

**Modellierung der Oberflächenreaktionen von  
Vesikeln und Proteinen mit Hilfe  
dynamischer Monte Carlo-Simulationen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“**

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

vorgelegt von  
Eike Lüthgens  
geboren in Pinneberg

Mainz, 2005



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>5</b>
2.1	Kinetik der RSA .....	6
2.2	Kinetik der RSA unter Transportbedingungen.....	11
2.3	Berechnung kinetischer Konstanten .....	15
2.3.1	Berechnung der Adsorptionskonstante .....	15
2.3.2	Berechnung der Transportrate .....	16
2.4	Monte Carlo-Algorithmen von Oberflächenreaktionen.....	19
2.4.1	Methode der „zufälligen Wahl“ .....	20
2.4.2	Methode der „ersten Reaktion“ .....	22
<b>3</b>	<b>Formulierung des Modells.....</b>	<b>25</b>
3.1	Zielsetzung .....	26
3.2	Algorithmusbeschreibung .....	29
3.2.1	Desorption von Partikeln .....	31
3.2.2	Spreiten von Liposomen.....	31
3.2.3	Heterogene Oberflächen.....	32
3.2.4	Variation des Partikelradius .....	33
3.2.5	Algorithmus .....	33
3.3	Test des Algorithmus.....	36
3.3.1	Test der Belegung.....	36
3.3.2	Test der Kinetik.....	40
<b>4</b>	<b>Messmethoden.....</b>	<b>43</b>
4.1	Quarzmikrowaage-Technik.....	44
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften .....	44
4.1.2	Elektronische Modellierung.....	45
4.1.3	Elektronisches Verhalten nach Beladung der QCM.....	50
4.1.4	Messaufbauten und Messgrößen der QCM .....	52
4.2	Rasterkraftmikroskopie .....	55
4.3	Impedanzspektroskopie .....	57
<b>5</b>	<b>Präparative Methoden und Probensysteme.....</b>	<b>61</b>
5.1	Präparative Methoden .....	62
5.1.1	Vorbereitung der Schwingquarze .....	62

5.1.2	Präparation der <i>self-assembly</i> -Schichten.....	62
5.1.3	Präparation unilamellarer Vesikel .....	63
5.2	Probensysteme.....	64
5.2.1	Übersicht der verwendeten Phospholipide .....	64
5.2.2	Latex Beads (Polymer-Kolloide) auf funktionalisierter Goldoberfläche .....	66
5.2.3	Unilamellare Phospholipidvesikel auf funktionalisierter Goldoberfläche .....	66
5.2.4	Biotindotierte unilamellare Vesikel auf einer Avidinschicht.....	67
5.2.5	Membran-Membran Wechselwirkung vermittelt durch Annexin A1 .....	68
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>69</b>
6.1	Adsorption von Latex Beads .....	70
6.2	Einfluss der Simulationsparameter .....	75
6.3	Adsorption von elektrisch geladenen unilamellaren Vesikeln .....	81
6.3.1	Experimentelle Phänomene bei Adsorption von Vesikeln.....	81
6.3.2	Adsorption von Phospholipidvesikeln.....	86
6.4	Adsorption von unilamellaren biotindotierten Vesikeln .....	98
6.4.1	Interpretation der QCM-Daten .....	99
6.4.2	Bestimmung der kinetischen Konstanten .....	100
6.5	Annexin A1 vermittelte Adsorption von Liposomen an Lipiddoppelschichten .....	103
6.5.1	Einfluss der Annexinbelegung .....	105
6.5.2	Einfluss der Elektrostatik.....	106
6.5.3	Interpretation der QCM-Daten und der Monte Carlo-Simulationen.....	108
6.6	Signifikanz der kinetischen Konstanten.....	110
<b>7</b>	<b>Fluktuationsspektroskopie: mögliche Sensorapplikationen .....</b>	<b>113</b>
7.1	Theoretische Grundlagen der Fluktuationsspektroskopie am Beispiel einer einfachen reversiblen Reaktion.....	115
7.2	Anwendung der Fluktuationsspektroskopie auf Oberflächenreaktionen .....	118
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
10.1	Benutzeroberflächen der erstellten Delphi-Programme.....	144
10.1.1	VESAD .....	144
10.1.2	DaPro .....	145
10.1.3	Voronoi-Calculator.....	146
10.1.4	DiCa und AB-Fluc .....	147

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 2.1:</b>	Teilbereich einer Oberfläche, die mit mehreren Scheiben des Durchmessers $d$ belegt ist.	7
<b>Abb. 2.2:</b>	A Vergleich verschiedener ASF mit Daten aus MC-Simulationen bei irreversibler Adsorption. B Vergleich der Langmuir-Kinetik mit Gl. (2.10) und Daten einer simulierten Adsorptionsisotherme bei reversibler Adsorption.	10
<b>Abb. 2.3:</b>	A Angenommener Potentialverlauf für die Berechnung reversibler Adsorption unter Transportbedingungen nach Adamczyk (Adamczyk 2000). B Das Flächendiagramm zeigt verschiedene Regionen von attraktiven und repulsiven Kräften als Funktion des dimensionslosen Produkts $\kappa l$ und der Ladungsdichten $\sigma_1/\sigma_2$ von sich annähernden Oberflächen.	12
<b>Abb. 2.4:</b>	A Geometrie der Staupunktströmung mit den für die Betrachtung relevanten Größen. B Stromlinien eines Fluids in Staupunktgeometrie für $h/R = 1.6$ für verschiedene Reynoldszahlen $Re$ nach Adamczyk (Adamczyk <i>et al.</i> 2001).	17
<b>Abb. 3.1:</b>	Darstellung verschiedener Grenzflächenprozesse mit Benennung entsprechender kinetischer Konstanten.	27
<b>Abb. 3.2:</b>	Teilausschnitte der Simulationsfläche in Folge der Aktivierung verschiedener Optionen zur Steuerung der Oberflächenprozesse.	28
<b>Abb. 3.3:</b>	Flussdiagramm des Simulationsprogramms „VESAD“.	34
<b>Abb. 3.4:</b>	A Belegung als Funktion der Zeit in willkürlichen Einheiten in halblogarithmischer Auftragung. B Typischer Verlauf der Paarkorrelationsfunktion für das Modell der zweidimensionalen irreversiblen RSA in der Nähe des <i>jamming limits</i> .	37
<b>Abb. 3.5:</b>	Voronoi-Diagramm eines Ausschnitts der Simulationsfläche bei hoher Belegung nahe des <i>jamming limits</i> .	39
<b>Abb. 3.6:</b>	Belegungsgrad aufgetragen gegen die Zeit für verschiedene Adsorptionsmodelle.	40
<b>Abb. 4.1:</b>	A Ersatzschaltbild des beidseitig akustisch offenen Schwingquarzes. B Ersatzschaltbild bei einseitiger Beladung des Quarzes, welches sich aus A ergibt, wenn ein akustischer Port kurzgeschlossen wird, nach Mason (Mason 1958).	46
<b>Abb. 4.2:</b>	Ersatzschaltbild der Quarzmikrowaage mit Beladung in der Nähe der Resonanz und nebenstehend das BVD-Ersatzschaltbild, welches zur Beschreibung unbelasteter Quarze in der Elektrotechnik dient.	48
<b>Abb. 4.3:</b>	Messaufbau zur Durchführung von Quarzmikrowaage-Messungen.	53
<b>Abb. 4.4:</b>	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Raserkraftmikroskops in der Betriebsart <i>intermittent-contact-mode</i> .	55

<b>Abb. 5.1:</b>	Schematische Darstellung der untersuchten Probensysteme	<b>67</b>
<b>Abb. 6.1:</b>	Simulierter zeitlicher Verlauf der Belegung bei Berücksichtigung des Corona Effektes.	<b>70</b>
<b>Abb. 6.2:</b>	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von positiv geladenen Latex Beads auf einer Glimmeroberfläche bei verschiedenen Ionenstärken (Semmler <i>et al.</i> 1998).	<b>71</b>
<b>Abb. 6.3:</b>	A Quarzmikrowaagemessungen der Adsorption von Latex Beads ( $d = 500$ nm) an einer mit AUT funktionalisierten Goldoberfläche aufgenommen mit einem Netzwerkanalysator. B Frequenzverschiebungen bei unterschiedlichen Transportraten nach Gl. (2.27) und dazugehörige Simulationen.	<b>72</b>
<b>Abb. 6.4:</b>	Einfluss der kinetischen Konstanten $k_{on}$ und $k_{tr}$ auf den zeitlichen Verlauf der Frequenzverschiebung. A Variation der Transportrate bei fester Adsorptionsrate $k_{on} = 5 \cdot 10^{-7}$ m/s. B Variation der Adsorptionsrate bei fester Transportrate $k_{tr} = 5 \cdot 10^{-7}$ m/s.	<b>75</b>
<b>Abb. 6.5:</b>	Einfluss des Vesikelspreitprozesses auf den zeitlichen Verlauf der Adsorptionsisotherme. A Belegung durch Vesikel (○) und Lipiddoppelschicht (■) aufgetragen gegen die Zeit für $k_{rup} = 10^{-4}$ s <sup>-1</sup> . B Resultierende Frequenzverschiebung.	<b>76</b>
<b>Abb. 6.6:</b>	Einfluss der Polydispersität der Partikel auf die Belegung. A Belegung gegen die Zeit für Partikel mit mittlerem Durchmesser $d = 100$ nm und verschiedenen Standardabweichungen $\sigma$ . B Größenverteilung der Partikel auf der Oberfläche am Ende der in A gezeigten Simulationen.	<b>78</b>
<b>Abb. 6.7:</b>	Impedanzspektrum einer MPA <i>self-assembly</i> -Schicht (●) auf einer Goldoberfläche in doppelt logarithmischer Auftragung und nach Zugabe von DDAB/DPPC = 9:1 Vesikeln (●).	<b>82</b>
<b>Abb. 6.8:</b>	Quarzmikrowaagemessung der Adsorption von DDAB/DPPC-Vesikeln ( $d = 100$ nm) an einer mit MPA funktionalisierten Goldoberfläche.	<b>83</b>
<b>Abb. 6.9:</b>	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht eines DDAB/DPPC = 9:1 Gemisches auf einer MPA <i>self-assembly</i> -Oberfläche im <i>intermittent-contact-mode</i> .	<b>85</b>
<b>Abb. 6.10:</b>	Ergebnisse der QCM-Messungen von Faiß und Mitarbeitern (Faiß <i>et al.</i> 2004). A Durchschnittliche Frequenzverschiebung gegen den molaren Anteil $\chi_{POPG}$ nach Anbindung von POPC/POPG-Vesikeln, B Durchschnittliche Änderung des Widerstandes. C Durchschnittlich Frequenzverschiebung gegen den molaren Anteil $\chi_{DPPG}$ nach Anbindung von DPPC/DPPG-Vesikeln. D Durchschnittliche Änderung des Widerstandes.	<b>87</b>
<b>Abb. 6.11:</b>	A Formen von adsorbierten Vesikel in zweidimensionaler Darstellung für verschiedene reduzierte dimensionslose Potentiale $w = 2, 2.9, 4.1, 6.4, 10.2$ nach Seifert (Seifert und Lipowsky 1990). B Dimensionsloses Kontaktpotential $w$ für den Fall starker Adhäsion als Funktion des Vesikelradius $a$ in halblogarithmischer Darstellung.	<b>89</b>
<b>Abb. 6.13:</b>	Komplexer Schermodul $G^*$ als Funktion der Höhe $h$ der Vesikelschicht.	<b>91</b>

- Abb. 6.14:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von DPPC/DPPG = 9:1 Vesikeln mit Durchmesser 100 nm. **93**
- Abb. 6.15:** QCM-Messungen nach Zugabe von Vesikeln mit der molaren Zusammensetzung POPC/POPG = 9:1 (A) und POPC/POPG = 3:7 (B). **94**
- Abb. 6.16:** Adsorptions- und Transportraten in halblogarithmischer Auftragung ermittelt durch Anpassung von Simulationen an QCM-Messungen nach Adsorption von POPC/POPG-, bzw. DPPC/DPPG-Vesikeln mit variierendem PG-Gehalt. A Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  gegen  $\chi_{\text{POPG}}$ . B Massentransport  $k_{\text{tr}}$  gegen  $\chi_{\text{POPG}}$ . C Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  gegen  $\chi_{\text{DPPG}}$ . D Transportrate  $k_{\text{tr}}$  gegen  $\chi_{\text{DPPG}}$ . **95**
- Abb. 6.17:** Abhängigkeit des Massentransports von dem Durchmesser des Vesikels. **96**
- Abb. 6.18:** Frequenzverschiebung nach Adsorption von DPPC/Biotin-X-DOPE, bzw. POPC/Biotin-X-DOPE gegen den molaren Anteil des biotinylierten Lipids (aus (Janke 2004)). **98**
- Abb. 6.19:** AFM-Messungen nach Adsorption von DPPC/Biotin-X-DHPE auf einer mit Streptavidin bedeckten Glimmeroberfläche bei unterschiedlichen molaren Anteilen von Biotin-X-DHPE: A 10 mol%, B 20 mol% und C 30 mol%. In der unteren Reihe sind die Höhenprofile einzelner Vesikel bei entsprechenden Biotingehalten abgebildet. **99**
- Abb. 6.20:** Frequenzverschiebungen aufgenommen mit der Quarzmikrowaage (●) nach Zugabe von DPPC/Biotin-X-DOPE-Vesikeln mit unterschiedlichem molarem Anteil an Biotin-X-DOPE und die dazugehörigen simulierten Daten (—). Die Einsätze zeigen die Oberflächenverteilung der Vesikel auf einer 50·50  $\mu\text{m}^2$  Simulationsfläche am Ende der Simulation. **100**
- Abb. 6.21:** Frequenzverschiebung aufgenommen mit der Quarzmikrowaage (●) nach Zugabe von POPC/Biotin-X-DOPE-Vesikeln mit  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.05$  und die zugehörige Simulation. **101**
- Abb. 6.22:** D-QCM Messungen der Adsorption von Annexin A1 an eine festkörpergestützte POPC/POPS = 4:1 Lipiddoppelschicht mit nachfolgender Anbindung von Vesikeln mit einem Durchmesser von 120 nm. A Frequenzverschiebung nach Zugabe von 0.3  $\mu\text{M}$  Annexin (Anx). B Zugehörige Dissipationsänderung. **104**
- Abb. 6.23:** A Zeitlicher Verlauf der Frequenzverschiebung nach Zugabe von POPC/POPS = 4:1 Vesikeln zu einer POPC/POPS = 4:1 Lipiddoppelschicht, zu der zuvor (a) 0  $\mu\text{M}$ , (b) 0.045  $\mu\text{M}$  bzw. (c) 0.3  $\mu\text{M}$  Annexin A1 zugegeben wurde.. B Verläufe der zugehörigen Dissipationsänderungen. **105**
- Abb. 6.24:** Zeitlicher Verlauf der Frequenzverschiebung nach Zugabe von POPC/POPS = 4:1 Vesikeln bei verschiedenen Ionenstärken. **107**
- Einfluss der Abweichung der kinetischen Konstanten von ihrem optimalen Wert. A Variation der Transportrate für die Adsorption von POPC/POPG = 9:1 Vesikeln auf AUT aus Abb. 6.15. B Variation der Adsorptionsrate der Simulation nach Abb. 6.22A.. **110**
- Abb. 7.1:** Prinzip der Fluktuationsspektroskopie. **116**

