fourier Transformierte Infrarot-Spektroskopie (FTIR)**

Zum Nachweis der kovalenten Anbindung von Decylamin an das Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer (MAH-PP) wurde FTIR-Spektroskopie an einem Nicolet Magna 850 Spektrometer in Reflektion gemessen. Hierzu wurde Gold mit einer Schichtdicke > 80 nm aufgedampft.



## 7 Abschließende Diskussion

Die Aufrechterhaltung von biochemischen Prozessen einer Zelle hängt in subtiler Weise von der Funktionalität der biologischen Membran ab. Eine Reihe von Erkrankungen lassen sich auf Defekte oder Fehlfunktionen von Membranproteinen oder membranassoziierten Prozessen zurückführen. Ein tieferes Verständnis dieser Prozesse sowie des gesamten Membranaufbaus ist daher von großem Interesse. Die Entwicklung und der Aufbau künstlicher Biomembranen können nicht nur zu einem besseren Verständnis von natürlichen Membranen und Membrandefekten beitragen, sie können auch als Biosensoren beispielsweise zum Auffinden und Testen neuer pharmakologischer Wirksubstanzen verwendet werden.

Hydrophobe Wechselwirkungen sind eine treibende Kraft für die Ausbildung und Aufrechterhaltung sowohl natürlicher als auch künstlicher Membranen. Dies zeigte sich beim Aufbau von sBLM's auf binären Submonolagen mit unterschiedlichen hydrophoben Anteilen und beim Aufbau der plasmapolymereunterstützten tBLM's. In beiden Fällen fand die Vesikelspreitung bevorzugt auf solchen Oberflächen statt, die einen sehr hohen hydrophoben Anteil in der Submonolage aufwiesen. Weiterhin zeigte sich, dass Vesikelspreitung auf einer zweistufig präparierten binären Submonolage (aus 2-Mercaptoethanol und DPPTE) zu Membranen mit wesentlich besseren elektrochemischen Eigenschaften führte als die Spreitung auf koadsorbierten Thiolschichten. Als Grund kann hier die Domänenstruktur der zweistufig präparierten Submonolagen angesehen werden. Koadsorbierte Filme weisen eine hohe Durchmischung der beiden Molekülspezies auf, was dazu führt, dass keine eindeutigen hydrophoben bzw. hydrophilen Bereiche vorliegen. Derartige Oberflächen sind nicht in der Lage Vesikel ausreichend zu destabilisieren, damit eine Fusion mit der Thiolschicht stattfinden kann. Aus der gehinderten Fusion der Vesikel mit der koadsorbierten Submonolage resultieren lediglich Membranen mit ungenügenden elektrochemischen Eigenschaften.

Die Ausbildung von Domänen durch die Zweistufenmethode führt jedoch dazu, dass klar begrenzte hydrophile und hydrophobe Bereiche (Domänen) auf der Goldelektrode entstehen. Jeder Bereich für sich ist in der Lage destabilisierend auf die Vesikel zu wirken. In den Versuchen wurde allerdings deutlich, dass erst mit einem hohen hydrophoben Anteil (DPPE) von über 80 % mit einer Vesikelspreitung zu rechnen ist. Dabei erwiesen sich Oberflächen mit einem hydrophoben Anteil von ~ 97 % als optimal für den Membranaufbau, was sich vor allem in den niedrigen Kapazitätswerten der Membran widerspiegelt. Dies bestätigt die besondere Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen für den Aufbau von Modellmembranen. Reine 2-Mercaptoethanol-schichten zeigten mit einem Kontaktwinkel von ~ 50° einen für hydrophile Oberflächen noch relativ hohen Kontaktwinkel. Da Vesikel aber erst auf hydrophilen Oberflächen (z.B. aktiviertes Glas) mit einem Kontaktwinkel  $< 5^\circ$  spontan fusionieren [196] und Spreitungsversuche auf 2-Mercaptoethanol-schichten nur eine bedingte Fusion der Vesikel zeigen [217], kann den 2-Mercaptoethanol-Bereichen nur eine zusätzliche destabilisierende Wirkung auf die Vesikel zugesprochen werden, besonders wenn diese auf hydrophobe/hydrophile Grenzbereiche treffen. Zu große 2-Mercaptoethanol-Domänen führen vermutlich aufgrund des für hydrophile Oberflächen relativ hohen Kontaktwinkels überwiegend zu einer Vesikeladsorption. Deshalb wurde auf Oberflächen mit einem relativ hohen 2-Mercaptoethanolanteil bzw. mit einem hydrophoben Anteil von  $< 80\%$  (aus der AFM-Bildanalyse) nur die Ausbildung von Membranen mit schlechten elektrochemischen Eigenschaften beobachtet.

Der selbstorganisierende Aufbau (self-assembly) von Thiolschichten ist für den Aufbau von oberflächengebundenen Lipidmodellmembranen von großem Interesse. Daher ist die Kontrolle der Oberflächenzusammensetzung besonders unter dem Aspekt der forcierten Vesikelspreitung auf hydrophoben Oberflächen ein wichtiger Faktor in der Herstellung von Modellmembranen. Durch den Aufbau binärer Thiolschichten ist eine Reduzierung der Ankerdichte möglich. Es konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Einschritt-methode (Koadsorption) die Zweischritt-methode (2-step self-assembly) eine wesentlich bessere Kontrolle der submembranen Architektur ermöglicht.

Die Reduzierung und die Kontrolle der Ankerdichte der proximalen Lipidschicht zur Gewährleistung der lateralen Beweglichkeit der Membranlipide stellen einen weiteren, für die Funktionalität von Membranproteinen wichtigen Faktor dar. Modellmembranen, die auf den zweistufig präparierten binären Submonolagen aufgebaut wurden, zeigten aufgrund der lateralen Verdünnung der Submonolage Vorteile bei der Untersuchung der Annexin-V Mutanten. Es konnten wesentlich deutlichere proteinbedingte Effekte beobachtet werden als auf den Membranen mit unverdünnter Submonolage. Das Konzept von Skerra, Annexin V mit einer funktionellen regulatorischen Einheit zur Kontrolle der Proteinaktivität zu versehen, konnte hier eindeutig auf den im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten sBLM's experimentell bestätigt werden. Die Reversibilität der Hemmung der Annexin V-Mutante konnte erstmals experimentell nachgewiesen werden.

Die Kontrolle des Oberflächenaufbaus von Thiolschichten sowie die Möglichkeit, strukturierte Oberflächen durch self-assembly zu erhalten, ist nicht nur für den Aufbau von Lipidmembranen von Interesse, sondern auch für den Aufbau biokompatibler Oberflächen. So kann durch den Aufbau binärer Thiolschichten eine gezielte Funktionalisierung von Oberflächen mit Zellen oder Proteinen vorgenommen oder unspezifische Adhäsion verhindert werden [230-232]. Dies ist besonders beim Aufbau von Biosensoren von Interesse.

Die direkte elektrostatische Anbindung der Membran an einen Plasmapolymerefilm führt zu Membranen mit ungenügenden elektrochemischen Eigenschaften. Offensichtlich reichen die elektrostatischen Wechselwirkungen nicht dazu aus, die Vesikelspreitung zu forcieren. Nach Funktionalisierung des MAH-PP mit Decylamin kann auf diesen Filmen jedoch eine deutliche Vesikelspreitung beobachtet werden. Es zeigte sich auch hier, dass die hydrophoben Wechselwirkungen in überwiegenderem Maße an der Ausbildung der Membran beteiligt sind. Die Quellung des Polymerfilms führt zu einer Verschlechterung der elektrochemischen Eigenschaften der Membran. Durch die Kombination aus kovalenter Anbindung über Decylamid-Gruppen und elektrostatischer Anbindung der Membranbindung über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnten stabile Membrankapazitäten von  $< 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  erreicht werden. Auch in diesem Ansatz trat infolge der Quellung eine Abnahme des Widerstandes ein.

Die Probleme beim Aufbau von Membranen auf Plasmapolymere lassen sich anhand der Überlegungen der Vorgänge auf sBLM's erklären. Eine Oberfläche, auf der eine Membran aufgebaut werden soll, muss definierte charakteristische Eigenschaften hinsichtlich der Hydrophobizität aufweisen. Kontaktwinkelmessungen zeigten, dass weder das unfunktionalisierte MAH-PP eindeutig hydrophilen noch die mit Decylamin funktionalisierten MAH-PP Filme eindeutig hydrophobe Oberflächeneigenschaften besitzen. Hinzu kommt, dass infolge der Quellung die bereits ausgeformte Membran zerreißt, was die Instabilität der Membranen bedingt.

Ein großer Vorteil der plasmapolymereunterstützten tBLM's ist jedoch, dass auf den MAH-PP-Filmen hochfluide Membranen aufgebaut werden können. Aus diesem Grund ist die Inkorporation von Membranproteinen unter Erhalt ihrer Proteinaktivität möglich. Dies kann anhand der Cytochrom-c-Oxidase und des Ionencarriers Valinomycin gezeigt werden. Membranproteine können so in einer naturnahen Umgebung untersucht werden. Die Fluidität von Membranen ist besonders für die Untersuchung der Diffusion von Membranproteinen innerhalb der Membran von Interesse (z. B. bei G-Proteinen). Ferner sind auf solchen Membranen Untersuchungen zur Zellerkennung und zum Adhäsionsverhalten von Zellen möglich. Ebenso können Antikörperreaktionen studiert werden. Die Plasmapolymereisation bietet zudem die Möglichkeit sterile Oberflächen aufzubauen, was z. B. für die Arbeit mit Zellkulturen interessant ist.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich deutlich, dass den hydrophoben Eigenschaften für den Aufbau von Modellmembranen eine enorme Bedeutung zukommt. Die Reduzierung der Ankerdichte der Submonoschicht stellt für den Aufbau der Membranen somit einen besonders kritischen Faktor dar, da sich durch die laterale Verdünnung der Submonolage die Oberflächeneigenschaften hinsichtlich der Vesikelspreitung ungünstig verändern. Der Aufbau von qualitativ hochwertigen Membranen mit einer stark reduzierten Ankerdichte ist daher sehr schwierig. Es wird deutlich, dass Kompromisse hinsichtlich der Membranqualität und der Fluidität je nach Verwendungszweck der Membranen eingegangen werden müssen.

## 8 Anhang

### 8.1. Plasma und Plasmapolymerisation

Plasma findet man als natürliches Phänomen überall in der Natur (Blitze, Nordlichter). Es wird angenommen, dass 99 % der gesamten im Universum vorhandenen Materie sich in diesem Zustand befindet [233].

Das Plasma (griech.: Gebildetes, Geformtes) stellt ein partiell ionisiertes, hochenergetisches, quasineutrales Gas dar. Es besteht aus positiv und negativ geladenen, sowie neutralen Teilchen. Masse im Zustand des Plasmas befindet sich in einem wesentlich höher angeregten Zustand als der feste, flüssige oder gasförmige Zustand, weswegen es auch als der „4. Aggregatzustand“ bezeichnet wird (Abb. 8.1 aus [234]).

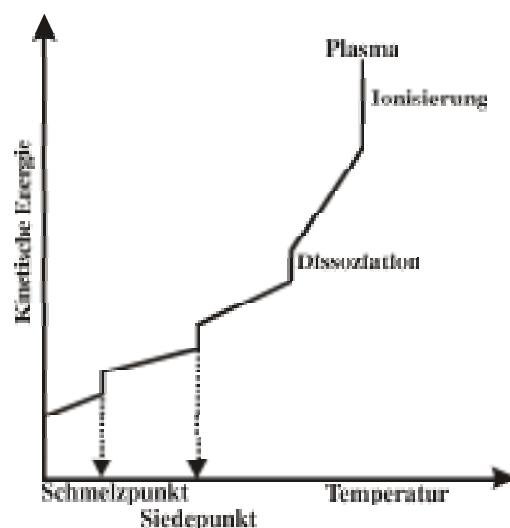
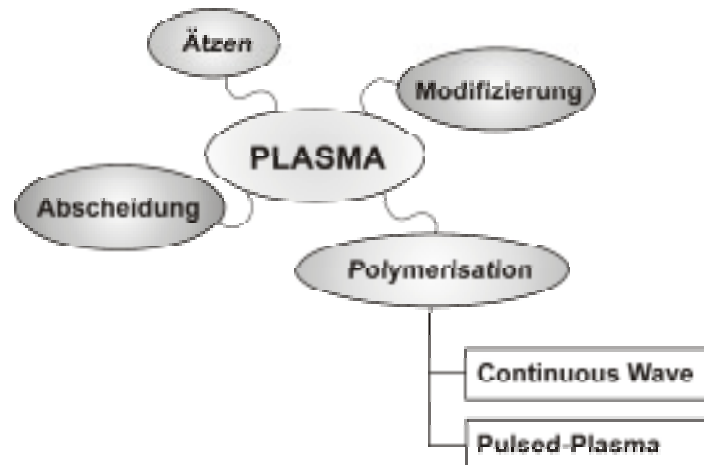


Abb. 8.1: Übergänge der einzelnen Aggregatzustände [1].

Die Nutzung von Plasmen ist sehr vielfältig und findet derzeit vor allem in der Industrie Anwendung [233]. Abb. 8.2 beschreibt die unterschiedlichen Anwendungsbereiche, wobei

die Verwendung von nicht polymerisierbaren Gasen (He, Ar, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) den größten Anwendungsbereich in der Oberflächenmodifizierung und Oberflächenstrukturierung durch Ätzprozesse ausmacht.



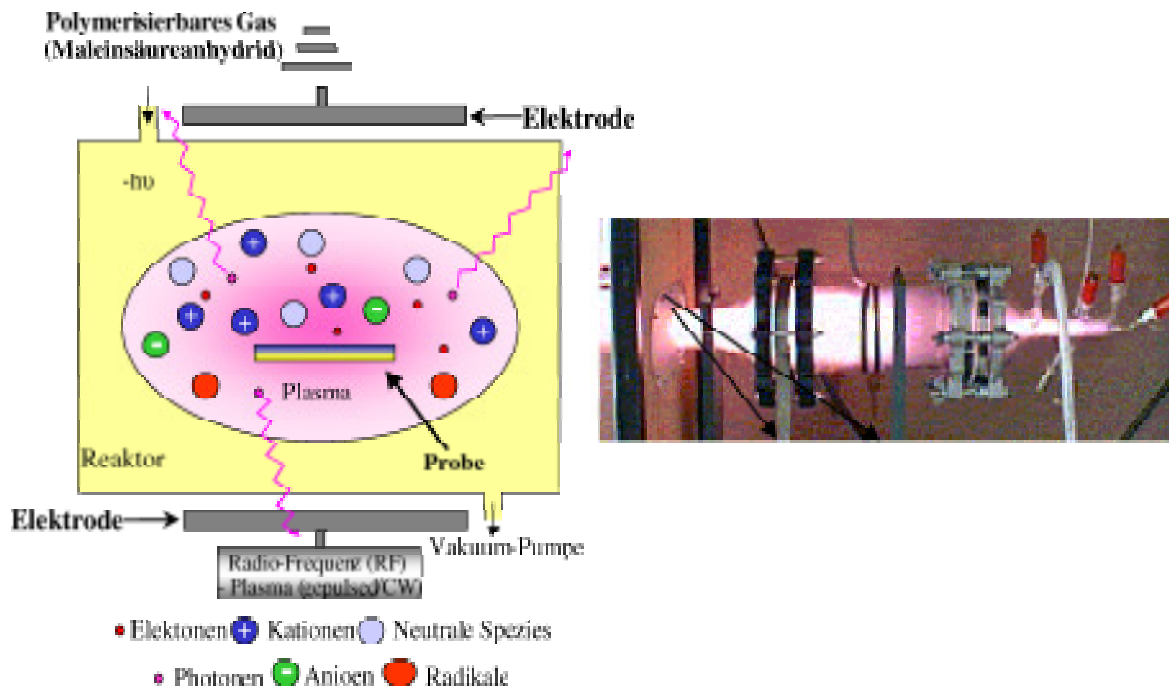
**Abb. 8.2:** Anwendungsbereiche von Plasma.

Polymerisierbare Gase (kleine in die Gasphase überführbar organische Moleküle: z. B. Maleinsäureanhydrid) werden ebenfalls für die Modifikation von Oberflächen ausgenutzt, in dem sie in ein Plasma überführt werden und so polymerisierbar sind. Durch das Aufbringen solcher Polymerfilme können die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Materialien verändert werden und finden potentielle Produktanwendungen in der Prävention der unerwünschten Besiedelung von Oberflächen (Antifouling-Beschichtungen z. B. von Schiffsrümpfen oder Kathetern) oder aber in der Prothetik zur Verbesserung des Einwuchses der Prothese in das Gewebe und der dadurch verbesserten Nutzungsdauer.

Die Erzeugung von Plasma kann durch die Zufuhr von thermischer, optischer, elektrischer oder kinetischer Energie erfolgen. Das im Rahmen dieser Arbeit für die Polymerisation genutzte Plasma wird in einem Pyrex-Glasreaktor durch Anlegen einer relativ niedrigen (im Vergleich zu Gleichstrom-Plasmen), radiofrequenzmodulierten (13,56 MHz) Spannung an das sich in der Gasphase befindende Maleinsäureanhydrid (Monomer) erzeugt. Das Radiofrequenzplasma (RF-Plasma) hat den Vorteil, dass die geladenen Teilchen nicht mehr



dem periodischen Wechsel in der Feldpolarität folgen können (ab Frequenzen  $> 500$  Hz) und so das Plasma innerhalb des Elektrodenvolumens bleibt, d.h. in dem von den Elektroden umschlossenen „Raum“ (Abb. 8.3).

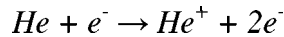


**Abb. 8.3:** Schematische Darstellung (links) und Foto des verwendeten Plasmareaktors.

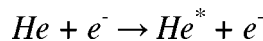
Durch die angelegte Radiofrequenz kann deutlich der Verlust an geladenen Teilchen gegenüber dem Plasma eines durch elektrische Entladungen (Lichtbogen etc.) erzeugten Gleichstrom-Plasmas (engl. *direct current (DC) glow discharge plasma*) reduziert werden. Dadurch finden weiterhin Teilchenkollisionen im RF-Plasma statt, die eine Regeneration des Plasmas gewährleisten. Aus diesem Grund kann das RF-Plasma auch mit am Reaktor extern angebrachten Elektroden, durch das Anlegen einer wesentlich geringeren Spannung erzeugt und aufrecht erhalten werden, als dies der Fall für ein Gleichstrom-Plasma ist [152].

Die genauen mechanistischen Prozesse innerhalb eines Plasmas und die daraus resultierenden Modifikationen einer Oberfläche sind nur wenig verstanden. Im folgenden

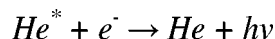
Abschnitt werden die wesentlichen Kollisionsreaktionen innerhalb eines Plasmas zusammengefasst:

**Ionisierung:**

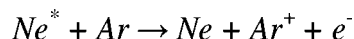
Elektronen werden von dem angelegten elektrischen Feld beschleunigt und können durch Kollision mit anderen Teilchen erneute Ionisierungsreaktionen hervorrufen. Ionisierung ist der wichtigste Schritt in der Erzeugung und Aufrechterhaltung eines Plasmas.

**Anregung:**

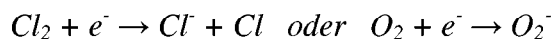
Die Kollision eines Elektrons mit einem Teilchen kann zur Übertragung der kinetischen Energie des Elektrons auf das Teilchen führen.

**Relaxation:**

Das angeregte Elektron fällt in seinen Grundzustand zurück. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form eines Photons emittiert.

**Penning-Ionisierung:**

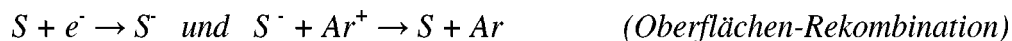
Angeregte Zustände, die metastabil sind und eine längere Lebensdauer (1ms oder länger) haben, besitzen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Kollision mit einer anderen Spezies was zu einer erhöhten bzw. erleichterten Ionisation führt.

**Bildung negativ geladener Ionen:**

Halogenide oder Sauerstoff können bei der Kollision mit freien Elektronen diese einfangen und auf diesem Weg ionisiert werden.

**Rekombination:**

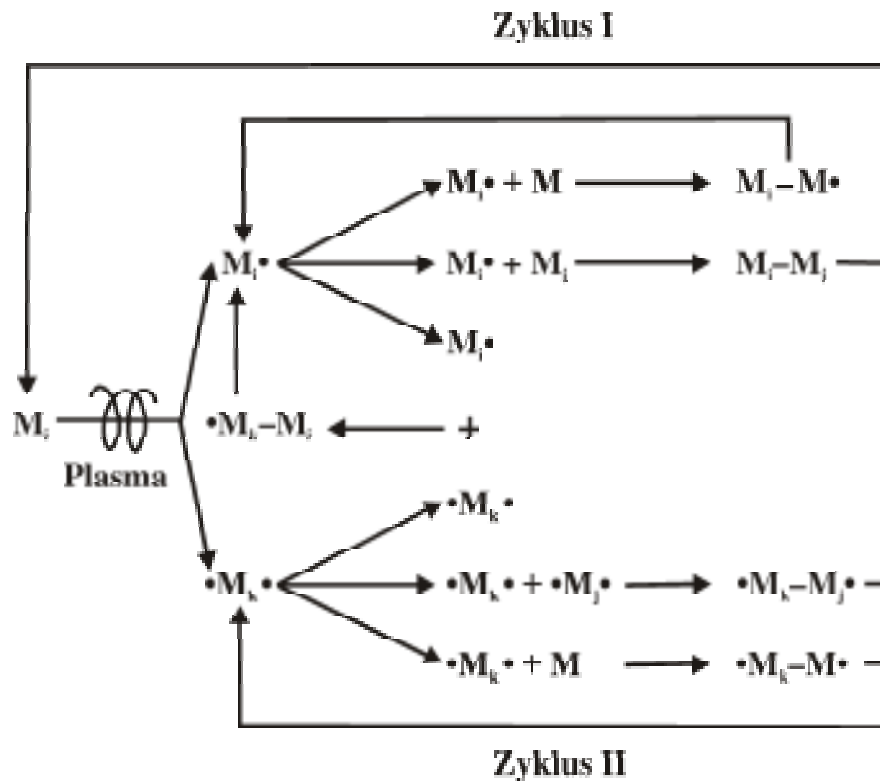
Dieser Prozess spielt nur eine untergeordnete Rolle, bedingt aber, dass die meisten Plasmen nur partiell ionisierte Gase darstellen.



Rekombinationsprozesse spielen sich auch auf der Oberfläche (S = Surface) der Reaktorwand ab, was zur Neutralisation der Ladungen führt.

**Radikalbildung:**

Ähnliche Kollisionsprozesse finden auch während der Plasmapolymerisation statt, wobei die Ionisation für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Plasmas erforderlich ist [235]. Die *eigentliche Plasmapolymerisation* wird jedoch als Nebenreaktion des Ionisationsprozesses angesehen und folgt im wesentlichen einem radikalischen Mechanismus [152]. In Abb. 8.4 sind die an der Plasmapolymerisation beteiligten Reaktionen zusammen gefasst [235,236], wobei *M* das Monomer oder irgendein auftretendes Dissoziationsprodukt, einschließlich Atome, darstellt. *M•*, bzw. *•M•* stellen die radikalischen reaktiven Spezies des Reaktionsgeschehens dar. Andere reaktive Teilchen können ebenfalls als Reaktionsteilnehmer in Erwägung gezogen werden, auch wenn sie eine untergeordnete Rolle spielen.



**Abb. 8.4:** Schematische Darstellung des mechanistischen Ablaufs während der Plasmapolymerisation.

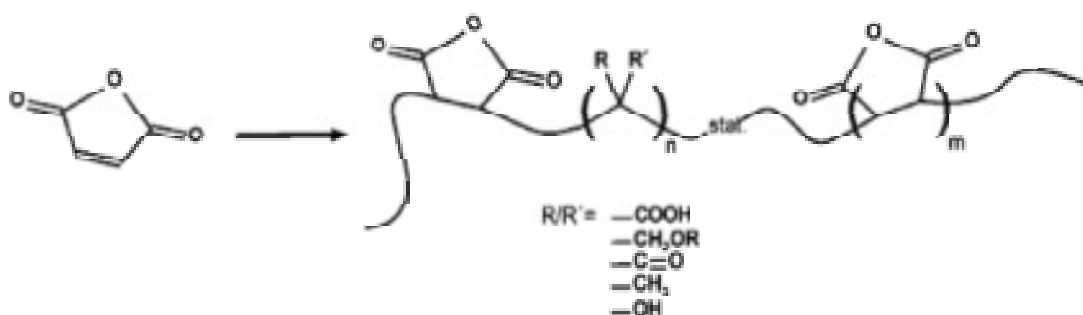
Unter Plasmapolymerisation versteht man die Polymerisation von Molekülen unter Verwendung von Plasma. Es gibt zwei Möglichkeiten für den Aufbau der Plasmapolymere: Das Plasma wird erzeugt und kontinuierlich aufrechterhalten (*Continuous Wave (CW)-Plasma*) oder das Plasma wird in bestimmten Zeitintervallen an- und ausgeschaltet, d. h. es wird gepulst (*Pulsed-Plasma*). Die eingespeiste Spitzenleistung  $P_{max}$  wird nach Gleichung 3-1 mit den Ein- ( $t_{on}$ ) und Auszeiten ( $t_{off}$ ) des Plasmas ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergibt sich die äquivalente eingespeiste Leistung ( $P_{äquiv.}$ ) des Gesamtprozesses. Das Verhältnis aus der Ein- und Auszeit des Plasmas wird als *duty cycle (DC)* bezeichnet, wobei das Verhältnis von  $t_{on}$  und  $t_{off}$  stark den vorherrschenden Reaktionsmechanismus der Plasmapolymerisation und somit die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Polymers beeinflusst [151,237]. Auch die eingespeiste Leistung ( $P_{max}$ ) und somit  $P_{äquiv.}$  besitzen einen großen Einfluss auf die Polymerstruktur.

$$P_{\text{äquiv.}} = P_{\text{max.}} \left( \frac{t_{\text{on}}}{t_{\text{on}} + t_{\text{off}}} \right) \quad \text{Gl. 3-1}$$