<b>Abb. 7.2:</b>	A Simulation des zeitlichen Verlaufs der Belegung für verschiedene Transportraten. B Spektraldichte der Fluktuation in der Belegung ohne Berücksichtigung des Transports bei gleichen kinetischen Konstanten.	<b>119</b>
<b>Abb. 7.3:</b>	A Teilausschnitt einer Fläche, die in Teilflächen mit Kantenlänge 1 $\mu\text{m}$ gegliedert ist. Das Auszählen der Partikel pro Untereinheit ergibt das Histogramm in B.	<b>121</b>
<b>Abb. 7.4:</b>	Mittlere quadratische Schwankung der Belegung als Funktion der Belegung.	<b>122</b>
<b>Abb. 7.5:</b>	Intrinsische Zeitkonstante $\tau$ als Funktion der Gleichgewichtsbelegung $\langle \Theta \rangle$ .	<b>124</b>
<b>Abb. 7.6:</b>	Spektraldichten von Fluktuationen in der Belegung mit (graue Punkte) und ohne Rauschuntergrund (schwarze Punkte).	<b>126</b>
<b>Abb. 7.7:</b>	Halblogarithmische Darstellung eines Langzeitfluktuationsspektrums (2) eines „kalten“ Systems, welches durch eine Belegung jenseits des <i>jamming limits</i> (gegeben durch Kurve (3)) charakterisiert ist.	<b>127</b>
<b>Abb. 10.1:</b>	GUI des Simulationsprogramms „VESAD“.	<b>144</b>
<b>Abb. 10.2:</b>	GUI des Programms „DaPro“.	<b>145</b>
<b>Abb. 10.3:</b>	GUI des Programms „Voronoi-Calculator“.	<b>146</b>
<b>Abb. 10.4:</b>	GUI der Programme „AB-Fluc“ (A) und „Dica“ (B).	<b>147</b>

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 3.1:</b>	Anfangssteigung der Adsorptionskinetik in Abhängigkeit des Modells und der Simulationsparameter.	<b>41</b>
<b>Tab. 5.1:</b>	Übersicht der verwendeten Phospholipide, Strukturformeln und physikalischen Eigenschaften (Avanti Polar Lipids, Lipidat).	<b>64</b>
<b>Tab. 6.1:</b>	Zusammenfassung der kinetischen Konstanten aus der Anpassung von MC-Simulationen an die Adsorptionskinetiken von Latex Beads bei verschiedenen Pumpraten und Teilchendichten und Vergleich mit theoretischen Werten.	<b>73</b>
<b>Tab. 6.2:</b>	Parameter der in Abb. 6.24 dargestellten simulierten Kurven in Abhängigkeit von der berechneten Ionenstärke, bzw. der NaCl-Konzentration.	<b>108</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AFM</b>	Rasterkraftmikroskop/ Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscope / microscopy)
<b>ASF</b>	Funktion der zur Verfügung stehenden Oberfläche (engl.: available surface function)
<b>B-X-DOPE</b>	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-N-(cap-biotinoyl-phosphoethanolamin)
<b>DDAB</b>	Dimethyldioctadecylammonium (Bromid-Salz)
<b>DGL</b>	Differentialgleichung
<b>DPPC</b>	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<b>DPPG</b>	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELL</b>	Ellipsometrie (engl.: ellipsometry)
<b>FRM</b>	Methode der ersten Reaktion (engl.: first reaction method)
<b>IS</b>	Impedanzspektroskopie (engl.: impedance spectroscopy)
<b>KMCM</b>	Kinetische Monte Carlo Methode (engl.: kinetic monte carlo method)
<b>MC</b>	Monte Carlo
<b>PLM</b>	Parklückenmodell (engl.: parking lot model)
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<b>POPG</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]
<b>POPS</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-l-serin]
<b>PS</b>	Spezielles anziehendes Potential, s Fußnote S. 18 (engl.: perfect sink)
<b>QCM</b>	Quarzmikrowaage (engl.: quartz crystal microbalance)
<b>RIFS</b>	Reflexionsinterferenzspektroskopie (engl.: reflection interference spectroscopy)
<b>RSA</b>	Zufällige sequentielle Adsorption (engl.: random sequential adsorption)
<b>RSM</b>	Methode der zufälligen Wahl (engl.: random selection method)
<b>SA</b>	Selbstorganisierend (engl.: self-assembly)
<b>SPR</b>	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. : surface plasmon resonance)
<b>SPT</b>	Skalierende Partikel Theorie (engl. : scaled particle theory)
<b>VSSM</b>	Methode der variablen Schrittweite (engl.: variable step size method)

# 1 EINLEITUNG

Die Erforschung von Zellmembranen hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer unterschiedlichen Funktionen ist eine grundlegende Aufgabe der Naturwissenschaften. Grundbaustein der biologischen Membranen sind Lipidmoleküle, die eine ca. 6 nm dicke Doppelschicht bilden (Stryer 1999). Neben den Lipiden finden sich zahlreiche Proteine in der Membran und je nach Zell- und Membrantyp auch Kohlehydrate. Eine systematische experimentelle Untersuchung erfordert daher eine Zerlegung des komplexen Systems in einfache, gut kontrollierbare Bestandteile. Anstelle von natürlichen Zellmembranen werden in den Biowissenschaften häufig festkörpergestützte Lipiddoppelschichten mit definierter molarer Lipidzusammensetzung zur Klärung spezifischer biologischer Fragestellungen oder zur Immobilisierung amphiphiler Rezeptoren im Bereich der Biosensorik eingesetzt (Stelzle *et al.* 1993, Sackmann 1996). Hauptsächlich wird zur Erzeugung dieser festkörpergestützten Doppelschichten die Langmuir-Blodgett Technik (LB) oder die Vesikelspreittechnik verwendet. Letztere hat sich seit ihrer ersten Erwähnung im Jahr 1985 aufgrund der einfachen Handhabung, der guten Reproduzierbarkeit und der geringen Defektdichte etabliert (Tamm und McConnell 1985). Die Technik beruht auf der Adsorption von Vesikeln an einer entsprechend präparierten Oberfläche mit anschließender Deformation und Spreiten zu einer Lipiddoppelschicht. Die Kinetik, der diese Prozesse unterliegen, ist theoretisch nur schwer zu modellieren. Dies liegt an der Vielzahl der freien Parameter des Systems. Neben den Vesikeleigenschaften spielt die Pufferzusammensetzung und die Oberflächenbeschaffenheit eine entscheidende Rolle. Experimentell lassen sich diese Grenzflächenprozesse hingegen mit einer Vielzahl von integralen oberflächenanalytischen Methoden untersuchen, wobei vor allem elektrochemische und optische Verfahren, wie z.B. die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), die Ellipsometrie (ELL), die Reflexionsinterferenzspektroskopie (RIFS), die Impedanzspektroskopie (IS) oder die Quarzmikrowaage-Technik (QCM) eingesetzt werden (Salamon *et al.* 1996, Janshoff *et al.* 2000, Höök *et al.* 2001). Bei allen Techniken leidet die Quantifizierung der Adsorptionskinetik inhärent unter der Vermischung des Adsorptionsprozesses und dem makroskopischen Transport der Partikel zur Oberfläche sowie der Diffusion der ungerührten Schicht, welche an die Sensoroberfläche grenzt. Zudem führen konformative Änderungen der Vesikel, wie z.B. die Deformation oder das Spreiten, die bei integralen Messmethoden nicht richtig erkannt werden, zu einer Fehlinterpretation der Kinetik (Schuck und Minton 1996, Schuck 1997). Ein weiteres Problem besteht darin, dass bei Lipiddoppelschichten mit Domänenstrukturen, die häufig unterschiedliche

Bindungsraten aufweisen, die Kinetik nur als Mittelwert in die Messdaten eingeht. Die Diffusion verhindert zudem eine akkurate Bestimmung der Desorption, da eine unausweichliche Rückbindung die Reaktion scheinbar verlangsamt. Das Hauptziel dieser Arbeit besteht daher darin, die Kinetik der Adsorption von Vesikeln und Proteinen unter realistischen physikalischen Randbedingungen mit Hilfe dynamischer Monte Carlo(MC)-Simulationen zu beschreiben. Das Fundament zur Programmierung auf Basis der zufälligen sequentiellen Adsorption (RSA) legen eine Vielzahl theoretischer Studien, die sich mit der Adsorption sphärischer Partikel befassen (Boublik 1974, Feder 1980, Swendsen 1981).

Experimentelle Grundlage der Simulationen bilden Adsorptionsisothermen von unterschiedlichen Probensystemen, aufgenommen mit der QCM. Die Bedeutung dieser hat seit ihren Anfängen als Schichtdickensensor ständig zugenommen. Zunächst ist die Entdeckung von Nomura und Okuhara zu nennen, die den Nachweis erbrachten, dass ein Quarz Kristall auch unter Flüssigkeiten zu Scheroszillationen angeregt werden kann (Nomura und Okuhara 1982). Damit war der Grundstein für ein breites Anwendungsfeld dieser Technologie gelegt. Ursprünglich als reiner Massensensor aufgrund der Proportionalitätsbeziehung von Frequenzverschiebung und aufgetragener Masse eingesetzt, wird die QCM inzwischen auch zur Bestimmung dynamischer mechanischer Parameter, wie z.B. dem komplexen Schermodul von Polymeren, verwendet (Lucklum *et al.* 1996, Lucklum und Hauptmann 2000, Johannsmann 2001). Dazu werden neben der eigentlichen Resonanzfrequenz auch höhere Harmonische dieser Grundfrequenz bzw. die Leitfähigkeit oder der Dissipationsfaktor elektronisch ausgelesen. Trotz der enormen Fortschritte bei der Modellierung homogener visko-elastischer Schichten und der zahlreichen theoretischen Arbeiten mit dem Ziel Multischichtsysteme auf der Sensoroberfläche zu beschreiben, ist es bisher nicht gelungen eine exakte mathematische Beschreibung für die Anbindung sphärischer visko-elastischer Körper zu finden (Bandey *et al.* 1999, Hillman und Jackson 2001).

Ein großer Vorteil der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten QCM-Messaufbauten besteht darin, dass sich der Massentransport aufgrund der Geometrie der Flüssigkeitszelle mit Hilfe einer laminaren Staupunktströmung beschreiben lässt, die in der Literatur umfangreich theoretisch behandelt wird. Der Massentransport zur Oberfläche lässt sich in dieser Geometrie durch eine mittlere Transportrate in die MC-Simulationen einarbeiten. Im Abgleich mit experimentellen Daten lassen sich dann Rückschlüsse auf die adsorbierte Schicht ziehen und die kinetischen Konstanten des jeweiligen Systems bestimmen.

Ein typisches, häufig genutztes Modellsystem für Adsorptionsexperimente besteht aus Latex Beads auf funktionalisierter Oberfläche (Adamczyk *et al.* 1996, Adamczyk und Weronki 1999,

Adamczyk *et al.* 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wird es als Testsystem für die Übereinstimmung von Experiment und Simulation verwendet. Im Gegensatz zu den Latex Beads müssen bei auf Vesikeln basierenden Probensystemen unterschiedliche konformative Änderungen im Anschluss an den Adsorptionsprozess, wie z.B. die Deformation und das Spreiten, berücksichtigt werden. Erste Ansätze dazu stammen von Zhdanov (Zhdanov und Kasemo 1998, Zhdanov *et al.* 2000). Mit Hilfe von Adsorptionskinetiken von geladenen und funktionalisierten Vesikeln auf *self-assembly*-Schichten werden unterschiedliche Möglichkeiten der Modellierung aufgezeigt. Zusätzlich zur Kinetik werden anhand der Simulationen auch Informationen über die Oberflächenverteilung gewonnen.

Monte Carlo-Simulationen in Zusammenspiel mit QCM-Messungen können auch erfolgreich zur Extraktion relevanter kinetischer Konstanten komplexer Prozesse eingesetzt werden. Dies wird am Beispiel der Annexin A1 vermittelten Adsorption von anionischen Vesikeln an PS-haltige Lipidmembranen auf Oberflächen als Funktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts und der Ionenstärke gezeigt (Kastl *et al.* 2004).

Bei der Untersuchung von Adsorptions- und Desorptionsereignissen ist im Rahmen dieser Arbeit ein völlig neues Sensorkonzept ausgearbeitet worden, welches die oben genannten Probleme umgeht, da es auf der Analyse der Fluktuation in der Belegung der Sensorfläche beruht (Lüthgens und Janshoff 2005). Zur Untermauerung des Prinzips wird der hergeleitete mathematische Formalismus auf Daten aus dynamischen MC-Simulationen angewandt, wobei sich verschiedene Aspekte dieses Sensorkonzepts offenbaren.



## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In der vorliegenden Arbeit werden MC-Simulationen basierend auf dem Modell der zufälligen sequentiellen Adsorption (RSA = *random sequential adsorption*) vorgestellt.