Gleiche Werte für  $P_{\text{äquiv.}}$  sollten dabei zu vergleichbaren Polymeren führen. Unter CW-Plasma präparierte Polymere zeigen oft einen hohen Verlust der funktionellen Gruppen [152] und eine stärkere Vernetzung. Grund hierfür ist, dass es während der Plasmaphase zu den oben genannten Kollisionsreaktionen kommt, d. h. es entstehen sehr viele aktive Spezies (siehe oben), die dann miteinander reagieren. In der Plasmaphase bestimmen Ätz- und Abscheidungsprozesse den Polymeraufbau. Da auch Fraktionierungen auftreten, die dann ebenfalls weiter reagieren, können dicht vernetzte Polymere entstehen. Je höher die eingespeiste Leistung dabei ist, desto vernetzter sind die Polymere und tragen demnach nur noch wenige funktionelle Gruppen. Unter DC-Bedingungen hingegen entstehen in der Plasma-on-Phase die gleichen aktiven Spezies wie unter CW-Bedingungen, die aber in der off-Phase unter Rekombination sehr schnell abreagieren. Lediglich die langlebigen Radikale bleiben bestehen, die dann unter der Annahme eines radikalischen Mechanismus (Abb. 8.4) polymerisieren. In der on-Phase treten neben den Abscheidungsprozessen ebenfalls Ätzprozesse auf. Durch das Pulsen des Plasmas können die Ätzprozesse (fehlen in der off-Phase) eingeschränkt werden, so dass die Abscheidungsprozesse, die vor allem in der off-Phase auftreten, überwiegen. Umso länger die Plasma-on-Phase im Verhältnis zur Plasma-off-Phase ist, desto mehr Reaktionszentren entstehen auch hier im wachsenden Polymer, was wiederum weniger funktionelle Gruppen und eine stärkere Vernetzung bedingt. Für beide Plasmavariationen (CW oder DC) nimmt die Anzahl an funktionellen Gruppen im Polymer mit der Höhe der eingespeisten Leistung ab und der Vernetzungsgrad des Polymers zu. Durch das DC-Plasma lassen sich insgesamt mildere Reaktionsbedingungen als unter CW-Bedingungen schaffen. Die Variation der Prozessparameter, wie die Lokalisation des Probenträgers, dessen Temperatur, der eingespeisten Leistung ( $P_{\text{max.}}$ ), des Monomerdurchsatzes im Reaktor sowie des verwendeten Prozessdrucks beeinflussen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Polymere ebenfalls stark ([152] und dort zitierte Literatur). Im Fall der Maleinsäureanhydridpolymere kann durch die Verwendung von gepulstem Plasma im Vergleich zu CW-Plasmen Polymere mit einem höheren Anteil an funktionellen Gruppen erhalten werden [151]. In der von Jenkins et al [87] publizierten

Arbeit zeigen die durch gepulstes Plasma generierten Maleinsäureanhydrid-Polymere die besten Eigenschaften für den Aufbau von Modellmembranen, wobei die Verwendung von 100 W als eingespeister Spitzenleistung ( $P_{max}$ ), zusammen mit einer  $t_{on}/t_{off}$ -Periode von 1/40 ms als besonders geeignet erwiesen. Die hieraus resultierende äquivalente Leistung für den Gesamtprozess betrug, gemäß Gl. 3-1, 2,4 W. Die Wahl dieser Parameter für die Plasmapolymerisation wurde mit der erhöhten Anzahl an Maleinsäureanhydridgruppen im entstehenden Polymer begründet [141], da diese für die Anbindung der Lipidmembran essenziell sind [87]. Je mehr Anhydridgruppen vorhanden sind, umso mehr Carboxylgruppen sind nach der Hydrolyse des Polymers vorhanden, die dann für die elektrostatische Anbindung der Lipidmembran in dem von Jenkins et al publizierten System ausgenutzt werden können. Dies gilt auch für die kovalente Anbindung der Lipidmembran. Denn umso mehr Anhydridgruppen im Polymer vorhanden sind, umso mehr Reaktionspartner stehen auch für die Aminolyse mit Decylamin zur Verfügung. Hierdurch kommt es zur Ausbildung einer Pseudo-Lipidmonolage, die dem Aufbau der Membran dient. Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmapolymere wurde aus diesem Grund ebenfalls ein gepulstes Plasma verwendet. Da der verwendete RF-Generator nicht baugleich mit dem von Jenkins et al [87] verwendeten war, konnten nicht die exakt gleichen Polymerisationsparameter von  $P_{max.} = 100$  W und DC = 1/40 ms verwendet werden. Der hier verwendete RF-Generator konnte in einer  $t_{on}$ -Zeit von 1 ms kein  $P_{max.}$  von 100 W erreichen. Aus diesem Grund musste  $P_{max}$  auf 50 W reduziert werden und dementsprechend musste auch eine Anpassung des duty cycle (DC) auf 1/20 ms erfolgen, so dass die gleiche äquivalente Leistung  $P_{äquiv.}$  wie bei Jenkins et al von 2,4 W resultierte.

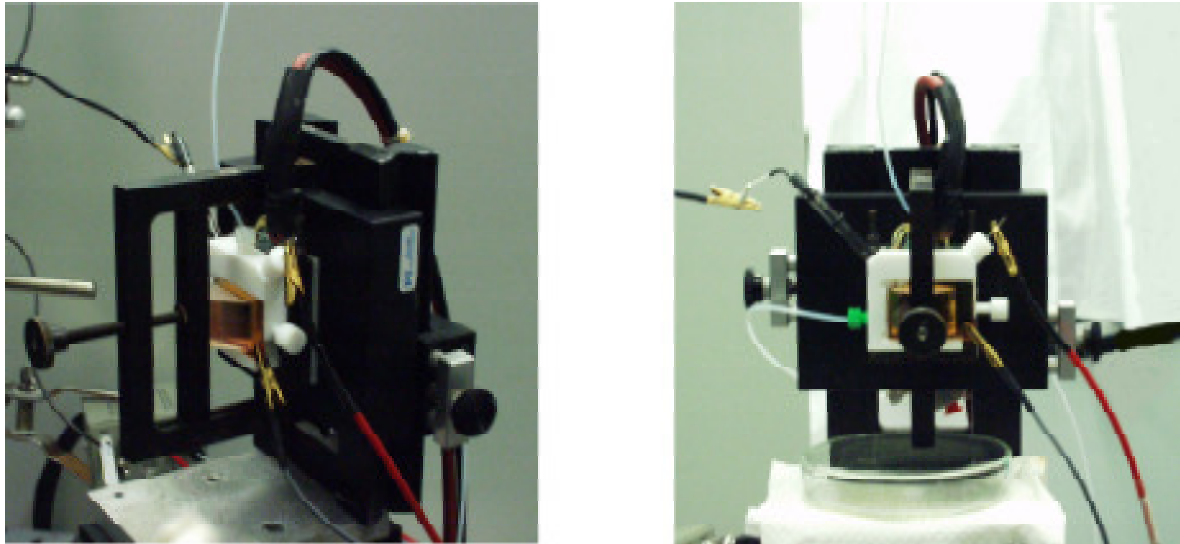
Abb. 8.5 (aus [141]) verdeutlicht die durch die Plasmapolymerisation von Maleinsäureanhydrid entstandenen funktionellen Gruppen.



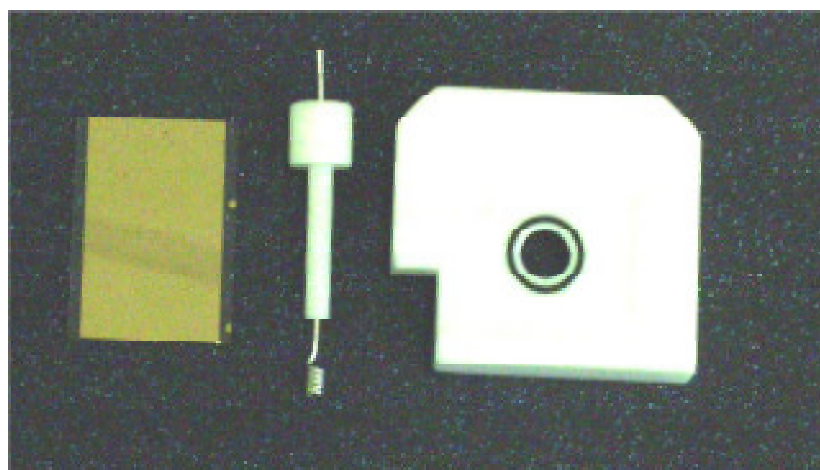
**Abb. 8.5:** Vereinfachtes Reaktionsschema der Plasmapolymerisation von Maleinsäureanhydrid und der während der Polymerisation entstehenden funktionellen Gruppen.

## 8.2 Messzellen (Abbildungen)

### 8.2.1 Messzelle für die kombinierte Oberflächenplasmonen- und Impedanzspektroskopie



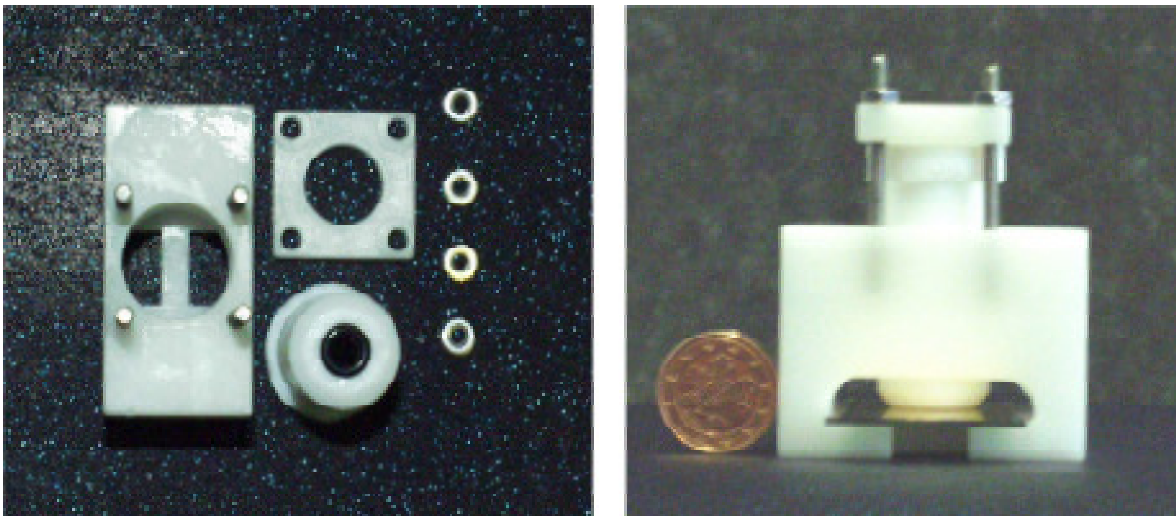
**Abb. 8.6:** Komplette Messzelle mit Halterung und den Anschlüssen für die Elektroden bzw. dem Ein- und Auslass für den Puffer.



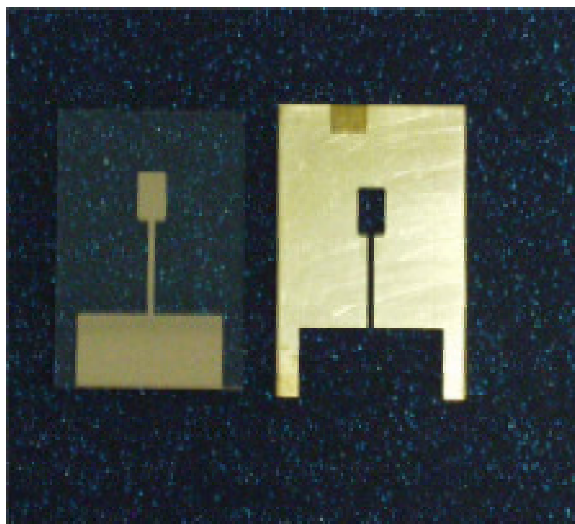
**Abb. 8.7:** Aufsicht auf eine aufgedampfte Goldelektrode (= Arbeitselektrode, links), einer Platinelektrode (Gegenelektrode, Bildmitte) und Teflonzelle für die kombinierte SPS/EIS-Messung.

Die genauen Abmessungen der Zelle bzw. der Halterung können unter [60] eingesehen werden.

### 8.2.2 Messzelle für die elektrochemische Impedanzspektroskopie



**Abb. 8.9:** Messzelle für die EIS. Einzelteile der Zelle (links) und zusammgebaut mit Goldelektrode (= Arbeitselektrode).



**Abb. 8.10:** Spezielle Goldelektrode (links) für reine EIS-Messungen in der SPS/EIS-Zelle (Abb. 8.2). Zur Herstellung wurde eine entsprechende Schablone verwendet (rechts).



# Abbildungsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1.1:</b>	Schematische Darstellung einer tierischen Zelle 2
<b>Abb. 1.2</b>	Bewegungsmöglichkeiten von Lipiden in Membranen 3
<b>Abb. 1.3:</b>	Schematische Darstellung der wichtigsten Modellmembransysteme 5
<b>Abb. 1.4:</b>	Struktur von Distearoylphosphatidylcholin 11
<b>Abb. 1.5:</b>	Struktur der auf Glycerin und Sphingosin basierenden Phospholipiden 12
<b>Abb. 1.6:</b>	Struktur verschiedener Alkohole, die mit dem Phosphatrest der Phospholipide verestert sein können ( $R_1$ ) und den hydrophilen Teil der Phospholipide bilden 12
<b>Abb. 1.7:</b>	Cholesterin 14
<b>Abb. 1.8:</b>	Auswahl einiger Aggregatstrukturen in Abhängigkeit des molekularen Platzbedarfs und des kritischen Packungsparameters CPP. 15
<b>Abb. 1.9:</b>	Das Phasendiagramm zeigt den Existenzbereich verschiedener thermotropher, lamellarer Phasen 16
<b>Abb. 1.10:</b>	Ungesättigtes Phospholipid mit „Kinke“ (cis-t-g <sup>-</sup> - Sequenz) im Fettsäurerest 17
<b>Abb. 1.11:</b>	Phospholipide zum Aufbau spacerloser Thiolipid-Modellmembranen 18
<b>Abb. 1.12:</b>	Phospholipide zum Aufbau von Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen 20
<b>Abb. 1.13:</b>	Fluoreszenzmarkiertes Lipid für die Fluoreszenzmikroskopie 21
<b>Abb. 1.14:</b>	Membranproteine 21
<b>Abb. 1.15:</b>	Bänderstruktur von humanem Annexin V (1AVR) 23
<b>Abb. 1.16:</b>	Zentrale Pore des Annexin V 24
<b>Abb. 1.17:</b>	Modell der $Ca^{2+}$ - und pH-Abhängigen Struktur und Membranassoziation von Annexin V und Annexin XII 25
<b>Abb. 1.18:</b>	Kristallstruktur des aus <i>Strep</i> -tag II und rekombinantem „core“ Streptavidin gebildeten Komplex 27
<b>Abb. 1.19:</b>	Strukturvergleich zwischen D-Biotin und D-Desthiobiotin 27
<b>Abb. 1.20:</b>	Schematische Darstellung der reversiblen Anbindung von Streptavidin an das Fusionsprotein bestehend aus Annexin V und <i>Strep</i> -tag II 28
<b>Abb. 1.21:</b>	Valinomycin 29
<b>Abb. 1.22:</b>	Protonenflüsse durch die Mitochondrienmembran 30

<b>Abb. 1.23:</b>	Topologisches Schema zur Anordnung von Redoxsystemen der mitochondrialen Atmungskette.	31
<b>Abb. 1.24:</b>	Struktur der dimeren CcOX aus Rinderherzmitochondrien	32
<b>Abb. 1.25:</b>	Häm a-Molekül	33
<b>Abb. 1.26:</b>	Katalytischer Zyklus der CcOX	33
<b>Abb. 3.1:</b>	Schema zum Aufbau spacerloser, binärer Modellmembranen	29
<b>Abb. 3.2:</b>	Schematischer Aufbau der auf DPPTE und 2-Mercaptoethanol beruhenden Modellmembran	32
<b>Abb. 3.3:</b>	Schematischer Aufbau einer auf Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer beruhenden Modellmembran	44
<b>Abb. 3.4:</b>	Stufenweiser Aufbau der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran	46
<b>Abb. 3.5:</b>	Stufenweiser Aufbau der Decylamin modifizierten Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran	47
<b>Abb. 3.6:</b>	Vereinfachte Darstellung der Reaktion zwischen plasmapolymerisiertem Maleinsäureanhydrid und Decylamin	48
<b>Abb. 3.7:</b>	Schematische Darstellung einer auf Decylamin modifiziertem Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer aufgebauten Modellmembran durch die teilweise erfolgende elektrostatische Anbindung von anionischen, freien Lipiden in der Submonoschicht der Membran	49
<b>Abb. 4.1:</b>	Helmholtzmodell der elektrischen Doppelschicht	51
<b>Abb. 4.2:</b>	Gouy-Chapman-Modell der elektrischen Doppelschicht	53
<b>Abb. 4.3:</b>	Stern-Modell der elektrischen Doppelschicht	54
<b>Abb. 4.4:</b>	Grahame-Modell der elektrischen Doppelschicht	56
<b>Abb. 4.5:</b>	Einfluss einer adsorbierten Lipidmembran auf die Gesamtkapazität	57
<b>Abb. 4.6:</b>	Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung	58
<b>Abb. 4.7:</b>	Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung und entsprechender Stromantwort an einem ohmschen Widerstand	59
<b>Abb. 4.8:</b>	Kreisfrequenz und Spannungs-Zeit-Diagramm der Wechselspannung und entsprechender Stromantwort an einem reinen Kondensator	60
<b>Abb. 4.9:</b>	Vektordarstellung des Wechselstroms	61
<b>Abb. 4.10:</b>	Vektordarstellung	62
<b>Abb. 4.11:</b>	Bode-Plot für einen ohmschen Widerstand	65
<b>Abb. 4.12:</b>	Bode-Plot für einen Kondensator	66
<b>Abb. 4.13:</b>	Bode-Plot für einen Widerstand und einem Kondensator in Serie	68

<b>Abb. 4.14:</b>	Bode-Plot für einen Widerstand und einem Kondensator in Parallelschaltung	70
<b>Abb. 4.15:</b>	Bode-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand und einem Kondensator in Serie mit einem Vorwiderstand	71
<b>Abb. 4.16:</b>	Bode-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand	72
<b>Abb. 4.17:</b>	Nyquist-Plot für einem ohmschen Widerstand	73
<b>Abb. 4.18:</b>	Nyquist-Plot für einen reinen Kondensator	73
<b>Abb. 4.19:</b>	Nyquist-Plot für einen reinen ohmschen Widerstand in Serie mit einem Kondensator	74
<b>Abb. 4.20:</b>	Nyquist-Plot für einen Widerstand und einem Kondensator in Parallelschaltung	74
<b>Abb. 4.21:</b>	Nyquist-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand und einem Kondensator in Serie mit einem Vorwiderstand	75
<b>Abb. 4.22:</b>	Nyquist-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand	76
<b>Abb. 4.23:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen ohmschen Widerstand	77
<b>Abb. 4.24:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen reinen Kondensator	78
<b>Abb. 4.25:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen reinen ohmschen Widerstand in Serie mit einem Kondensator	79
<b>Abb. 4.26:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für einen Widerstand und einem Kondensator in Parallelschaltung	79
<b>Abb. 4.27:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für eine Parallelschaltung aus Widerstand und einem Kondensator in Serie mit einem Vorwiderstand	80
<b>Abb. 4.28:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot für zwei RC-Glieder in Serie mit einem Vorwiderstand	81
<b>Abb. 4.29:</b>	Ersatzschaltkreis für eine Lipidmodellmembran ohne Submembranraum	82
<b>Abb. 4.30:</b>	Ersatzschaltkreis für eine Lipidmodellmembran mit Submembranraum/Spacer	83
<b>Abb. 4.31:</b>	Änderung der Schichtdicke $d$ während des Bilayer-Aufbaus	84
<b>Abb. 4.32:</b>	Defekt in Lipiddoppelmembran	85
<b>Abb. 4.33:</b>	Einfluss der Rauigkeit der Elektrode auf die Defektrate	88
<b>Abb. 4.34:</b>	Schematische Darstellung des Strahlengangs durch zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes	89
<b>Abb. 4.35:</b>	Schematische Darstellung des Strahlengangs durch ein Glasprisma	90
<b>Abb. 4.36:</b>	Abfall der Feldintensität an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum	91
<b>Abb. 4.37:</b>	Der Wellenvektor $k_{x,Luft}$ in Ausbreitungsrichtung $x$ ist zu klein, um ein Oberflächenplasmon anregen zu können.	93
<b>Abb. 4.38:</b>	Die Dispersionslinie eines Photons	93
<b>Abb. 4.39:</b>	Anregung von Oberflächenplasmonen durch unterschiedliche experimentelle Anordnungen.	94

<b>Abb. 4.40:</b>	Reflexionskurve des zur Plasmonenanregung verwendeten Lichts in Abhängigkeit vom äußeren Einfallswinkel	95
<b>Abb. 4.41:</b>	Reflexionskurve vor und nach Aufbringung eines dünnen dielektrischen Films	98
<b>Abb. 4.42:</b>	Reflexionskurve und dazu gehörige Kinetikkurve	93
<b>Abb. 4.43:</b>	AFM-Spitze aus einem Si-Einkristall	101
<b>Abb. 4.44:</b>	Prinzip AFM	102
<b>Abb. 4.45:</b>	Vergleich des Auflösungsvermögens einer sehr feinen AFM-Spitze mit einer stumpfen	102
<b>Abb. 4.46:</b>	Schematische (AFM-)Aufsicht und Seitenansicht auf eine mit zwei unterschiedlichen Molekülen assemblierten Oberfläche. Mittels Bildanalyseverfahren kann das Verhältnis von Molekülen auf der Oberfläche analysiert werden	106
<b>Abb. 4.47:</b>	Schema FRAP-Messung	107
<b>Abb. 4.48:</b>	Flüssigkeitstropfen auf einer Festkörperoberfläche.	109
<b>Abb. 4.49:</b>	Expansion eines Tropfens auf einer unebenen Oberfläche	111
<b>Abb. 5.1:</b>	Optische Schichtdickenzunahme der binären Submonolage	114
<b>Abb. 5.2:</b>	Schematische Darstellung der Schichtdickenzunahme durch Erhöhung der Oberflächenkonzentration	115
<b>Abb. 5.3:</b>	Kapazitäten verschiedener binärer Submonolagen bestehend aus 2-Mercaptoethanol und DPPTE	116
<b>Abb. 5.4:</b>	Einfluss der Assemblierungszeit der zweiten Präparationsstufe auf den Widerstand der Thiolmonolage	117
<b>Abb. 5.5:</b>	AFM-Aufnahmen (tapping-mode in Luft) der Oberflächentopographie nach 15minütiger Assemblierung in 2-Mercaptoethanol und danach erfolgter zweiter Assemblierung zu unterschiedlichen Zeiten mit DPPTE	118
<b>Abb. 5.6:</b>	AFM-Aufnahmen (tapping-mode in Luft) der Oberflächentopographie einer reinen DPPTE-Monolage auf Mica/Au (111)	122
<b>Abb. 5.7:</b>	AFM-Aufnahmen (tapping-mode in Luft) der Oberflächentopographie nach Koadsorption mit 2-Mercaptoethanol und DPPTE zu verschiedenen Assemblierungszeiten.	124
<b>Abb. 5.8:</b>	Prozentuale Oberflächenbelegung mit DPPTE zu verschiedenen Assemblierungszeiten	126
<b>Abb. 5.9:</b>	Kontaktwinkel zu verschiedenen Assemblierungszeiten	128
<b>Abb. 5.10:</b>	Hysterese des Kontaktwinkels zu unterschiedlichen Assemblierungszeiten der zwei verschiedenen Präparations-techniken.	130
<b>Abb. 5.11:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf reinen DPPTE-Schichten	132
<b>Abb. 5.12:</b>	Nyquist-Plot vor und nach der Vesikelspreitung (DMPC/DMPS)	133

<b>Abb. 5.13:</b>	Auswirkungen der Elektrodenrauigkeit und Defekten in der Submonolage auf den Widerstand vor und nach der Vesikelspreitung	133
<b>Abb. 5.14:</b>	SPS-Messungen vor und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer reinen DPPTE-Monolage	135
<b>Abb. 5.15:</b>	SPS-Kinetikkurven der Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer reinen DPPTE-Monolage	135
<b>Abb. 5.16</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor und nach der Vesikelspreitung (DMPC/DPhytPS) auf 15 h koadsorbierten binären Monolagen	136
<b>Abb. 5.17:</b>	Optische Schichtdickenzunahme $\Delta d$ durch Spreitung von DMPC/DMPS- bzw. DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf binären Submonolagen	137
<b>Abb. 5.18:</b>	Kapazität als Funktion der Zeit bei Vesikelspreitung auf verschiedenen Monolagen	139
<b>Abb. 5.19:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor und nach Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer zweistufig präparierten binären Monolage (aus 2-Mercaptoethanol/DPPTE, 15/15-Probe)	140
<b>Abb. 5.20:</b>	Nyquist-Plot vor und nach der Vesikelspreitung (DMPC/DMPS) auf einer 15/15-Submonolage	140
<b>Abb. 5.21:</b>	Zeitliche Widerstandsänderung durch die Spreitung von DMPC/DMPS-Vesikeln auf durch 2-step self-assembly präparierten binären Monolagen unterschiedlicher Assemblierungszeiten	141
<b>Abb. 5.22:</b>	Kapazitätsänderung als Funktion der Zeit während der Vesikelspreitung auf zweistufig präparierten binären Submonolagen	142
<b>Abb. 5.23:</b>	Widerstandsänderung durch die Spreitung von DMPC/DPhytPS-Vesikeln auf durch 2-step self-assembly präparierten binären Monolagen zu unterschiedlichen Assemblierungszeiten	145
<b>Abb. 5.24:</b>	SPS-Kinetikkurve der Vesikelspreitung (DMPC/DPhytPS) auf einer 15/15-Monolage	147
<b>Abb. 5.25:</b>	AFM-Aufnahmen einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran	147
<b>Abb. 5.26:</b>	Modellvorstellung der Vesikelspreitung auf hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen	149
<b>Abb. 5.27:</b>	Kinetik (SPS) der Annexin V-Membranbindung	152
<b>Abb. 5.28:</b>	Zeitliche Änderung der elektrochemischen Eigenschaften unterschiedlicher Modellmembranen unter dem Einfluss der Annexin V-Mutanten	154
<b>Abb. 5.29:</b>	Zeitliche Änderung der Kapazität unter Annexin V-Einfluss auf eine auf einer binären 15/15-Monolage aufgebauten DMPC/DPhytPS-Modellmembran und der Versuch der Hemmung durch Streptavidinzugabe	155

<b>Abb. 5.30:</b>	AFM-Aufnahmen der Oberflächenbelegung einer DMPC/DPhytPS- bzw. einer DMPC/DMPS-Membran mit Annexin V	156
<b>Abb. 5.31:</b>	AFM-Aufnahmen (contact mode) einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ohne Annexin V-Mutante und mit partiell abgeschabter Annexin-Schicht	157
<b>Abb. 5.32:</b>	AFM-Aufnahmen (contact mode) einer mit Annexin V-Mutanten bedeckten 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer mit partiell entfernter Annexinschicht und ebenfalls partiell entfernter Membran	158
<b>Abb. 5.33:</b>	Kinetik (EIS) der reversibeln Hemmung der Kanaleigenschaften von Annexin V mittels Streptavidin	159
<b>Abb. 5.34:</b>	Vergleich der Annexin V-Aktivität und der Möglichkeit der reversibeln Hemmung durch die Streptavidin-Mutante 1	160
<b>Abb. 5.35:</b>	3D-Ausschnitt der Oberflächentopographie einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran mit gebundenen Annexin V-Proteinen	162
<b>Abb. 5.36:</b>	Gaußverteilung der Größenverhältnisse einzelner Annexin V-Proteine auf einer 15/15-DMPC/DPhytPS-Membran.	162
<b>Abb. 5.37:</b>	Auflösung kleiner Strukturen durch die AFM-Spitze	163
<b>Abb. 5.38:</b>	EIS-Spektrum eines MAH-PP Films vor und nach der Quellung	168
<b>Abb. 5.39:</b>	Vesikelspreitung von DMPC-Vesikeln auf einem zuvor gequollenen plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid-Film	169
<b>Abb. 5.40:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot und Bode-Plot vor und nach der Vesikelspreitung (DMEPC) auf einem gequollenen MAH-PP Film	170
<b>Abb. 5.41:</b>	Kinetik (EIS-Messungen) der Spreitung von DMPC-Vesikeln auf einem ungequollenen plasmapolymersierten Maleinsäureanhydrid-Film	171
<b>Abb. 5.42:</b>	FTIR-Spektrum des Bernsteinsäureanhydrids, eines unmodifizierten und eines Decylamin modifizierten MAH-PP Films	173
<b>Abb. 5.43:</b>	Vesikelspreitung auf Decylamin modifiziertem MAH-PP	175
<b>Abb. 5.44:</b>	Kinetik (EIS) der Vesikelspreitung auf Decylamin modifizierten MAH-PP	176
<b>Abb. 5.45:</b>	Vesikelspreitung auf ungequollenem Decylamin modifiziertem MAH-PP in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer	177
<b>Abb. 5.46:</b>	Kinetik (EIS) der Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden auf Decylamin modifiziertem MAH-PP in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer	178
<b>Abb. 5.47:</b>	Frequenzreduzierter Admittanz-Plot vor und nach erfolgter Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG-Lipiden in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer	179
<b>Abb. 5.48:</b>	Zeitliche Änderung des Polymerwiderstandes und der Polymerkapazität infolge der Vesikelspreitung von DPhytPC/DPhytPG in $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer	180