Allgemein werden MC-Rechnungen, die Reaktionen simulieren, dynamische MC-Simulationen genannt. Eine Untergruppe davon sind die kinetischen MC-Simulationen, die sich mit Oberflächenreaktionen beschäftigen (arxiv und Jansen 2003).

In Abschnitt 1 wird über den Ansatz der Langmuir Gleichung eine erweiterte Differentialgleichung (DGL) zur Beschreibung der RSA eingeführt und es werden verschiedene Ansätze zu deren Lösung vorgestellt. Anschließend wird auf die Kinetik des Gesamtprozesses eingegangen, d.h. Transport und Adsorption, bzw. Desorption. Die dabei auftretenden Konstanten hängen neben dem Potential auch von der Geometrie der Messanordnung ab (Adamczyk *et al.* 1996). Im Folgenden wird der Massentransport zur Oberfläche für eine Staupunktströmung, wie er bei dem experimentellen Aufbau der QCM Messzelle zur Anwendung kommt, behandelt (Dabros und van de Ven 1983). Zuletzt werden mögliche Algorithmen vorgestellt, die die Simulation von Oberflächenreaktionen beschreiben.

## 2.1 Kinetik der RSA

Gewöhnlich wird die Kinetik der Adsorption kleiner Moleküle für Monolagen durch das so genannte Langmuir-Modell beschrieben: (Langmuir 1918)

$$\frac{\partial \Theta}{\partial t} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} (\Theta_{\text{max}} - \Theta) - k_{\text{off}} \Theta. \quad (2.1)$$

Die Kinetik wird durch die Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$ , bzw. durch die Desorptionsrate  $k_{\text{off}}$ , festgelegt. Die Dichte der Moleküle mit Radius  $a$  in der Flüssigkeit ist mit  $\rho_{\text{bulk}}$  bezeichnet, die Oberflächenbelegung mit  $\Theta$  und  $t$  ist die Zeit. In der Originalpublikation entfällt die Normierung auf die maximale Belegung  $\Theta_{\text{max}}$ , d.h. es gilt  $\Theta_{\text{max}} = 1$ . Das Langmuir-Modell gilt für Teilchen ohne gegenseitige Wechselwirkung, die jeweils mit genau einem Gitterplatz reagieren können. Die allgemeine Lösung ist durch

$$\Theta = \Theta_{\text{GG}} \left[ 1 - \exp\left(-\left(k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} + k_{\text{off}}\right)t\right) \right] \quad (2.2)$$

gegeben. Der Gleichgewichtswert  $\Theta_{\text{GG}}$  ergibt sich zu

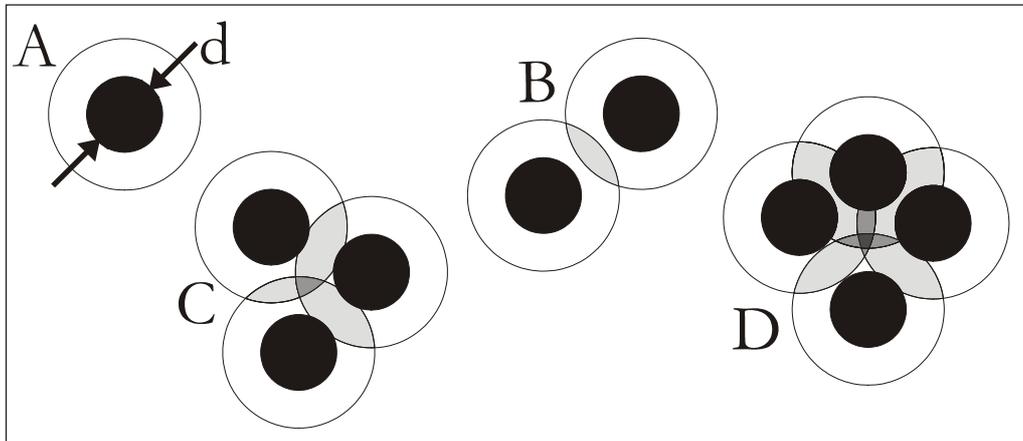
$$\Theta_{\text{GG}} = \Theta_{\text{max}} \left( 1 + \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}}} \right)^{-1}. \quad (2.3)$$

Bei der Adsorption von Vesikeln oder größeren Molekülen, wie Proteinen, im Folgenden der Einfachheit halber Partikel genannt, wird die Kinetik des Prozesses nicht korrekt wiedergegeben, sobald sich das Partikel über mehrere Gitterplätze erstreckt. Unter Zuhilfenahme der Funktion, welche die zur Verfügung stehende Oberfläche beschreibt (ASF = *available surface function*)  $\Phi(\Theta)$  ergibt sich eine generalisierte Form der Langmuir-Gleichung

$$\frac{\partial \Theta}{\partial t} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \Phi(\Theta) - k_{\text{off}} \Theta \quad (2.4)$$

(Schaaf und Talbot 1989b). Diese Gleichung ist die Ausgangsgleichung für die zweidimensionale RSA. Häufig wird in der Literatur zwischen dem Modell der irreversiblen RSA, in dem die Desorption verboten und somit in Gleichung (2.4) der Subtrahend entfällt, und dem Modell der reversiblen RSA, welches Desorption oder Diffusion zulässt, unterschieden. Im Gegensatz zum eindimensionalen Fall, dem so genannten *parking lot model* (PLM), lässt sich Gleichung (2.4) nicht analytisch lösen. Zur Bestimmung von  $\Phi(\Theta)$  gibt es verschiedene Ansätze, die aufgrund des

Prozesses zu Nahrungslosungen führen, die zumeist nur für einen gewissen Belegungsgrad gültig sind. Eine anschauliche Interpretation der ASF ist die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen Adsorptionsversuch. Zur Verdeutlichung wird im Folgenden die Herleitung der ersten Glieder dieser Reihe für die RSA skizziert (Schaaf und Talbot 1989a).



**Abb. 2.1:** Teilbereich einer Oberfläche, die mit mehreren Scheiben des Durchmessers  $d$  belegt ist. Im Ausschlusskreis mit Radius  $d$  darf sich kein weiterer Mittelpunkt einer Scheibe befinden. Schnittmengen dieser Bereiche (hier in verschiedenen Graustufen dargestellt) müssen bei der Berechnung der ASF als Korrekturglieder berücksichtigt werden. C zeigt paarweise überlappende Bereiche wie in B, wobei das Zentrum Schnittmenge aller Scheiben ist. In D wird die Situation für vier Scheiben dargestellt. Die Berücksichtigung der verschiedenen Fälle resultiert in einer Potenzreihe (Gleichung (2.5)).

Das Adsorbat wird zur Vereinfachung als Scheibe mit festem Durchmesser  $d$  dargestellt. Ein Adsorptionsversuch auf freier Oberfläche ist immer erfolgreich und hat somit die Wahrscheinlichkeit 1. Sind schon  $N$  Scheiben auf der Oberfläche adsorbiert, werden sie bei genügend Abstand voneinander eine Fläche von  $N\pi d^2$  blockieren, da sich kein Teilchen innerhalb eines Durchmessers  $2d$ , der Fläche des so genannten Ausschlusskreises, um ihr jeweiliges Zentrum anlagern darf. Bei höherer Belegung wird die Situation komplizierter, da sich die Ausschlussgebiete einzelner Scheiben nicht einfach additiv verhalten. Scheiben mit Abständen  $r_o \in ]d, 2d[$  bilden Paare, bei denen sich die Ausschlusskreise überlappen. Die Abnahme der für die Adsorption zur Verfügung stehenden Oberfläche wird für Paare daher nicht  $2\pi d^2$  betragen, sondern wie in Abb. 2.1 B dargestellt einen um die Schnittmenge der Ausschlusskreise korrigierten Betrag. Für jede weitere Scheibe innerhalb eines Abstandes  $r_o$  von bereits bestehenden Paaren (Fälle C und D) wird wiederum eine Korrektur des zuviel berechneten Gebietes notwendig sein. Es kann gezeigt werden, dass sich die ASF wie eine Potenzreihe gemäß

$$\Phi(\Theta) = 1 + A_1\Theta + A_2\Theta^2 + A_3\Theta^3 + \dots \quad (2.5)$$

verhält, worin  $A_1$  durch die Beziehung  $-N\pi d^2 / N\pi a^2 = -4$  gegeben ist (Reiss *et al.* 1959). Höhere Glieder lassen sich z.B. durch Virialentwicklung bestimmen (Rowlinson 1963).

Für Scheiben gleicher Größe treten Terme höherer Ordnung als  $A_4$  aufgrund der Geometrie nicht auf (s. Abb. 2.1 D).

Die Entwicklung für das irreversible RSA-Modell in Potenzen der Belegung bis zur 3. Ordnung ergibt

$$\Phi(\Theta) = 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi}\Theta^2 + \frac{40\sqrt{3}\pi - 176}{3\pi^2}\Theta^3 \approx 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi}\Theta^2 + 1.4069\Theta^3 \quad (2.6)$$

(Schaaf und Talbot 1989b). In der gleichen Publikation findet sich auch die Entwicklung der ASF nach dem Modell der reversiblen RSA. Für diese ergibt sich bis zur dritten Ordnung

$$\Phi(\Theta) = 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi}\Theta^2 + 2.4243\Theta^3. \quad (2.7)$$

Bis zur zweiten Ordnung stimmen die Reihenentwicklungen für den Fall der reversiblen und der irreversiblen RSA überein. Die Vorfaktoren höherer Potenzen weichen jedoch ab, da die ASF für die irreversible RSA bei Erreichen der maximalen Belegung, dem so genannten *jamming limit*  $\Theta_{\text{jam}} = 0.547$ , für kreisförmige Scheiben Null ist (Wang 1994).

Ein anderer theoretischer Zugang zur Bestimmung der ASF für das Modell der reversiblen RSA basiert auf der so genannten *scaled particle* Theorie (SPT)<sup>1</sup>. Mit Hilfe der SPT lässt sich die Zustandsgleichung für das chemische Potential  $\mu$  einer Flüssigkeit von zweidimensionalen konvexen Teilchen berechnen (Reiss *et al.* 1959, Boublik 1975). Ein Vergleich mit

$$\mu = \mu_0 + k_B T \ln(f \rho_{\text{bulk}}) = \mu_i - k_B T \ln \Phi(\Theta) \quad (2.8)$$

ergibt die gesuchte Funktion  $\Phi(\Theta)$  (Widom 1963, Adamczyk *et al.* 1999). In (2.8) bezeichnet  $\mu_0$  das Referenzpotential,  $\mu_i = \mu_0 + k_B T \ln \rho_{\text{bulk}}$  das chemische Potential der idealen Phase,  $f = 1/\Phi(\Theta)$  den Aktivitätskoeffizienten,  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die absolute Temperatur. Für die ASF von kreisförmigen Scheiben folgt dann

---

<sup>1</sup>Die SPT geht auf eine Publikation von Reiss und Mitarbeitern zurück, die die reversible Arbeit, ein Lösungsmittelmolekül variabler Größe einer Lösung hinzuzufügen, mit Hilfe von Methoden der statistischen Mechanik berechnet haben (Reiss *et al.* 1959).

$$\Phi(\Theta) = (1 - \Theta) \exp \left[ -3 \frac{\Theta}{1 - \Theta} - \left( \frac{\Theta}{1 - \Theta} \right)^2 \right]. \quad (2.9)$$

Für kleine  $\Theta$  ergibt eine Taylorentwicklung  $\mathcal{A}_1 = 4$  und  $\mathcal{A}_2 = 3.5$  in guter Übereinstimmung mit Gleichung (2.6).

Einsetzen der Näherung (2.6) bis zur 2. Ordnung in die generalisierte Langmuirgleichung (2.4) führt zu einer Gleichung, deren analytische Lösung

$$\Theta(t) = \Theta_n + \frac{\Theta_n - \Theta_p}{\frac{\Theta_p}{\Theta_n} \exp \left( \tilde{k}_{\text{on}} \frac{6\sqrt{3}}{\pi} (\Theta_p - \Theta_n) t \right) - 1} \quad (2.10)$$

lautet. Hier wurde die Substitution  $\tilde{k}_{\text{on}} = \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} k_{\text{on}}$  verwendet. Die Terme  $\Theta_p$  und  $\Theta_n$  haben dann die Form

$$\Theta_n = \frac{4 + \frac{k_{\text{off}}}{\tilde{k}_{\text{on}}}}{12\sqrt{3}/\pi} - \sqrt{\left[ \frac{\pi}{12\sqrt{3}} \left( 4 + \frac{k_{\text{off}}}{\tilde{k}_{\text{on}}} \right) \right]^2 - \frac{\pi}{6\sqrt{3}}} \quad (2.11)$$

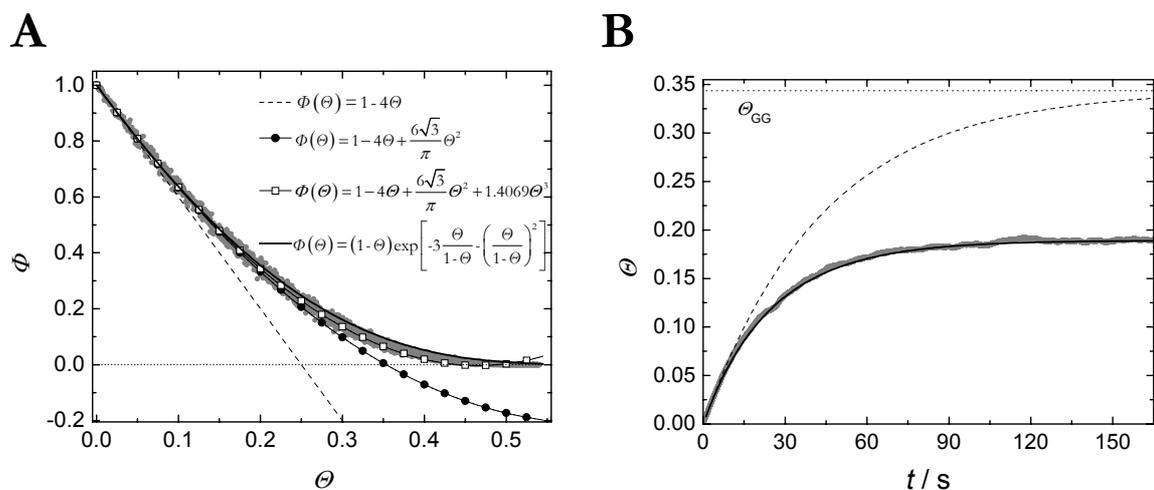
und

$$\Theta_p = \frac{4 + \frac{k_{\text{off}}}{\tilde{k}_{\text{on}}}}{12\sqrt{3}/\pi} + \sqrt{\left[ \frac{\pi}{12\sqrt{3}} \left( 4 + \frac{k_{\text{off}}}{\tilde{k}_{\text{on}}} \right) \right]^2 - \frac{\pi}{6\sqrt{3}}}. \quad (2.12)$$

Für mittlere Belegungsgrade  $\Theta < 0.25$  ist diese Lösung in guter Übereinstimmung mit der ASF aus dynamischen MC-Simulationen.