<b>Abb. 5.49:</b>	Aufsicht auf die fluoreszenzmarkierte Membran und zeitabhängige Veränderung der Intensität nach erfolgter Bleichung	182
<b>Abb. 5.50:</b>	Aufsicht auf die fluoreszenzmarkierte Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Membran und zeitabhängige Veränderung der Intensität nach erfolgter Bleichung	184
<b>Abb. 5.51:</b>	Widerstandsänderung durch den Ionencarrier Valinomycin	186
<b>Abb. 5.52:</b>	Einbau der Cytochrom-c-Oxidase (CcOX) in eine Decylamin modifizierte MAH-PP unterstützte DPhytPC/DPhytPG-Membran in Ca <sup>2+</sup> -Puffer	187
<b>Abb. 5.53:</b>	Bänderstruktur der zweiten Untereinheit der CcOX	188
<b>Abb. 5.54:</b>	Aktivität der CcOX	189
<b>Abb. 6.1:</b>	Schematische Zeichnung des Reiters (Probenhalter) mit eingebauter Messzelle	200
<b>Abb. 6.2:</b>	Aufbau des Oberflächenplasmonenspektroskops	201
<b>Abb. 6.3:</b>	Schematische Darstellung des Plasmareaktors und der elektronischen Komponenten	204
<b>Abb. 8.1:</b>	Übergänge der einzelnen Aggregatzustände	211
<b>Abb. 8.2:</b>	Anwendungsbereiche von Plasma	212
<b>Abb. 8.3:</b>	Schematische Darstellung und Foto des verwendeten Plasmareaktors	213
<b>Abb. 8.4:</b>	Schematische Darstellung des mechanistischen Ablaufs während der Plasmapolymerisation	216
<b>Abb. 8.5:</b>	Vereinfachtes Reaktionsschema der Plasmapolymerisation von Maleinsäureanhydrid	218
<b>Abb. 8.6:</b>	Komplette Messzelle mit Halterung und den Anschlüssen für die Elektroden, bzw. dem Ein- und Auslass für Puffer	219
<b>Abb. 8.7:</b>	Aufsicht auf eine aufgedampfte Goldelektrode, einer Platinelektrode und Teflonzelle für die kombinierte SPS/EIS-Messungen	219
<b>Abb. 8.9:</b>	Messzelle für die EIS	220
<b>Abb. 8.10:</b>	Spezielle Goldelektrode für reine EIS-Messungen in der SPS/EIS-Zelle	220





## Literaturverzeichnis

- [1] Campbell, N. A.; Reece, J. B.: Biologie; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **1997**.
- [2] Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.: Molekulare Zellbiologie; 2.; de Gruyter: Berlin, **1996**.
- [3] Chiras, D.: Human Biology. [www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/cellmemb.gif](http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/cellmemb.gif) **1999**.
- [4] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et al.: Molecular Biology of the Cell; 3.; Garland Publishing: New York and London, **1994**.
- [5] Stryer, L.: Biochemistry; 4.; Freeman: New York, **1995**.
- [6] Singer, S. J., Nicolson, G. L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [7] Ke, P. C.; Naumann, C. A.: Hindered Diffusion in Polymer-Tethered Phospholipid Monolayers at the Air-Water Interface: A Single Molecule Fluorescence Imaging Study. *Langmuir* **2001**, *17*, 5076-5081.
- [8] Mc Closkey, M. A., Poo, M.: Rates of Membrane-Associated Reactions: Reduction of Dimensionality Revisited. *The Journal of Cell Biology* **1986**, *102*, 88-96.
- [9] Abney, J. R.; Scalettar, B. A.: Fluctuations and Membrane Heterogeneity. *Biophysical Chemistry* **1995**, *57*, 27-36.
- [10] Hoppe, W.: Biophysik; 2., völlig Neubearb. Aufl.; Springer Verlag: Berlin, **1982**.
- [11] Berk, D.; Hochmuth, H.: Lateral Mobility of Integral Proteins in Red-Blood-Cell Tethers. *BioPhysical Journal* **1992**, *61*, 9-18.
- [12] Bevers, E. M.; Comfurius, P.; Dekkers, D. W. C.; Zwaal, R. F. A.: Lipid Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1999**, *1439*, 317-330.
- [13] Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M.: Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 217-245.

- [14] Hanayama, R.; Tanaka, M.; Miwa, K.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A. et al.: Identification of a Factor That Links Apoptotic Cells to Phagocytes. *Nature* **2002**, *417*, 182-187.
- [15] Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C.: A Novel Assay for Apoptosis Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **1995**, *184*, 39-51.
- [16] Ohtsuki, K., Akashi, K., Aoka, Y., Blankenberg, F. G., Kapiwoda, S., Tait, J. F., Strauss, H. W.: Technetium-99m Hynic-Annexin V: A Potential Radiopharmaceutical for the in-Vivo Detection of Apoptosis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **1999**, *26*, 1251 - 1258.
- [17] Bevers, E. M.; Comfurius, P.; Van Rijn, J. L. M. L., et al.: Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *European Journal of Biochemistry* **1982**, *122*, 429-436.
- [18] Bevers, E. M.; Comfurius, P.; Zwaal, R. F. A.: Changes in Membrane Phospholipid Distribution During Platelet Activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1983**, *736*, 57-66.
- [19] Raynal, P.; Pollard, H. B.: Annexins: The Problem of Assessing the Biological Role for a Gene Family of Multifunctional Calcium- and Phospholipid-Binding Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1994**, *1197*, 63-93.
- [20] Singer, S. J.: Structure of the Cell Surface. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **1982**, *60*, 25-30.
- [21] Vredenberg, W. J.: A Method for Measuring the Kinetics of Energy-Dependent Changes in the Electrical Membrane Resistance of Metabolizing Plant Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1972**, *274*, 505-514.
- [22] Pannicke, T.; Roncagliolo, M.; Reichenbach, A.; Palacios, A. G.: Electrophysiological Properties of Retinal Muller Glial Cells from Myelin Mutant Rat. *Glia* **2004**, *45*, 338-345.
- [23] Henkel, T.; Mittler, S.; Pfeiffer, W.; Rotzer, H.; Apell, H. J. et al.: Lateral Order in Mixed Lipid Bilayers and Its Influence on Ion Translocation by Gramicidin: A Model for the Structure- Function Relationship in Membranes. *Biochimie* **1985**, *71*, 89-98.
- [24] Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J.: Improved Patch-Clamp Technique for High-Resolution Current Recordings from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflüg. Arch.* **1981**, *391*, 85-100.
- [25] Ashcroft, F. M.: Ion Channels and Disease; *Academic Press*, **2000**.

- [26] Naumann, C. A., Knoll, W., Frank, C. W.: Hindered Diffusion in Polymer-Tethered Membranes: A Monolayer Study at the Air-Water Interface. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1097-1103.
- [27] Seitz, M., Wong, J. Y., Park, C. K., Alcantar, N. A., Israelachvili, J.: Formation of Tethered Supported Bilayers Via Membrane-Inserting Reactive Lipids. *Thin Solid Films* **1998**, 327-329, 767-771.
- [28] Seitz, M., Park, C. K., Wong, J. Y., Alcantar, N. A., Israelachvili, J. N.: Long-Range Interaction Forces between Polymer-Supported Lipid Bilayer Membranes. *Langmuir* **2001**, 17, 4616-4626.
- [29] Sackmann, E.: Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* **1996**, 271, 43-48.
- [30] Gaines Jr., G. L.: Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces.; John Wiley & Sons.: New York, London, Sidney, **1966**.
- [31] Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E.: Polymorphism of Phospholipid Monolayers. *Journal De Physique* **1978**, 39, 301-313.
- [32] Phillips, M. C.; Ladbrooke, B. D.; Chapman, D.: Molecular Interactions in Mixed Lecithin Systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1970**, 196, 35-44.
- [33] Bauer, K. H.; Froemming, K.-H.; Fuehrer, C.: Pharmazeutische Technologie; 5.; Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, **1997**.
- [34] Chapman, D.: Phase-Transitions and Fluidity Characteristics of Lipids and Cell-Membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1975**, 8, 185-235.
- [35] Sackmann, E.: Dynamic Molecular-Organization in Vesicles and Membranes. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1978**, 82, 891-909.
- [36] Kornberg, R. D.; Mc Connell, H. M.: Lateral Diffusion of Phospholipids in a Vesicle Membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 2564-2568.
- [37] Galla, H. J.; Sackmann, E.: Chemically-Induced Phase Separation in Mixed Vesicles Containing Phosphatidic-Acid - Optical Study. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, 4114-4120.
- [38] Galla, H. J.; Hartmann, W.; Sackmann, E.: Peptide Binding to Lipid Bilayer Vesicles - Model System for a Lipid-Protein Interaction. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **1978**, 359, 1084-1085.

- [39] Galla, H. J.; Hartmann, W.; Sackmann, E.: Lipid-Protein-Interaction in Model Membranes - Binding of Melittin to Lecithin Bilayer Vesicles. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1978**, *82*, 918-922.
- [40] Kornberg, R. D., Mc Namee, M. G., Mc Connell, H. M.: Measurement of Transmembrane Potentials in Phospholipid Vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 1508-1513.
- [41] Neher, E., Sakmann, B.: Die Erforschung Von Zellsignalen Mit Der Patch-Clamp Technik. *Spektrum der Wissenschaft* **1992**, *5*, 48.
- [42] Banerjee, R.: Liposomes: Applications in Medicine. *J. Biomater. Appl.* **2001**, *16*, 3-21.
- [43] Lian, T.; Ho, R. J. Y.: Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *90*, 667-680.
- [44] Agarwal, R.; Katare, O. P.: Preparation and in Vitro Evaluation of Miconazole Nitrate-Loaded Topical Liposomes. *Pharmaceutical Technology* **2002**, *November 2*, 48-60.
- [45] Gutman, R. L.; Peacock, G.; Lu, D. R.: Targeted Drug Delivery for Brain Cancer Treatment. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 31-41.
- [46] Patel, H. M.; Ryman, B. E.: Oral-Administration of Insulin by Encapsulation within Liposomes. *Febs Letters* **1976**, *62*, 60-63.
- [47] Patel, H. M.; Stevenson, R. W.; Parsons, J. A.; Ryman, B. E.: Use of Liposomes to Aid Intestinal-Absorption of Entrapped Insulin in Normal and Diabetic Dogs. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1982**, *716*, 188-193.
- [48] Spangler, R. S.: Insulin Administration Via Liposomes. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 911-922.
- [49] Choudhari, K. B.; Labhasetwar, V.; Dorle, A. K.: Liposomes as a Carrier for Oral Administration of Insulin: Effect of Formulation Factors. *J. Microencapsul.* **1994**, *11*, 319-325.
- [50] Conlan, J. W.; Krishnan, L.; Willick, G. E.; Patel, G. B.; Sprott, G. D.: Immunization of Mice with Lipopeptide Antigens Encapsulated in Novel Liposomes Prepared from the Polar Lipids of Various Archaeobacteria Elicits Rapid and Prolonged Specific Protective Immunity against Infection with the Facultative Intracellular Pathogen, *Listeria Monocytogenes*. *Vaccine* **2001**, *19*, 3509-3517.
- [51] Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C.: Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System. *Nature* **1962**, *194*, 979.

- [52] Clowes, A. W.; Cherry, R. J.; Chapman, D.: Physical Properties of Lecithin-Cerebroside Bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1971**, 249, 301-317.
- [53] Stark, G.: Bilayer Lipid Membranes. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1978**, 82, 890-891.
- [54] Mueller, P.; Rudin, D. O.: Development of K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> Discrimination in Experimental Bimolecular Lipid Membranes by Macrocyclic Antibiotics. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **1967**, 26, 398-404.
- [55] Coronado, R.: Recent Advances in Planar Phospholipid Bilayer Techniques for Monitoring Ion Channels. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1986**, 15, 259-277.
- [56] Andreoli, T. E.: Planar Lipid Bilayer Membranes. *Methods in Enzymology* **1974**, 32, 513-539.
- [57] Gennis, R. B.: Biomembranes: Molecular Structure and Function; Springer-Verlag: New York, **1989**.
- [58] Raguse, B.; Braach-Maksvytis, V.; Cornell, B. A.; King, L. G.; Osman, P. D. J. et al.: Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* **1998**, 14, 648-659.
- [59] Ulman, A.: An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly; Academic Press: San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, **1991**.
- [60] Wieder, H.: Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen Auf Gold Zur Rekonstitution Von Membranproteinen. *Fachbereich Chemie und Pharmazie* **2000**.
- [61] Cornell, B. A.; Krishna, G.; Osman, P. D.; Pace, R. D.; Wieczorek, L.: Tethered-Bilayer Lipid Membranes as a Support for Membrane-Active Peptides. *Biochemical Society Transactions* **2001**, 29, 613-617.
- [62] Florin E, L.; Gaub H, E.: Painted Supported Lipid Membranes. *Biophys. J.* **1993**, 64, 375-383.
- [63] Seifert, K.; Fendler, K.; Bamberg, E.: Charge Transport by Ion Translocating Membrane Proteins on Solid Supported Membranes. *Biophys. J.* **1993**, 64, 384.
- [64] Plant, A. L.; Tarlov, M.: Self-Assembled Monolayers as Substrates for Planar Model Membranes. *Biophysical Journal* **1993**, 64, A298-A298.
- [65] Plant, A. L.; Gueguetchkeri, M.; Yap, W.: Supported Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Membranes - Insulating Properties. *Biophysical Journal* **1994**, 67, 1126-1133.

- [66] Plant, A. L.: Self-Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **1993**, 9, 2764-2767.
- [67] Stelzle, M.; Weissmueller, G.; Sackmann, E.: On the Application of Supported Bilayers as Receptive Layers for Biosensors with Electrical Detection. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 2974-2981.
- [68] Steinem, C.; Janshoff, A.; Ulrich, W.-P.; Sieber, M.; Galla, H.-J.: Impedance Analysis of Supported Lipid Bilayer Membranes: A Scrutiny of Different Preparation Techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1996**, 1279, 169-180.
- [69] Peggion, C., Formaggio, F., Toniolo, C., Becucci, L., Moncelli, M. R., Guidelli, R.: A Peptide-Tethered Lipid Bilayer on Mercury as a Biomimetic System. *Langmuir* **2001**, 17, 6585-6592.
- [70] Elender, G.; Kuhner, M.; Sackmann, E.: Functionalisation of Si/SiO<sub>2</sub> and Glass Surfaces with Ultrathin Dextran Films and Deposition of Lipid Bilayers. *Biosensors and Bioelectronics* **1996**, 11, 565-577.
- [71] Rothe, U., Aurich, H.: Lipid-Coated Particles - a New Approach to Fix Membrane-Bound Enzymes onto Carrier Surfaces. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1989**, 11, 18-30.
- [72] Sinner, E. K.; Knoll, W.: Functional Tethered Membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, 705-711.
- [73] Krishna, G.; Schulte, J.; Cornell, B. A.; Pace, R.; Wieczorek, L. et al.: Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: The Interfacial Capacitance. *Langmuir* **2001**, 17, 4858-4866.
- [74] Naumann, C. A., Prucker, O., Lehmann, T., Ruhe, J., Knoll, W., Frank, C. W.: The Polymer-Supported Phospholipid Bilayer: Tethering as a New Approach to Substrate-Membrane Stabilization. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 27-35.
- [75] Wagner, M. L.; Tamm, L. K.: Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophys. J.* **2000**, 79, 1400-1414.
- [76] Cornell, B. A.; BraachMaksvytis, V. L. B.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Raguse, B. et al.: A Biosensor That Uses Ion-Channel Switches. *Nature* **1997**, 387, 580-583.
- [77] Lang, H.; Duschl, C.; Vogel, H.: A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir* **1994**, 10, 197-210.
- [78] Williams, L. M.; Evans, S. D.; Flynn, T. M.; Marsh, A.; Knowles, P. F. et al.: Kinetics of Formation of Single Phospholipid Bilayers on Self-Assembled

- Monolayer Supports, as Monitored by Surface Plasmon Resonance. *Supramolecular Science* **1997**, *4*, 513-517.
- [79] Cornell, B. A.; BraachMaksvytis, V. L. B.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Pace, R. J. et al.: A Synthetic Gated Ion Channel within a Synthetic Tethered Membrane. *Biophysical Journal* **1997**, *72*, Th289-Th289.
- [80] Steinem, C.; Janshoff, A.; von dem Bruch, K.; Reihls, K.; Goossens, J. et al.: Valinomycin-Mediated Transport of Alkali Cations through Solid Supported Membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1998**, *45*, 17-26.
- [81] Lahiri, J.; Kalal, P.; Frutos, A. G.; Jonas, S. T.; Schaeffler, R.: Method for Fabricating Supported Bilayer Lipid Membranes on Gold. *Langmuir* **2000**, *16*, 7805-7810.
- [82] Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B. et al.: Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19*, 5435-5443.
- [83] Hausch, M.; Zentel, R.; Knoll, W.: Synthesis and Characterization of Hydrophilic Lipopolymers for the Support of Lipid Bilayers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1999**, *200*, 174-179.
- [84] Purucker, O.; Fortig, A.; Jordan, R.; Tanaka, M.: Supported Membranes with Well-Defined Polymer Tethers-Incorporation of Cell Receptors. *Chemphyschem* **2004**, *5*, 327-335.
- [85] Erdelen, C.; Haeussling, L.; Naumann, R.; Ringsdorf, H.; Wolf, H. et al.: Self-Assembled Disulfide-Functionalized Amphiphilic Copolymers on Gold. *Langmuir* **1994**, *10*, 1246-1250.
- [86] Zhang, L. Q.; Longo, M. L.; Stroeve, P.: Mobile Phospholipid Bilayers on a Polyon/Alkylthiol Layer Pair. *Langmuir* **2000**, *16*, 5093-5099.
- [87] Jenkins, A. T. A.; Hu, J.; Wang, Y. Z.; Schiller, S.; Foerch, R. et al.: Pulsed Plasma Deposited Maleic Anhydride Thin Films as Supports for Lipid Bilayers. *Langmuir* **2000**, *16*, 6381-6384.
- [88] Rothe, U.; Aurich, H.; Engelhardt, H.; Oesterhelt, D.: Oriented Incorporation of Bacteriorhodopsin into the Lipid Shell of Phospholipid-Coated Polymer Particles. *FEBS Letters* **1990**, *263*, 308-312.
- [89] Naumann, R.; Jonczyk, A.; Kopp, R.; van Esch, J.; Ringsdorf, H. et al.: Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angewandte Chemie, International Edition in English* **1995**, *34*, 2056-2058.
- [90] Stora, T. D., Z.; Vogel, H.; Duschl, C.: Histidine-Tagged Amphiphiles for the Reversible Formation of Lipid Bilayer Aggregates on Chelator-Functionalized Gold Surfaces. *Langmuir* **2000**, *16*, 5471-5478.

- [91] Györváry, E.; Wetzler, B.; Sleytr, U. B.; Sinner, A.; Offenhausser, A. et al.: Lateral Diffusion of Lipids in Silane-, Dextran-, and S-Layer-Supported Mono- and Bilayers. *Langmuir* **1999**, *15*, 1337-1347.
- [92] Berquand, A.; Mazeran, P. E.; Pantigny, J.; Proux-Delrouyre, V.; Laval, J. M. et al.: Two-Step Formation of Streptavidin-Supported Lipid Bilayers by PEG-Triggered Vesicle Fusion. Fluorescence and Atomic Force Microscopy Characterization. *Langmuir* **2003**, *19*, 1700-1707.
- [93] Proux-Delrouyre, V.; Elie, C.; Laval, J. M.; Moiroux, J.; Bourdillon, C.: Formation of Tethered and Streptavidin-Supported Lipid Bilayers on a Microporous Electrode for the Reconstitution of Membranes of Large Surface Area. *Langmuir* **2002**, *18*, 3263-3272.
- [94] Proux-Delrouyre, V.; Laval, J. M.; Bourdillon, C.: Formation of Streptavidin-Supported Lipid Bilayers on Porous Anodic Alumina: Electrochemical Monitoring of Triggered Vesicle Fusion. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 9176-9177.
- [95] Naumann, R.; Jonczyk, A.; Kopp, R.; Vanesch, J.; Ringsdorf, H. et al.: Incorporation of Membrane-Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34*, 2056-2058.
- [96] Naumann, R.; Jonczyk, A.; Hampel, C.; Ringsdorf, H.; Knoll, W. et al.: Coupling of Proton Translocation through ATPase Incorporated into Supported Lipid Bilayers to an Electrochemical Process. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1997**, *42*, 241-247.
- [97] Yin, P.; Burns, C. J.; Osman, P. D. J.; Cornell, B. A.: A Tethered Bilayer Sensor Containing Alamethicin Channels and Its Detection of Amiloride Based Inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 389-397.
- [98] Naumann, R.; Schmidt, E. K.; Jonczyk, A.; Fendler, K.; Kadenbach, B. et al.: The Peptide-Tethered Lipid Membrane as a Biomimetic System to Incorporate Cytochrome c Oxidase in a Functionally Active Form. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 651-662.
- [99] Naumann, R.; Walz, D.; Schiller, S. M.; Knoll, W.: Kinetics of Valinomycin-Mediated K<sup>+</sup> Ion Transport through Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *550-551*, 241-252.
- [100] Naumann, R.; Baumgart, T.; Graber, P.; Jonczyk, A.; Offenhausser, A. et al.: Proton Transport through a Peptide-Tethered Bilayer Lipid Membrane by the H<sup>+</sup>-ATP Synthase from Chloroplasts Measured by Impedance Spectroscopy. *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17*, 25-34.



- [101] Heyse, S.; Stora, T.; Schmid, E.; Lakey, J. H.; Vogel, H.: Emerging Techniques for Investigating Molecular Interactions at Lipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1998**, 1376, 319-338.
- [102] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.: Biochemie; 5; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, **2003**.
- [103] Winter, R.; Noll, F.: Methoden Der Biophysikalischen Chemie; Taubner Studienbücher: Stuttgart, **1998**.
- [104] Blocher, D.; Six, L.; Gutermann, R.; Henkel, B.; Ring, K.: Physicochemical Characterization of Tetraether Lipids from *Thermoplasma Acidophilum*. Calorimetric Studies on Miscibility with Diether Model Lipids Carrying Branched or Unbranched Alkyl Chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, 818, 333-342.
- [105] Lingler, S.; Rubinstein, I.; Knoll, W.; Offenhausser, A.: Fusion of Small Unilamellar Lipid Vesicles to Alkanethiol and Thiolipid Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* **1997**, 13, 7085-7091.
- [106] MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S. et al.: Physical and Biological Properties of Cationic Triesters of Phosphatidylcholine. *Biophysical Journal Biophys. J.* **1999**, 77, 2612-2629.
- [107] Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J.: Kurzes Lehrbuch Der Biochemie Für Mediziner Und Naturwissenschaftler; Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **1994**.
- [108] Hauser, H.; Shipley, G. G.: Interactions of Divalent-Cations with Phosphatidylserine Bilayer-Membranes. *Biochemistry* **1984**, 23, 34-41.
- [109] Silvius, J. R.; Gagne, J.: Lipid Phase-Behavior and Calcium-Induced Fusion of Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylserine Vesicles - Calorimetric and Fusion Studies. *Biochemistry* **1984**, 23, 3232-3240.
- [110] Garidel, P.; Forster, G.; Richter, W.; Kunst, B. H.; Rapp, G. et al.: 1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphoglycerol (DMPG) Divalent Cation Complexes: An X-Ray Scattering and Freeze-Fracture Electron Microscopy Study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, 2, 4537-4544.
- [111] Brisson, A.; Mosser, G.; Huber, R.: Structure of Soluble and Membrane-Bound Human Annexin-V. *Journal of Molecular Biology* **1991**, 220, 199-203.
- [112] Smith, P. D.; Moss, S. E.: Structural Evolution of the Annexin Supergene Family. *Trends in Genetics* **1994**, 10, 246.
- [113] Crumpton, M. J.; Dedman, J. R.: Protein Terminology Tangle. *Nature* **1990**, 345, 212-212.

- [114] Huber, R.; Berendes, R.; Burger, A.; Schneider, M.; Karshikov, A. et al.: Crystal and Molecular-Structure of Human Annexin-V after Refinement - Implications for Structure, Membrane-Binding and Ion Channel Formation of the Annexin Family of Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1992**, 223, 683-704.
- [115] Pollard, H. B.; Rojas, E.: Ca<sup>2+</sup>-Activated Synexin Forms Highly Selective, Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup>-Channels in Phosphatidylserine Bilayer-Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, 85, 2974-2978.
- [116] Demange, P.; Voges, D.; Benz, J.; Liemann, S.; Gottig, P. et al.: Annexin V: The Key to Understanding Ion Selectivity and Voltage Regulation? *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, 19, 272-276.
- [117] Rojas, E.; Pollard, H.; Haigler, H.; Parra, C.; Burns, A.: Calcium-Activated Endonexin II Forms Calcium Channels across Acidic Phospholipid Bilayer Membranes. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 21207-21215.
- [118] Burger, A.; Voges, D.; Demange, P.; Perez, C. R.; Huber, R. et al.: Structural and Electrophysiological Analysis of Annexin-V Mutants - Mutagenesis of Human Annexin-V, an in-Vitro Voltage-Gated Calcium-Channel, Provides Information About the Structural Features of the Ion Pathway, the Voltage Sensor and the Ion Selectivity Filter. *Journal of Molecular Biology* **1994**, 237, 479-499.
- [119] Karshikov, A.; Berendes, R.; Burger, A.; Cavalie, A.; Lux, H. D. et al.: Annexin-V Membrane Interaction - an Electrostatic Potential Study. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1992**, 20, 337-344.
- [120] Isas, J. M.; Cartailleur, J.-P.; Sokolov, Y.; Patel, D. R.; Langen, R. et al.: Annexins V and XII Insert into Bilayers at Mildly Acidic Ph and Form Ion Channels. *Biochemistry* **2000**, 39, 3015-3022.
- [121] Neumann, E.; Siemens, P. M.; Toensing, K.: Electroporative Fast Pore-Flickering of the Annexin V-Lipid Surface Complex, a Novel Gating Concept for Ion Transport. *Biophysical Chemistry* **2000**, 86, 203-220.
- [122] Gotow, T.; Sakata, M.; Funakoshi, T.; Uchiyama, Y.: Preferential Localization of Annexin V to the Axon Terminal. *Neuroscience* **1996**, 75, 507-521.
- [123] Luckcuck, T.; Trotter, P. J.; Walker, J. H.: Localization of Annexin V in the Adult and Neonatal Heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 238, 622-628.
- [124] Song, G.; Campos, B.; Wagoner, L. E.; Dedman, J. R.; Walsh, R. A.: Altered Cardiac Annexin Mrna and Protein Levels in the Left Ventricle of Patients with End-Stage Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1998**, 30, 443-451.