Um dies zu verdeutlichen, sind in Abb. 2.2 A Daten aus MC-Simulationen den verschiedenen ASF gegenübergestellt. Die gezeigte aus Simulationen nach dem Modell der irreversiblen RSA gewonnene ASF ergibt sich als Mittelwert der Adsorptionswahrscheinlichkeit für jeweils 1000 Adsorptionsversuche pro Belegungsgrad. Die ASF wird dann aus dem Verhältnis einer erfolgreichen Adsorption zur Anzahl der Versuche berechnet. Während die dem Langmuir-Modell entsprechende ASF  $\Phi(\Theta) = 1 - 4\Theta$  nur bei geringen Belegungsgraden ( $\Theta < 0.1$ ) den Verlauf der simulierten Daten entspricht, zeigt die Reihenentwicklung bis zur zweiten Ordnung nach Gleichung (2.6) oder (2.7) auch für mittlere Belegungsgrade ( $\Theta < 0.25$ ) gute Übereinstimmung. Wird auch die dritte Ordnung berücksichtigt, so stimmt die ASF bis zu einer Belegung von  $\Theta = 0.35$  mit den aus Simulationen gewonnenen Daten überein. Für höhere

Belegungen nahe dem *jamming limit* ( $\Theta > 0.45$ ) liefert die so berechnete ASF keine physikalisch sinnvollen Ergebnisse mehr, da ihr Wert stetig zunimmt und nicht gegen Null strebt. Als vierte Funktion ist die mit Hilfe der SPT berechnete exponentielle ASF, Gleichung (2.9), dargestellt. Diese gibt den gesamten Verlauf gut wieder, ist aber für hohe Belegungsgrade ( $\Theta > 0.35$ ) leicht zu größeren Werten verschoben. Dieses Verhalten begründet sich in der Herleitung von Gleichung (2.9). Die exponentielle ASF entstammt der SPT und beschreibt daher reversible Adsorptionsprozesse. Die ASF der reversiblen Adsorption strebt nahe dem *jamming limit* langsamer gegen Null als die ASF nach dem Modell der irreversiblen RSA, da immer wieder erfolgreiche Adsorptionsversuche stattfinden. Somit ergibt sich ein höherer Wert für diese ASF.



**Abb. 2.2:** A Vergleich verschiedener ASF mit Daten aus MC-Simulationen ( $\bullet$ ) bei irreversibler Adsorption. Die zugehörigen Funktionen sind in der Legende angegeben. Die Übereinstimmung der Reihenentwicklung der ASF nach Gl. (2.6) mit den aus Simulationen gewonnenen Daten reicht bei Mitnahme höherer Glieder bis zu einer Belegung von fast 40%. Die exponentielle ASF (2.9) gibt die simulierten Daten gut wieder, ist jedoch bei hohen Belegungsgraden ( $\Theta > 0.3$ ) leicht zu größeren Werten verschoben. B Vergleich der Langmuir-Kinetik (gestrichelte Linie) mit Gl. (2.10) (durchgezogene Linie) und Daten einer simulierten Adsorptionsisotherme bei reversibler Adsorption. Die gepunktete Linie entspricht dem Gleichgewichtswert nach Gl. (2.3).

Abb. 2.2 B zeigt die Kinetik einer Simulation der reversiblen RSA angepasst durch Gl. (2.10) (durchgezogene Linie), die für Belegungen unter 25% eine sehr gute Übereinstimmung liefert. Die Langmuir Kinetik (gepunktete Linie), normiert auf den Gleichgewichtswert gemäß Gleichung (2.3), weicht hingegen bei gleichen kinetischen Konstanten stark ab. Auf die Fluktuation der Belegung im Plateaubereich wird in Kapitel 7 eingegangen.

## 2.2 Kinetik der RSA unter Transportbedingungen

Einen großen Einfluss auf die Kinetik realer Messsysteme hat der Massentransport. Betrachtet man die Belegung einer Oberfläche als Funktion der Zeit, so ist gerade im Anfangsbereich der Transport, d.h. die Versorgung des Systems mit weiteren Partikeln, ein limitierender Faktor. Befindet sich das System hingegen im Gleichgewicht, so ist dieser Faktor zu vernachlässigen. Für die reversible Adsorption nach dem RSA-Modell bedeutet dies, dass durch die Lösung von Gl. (2.4) der Gleichgewichtswert  $\Theta_{GG}$  festgelegt ist, die Kinetik aber nur bei sehr großen Transportraten korrekt wiedergegeben wird. Für das Modell der irreversiblen RSA wird in beiden Fällen die maximale Belegung erreicht, allerdings beeinflusst der Transport die Geschwindigkeit des Prozesses.

Gewöhnlich wird bei der Untersuchung der Proteinadsorption davon ausgegangen, dass die Kinetik des Prozesses durch den Fluss zur Oberfläche gemäß

$$j = j_0 \Phi(\Theta) \quad (2.13)$$

bestimmt ist (Adamczyk 2000). In dieser Gleichung bezeichnet  $j_0$  den Fluss für die unbedeckte Oberfläche. Der Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass die ASF a priori bekannt sein muss und spezifische Wechselwirkungen von Partikel und Oberfläche nicht separat behandelt werden. Eine andere Vorgehensweise besteht daher darin, den Transport der Partikel zur Oberfläche getrennt von der Oberflächenreaktion zu betrachten und diesen mittels einer weiteren Größe, der Transportkonstante  $k_{tr}$ , zu berücksichtigen.

Allgemein ist das Transportproblem über die vektorielle Form der Kontinuitätsgleichung

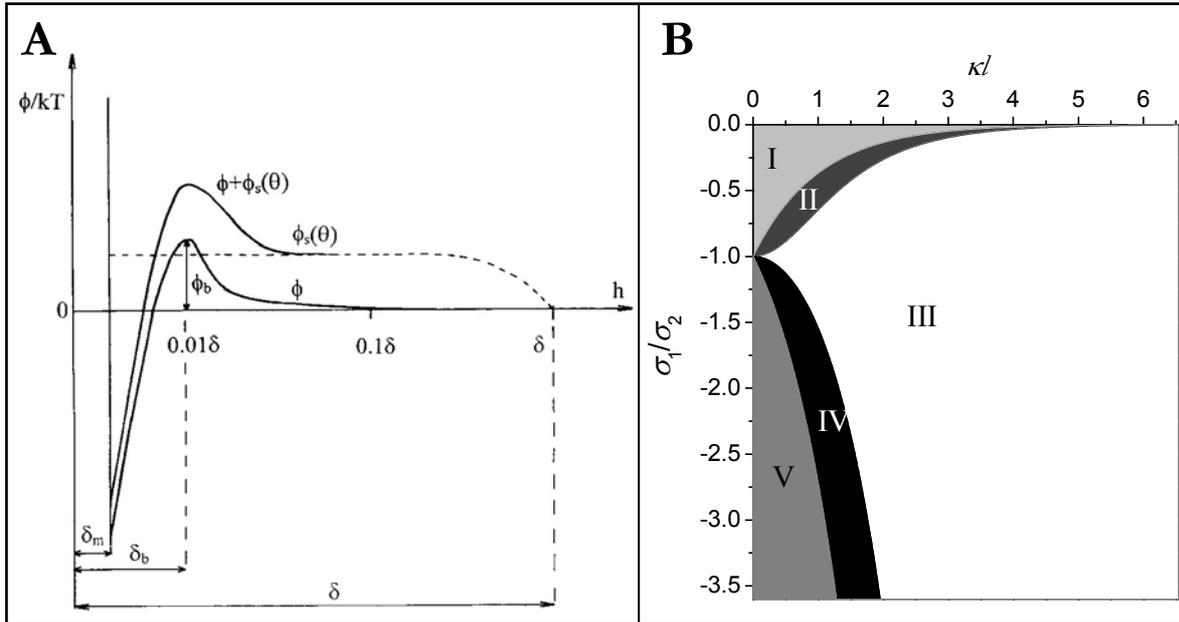
$$\frac{\partial \rho_{\text{bulk}}}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{j} = 0 \quad (2.14)$$

bestimmt, wobei der Flussdichtevektor  $\vec{j}$  durch die Beziehung

$$\vec{j} = -\vec{D} \left[ \nabla \rho_{\text{bulk}} + (\nabla \phi / k_B T) \rho_{\text{bulk}} \right] + \vec{j}_{\text{konv}} \quad (2.15)$$

gegeben ist (Adamczyk und Weronki 1999, Adamczyk *et al.* 2001). Hierin bezeichnet  $\vec{D}$  den Diffusionstensor,  $\phi$  das Wechselwirkungspotential von Wand und Partikel und  $\vec{j}_{\text{konv}}$  den Partikelflussvektor aufgrund hydrodynamischer Kräfte. Zusätzlich müssen Rand- und Anfangsbedingungen formuliert werden. In dieser Form ist eine analytische Lösung nicht möglich. Es wird daher dem Ansatz von Adamczyk gefolgt, der ein typisches

Wechselwirkungspotential  $\phi$  zwischen Partikel und Oberfläche annimmt (s. Abb. 2.3) und das Transportproblem eindimensional behandelt (Adamczyk 2000).



**Abb. 2.3** A Angenommener Potentialverlauf für die Berechnung reversibler Adsorption unter Transportbedingungen nach Adamczyk (Adamczyk 2000). Eingezeichnet ist der Verlauf in Energieeinheiten gegen den Abstand  $h$  zur Oberfläche. Das Potential weist ein Minimum in der Adsorptionsebene  $\delta_m$  auf. Einflüsse des Potentials sind bis zu einer Entfernung  $\delta$ , die in der Größenordnung des Partikeldurchmessers liegt, zu spüren. B Das Flächendiagramm zeigt verschiedene Regionen von attraktiven und repulsiven Kräften als Funktion der dimensionslosen Produkte  $\kappa l$  und der Ladungsdichten  $\sigma_1/\sigma_2$  von sich annähernden Oberflächen (Parsegian und Gingell 1972). I: Abstoßung bei positivem Potential beider Oberflächen; II: Anziehung bei positivem Potential beider Oberflächen; III: Anziehung bei Oberflächenpotential mit unterschiedlichen Vorzeichen; IV: Anziehung bei negativem Potential beider Oberflächen; V: Abstoßung bei negativem Potential beider Oberflächen.

Durch diese Vereinfachung erhält die zu lösende DGL die Gestalt

$$\frac{d\rho_{\text{bulk}}}{dt} = -\frac{\partial}{\partial h} j(b,t) = \frac{\partial}{\partial h} \left[ D(h) \frac{\partial(\mu + \phi)/k_B T}{\partial h} \rho_{\text{bulk}} \right]. \quad (2.16)$$

Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist in diesem Fall abhängig vom Abstand  $h$  der Partikel zur Oberfläche.

Für ein System elektrisch geladener Partikel mit entgegengesetzt geladener Oberfläche sind in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung und damit auch von der Debyelänge  $\kappa^{-1}$  verschiedene Potentialverläufe möglich. Die Debyelänge ist definiert als

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon_0 k_B T}{\sum_i \rho_{\infty,i} e^2 \zeta_i^2}} \quad (2.17)$$

Die DLVO<sup>2</sup>-Theorie beschreibt die Wechselwirkung als Superposition der attraktiven van der Waals-Kraft und der Repulsion bzw. Attraktion aufgrund der elektrischen Doppelschichten. In Teilbild B von Abb. 2.3 sind Flächen mit attraktiver bzw. repulsiver Wechselwirkung als Funktion des dimensionslosen Produktes von reziproker Debyelänge und Abstand der Oberflächen  $\kappa l$  und der Ladungsdichten  $\sigma_1/\sigma_2$  der Flächen eingezeichnet. Die Rechnungen sind für ebene sich annähernde Oberflächen durchgeführt und zeigen, dass trotz unterschiedlicher Oberflächenladungen auch abstoßende Kräfte in Abhängigkeit von der Debyelänge auftreten können (Parsegian und Gingell 1972).

Das Potential für ein System elektrisch geladener Partikel mit entgegengesetzt geladener Oberfläche oder für die Proteinanbindung an eine geeignet präparierte Oberfläche weist zumeist ein gut definiertes Potentialminimum auf (s. Abb. 2.3). Partikel werden sich innerhalb des Potentialminimums  $\delta_m$  aufhalten, d.h. sie werden adsorbieren, wenn die Breite des Potentialminimums kleiner als der Partikeldurchmesser ist. Adsorbierte Partikel tragen zu einem Potentialwall  $\phi + \phi_s$  mit einem sterischen Anteil  $\phi_s$  bei, dessen Ausdehnung in der Größenordnung des Partikels liegt.

Unter quasi-stationären Bedingungen, d.h. wenn die Variation der Belegung  $\Theta$  während der Relaxationszeit  $t_r = \delta^2 / D$  vernachlässigbar ist, lässt sich Gleichung (2.16) vereinfachen. Mit dem chemischen Potential aus Gl. (2.16) ergibt sich nach Integration

$$-j_0 = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho(\delta) \bar{\Phi}(\Theta) - k_{\text{off}} \frac{\bar{\Phi}(\Theta)}{\Phi(\Theta)} \Theta. \quad (2.18)$$

Hierin bezeichnet  $\bar{\Phi}(\Theta)$  eine generalisierte ASF, die von der Form des Potentials abhängt. Das Gesetz der Massenerhaltung fordert, dass die Änderung der Oberflächenbelegung gleich dem Partikelfluss  $j_0$  an der Stelle  $\delta$  (s. Abb. 2.3) ist:  $d\Theta/dt = -j_0$ . Mit der Annahme eines linearen Transports von Partikeln aus der Lösung zur Grenzschicht

$$j = -k_{\text{tr}} [\rho_{\text{bulk}} - \rho(\delta)] \quad (2.19)$$

folgt

---

<sup>2</sup> nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek

$$\frac{d\Theta}{dt} = \frac{k_{\text{on}} \pi a^2 \bar{\Phi}(\Theta) \rho_{\text{bulk}} - k_{\text{off}} \frac{\bar{\Phi}(\Theta)}{\Phi(\Theta)} \Theta}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{tr}}} \bar{\Phi}(\Theta)}. \quad (2.20)$$

Für den Fall, dass das Potential  $\phi$  aus Abb. 2.3 ein Maximum in der Größenordnung einiger  $k_{\text{B}}T$  aufweist, strebt  $\bar{\Phi}(\Theta)$  gegen  $\Phi(\Theta)$ . Gleichung (2.20) vereinfacht sich dann zu

$$\frac{d\Theta}{dt} = \frac{k_{\text{on}} \pi a^2 \Phi(\Theta) \rho_{\text{bulk}} - k_{\text{off}} \Theta}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{tr}}} \Phi(\Theta)} \quad (2.21)$$

(Adamczyk *et al.* 1999). Diese Beziehung lässt sich sehr einfach aus den Gleichungen (2.19) und (2.4) herleiten, wobei in letzterer die Partikeldichte in der Lösung  $\rho_{\text{bulk}}$  durch die Dichte nahe der Oberfläche  $\rho(\delta)$  ersetzt werden muss. Für das Modell der irreversiblen RSA entfällt der Desorptionsterm (2. Term auf der rechten Seite von Gleichung (2.4)).

## 2.3 Berechnung kinetischer Konstanten

Für die Anpassung der Simulationen an die Messwerte sind gute Schätzwerte für die Adsorptionsrate  $k_{on}$  und die Transportrate  $k_{tr}$  unerlässlich. Dieser Abschnitt widmet sich daher der Abschätzung dieser Konstanten. Weitere, die Kinetik bestimmende Größen, wie z.B. die Desorptionsrate  $k_{off}$ , hängen nicht nur von der Wechselwirkung der Teilchen untereinander und der Substrat-Partikel-Wechselwirkung ab, sondern auch von der Geometrie des Systems, die die Scherkräfte aufgrund der Tangentialkomponente des Flüssigkeitsstroms beeinflusst und werden im Rahmen dieser Arbeit theoretisch nicht ergründet.

### 2.3.1 Berechnung der Adsorptionskonstante

Ein einfacher Ansatz zur Behandlung der Adsorption von Partikeln an einer Oberfläche verwendet das so genannte *hard particle* Konzept, welches ursprünglich der Beschreibung einfacher Flüssigkeiten von sphärischen Molekülen diente (Barker und Henderson 1967). Nach diesem Ansatz werden Partikel als harte Körper mit Radius  $a^* = a + h_s$  behandelt. Die Größe  $h_s$  bezeichnet die Reichweite der spezifischen bzw. der elektrostatischen Wechselwirkung als Funktion der Oberflächenladung des Partikels und der Ionenstärke der Lösung. Es gilt

$$h_s = \frac{1}{2} \kappa^{-1} \left( \ln \left( \frac{\phi_0}{\phi_{ch}} \right) - (\kappa a)^{-1} \ln \left( 1 + \frac{1}{2} (\kappa a)^{-1} \ln \left( \frac{\phi_0}{\phi_{ch}} \right) \right) \right) \quad (2.22)$$

mit dem Potential

$$\phi_0 = 32\pi\epsilon_0\epsilon \left( \frac{\kappa_B T}{e} \right)^2 \tanh^2 \left( \frac{e\psi}{4\kappa_B T} \right), \quad (2.23)$$

und dem charakteristischen Potential  $\phi_{ch} = 1.5\kappa_B T$  (Rädler und Sackmann 1992, Adamczyk 2003).

In das Wechselwirkungspotential  $\phi_0$  zwischen adsorbierten Partikeln und Partikeln in Lösung geht das Oberflächenpotential  $\psi$  des Teilchens, die dimensionslose Dicke der elektrischen Doppelschicht  $(\kappa a)^{-1}$  mit der Debyelänge  $\kappa^{-1}$ , die dielektrische Konstante  $\epsilon$  von Wasser und die Elementarladung  $e$  ein. Für elektrisch geladene Partikel und eine entgegengesetzt geladene

Oberfläche lässt sich das Potential durch ein so genanntes *perfect sink* (PS)<sup>3</sup> Potential ohne Barriere ersetzen. In dem RSA Modell werden Adsorptionsversuche mit modifiziertem Radius  $a^*$  nach dem *hard particle* Konzept berechnet. Die Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  berechnet sich dann zu

$$k_{\text{on}} = \frac{1}{2a} \frac{D_{\infty}}{1 + \frac{1}{2} \ln \left( 1 + \frac{a}{h_s} \right)} \quad (2.24)$$

(Adamczyk 2000). Der Diffusionskoeffizient  $D_{\infty}$  der Partikel in Lösung lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein Beziehung

$$D_{\infty} = \frac{k_{\text{B}} T}{6\pi a \eta} \quad (2.25)$$

ermitteln, die für kugelförmige Teilchen in einem Lösungsmittel mit Viskosität  $\eta$  gilt.

Im Falle einer ausgeprägten Barriere wie in Abb. 2.3, lässt sich die Konstante  $k_{\text{on}}$  aus dem Verlauf des Potentials berechnen. Unter der Voraussetzung, dass die Barriere einen parabolischen Verlauf annimmt deren Maximum in der Größenordnung von  $k_{\text{B}} T$  liegt, gilt

$$k_{\text{on}} = \frac{D_{\infty}}{a} \sqrt{\frac{\phi_b}{\pi k_{\text{B}} T}} e^{-\frac{\phi_b}{k_{\text{B}} T}} \quad (2.26)$$

(Ruckenstein 1978, Adamczyk *et al.* 1999). Während Gleichung (2.24) Werte in der Größenordnung  $10^{-5}$  m/s liefert, liegen die Werte nach Gleichung (2.26) bei  $5 \cdot 10^{-7}$  m/s für einen Potentialwall der Höhe  $5k_{\text{B}} T$ . Die Anpassung der Simulationen an die experimentellen Daten gibt dementsprechend Aufschluss darüber, welches Modell zutrifft, bzw. wie hoch die Barriere ist.

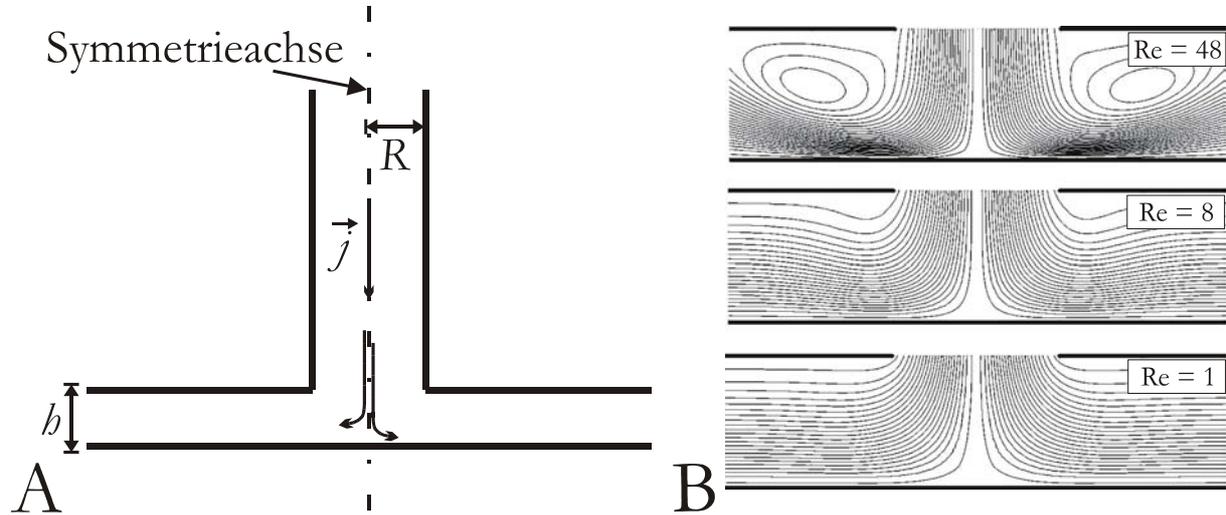
### 2.3.2 Berechnung der Transportrate

Bisher ist die Kinetik der Oberflächenreaktionen ohne Berücksichtigung von hydrodynamischen Wechselwirkungen betrachtet worden. Die Hydrodynamik wird maßgeblich von der Geometrie des Systems bestimmt. Die der Arbeit zugrunde liegenden Messungen und somit auch die Simulationen behandeln den Fall der Staupunktströmung. Abb. 2.4 A zeigt einen Schnitt durch die zylindersymmetrische Anordnung.

---

<sup>3</sup> Das PS Potential ist bis zu einem sehr kleinen Abstand  $\delta_m$  Null und strebt dann nach minus unendlich (v. Smoluchowski 1916).

Die Lösung mit den Partikeln strömt durch einen Zufluss mit Radius  $R$  in Richtung Oberfläche. Die Austrittsöffnung ist von der Ebene, in der die Oberflächenreaktion stattfindet, durch den Abstand  $b$  getrennt. Nach der Oberflächenreaktion fließt die Lösung seitlich zurück in den geschlossenen Kreislauf.



**Abb. 2.4:** A Geometrie der Staupunktströmung mit den für die Betrachtung relevanten Größen. Der Fluss der Lösung durch die Messanordnung ist durch einige Pfeile, die den Partikelflussvektor  $\vec{j}$  repräsentieren, angedeutet. B Stromlinien eines Fluids in Staupunktgeometrie für  $b/R = 1.6$  für verschiedene Reynoldszahlen  $Re$  nach Adamczyk (Adamczyk *et al.* 2001).

Für einen Partikelstrom gilt die Kontinuitätsgleichung (2.14) mit dem entsprechenden Flussvektor  $\vec{j}$ . Adamczyk und Mitarbeiter lösen dieses Gleichungssystem numerisch mit der Methode finiter Differenzen (Adamczyk *et al.* 2001). Dabei werden die Randbedingungen des PS Modells angenommen und es werden spezifische Wechselwirkungen zwischen den Teilchen, sowie die Gravitation und hydrodynamische Wandeffekte vernachlässigt. Die resultierende Verteilung der Flusslinien ist in Abb. 2.4 B für verschiedene Reynoldszahlen und das Verhältnis  $b/R = 1.6$  dargestellt. Während sich der Partikelstrom für kleine Reynoldszahlen (1 und 8) in der Nähe der Oberfläche laminar verhält, führt eine Erhöhung der Reynoldszahl deutlich zu Wirbelbildung. Unter Zuhilfenahme der Beziehung  $j = -k_{tr} \rho_{bulk}$  ergibt sich dann für die Transportkonstante in Staupunktgeometrie folgende Näherung:

$$k_{tr} = 0.78 \left( \frac{\alpha_0 \nu D_\infty^2}{R^2} \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (2.27)$$

Der Faktor  $\alpha_0$  ist abhängig von dem Verhältnis  $b/R$  und von der Reynoldszahl  $Re = R\nu / \nu$ ,

worin  $v$  die mittlere Flussgeschwindigkeit und  $\nu$  die kinematische Viskosität der Lösung bezeichnet. Für  $b/R = 1.6$  und  $Re < 10$  gilt näherungsweise die Beziehung

$$\alpha_0 = 1.78 + 0.186 Re + 0.034 Re^2 \quad (2.28)$$

(Adamczyk *et al.* 2001). Für die Reynoldszahl ergibt sich bei den verwendeten Messaufbauten ein Wert von  $Re \approx 5$ . Das bedeutet, dass eine laminare Strömung an der Sensorgrenzfläche vorliegt. Das Verhältnis von  $b/R$  liegt unterhalb dem oben angegebenen Wert von 1.6. Kleinere Werte dieses Verhältnisses führen zu einer geringen Verschiebung zu größeren Werten von  $\alpha_0$  (Dabros und van de Ven 1983). Gleichung (2.27) ist aufgrund des PS Modells in guter Näherung nur für geringe Belegungsgrade gültig und wird daher in dieser Arbeit generell zur Abschätzung der maximalen Transportrate genutzt.

## 2.4 Monte Carlo-Algorithmen von Oberflächenreaktionen

Eines der Hauptprobleme von dynamischen MC-Simulationen besteht darin, eine Beziehung zwischen der Simulationszeit und der Echtzeit herzustellen. Häufig wird daher die Zeit in willkürlichen Einheiten oder die Zahl der MC-Schritte als Zeitachse gegeben, siehe z.B. (Zhdanov *et al.* 2000). Ausgangspunkt für die zeitliche Entwicklung eines simulierten Systems ist die so genannte Mastergleichung:

$$\frac{\partial P(\alpha, t)}{\partial t} = \sum_{\beta} [W_{\beta\alpha} P(\beta, t) - W_{\alpha\beta} P(\alpha, t)] \quad (2.29)$$

((arxiv und Jansen 2003)). Hierin bezeichnet  $W_{\beta\alpha}$  die Übergangswahrscheinlichkeit des Systems pro Zeiteinheit vom Zustand  $\beta$  in den Zustand  $\alpha$ , welches sich mit der Wahrscheinlichkeit  $P(\beta, t)$  im Zustand  $\beta$  zum Zeitpunkt  $t$  befindet und  $W_{\alpha\beta}$  die Übergangswahrscheinlichkeit vom Zustand  $\alpha$  in den Zustand  $\beta$ , welches sich mit der Wahrscheinlichkeit  $P(\alpha, t)$  im Zustand  $\alpha$  befindet. Im Gleichgewicht ist die Zeitableitung null und die Summe der Übergänge in den Zustand  $\alpha$  ist gleich der Summe der Übergänge aus diesem Zustand. Die Erfüllung dieser Bedingung für jedes einzelne Paar, das so genannte *detailed balance criterion*

$$W_{\beta\alpha} P(\beta, GG) = W_{\alpha\beta} P(\alpha, GG), \quad (2.30)$$

stellt den richtigen Gleichgewichtswert einer MC-Simulation sicher. Um die Kinetik der MC-Simulation anzupassen, müssen spezielle Anforderungen an die Übergangswahrscheinlichkeiten gestellt werden. Lassen sich diese durch Übergangsraten ersetzen, so wird die Mastergleichung erfüllt, wenn die Raten einer Poissonstatistik genügen (van Kampen 1992).