- [125] Gidon-Jeangirard, C.; Solito, E.; Hofmann, A.; Russo-Marie, F.; Freyssinet, J.-M. et al.: Annexin V Counteracts Apoptosis While Inducing Ca<sup>2+</sup> Influx in Human Lymphocytic T Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 265, 709-715.
- [126] Kourie, J. I.; Wood, H. B.: Biophysical and Molecular Properties of Annexin-Formed Channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2000**, 73, 91-134.
- [127] Gerke, V.; Moss, S. E.: Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 331-371.
- [128] Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R., Skerra, A.: Molecular Interaction between the Strep-Tag Affinity Peptide and Its Cognate Target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 255, 753-766.
- [129] Skerra, A., Schmidt, T. G. M.: Applications of a Peptide Ligand for Streptavidin: The Strep-Tag. *Biomolecular Engineering* **1999**, 16, 79-86.
- [130] Voss, S., Skerra, A.: Mutagenesis of a Flexible Loop in Streptavidin Leads to Higher Affinity for the Strep-Tag II Peptide and Improved Performance in Recombinant Protein Purification. *PROTEIN ENGINEERING* **1997**, 10, 975-982.
- [131] Voet, D., Voet, J. G.: Biochemie; VCH: Weinheim, **1992**.
- [132] Schiller, S. M.; Naumann, R.; Lovejoy, K.; Kunz, H.; Knoll, W.: Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasoother Gold Surfaces. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, 208-211.
- [133] Mitchell, P.: Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *BIOLOGICAL REVIEWS OF THE CAMBRIDGE PHILOSOPHICAL SOCIETY* **1966**, 41, 445.
- [134] Malmstroem, B. G.: Cytochrome c Oxidase as a Redox-Linked Proton Pump. *Chem. Rev* **1990**, 90, 1247-1260.
- [135] Drosou, V.; Reincke, B.; Schneider, M.; Ludwig, B.: Specificity of the Interaction between the Paracoccus Denitrificans Oxidase and Its Substrate Cytochrome c: Comparing the Mitochondrial to the Homologous Bacterial Cytochrome c 552, and Its Truncated and Site-Directed Mutants. *Biochemistry* **2002**, 41, 10629-10634.
- [136] Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Hüttemann, M., Lee, I., Kadenbach, B.: Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation. *ChemBioChem* **2001**, 2, 392-403.
- [137] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa S.: The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8. *Science* **1996**, 272, 1136-1144.

- [138] Michel, H.: Cytochrome c Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping—a Discussion. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15129-15140.
- [139] Richter, O.-M. H., Ludwig, B.: Cytochrome c Oxidase—Structure, Function, and Physiology of a Redox-Driven Molecular Machine. *Reviews of Physiology, Biochemistry* **2003**, *147*, 47-74.
- [140] Lingler, S.: Entwicklung Und Charakterisierung Von Festkörperunterstützten Modellmembranen Zur Rekonstitution Von Valinomycin Und F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. *Uni. Mainz* **1998**.
- [141] Schiller, S.; Hu, J.; Jenkins, A. T. A.; Timmons, R. B.; Sanchez-Estrada, F. S. et al.: Chemical Structure and Properties of Plasma-Polymerized Maleic Anhydride Films. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 235-242.
- [142] Naumann, R., Baumgart, T., Gräber, P., Jonczyk, A., Offenhäusser, A., Knoll, W.: Proton Transport through a Peptide-Tethered Bilayer Lipid Membrane by the H<sup>+</sup>-ATP Synthase from Chloroplasts Measured by Impedance Spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17*, 25-34.
- [143] Baumgart, T.; Kreiter, M.; Lauer, H.; Naumann, R.; Jung, G. et al.: Fusion of Small Unilamellar Vesicles onto Laterally Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiolipectides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *258*, 298-309.
- [144] Folkers, J. P.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Deutch, J.: Phase Behavior of Two-Component Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 563-571.
- [145] Finklea, H. O.: Self-Assembled Monolayers on Electrodes. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester.
- [146] Nishida, N.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W.: Formation and Exchange Processes of Alkanethiol Self-Assembled Monolayer on Au(111) Studied by Thermal Desorption Spectroscopy and Scanning Tunneling Microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers* **1997**, *36*, 2379-2385.
- [147] Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M. et al.: Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 321-335.
- [148] Bumm, L. A.; Arnold, J. J.; Charles, L. F.; Dunbar, T. D.; Allara, D. L. et al.: Directed Self-Assembly to Create Molecular Terraces with Molecularly Sharp Boundaries in Organic Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8017-8021.

- [149] Bunjes, N.; Schmidt, E. K.; Jonczyk, A.; Rippmann, F.; Beyer, D. et al.: Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates. *Langmuir* **1997**, *13*, 6188-6194.
- [150] Ma, C.; Srinivasan, M. P.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Longo, M. L. et al.: Supported Lipid Bilayers Lifted from the Substrate by Layer-by-Layer Polyion Cushions on Self-Assembled Monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *28*, 319-329.
- [151] Ryan, M. E.; Hynes, A. M.; Badyal, J. P. S.: Pulsed Plasma Polymerization of Maleic Anhydride. *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 37-42.
- [152] van Os, M. T.: Surface Modification by Plasma Polymerization: Film Deposition, Tailoring of Surface Properties and Biocompatibility. *Dep. of Chemistry* **2000**.
- [153] Bard, A. J.; Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*; 2nd; John Wiley & Sons, Inc.: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**.
- [154] Greef, R.; Peat, R.; Peter, L. M.; Pletcher, D.; Robinson, J.: *Instrumental Methods in Electrochemistry*; Southampton Electrochemistry Group; Ellis Horwood Limited: Chichester, **1985**.
- [155] Macdonald, J. R. *Impedance Spectroscopy, Emphasizing Solid Materials and Systems*; John Wiley & Sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1987**.
- [156] Wiegand, G. A.-L., N.; Hillebrandt, H.; Sackmann, E.; Wagner, P.: Electrical Properties of Supported Lipid Bilayer Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4245-4250.
- [157] Cassier, T.; Sinner, A.; Offenhauser, A.; Mohwald, H.: Homogeneity, Electrical Resistivity and Lateral Diffusion of Lipid Bilayers Coupled to Polyelectrolyte Multilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *15*, 215-225.
- [158] Benz, R.; Janko, K.: Voltage-Induced Capacitance Relaxation of Lipid Bilayer Membranes Effects of Membrane Composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1976**, *455*, 721-738.
- [159] Lauger, P.; Lesslauer, W.; Marti, E.; Richter, J.: Electrical Properties of Bimolecular Phospholipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1967**, *135*, 20-32.
- [160] Plant, A. L.: Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics. *Langmuir* **1999**, *15*, 5128-5135.

- [161] Terrettaz, S., Mayer, M., Vogel, H.: Highly Electrically Insulating Tethered Lipid Bilayers for Probing the Function of Ion Channel Proteins. *Langmuir* **2003**, *19*, 5567-5569.
- [162] Stelzle, M.; Sackmann, E.: Sensitive Detection of Protein Adsorption to Supported Lipid Bilayers by Frequency-Dependent Capacitance Measurements and Microelectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1989**, *981*, 135-142.
- [163] Knoll, W.: Optical Characterization of Organic Thin-Films and Interfaces with Evanescent Waves. *Mrs Bulletin* **1991**, *16*, 29-39.
- [164] Knoll, W.: Interfaces and Thin Films as Seen by Bound Electromagnetic Waves. *Annual Review of Physical Chemistry* **1998**, *49*, 569-638.
- [165] Otto, A.: Excitation of Nonradiative Surface Plasmon Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection. *Zeitschrift Für Physik* **1968**, *216*, 398-410.
- [166] Kretschm.E: Determination of Optical Constants of Metals by Excitation of Surface Plasmons. *Zeitschrift Fur Physik* **1971**, *241*, 313.
- [167] Kreiter, M.: Oberflächenplasmonen-Artige Resonanz Auf Metallischen Gittern. *Fachbereich Physik* **2000**.
- [168] Scheller, A. *Wasplas*; 2.6 ed.; Max Planck-Institut für Polymerforschung: Mainz.
- [169] Worm, J. *Winspall*; 2.20 ed.; Max Planck-Institut für Polymerforschung: Mainz.
- [170] Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C.: Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, *56*, 930-933.
- [171] Binnig, G.; Gerber, C.; Stoll, E.; Albrecht, T. R.; Quate, C. F.: Atomic Resolution with Atomic Force Microscope. *Europhysics Letters* **1987**, *3*, 1281-1286.
- [172] Ohnesorge, F.; Binnig, G.: True Atomic Resolution by Atomic Force Microscopy through Repulsive and Attractive Forces. *Science* **1993**, *260*, 1451-1456.
- [173] Dufrene, Y. F.; Boland, T.; Schneider, J. W.; Barger, W. R.; Lee, G. U.: Characterization of the Physical Properties of Model Biomembranes at the Nanometer Scale with the Atomic Force Microscope. *Faraday Discussions* **1998**, 79-94.
- [174] Schneider, J.; Barger, W.; Lee, G. U.: Nanometer Scale Surface Properties of Supported Lipid Bilayers Measured with Hydrophobic and Hydrophilic Atomic Force Microscope Probes. *Langmuir* **2003**, *19*, 1899-1907.

- [175] Kokkoli, E.; Zukoski, C. F.: Interaction Forces between Hydrophobic and Hydrophilic Self-Assembled Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *230*, 176-180.
- [176] Nanoscience Instruments, I.: <http://www.nanoscience.com/index.html>, 2003.
- [177] Levi, S. A.; Guatteri, P.; van Veggel, F.; Vancso, G. J.; Dalcanale, E. et al.: Direct Observation of Surface-Controlled Self-Assembly of Coordination Cages by Using AFM as a Molecular Ruler. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 1892-1896.
- [178] Axelrod, D.; Koppel, D.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W.: Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys. J.* **1976**, *16*, 1055-1069.
- [179] Butt, H.-J.; Graf, K.; Kappl, M.: *Physics and Chemistry of Interfaces*; Wiley-VCH, **2003**.
- [180] Schlenoff, J. B.; Li, M.; Ly, H.: Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 12528-12536.
- [181] Friggeri, A.; Schonherr, H.; van Manen, H. J.; Huisman, B. H.; Vancso, G. J. et al.: Insertion of Individual Dendrimer Molecules into Self-Assembled Monolayers on Gold: A Mechanistic Study. *Langmuir* **2000**, *16*, 7757-7763.
- [182] Friggeri, A.; van Manen, H. J.; Auletta, T.; Li, X. M.; Zapotoczny, S. et al.: Chemistry on Surface-Confined Molecules: An Approach to Anchor Isolated Functional Units to Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6388-6395.
- [183] van Manen, H. J.; Auletta, T.; Dordi, B.; Schonherr, H.; Vancso, G. J. et al.: Non-Covalent Chemistry on Surface-Confined, Isolated Dendrimers. *Advanced Functional Materials* **2002**, *12*, 811-818.
- [184] Huisman, B. H.; Schonherr, H.; Huck, W. T. S.; Friggeri, A.; van Manen, H. J. et al.: Surface-Confined Metallodendrimers: Isolated Nanosize Molecules. *Angewandte Chemie-International Edition* **1999**, *38*, 2248-2251.
- [185] Folkers, J. P., Laibinis, P. E., Whitesides, G. M., Deutch, J.: Phase Behavior of Two-Component Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 563-571.
- [186] Folkers, J. P.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.: Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold - the Adsorption and Wetting Properties of Monolayers Derived from 2 Components with Alkane Chains of Different Lengths. *Journal of Adhesion Science and Technology* **1992**, *6*, 1397-1410.

- [187] Folkers, J. P.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.: Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold - Comparisons of Monolayers Containing Mixtures of Short-Chain and Long-Chain Constituents with CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>OH Terminal Groups. *Langmuir* **1992**, *8*, 1330-1341.
- [188] Brewer, N. J.; Leggett, G. J.: Chemical Force Microscopy of Mixed Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold: Evidence for Phase Separation. *Langmuir* **2004**, *20*, 4109-4115.
- [189] Hobara, D.; Ota, M.; Imabayashi, S.; Niki, K.; Kakiuchi, T.: Phase Separation of Binary Self-Assembled Thiol Monolayers Composed of 1-Hexadecanethiol and 3-Mercaptopropionic Acid on Au(111) Studied by Scanning Tunneling Microscopy and Cyclic Voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, *444*, 113-119.
- [190] Folkers, J. P.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Deutch, J.: Phase-Behavior of 2-Component Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 563-571.
- [191] Bumm, L. A., Arnold, J. J., Charles, L. F., Dunbar, T. D., Allara, D. L., Weiss, P. S.: Directed Self-Assembly to Create Molecular Terraces with Molecularly Sharp Boundaries in Organic Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8017-8021.
- [192] Lewis, P. A.; Donhauser, Z. J.; Mantoosh, B. A.; Smith, R. K.; Bumm, L. A. et al.: Control and Placement of Molecules Via Self-Assembly. *Nanotechnology* **2001**, *12*, 231-237.
- [193] Lavrich, D. J.; Wetterer, S. M.; Bernasek, S. L.; Scoles, G.: Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au(111). *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 3456-3465.
- [194] Lang, H. D., Claus; Vogel, Horst: A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir* **1994**, *10*, 197-210.
- [195] Boxer, S. G.: Molecular Transport and Organization in Supported Lipid Membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 704-709.
- [196] Keller, C. A.; Kasemo, B.: Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophysical Journal* **1998**, *75*, 1397-1402.
- [197] Salafsky, J.; Groves, J. T.; Boxer, S. G.: Architecture and Function of Membrane Proteins in Planar Supported Bilayers: A Study with Photosynthetic Reaction Centers. *Biochemistry* **1996**, *35*, 14773-14781.
- [198] Raedler, J., Strey, H., Sackmann, E.: Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces. *Langmuir* **1995**, *11*, 4539-4548.