Für den Poisson Prozess der Gasphasenadsorption auf einer einkristallinen Oberfläche haben Fichthorn und Weinberg einen Algorithmus vorgestellt, in dem die Zeiten für Adsorptions- und Desorptionsereignisse exponentialverteilt sind (Fichthorn und Weinberg 1991). Anstelle von Übergangswahrscheinlichkeiten verwenden sie Ratenkonstanten und erschaffen damit die so genannte Kinetische Monte Carlo Methode (KMCM = *kinetic monte carlo method*).

Aufgrund der Vielzahl von Publikationen über die Thematik der MC-Simulationen von Oberflächenreaktionen werden in diesem Abschnitt zwei häufig genutzte Algorithmen explizit vorgestellt: die Methode der „zufälligen Wahl“ (RSM = *random selection method*), und die Methode der „ersten Reaktion“ (FRM = *first reaction method*) (arxiv und Jansen 2003).

Ein anschaulicher Weg, um zur Mastergleichung zu gelangen, führt über Gillespies fundamentale

Hypothese für chemische Kinetik (Gillespie 1977):

Nehmen wir an, ein System sei im Zustand  $\alpha$ . Die Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte mögliche Reaktion  $\alpha \rightarrow \beta$  innerhalb einer infinitesimalen Zeit  $\delta t$  stattfindet, ist durch die Beziehung  $W_{\alpha\beta}\delta t$  gegeben.

Aus dieser Hypothese folgt direkt die Wahrscheinlichkeit, dass das System zum Zeitpunkt  $T$  immer noch im Zustand  $\alpha$  verweilt (Gelten 1999):

$$P(\alpha, T \geq t) = \exp(-W_{\alpha\beta}t). \quad (2.31)$$

Das bedeutet, dass die Zeit bis zur nächsten Reaktion einer Exponentialverteilung gehorcht und zudem konsistent ist mit der Mastergleichung (2.29). Die hier für chemische Kinetik beschriebene Verteilungsfunktion gilt insbesondere auch für Adsorptionsreaktionen.

Nachfolgende Algorithmusbeschreibungen beziehen sich hauptsächlich auf den oben genannten Übersichtsartikel von Jansen und kommen zum Teil in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Algorithmus zum Einsatz.

### 2.4.1 Methode der „zufälligen Wahl“

Die Bezeichnung „zufällige Wahl“ rührt daher, dass der Algorithmus das Zeitinkrement, die Art der Reaktion und den Ort der Reaktion unabhängig voneinander zufällig bestimmt. Der Algorithmus lässt sich von der Methode variabler Schrittweite (VSSM = *variable step size method*) ableiten (arxiv und Jansen 2003). An dieser Stelle wird der Algorithmus mit so genanntem *Oversampling* beschrieben. An Stelle der tatsächlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung mit der Rate

$$W = \sum_{i=1}^N W_i \quad \text{zur Bestimmung des Zeitinkrements wird die Verteilung mit maximaler Rate}$$

$$W_{\max} = \sum_{i=1}^M W_i \quad \text{verwendet, die Reaktion dann aber nur mit der Wahrscheinlichkeit } W/W_{\max}$$

akzeptiert. Die Zahl  $N$  bezeichnet in diesem Fall die möglichen Reaktionen, während  $M$  eine Zahl mit der Eigenschaft  $M > N$  ist. Für das Beispiel der Adsorption auf diskreten Gitterplätzen denke man sich  $M$  als Zahl aller Plätze, während  $N$  die freien Plätze zählt. Der Beweis für die Richtigkeit dieses Vorgehens findet sich in der elektronischen Publikation von Jansen (arxiv und Jansen 2003).

Ausgangspunkt der Simulation ist eine Anfangskonfiguration  $\alpha$  und ein Anfangszeitpunkt  $t_0$ . Für die in dieser Arbeit behandelten Simulationen ist die Anfangskonfiguration eine freie Oberfläche

zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$ . Die Raten verschiedener möglicher Reaktionstypen genügen bei der RSM der gleichen Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Der Algorithmus setzt sich aus sechs Schritten zusammen:

### 1. Initialisierung

Anfangskonfiguration  $\alpha$  und Anfangszeitpunkt  $t_0$  festlegen.

Maximale Rate  $k_{\alpha\beta} = MW_{\max}$  berechnen.

Abbruchbedingung wählen.

### 2. Reaktionszeit berechnen

Erzeugung eines Zeitintervalls  $\Delta t$ , in dem keine Reaktion stattfindet

$$\Delta t = -\frac{\ln(r)}{k_{\alpha\beta}}. \quad (2.32)$$

Für die Zufallszahl  $r$  gilt  $r \in ]0..1]$ .

### 3. Reaktionstyp wählen

Zufällige Wahl eines Reaktionstyps (falls mehrere Reaktionstypen möglich sind).

### 4. Reaktionsort wählen

Zufällige Wahl einer Position auf der Oberfläche.

### 5. Aktualisierung

Zeit aktualisieren:  $t \rightarrow t + \Delta t$ .

Bei einer möglichen Reaktion vom Typ  $i$  an dem ausgewählten Reaktionsort wird die Reaktion mit der Wahrscheinlichkeit  $W_i/W_{\max}$  ausgeführt.

Änderung der Konfiguration.

### 6. Fortsetzung

Rücksprung zu Schritt 2, wenn die Abbruchbedingung nicht erfüllt ist.

In Schritt 2 wird die Reaktionszeit mittels der Methode der inversen Funktion berechnet (Gillespie 1976, Knuth 2000). Um zu zeigen, dass diese einer Exponentialverteilung genügt, folgen wir dem Beweis von Knuth:  $r$  sei eine Zufallszahl mit  $r \in ]0..1]$  und  $T$  sei eine

Zufallsvariable mit einer Verteilungsfunktion  $F$  und einer inversen Funktion  $F^{-1}$ . Dann gilt für die Wahrscheinlichkeiten

$$P(F^{-1}(r) \leq t) = P(r \leq F(t)) = F(t) = P(T \leq t) \quad (2.33)$$

Somit hat  $T$  die gleiche Wahrscheinlichkeitsfunktion wie  $F^{-1}(r)$ . Die Übergangsrate gegeben durch  $F(T = t) = \exp(-k_{\alpha\beta}t)$  lässt sich daher durch Gleichung (2.32) erzeugen.

## 2.4.2 Methode der „ersten Reaktion“

Eine interessante Alternative zur RSM ist die *first reaction method* (FRM) (Gillespie 1976). Der Name beschreibt die grundlegende Eigenschaft des Algorithmus: Es wird die chronologisch nächste Reaktion bearbeitet. Ein Anwendungsfeld der Methode bietet sich, falls mehrere Reaktionen mit unterschiedlichen Raten durchzuführen sind. In diesem Fall werden die verschiedenen Reaktionszeiten anfangs berechnet und in Listen in chronologischer Reihenfolge sortiert. Der Algorithmus sieht folgendermaßen aus:

### 1. Initialisierung

Anfangskonfiguration  $\alpha$  und Anfangszeitpunkt  $t_0$  festlegen.

Generierung einer Liste mit allen möglichen Reaktionen und Berechnung der Zeit  $t_{\alpha\beta}$ , zu der ein entsprechendes Ereignis stattfinden kann. Für die Zeit gilt

$$t_{\alpha\beta} = t - \frac{\ln(r)}{k_{\alpha\beta}}, \quad (2.34)$$

wobei die Ratenkonstante  $k_{\alpha\beta}$  prozessabhängig ist.

Abbruchbedingung wählen.

### 2. Reaktion

Reaktion mit der kleinsten absoluten Zeit aus der Liste der Reaktionen auswählen.

Ist die Reaktion möglich, gehe zu Schritt 3, falls nicht, springe zu Schritt 4.

### 3. Aktualisierung der Konfiguration und der Liste

Konfigurationsänderung und Aktualisierung der Zeit  $t \rightarrow t_{\alpha\beta}$ .

Löschen der Reaktion aus der Liste und neue mögliche Reaktionen gemäß Gl. (2.34) einfügen.

#### **4. Aktualisierung der Liste**

Löschen der Reaktion aus der Liste.

#### **5. Fortsetzung**

Rücksprung zu Schritt 2, wenn die Abbruchbedingung nicht erfüllt ist.

Bei dieser Simulation von diskreten Ereignissen wird sowohl die Kinetik als auch die korrekte Wahrscheinlichkeit berechnet. Ein Nachteil des Algorithmus besteht in der zeitaufwendigen Sortierung der Liste nach jedem Ereignis.



### 3 FORMULIERUNG DES MODELLS

In diesem Kapitel wird kurz auf die Modellvorstellungen eingegangen, die dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Simulationsprogramm „VESAD“ zugrunde liegen. Ziel war es möglichst viele der experimentell beobachteten Phänomene, wie z.B. die Desorption von Partikeln oder das Spreiten von Liposomen, in den Programmcode zu implementieren. Um eine einfache Bedienung zu gewährleisten, verfügt das vollständig unter Delphi, Version 5.0, entwickelte Programm über eine grafische Benutzeroberfläche (GUI = *grafical user interface*). Diese ist im Anhang als Screenshot angefügt.

In Abschnitt 3.1 werden die grundlegenden Anforderungen formuliert, das Anwendungsfeld skizziert und ein Ausblick auf weitere Optionen des Simulationsprogramms gegeben.

Im darauf folgenden Abschnitt wird der Algorithmus beschrieben. Dabei tauchen neben eigenen Ideen auch die in Kapitel 2.4 vorgestellten Modelle der RSM und FRM auf. Zusätzlich zu dem Kernalgorithmus sind weitere Optionen im Programmcode implementiert, um die angeschlossenen biophysikalischen Fragestellungen zu bearbeiten. In einem Blockschaltbild wird der Algorithmus zusammenfassend dargestellt.

Abschließend werden Simulationen mit unterschiedlichen Parametern bei Aktivierung verschiedener Optionen durchgeführt und getestet, um die Korrektheit im Sinne der Aufgabenstellung zu belegen.

### 3.1 Zielsetzung

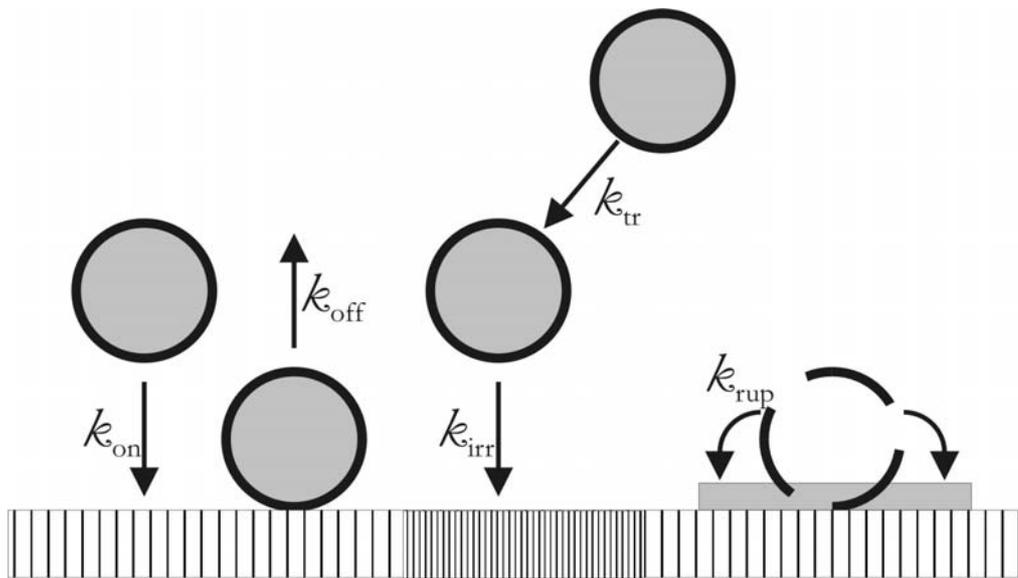
Die Grundidee des Programms VESAD besteht darin, die Adsorption von Vesikeln oder Proteinen an festkörperunterstützte Oberflächen zu simulieren. Zahlreiche experimentelle Befunde zu dieser Thematik werden in der Literatur erwähnt. Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens von Phospholipidvesikeln auf Siliziumdioxid zeigen neben der Adsorption das Spreiten der Liposomen (Keller *et al.* 2000, Reimhult *et al.* 2003). Der Spreitvorgang selbst wird kontrovers diskutiert, wobei drei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen werden. Neben dem spontanen Spreiten ist ein Prozess denkbar, bei dem das Aufplatzen durch eine bereits vorhandene Lipiddoppelschicht induziert wird. Der Betrag der Randspannung, die dem spontanen Aufplatzen entgegenwirkt, entlang des Umfangs der gespreiteten Lipiddoppelschicht ist in diesem Fall aufgrund des Kontaktes mit der vorhandenen Schicht reduziert (Seifert 1997). Der dritte Mechanismus favorisiert die Bildung größerer Vesikel durch Fusion von adhärennten Vesikeln mit nachfolgendem Aufplatzen (Zhdanov *et al.* 2000). Diese drei Prozesse unterscheiden sich aufgrund der Mechanismen in ihrer Kinetik. Wegen der Abhängigkeit von der verwendeten Oberfläche und der Zusammensetzung des Puffers, fällt es schwer generelle Vorhersagen über das Verhalten der Liposomen bei Wechselwirkung mit der Oberfläche zu treffen. Auch die Kinetik der Proteinadsorption zeigt deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung, bzw. von der Art des Bindungsmechanismus (Höök *et al.* 1998, Kastl *et al.* 2004).

Mit Hilfe von QCM Messungen ist es möglich, den zeitlichen Verlauf des Gesamtprozesses, d.h. die Überlagerung der Oberflächenreaktionen verschiedener Partikel aufzunehmen. Eine laterale Differenzierung ist jedoch nicht möglich, da die elektronisch ausgelesenen Parameter das Verhalten auf der gesamten Elektrodenfläche der QCM charakterisieren. Einen Anhaltspunkt für die räumliche Verteilung der Partikel auf der Oberfläche kann durch die Analyse von AFM Messungen gewonnen werden.

Wenn es gelingt einen Programmcode zu gestalten, der sowohl die Kinetik, als auch die räumliche Verteilung korrekt wiedergibt, ist es im Prinzip möglich zusätzlich zur Bestimmung von systemimmanenten kinetischen Konstanten klare Vorhersagen über den zeitlichen Verlauf der Messungen zu treffen. Zeitintensive Messreihen bekannter biologischer Systeme lassen sich dann vollständig simulieren (Faiß *et al.* 2004). Zur Umsetzung dieser Idee bedarf es wesentlicher Erweiterungen zum einfachen RSA Modell.

Das Adsorbat, welches je nach System aus Vesikeln, Latex Beads oder Proteinen besteht, wird durch Kugeln bzw. durch Scheiben auf der Oberfläche mit Durchmesser  $d$  dargestellt. Die

Simulationsfläche ist quadratisch mit variabler Kantenlänge und unterliegt periodischen Randbedingungen, um Randeﬀekte zu minimieren. Die Anfangskonzentration  $\rho_{\text{bulk}}$  der Partikel in Lösung ist in den Experimenten so hoch gewählt, dass die Verarmung aufgrund von Adsorption an der Oberfläche im geschlossenen Kreislauf vernachlässigt werden kann. Die kinetischen Konstanten werden vorgegeben und dem Verlauf der Messung angepasst. Neben den Ereignissen Adsorption und Desorption der RSA sind für das jeweilige Probensystem typische bzw. vermutete Prozesse implementiert und in nahezu beliebiger Kombination über so genannte *Checkboxen* verfügbar. Zeitabhängige Prozesse sind, wie in Abb. 3.1 dargestellt, mit verschiedenen kinetischen Konstanten verknüpft.



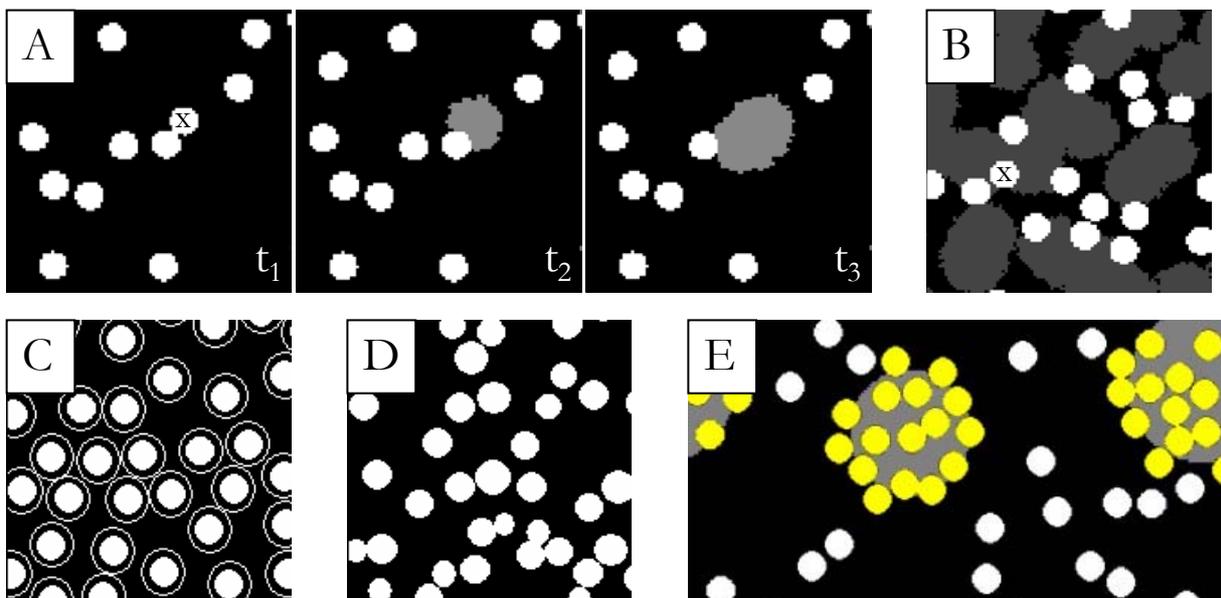
**Abb. 3.1:** Darstellung verschiedener Grenzflächenprozesse mit Benennung entsprechender kinetischer Konstanten. Über  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{irr}}$  wird die Adsorptionskinetik für heterogene Oberflächen gesteuert,  $k_{\text{off}}$  bestimmt die Desorptionsrate und  $k_{\text{tr}}$  den Transport aus dem Lösungsmittel zur Grenzschicht. Über  $k_{\text{rup}}$  kann das Spreiten von Liposomen auf der Oberfläche beeinflusst werden.

Die Abbildung zeigt zusätzlich zu den oben eingeführten Größen  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{tr}}$  eine das Spreiten von Vesikeln bestimmende Konstante  $k_{\text{rup}}$  und eine zweite Adsorptionsrate  $k_{\text{irr}}$ . Mit Hilfe von  $k_{\text{irr}}$  können heterogene Oberflächen modelliert werden. Dazu wird vor Beginn der Simulation ein durch den Benutzer festgelegter Teil der Oberfläche mit Domänen belegt. Adsorptionsversuche oberhalb der Domänen weisen dann eine andere, durch die Adsorptionsrate  $k_{\text{irr}}$  festgelegte, Kinetik auf.

Eine Übersicht der wichtigsten möglichen Optionen, wenn sie sich auch teilweise ausschließen bzw. auf unterschiedliche Systeme angewendet werden, ist in Abb. 3.2 zusammengefasst. Zu sehen sind verschiedene Ausschnitte der grafischen Ausgabe. Die Simulationsoberfläche

entspricht dem schwarzen Hintergrund, graue Flächen stellen in den Ausschnitten A bis D Lipiddoppelschichten dar und weiße, bzw. hellgraue Kreise entsprechen adsorbierten Partikeln. Nachstehend sind die entsprechenden Optionen aufgelistet:

- Spreiten von Vesikeln zu planaren Lipiddoppelschichten, Abb. 3.2 A.
- Induziertes Spreiten durch Kontakt mit einer Lipiddoppelschicht, Abb. 3.2 A.
- Sterische Hinderung des Spreitprozesses durch eine angrenzende Lipiddoppelschicht, Abb. 3.2 B.
- Negative Kooperativität durch endliche Reichweite von abstoßenden Kräften, auch Corona Effekt<sup>4</sup> genannt, Abb. 3.2 C.
- Gaußsche Radiusverteilung der Partikel, Abb. 3.2 D.
- Heterogene Oberflächen mit Domänen, die die Adsorption mit einer anderen kinetischen Konstanten  $k_{\text{irr}}$  zulassen, Abb. 3.2 E.



**Abb. 3.2:** Teilausschnitte der Simulationsfläche in Folge der Aktivierung verschiedener Optionen zur Steuerung der Oberflächenprozesse. A Spreiten von Vesikel x zur Zeit  $t_2$  führt durch induziertes Spreiten zum Spreiten von angrenzenden Vesikeln. B Vesikel x kann aufgrund sterischer Hinderung (angrenzende Lipiddoppelschicht) nicht spreiten. C Vesikel erreichen durch elektrische Abstoßung (dargestellt durch Kreise) eine geringere Packungsdichte. D Radien der adsorbierenden Vesikel genügen einer Gaußverteilung. E Eine heterogene Oberfläche (Domänen sind grau unterlegt) mit unterschiedlichen Bindungskonstanten führt zur Bildung von Partikelanhäufungen mit schnellerer Anbindung als auf der gewöhnlichen Oberfläche.

<sup>4</sup> Der Corona Effekt berücksichtigt z.B. die elektrostatische Abstoßung von Partikeln gleicher Ladung und führt zu einer effektiven Radiusvergrößerung.

## 3.2 Algorithmusbeschreibung

Zunächst wird der Algorithmus für das Modell der irreversiblen RSA mit Berücksichtigung des Massentransports beschrieben. Im Prinzip gleicht der Algorithmus der oben genannten RSM und setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen:

### 1. Initialisierung

Oberfläche leeren und Simulationszeit  $T = 0$  setzen.

Simulationsendzeitpunkt  $T_{\text{Ende}}$  wählen.

### 2. Reaktionsort wählen

Zufällige Wahl einer Position  $x,y$  auf der Oberfläche.

### 3. Reaktionszeit berechnen

Inkrement der Zeit um

$$\Delta t = \frac{-\ln(r)}{A\rho_{\text{bulk}}k_{\text{on}}} \quad (3.1)$$

mit einer Zufallszahl  $r \in ]0..1]$ , der Simulationsfläche  $A$ , der Partikelanfangskonzentration  $\rho_{\text{bulk}}$  und der kinetischen Konstanten  $k_{\text{on}}$ .

### 4. Adsorptionsversuch

Adsorption, wenn die Oberfläche innerhalb des Radius  $a$  des Partikels frei ist.

Bei Erfolg wird die Zeit um

$$\Delta t = \frac{1}{k_{\text{tr}}A\rho_{\text{bulk}}} \quad (3.2)$$

inkrementiert.

### 5. Fortsetzung

Rücksprung zu Schritt 2 bis zum Erreichen des Simulationsendes.

Die Wahl der Reaktion nach der RSM entfällt, da das irreversible Modell nur die Adsorption ermöglicht. Durch das Zeitinkrement (3.1) gehorchen die Zeiten einer Exponentialverteilung.

Der Faktor  $1/A$  verringert die zeitlichen Abstände der Ereignisse und erhöht somit die Adsorptionsrate. Die Normierung auf die gesamte Simulationsfläche entspricht der oben beschriebenen Methode des *Oversampling*, wobei die ASF in diesem Fall für die korrekte Adsorptionswahrscheinlichkeit sorgt. Die Anzahl der Partikel in Lösung  $\rho_{\text{bulk}}$  im Nenner berücksichtigt, dass die Zahl der Adsorptionsversuche pro Zeiteinheit proportional zur Partikeldichte ist.

Um zu zeigen, dass der Algorithmus die Kinetik der irreversiblen RSA, beschrieben durch Gl. (2.21) (ohne Desorptionsterm), erfüllt, betrachten wir die Änderung der Belegung nach  $N$  Adsorptionsversuchen. Für diese gilt

$$\Delta\Theta = \frac{N\pi a^2 \langle \Phi(\Theta) \rangle}{A}, \quad (3.3)$$

wobei  $\langle \Phi(\Theta) \rangle$  eine über die Zahl der Versuche gemittelte ASF bezeichnet. Die Simulationszeit schreitet dabei um

$$\Delta t = \sum_{i=1}^N \left( \frac{-\ln(r)}{k_{\text{on}} A \rho_{\text{bulk}}} + \frac{H(A_t - A_p)}{k_{\text{tr}} A \rho_{\text{bulk}}} \right) = \frac{N}{k_{\text{on}} A \rho_{\text{bulk}}} + \frac{N \langle \Phi(\Theta) \rangle}{k_{\text{tr}} A \rho_{\text{bulk}}} \quad (3.4)$$

voran. Der erste Term resultiert aus der Exponentialverteilung der Rate mit Mittelwert  $k_{\text{on}}$ . Der zweite Term enthält eine Sprungfunktion  $H(A_t - A_p)$ , mit

$$H(A_t - A_p) = \begin{cases} 1 & \text{für } A_t \geq A_p \\ 0 & \text{für } A_t < A_p \end{cases}, \quad (3.5)$$

wobei  $A_t$  die Fläche bezeichnet, auf der der Adsorptionsversuch stattfindet, und  $A_p$  die Fläche des Partikels. Daraus folgt, dass nur erfolgreiche Adsorptionsversuche zur Summe beitragen, deren Anzahl gleich  $N \langle \Phi(\Theta) \rangle$  ist. Bilden wir nun den Differenzenquotienten, so gelangen wir zu

$$\frac{\Delta\Theta}{\Delta t} = \frac{\pi a^2 \langle \Phi(\Theta) \rangle}{\frac{1}{k_{\text{on}} \rho_{\text{bulk}}} + \frac{\langle \Phi(\Theta) \rangle}{k_{\text{tr}} \rho_{\text{bulk}}}} = \frac{k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \langle \Phi(\Theta) \rangle}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{tr}}} \langle \Phi(\Theta) \rangle} \quad (3.6)$$

in Übereinstimmung mit der Differentialgleichung (2.21).

In den folgenden Abschnitten wird die Implementierung verschiedener Optionen in den

Algorithmus beschrieben, bevor anhand eines Flussdiagramms der Gesamtablauf erklärt wird.

### 3.2.1 Desorption von Partikeln

Wird die Desorption mit einbezogen, so muss der Algorithmus leicht modifiziert werden. Dazu wird in dieser Arbeit eine Kombination der RSM und der FRM verwendet. Den adsorbierten Partikeln werden exponentialverteilte Zeiten zugewiesen, nach denen sie von der Oberfläche desorbieren sollen. Diese Zeiten werden chronologisch sortiert und in einer Liste gespeichert. Vor der Wahl einer Position auf der Oberfläche für einen Adsorptionsversuch (2. Schritt im oben aufgeführten Algorithmus) wird die Simulationszeit  $T_{\text{sim}}$  mit der ersten Desorptionszeit  $t_{\text{des}}$  der Liste verglichen. Gilt  $T_{\text{sim}} > t_{\text{des}}$ , so desorbiert das entsprechende Partikel. Der Fehler, der dadurch auftritt, dass ein Partikel, welches eigentlich schon desorbiert ist, die Oberfläche blockiert, lässt sich einfach abschätzen: Die Anzahl der Fehler  $N_{\text{Fehler}}$  in einer Simulation für diesen Prozess muss zeitlich proportional zur Simulationszeit, zur Adsorptionsrate, zur Zeit eines Adsorptionsprozesses und zur reziproken Verweildauer des desorbierenden Partikels sein, räumlich ist sie proportional zur Ausschlussfläche des Partikels und antiproportional zur Fläche. Somit ergibt sich

$$N_{\text{Fehler}} \approx T_{\text{sim}} \frac{1}{k_{\text{on}} A \rho_{\text{bulk}}} \frac{k_{\text{on}} A \rho_{\text{bulk}}}{1/k_{\text{off}}} \frac{\pi d^2}{A} = k_{\text{off}} T_{\text{sim}} \frac{\pi d^2}{A}. \quad (3.7)$$

Für gewöhnliche Parameter ist dieser Wert viel kleiner als 1 und Ereignisse dieser Art können vernachlässigt werden. Nach Ende der Simulation werden die Ereignisse zeitlich sortiert.