- [199] Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K.: Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, 1103, 307-316.
- [200] Sui, S. F.; Urumow, T.; Sackmann, E.: Interaction of Insulin-Receptors with Lipid Bilayers and Specific and Nonspecific-Binding of Insulin to Supported Membranes. *Biochemistry* **1988**, 27, 7463-7469.
- [201] Stelzle, M., Weissmueller, G., Sackmann, E.: On the Application of Supported Bilayers as Receptive Layers for Biosensors with Electrical Detection. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 2974-2981.
- [202] Plant, A. L.: Self-Assembled Phospholipid Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **1993**, 9, 2764-2767.
- [203] Hubbard, J. B.; Silin, V.; Plant, A. L.: Self Assembly Driven by Hydrophobic Interactions at Alkanethiol Monolayers: Mechanism of Formation of Hybrid Bilayer Membranes. *Biophysical Chemistry* **1998**, 75, 163-176.
- [204] Plant, A. L.; Brighamburke, M.; Petrella, E. C.; Oshannessy, D. J.: Phospholipid Alkanethiol Bilayers for Cell-Surface Receptor Studies by Surface-Plasmon Resonance. *Analytical Biochemistry* **1995**, 226, 342-348.
- [205] Williams, L. M.; Evans, S. D.; Flynn, T. M.; Marsh, A.; Knowles, P. F. et al.: Kinetics of the Unrolling of Small Unilamellar Phospholipid Vesicles onto Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1997**, 13, 751-757.
- [206] Hopfer, U.; Lehninger, L.; Lennarz, W. J.: Effect of Polar Moiety of Lipids on Ion Permeability of Bilayer Membranes. *JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY.* **1970**, 2, 41-46.
- [207] Clowes, A. W., Cherry, R. J., Chapman, D.: Physical Properties of Lecithin-Cerebroside Bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1971**, 249, 301-317.
- [208] Silvius, J. R.; Gagne, J.: Calcium-Induced Fusion and Lateral Phase Separations in Phosphatidylcholine-Phosphatidylserine Vesicles - Correlation by Calorimetric and Fusion Measurements. *Biochemistry* **1984**, 23, 3241-3247.
- [209] Silvius, J. R.; Gagne, J.: Calcium Effects on Lipid Lateral Distribution and Fusion in Mixtures of Synthetic Phosphatidylserines, Phosphatidylcholines and Phosphatidylethanolamines. *Biophysical Journal* **1984**, 45, A169-A169.
- [210] Wilschut, J.; Hoekstra, D.: Membrane-Fusion - from Liposomes to Biological-Membranes. *Trends in Biochemical Sciences* **1984**, 9, 479-483.
- [211] Puu, G.; Gustafson, I.: Planar Lipid Bilayers on Solid Supports from Liposomes - Factors of Importance for Kinetics and Stability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1997**, 1327, 149-161.

- [212] Morillo, M.; Sagrista, M. L.; de Madariaga, M. A.: N-Stearoyl-Phosphatidylserine: Synthesis and Role in Divalent-Cation-Induced Aggregation and Fusion. *Lipids* **1998**, *33*, 607-616.
- [213] Leckband, D. E.; Helm, C. A.; Israelachvili, J.: Role of Calcium in the Adhesion and Fusion of Bilayers. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1127-1140.
- [214] Leckband, D. E.; Helm, C. A.; Israelachvili, J.: Role of Calcium in the Adhesion and Fusion of Bilayers (Vol 32, Pg 1127, 1993). *Biochemistry* **1993**, *32*, 4974-4974.
- [215] Ross, M.; Steinem, C.; Galla, H. J.; Janshoff, A.: Visualization of Chemical and Physical Properties of Calcium-Induced Domains in Dppc/Dpps Langmuir-Blodgett Layers. *Langmuir* **2001**, *17*, 2437-2445.
- [216] Reviakine, I.; Simon, A.; Brisson, A.: Effect of Ca<sup>2+</sup> on the Morphology of Mixed DPPC-DOPS Supported Phospholipid Bilayers. *Langmuir* **2000**, *16*, 1473-1477.
- [217] Jenkins, A. T. A.; Bushby, R. J.; Evans, S. D.; Knoll, W.; Offenhausser, A. et al.: Lipid Vesicle Fusion on Mu Cp Patterned Self-Assembled Monolayers: Effect of Pattern Geometry on Bilayer Formation. *Langmuir* **2002**, *18*, 3176-3180.
- [218] Schmidt, T. G. M.; Koepke, J.; Frank, R.; Skerra, A.: Molecular Interaction between the Strep-Tag Affinity Peptide and Its Cognate Target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *255*, 753-766.
- [219] Neumann, T.: Strategies for Detecting DNA Hybridisations Using Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *Fachbereich Chemie und Pharmazie* **2001**.
- [220] Neumann, E.; Toensing, K.; Siemens, P. M.: Electroporative Flicker Gating of H-Annexin V/Lipid Bilayer Complex - a Novel Concept for Ion Transport Control. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 351A-351A.
- [221] Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R.: Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [222] Neumann, E.; Siemens, P. M.; Toensing, K.: Electroporative Fast Pore-Flickering of the Annexin V-Lipid Surface Complex, a Novel Gating Concept for Ion Transport\*1. *Biophysical Chemistry* **2000**, *86*, 203-220.
- [223] Isas, J. M. C., J.-P.; Sokolov, Y.; Patel, D. R.; Langen, R.; Luecke, H.; Hall, J. E.; Haigler, H. T.: Annexins V and XII Insert into Bilayers at Mildly Acidic Ph and Form Ion Channels. *Biochemistry* **2000**, *39*, 3015-3022.
- [224] Pollard, H. B.; Rojas, E.: Ca<sup>2+</sup>-Activated Synexin Forms Highly Selective, Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels in Phosphatidylserine Bilayer-Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 2974-2978.

- [225] Campbell, N. A., Reece, J. B.: *Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **1997**.
- [226] Ke, P. C., Naumann, C. A.: Hindered Diffusion in Polymer-Tethered Phospholipid Monolayers at the Air-Water Interface: A Single Molecule Fluorescence Imaging Study. *Langmuir* **2001**, *17*, 5076-5081.
- [227] Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A.: Electrostatic Study of the Proton Pumping Mechanism in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1858-1871.
- [228] Tortonese, M.; Kirk, M.: *SPIE proceedings* **1997**, *3009*, 53-60.
- [229] Baumgart, T.: Preparation and Physicochemical Characterisation of Planar Supported Lipid Model Membrane Systems. *Fachbereich Chemie und Pharmazie* **2001**.
- [230] Roberts, C.; Chen, C. S.; Mrksich, M.; Martichonok, V.; Ingber, D. E. et al.: Using Mixed Self-Assembled Monolayers Presenting RGD and (EG)(3)OH Groups to Characterize Long-Term Attachment of Bovine Capillary Endothelial Cells to Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 6548-6555.
- [231] Chapman, R. G.; Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M.: Preparation of Mixed Self-Assembled Monolayers (Sams) That Resist Adsorption of Proteins Using the Reaction of Amines with a SAM That Presents Interchain Carboxylic Anhydride Groups. *Langmuir* **2000**, *16*, 6927-6936.
- [232] Ostuni, E.; Grzybowski, B. A.; Mrksich, M.; Roberts, C. S.; Whitesides, G. M.: Adsorption of Proteins to Hydrophobic Sites on Mixed Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2003**, *19*, 1861-1872.
- [233] Römpp Online; Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, **2004**.
- [234] Inagaki, N.: *Plasma Surface Modification and Plasma Polymerization*; Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA, **1996**.
- [235] Yasuda, H.: *Plasma Polymerization*; Academic Press inc.: Orlando, FL, **1985**.
- [236] Yasuda, H.; Wang, C. R.: Plasma Polymerization Investigated by the Substrate-Temperature Dependence. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1985**, *23*, 87-106.
- [237] Savage, C. R., Timmons, R. B., Lin, J. W.,: Molecular Control of Surface Film Compositions Via Pulsed Radio-Frequency Plasma Deposition of Perfluoropropylene Oxide. *Chem. Mater.* **1991**, *3*, 575-577.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die mich während meines Studiums und meiner Zeit als Doktorandin tatkräftig unterstützten und so zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Knoll für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und seinem Interesse an diesem Forschungsgebiet. Die besondere Wertschätzung gilt seiner motivierenden Art, seinen wertvollen Ideen, Ratschlägen und Diskussionen. Danken möchte ich ihm auch für die Möglichkeit, einen Teil meiner Arbeit am Department of Chemical Engineering, Stanford University, USA durchzuführen und somit nicht nur auf fachlicher Ebene sondern auch auf persönlicher Ebene meinen Erfahrungsschatz auszubauen.
- Meiner Projektleiterin Frau Dr. Renate Naumann für die Betreuung dieser Arbeit, den vielen konstruktiven Diskussionen und Ideen, dem immensen Erfahrungsschatz und dem grenzenlosen Einsatz auf dem Forschungsgebiet der Lipidmodellmembranen, sowie dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für die täglichen und nicht allzu täglichen Probleme hat. Des Weiteren danke ich ihr für die Durchsicht der Arbeit und den zahlreichen Verbesserungsvorschlägen.
- Frau Dr. Renate Förch für die Mitbetreuung des Plasmapolymersprojekts und der Durchsicht der auf dieses Projekt bezogenen Abschnitte dieser Arbeit. Recht herzlichen Dank auch für die unkomplizierte Vermittlung einer Wohnung in Köln (das „Kölner Klüngel“ lässt herzlich grüßen).
- Herrn Dr. Toby Jenkins für die vielen hilfreichen Diskussionen zur Impedanzspektroskopie (EIS) und zu den Lipidmodellmembranen, sowie für die Anregung zur Übernahme des Plasmapolymersprojektes. Auch danke ich Toby für die unvergesslichen Englischlektionen während einigen Pub- und Kneipenbesuchen in

Mainz und Bath sowie für die unvergessenen Wandertouren (z. B. durch dichten Nebel und strömenden Regen).

- Herrn Dr. Stuart Fraser für die Mithilfe bei der Präparation des MAH-PP Filme und der Wartung des Plasmareaktors.
- Herrn Dr. Holger Schönherr für die Übernahme der AFM-Messungen, der steten Bereitwilligkeit, die Ergebnisse zu diskutieren und für sein enormes Engagement und Interesse in Bezug auf das sBLM-Projekt und der Durchsicht der projektbezogenen Abschnitte dieser Arbeit. Ein Kooperationspartner wie aus dem Bilderbuch!
- Herrn Dr. Bernd Grohe für viele wichtige AFM-Voruntersuchungen und für die Diskussion dieser Ergebnisse. Vielleicht rauchen wir ja mal wieder eine selbst gedrehte Zigarette von dir...diesmal in Kanada!
- Herrn Dr. Ingo Köper für die Durchführung der FRAP-Messungen.
- Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Annexine und der Bereitstellung der Annexin V- und der Streptavidin-Mutanten.
- Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Bereitstellung der solubilisierten Cytochrom-c-Oxidase.
- Herrn Dipl. Ing. Andreas Scheller für den Kampf gegen Computerviren, -würmer und -bugs und der ständigen Aufdeckung und Entwicklung wirksamer Antibiotika zu diesem Zweck. Besonderen Dank auch für die überaus effektive Ambulanz bzw. Notaufnahme zur Behebung aller EDV-bezogener Probleme. Der 24-Stunden-Service hat auch über den großen Teich hinweg bestens funktioniert.
- Herrn Stefan Schiller für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen zum Aufbau der Plasmopolymer unterstützten Modellmembranen.
- Herrn Prof. Dr. Curtis W. Frank für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis am Dept. of Chemical Eng., Stanford University, USA.
- Frau Prof. Dr. Silvia Mittler für Ihren Beistand besonders in den kritischen Lebensphasen, für ihrer Herzlichkeit und Unkompliziertheit.
- Den Mitarbeitern der elektronischen und feinmechanischen Werkstatt sowie der Haustechnik für die schnellen Hilfeleistungen, Reparaturen und speziellen Anfertigungen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dipl. Ing. Natalie Horn, Herrn Dr. Marco Stemmler und Herrn Dipl. Ing. Bernhard Menges für die schnelle und gründliche Durchsicht der Arbeit.

Des Weiteren sei all denen gedankt, die meine Zeit am Max Planck-Institut für Polymerforschung für mich so unvergesslich gemacht haben. Die Herzlichkeit, mit der gelacht wurde, die vielen Späße und humorvollen, manchmal auch ernsthaften oder aufklärenden Gespräche (nicht zuletzt auch zum Abbau von Vorurteilen) und die „pharmazeutische Betreuung“ der Kaffee-Ecke werden mir immer in positiver Erinnerung bleiben. Ein großes Dankeschön geht auch an meine Bürokollegen und –kolleginnen, die mit viel Humor meinen Arbeitsalltag bereichert haben. Besonders hervorheben möchte ich hier Herrn Dr. Joey Robertson für die hilfreichen Diskussionen über die EIS.

All denen möchte ich danken, die mir mit viel Toleranz und Mitgefühl während des Abschiednehmens von meinem geliebten Vater beistanden und es mir ermöglichten, ihn auf seinem letzten Weg zu begleiten.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung danken und Judith für ihr offenes Ohr und seelischen Beistand.