Zusätzlich zur zeitlich induzierten Desorption ist es möglich alle in der Liste verbliebenen Partikel am Ende der voreingestellten Simulationszeit gemäß ihrer Desorptionszeit zu entfernen. Dies entspricht einem Spülvorgang der Messzelle ohne Partikel in Lösung, wobei Readsorptionsprozesse nicht berücksichtigt werden..

### 3.2.2 Spreiten von Liposomen

Das Spreiten von Vesikeln, damit ist die Bildung von planaren Lipiddoppelschichten gemeint, ist auf die gleiche Weise wie die Desorption über eine chronologisch sortierte Liste in den Algorithmus implementiert. Der Spreitprozess findet auf einem Gitter statt, wobei die Anzahl an Gitterplätzen über einen Genauigkeitsfaktor  $\xi$  mit  $\xi \in [1..100]$  festgelegt werden kann. Die Zahl

der Gitterplätze berechnet sich zu  $N_{\text{GP}} = \xi^2 A / d^2$ . Die Oberfläche des Vesikels  $A_V = 4\pi a^2$  spreitet unter Erhalt der Fläche über einen so genannten *random walk*<sup>5</sup> Prozess auf der Simulationsfläche zu einer Lipiddoppelschicht bestehend aus Segmenten, deren Anzahl näherungsweise über die Beziehung  $N_s = \pi\xi^2$  festgelegt ist. Im Experiment beobachtbare Multischichten, die durch die Überlagerung von Lipiddoppelschichten entstehen, werden in diesem Modell durch Entfernung überlappender Segmente wie einfache Lipiddoppelschichten behandelt.

Neben dem zeitlich ausgelösten Spreiten besteht auch die Möglichkeit den Spreitvorgang durch Lipiddoppelschichten zu induzieren bzw. zu inhibieren. Induziertes Spreiten wird ausgelöst, wenn ein Lipidsegment einen intakten Vesikel berührt. Inhibiertes Spreiten hingegen überprüft die angrenzenden Gitterplätze eines Vesikels, welcher zeitlich aktiviert aufplatzen soll. Der Anwender legt einen prozentualen Grenzwert für die Belegung in der Umgebung des Vesikels fest, oberhalb dessen das Spreiten inhibiert ist (s. a. Abb. 3.2 A, B).

### 3.2.3 Heterogene Oberflächen

Häufig bilden Doppelschichten bestehend aus verschiedenen Lipiden nach dem Spreiten Domänen unterschiedlicher Zusammensetzung aus, die die Adsorption bzw. die Bindungskonstante von Biomolekülen signifikant beeinflussen können. Um diese Systeme zu simulieren, ist in dem Programm eine Option implementiert, mit der Domänen auf der Oberfläche erzeugt werden können. Die Zahl und die Gesamtfläche dieser Bereiche werden vor der Simulation gewählt. Auf das Gitter, welches die Simulationsfläche repräsentiert, werden nach dem RSA Modell zusammenhängende kreisförmige Bereiche gekennzeichnet (s. Abb. 3.2 E). Die Adsorption auf diesen Domänen ist irreversibel mit der Adsorptionsrate  $k_{\text{irr}}$ , während der Rest der Simulationsfläche dem Modell der reversiblen RSA mit der Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  gehorcht.

---

<sup>5</sup> Der *random walk* besteht aus einer zufälligen Aneinanderreihung von Schritten. In diesem Algorithmus wird das erste Lipiddoppelschichtsegment auf die Position des ehemaligen Zentrums des Vesikels gesetzt. Weitere Segmente starten in diesem Punkt und werden zufällig zu einem der vier angrenzenden Gitterplätze bewegt. Ist dieser frei, wird das Segment dort platziert, ist er bereits mit einem Segment belegt, wird der Weg von dort fortgesetzt, befindet sich dort jedoch ein anderes Partikel, wird der letzte Schritt rückgängig gemacht.

### 3.2.4 Variation des Partikelradius

Die Durchmesser biologischer Proben variieren in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren. Die Durchmesser, der im Rahmen dieser Arbeit mit der Extrusionsmethode hergestellten unilamellaren Vesikel, gehorchen einer Gaußverteilung, wie dynamische Lichtstreuungsmessungen zeigen. Eine Gaußverteilung lässt sich rechnerisch mit Hilfe der so genannten „Zwölferregel“ erzeugen. Dazu wird die Summe  $S_G$  von jeweils zwölf Zufallszahlen, die über dem Intervall  $[0..1]$  gleichverteilt sind, gebildet. Diese Summe hat den Mittelwert  $\overline{S_G} = 6$  und die Standardabweichung  $\sigma_{S_G} = 1$ . Eine beliebige Gaußverteilung ergibt sich nun durch Subtraktion des Mittelwertes, Multiplikation der gewünschten Standardabweichung und Addition des neuen Mittelwertes.

Ein anderer Effekt, der Einfluss auf den Radius der Partikel hat, ist der oben erwähnte Corona Effekt. Für diesen Fall wird die Simulation mit vergrößertem Radius  $a^* = a + b_s$  durchgeführt, wobei der Wert von  $b_s$  am Anfang der Simulation festgelegt wird.

### 3.2.5 Algorithmus

Das untenstehende Flussdiagramm beschreibt den Kern des Algorithmus mit allen Optionen, die in der Wiederholungsschleife relevant sind. Optionen, die am Anfang der Simulation gesetzt werden, gehen in die Initialisierungsroutine ein und sind im Diagramm nicht dargestellt. Nach Wählen der Abbruchbedingung wird die Simulationszeit auf Null gesetzt. Die Hauptschleife wird so oft wiederholt, bis die Abbruchzeit erreicht ist. Am Anfang jedes Durchlaufs werden Listen abgefragt, in denen Desorptions- bzw. Spreitereignisse gespeichert sind. Überschreitet die Simulationszeit Ereignisse der jeweiligen Liste, so werden diese chronologisch ausgeführt, beginnend mit dem ersten Ereignis zur Zeit  $t_{\min}$ . Falls das Ereignis eine Desorption ist, wird die Zahl der desorbierten Partikel  $N_D$  inkrementiert. Die Protokollierung der desorbierten Partikel ist notwendig, um die Kinetik des Massentransports nicht zu verfälschen. Dieser wird wieder über Gl. (3.2) berechnet. Allerdings müssen Desorptionereignisse berücksichtigt werden. Anschaulich gesprochen werden sich Partikel, die schon adsorbiert waren nach der Desorption in einer Grenzschicht aufhalten und benötigen keine zusätzliche Transportzeit, um zur Oberfläche zu gelangen. Der Extremfall liegt vor, wenn sich die Belegung im Gleichgewicht befindet. In diesem



gemäß ihrer kinetischen Konstanten zugewiesen und anschließend verglichen. Das zuerst auftretende Ereignis wird in die entsprechende Liste einsortiert, das andere verworfen.

Sind Domänen auf der Oberfläche vorhanden, so genügt der Algorithmus der FRM. Die Simulationszeit, die aktuelle „reversible“ und die aktuelle „irreversible“ Zeit werden protokolliert. Zunächst werden die Zeiten des nächstmöglichen Adsorptionsversuchs auf reversibler Adsorptionsfläche und auf Domänenbereichen aus den entsprechenden Listen  $L_{\text{rev}}$  und  $L_{\text{irr}}$  miteinander verglichen, falls beide Listen Elemente enthalten. Dazu wird jeweils zu der Zeit des ersten Elementes der Liste die Transportzeit addiert, falls eine Adsorption möglich ist oder sich keine Partikel in der Grenzschicht befinden ( $N_D = 0$ ). Das zeitlich nächste Ereignis wird ausgewählt und der Partikel an die entsprechende Position auf der Oberfläche gesetzt bzw. verworfen. Anschließend wird die Simulationszeit auf die Zeit des ausgewählten Ereignisses gesetzt und dieses aus der Liste gelöscht. Bei einer erfolgreichen Adsorption muss die Zahl  $N_D$  der in der Grenzschicht vorhandenen Partikel ausgelesen werden. Ist diese gleich Null, so werden die Elemente der betroffenen Liste um die Transportzeit inkrementiert, andernfalls wird die Zahl der Partikel in der Grenzschicht um eins erniedrigt. Ist der Versuch auf reversibler Simulationsfläche erfolgreich, wird zusätzlich wieder eine Ereignisliste gemäß oben genannter Regel aufgefüllt.

Ist mindestens eine der beiden Adsorptionslisten leer, wird die Oberfläche an der vorher bestimmten Position  $(x,y)$  untersucht. Befindet sich innerhalb des Partikeldurchmessers eine Domäne, wird die Position der Liste irreversibler Adsorptionsversuche zugeordnet, wobei die entsprechende Zeit die aktuelle irreversible Zeit zuzüglich der exponentialverteilten Adsorptionszeit ist, andernfalls wird die Position der reversiblen Liste mit der entsprechenden Zeit zugeordnet.

### 3.3 Test des Algorithmus

Aus der Beschreibung des Algorithmus geht hervor, dass viele Prozesse des Simulationsprogramms über Zufallszahlen gesteuert werden. Deshalb ist es unerlässlich über eine große Anzahl von zufälligen oder pseudozufälligen Zahlen zu verfügen. Eine Pseudozufallszahl  $r_{n+1}$  lässt sich rekursiv mit Hilfe eines kongruenten Generators der Form

$$r_{n+1} = (a_1 r_n + a_2) \bmod a_3 \quad (3.8)$$

erzeugen (Press *et al.* 1992). Bei geeigneter Wahl positiver natürlicher Zahlen  $a_1$ ,  $a_2$  und  $a_3$  ergibt sich dadurch eine maximale Periodenlänge von  $a_3$ . Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Zufallszahlengenerator genutzt, der eine Kombination von drei linear kongruenten Generatoren darstellt, die so gewählt sind, dass die Periodenlänge der Pseudozufallszahlensequenz ca.  $3.5 \cdot 10^{17}$  beträgt. Dieser Generator ist in der sogenannten *SDL Component Suite* Version 7 für Delphi enthalten.

Neben dem Zufallszahlengenerator, der bei zu geringer Periodenlänge zu fehlerhafter Statistik führt, müssen auch Programmierfehler ausgeschlossen werden. Die folgenden zwei Unterabschnitte widmen sich dem Test des Simulationsprogramms hinsichtlich der Belegung und der Kinetik.

#### 3.3.1 Test der Belegung

Ein Zufallszahlengenerator mit zu geringer Periodenlänge führt dazu, dass im irreversiblen RSA Modell das *jamming limit* nicht erreicht wird, da nicht jeder Punkt der Simulationsfläche durch Pseudozufallszahlen abgefragt wird. Ein zweckmäßiger Test, ob die Periodenlänge ausreicht, besteht darin, die Belegung für große Simulationszeiten zu analysieren. Zum einen muss das *jamming limit* erreicht werden, zum anderen soll gezeigt werden, dass die zeitliche Entwicklung der Belegung nahe dem Grenzwert das Federsche Gesetz

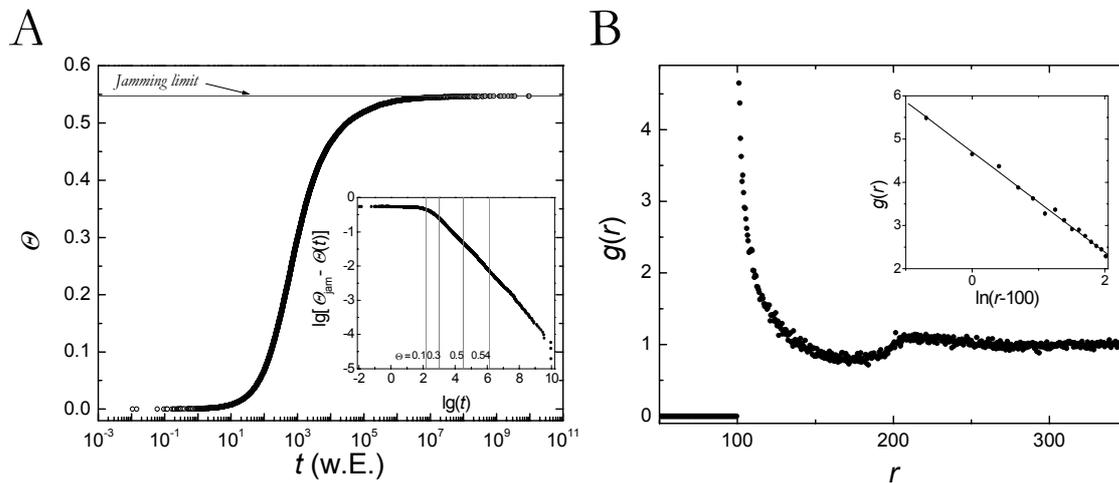
$$\Theta_{\text{jam}} - \Theta(t) = \frac{c}{t^p} \quad (3.9)$$

erfüllt (Swendsen 1981). Hierin bezeichnet  $c$  eine Konstante und  $p = 1/D_n$  ist der Exponent für Hyperkugeln in  $D_n$  Dimensionen (Feder 1980, Hinrichsen *et al.* 1986). Für das irreversible RSA Modell wird daher  $p = 1/2$  erwartet (Schaaf *et al.* 1998). Zusätzlich zur prozentualen Belegung

der Oberfläche gibt die Paarkorrelationsfunktion  $g(r)$  Aufschluss über die Verteilung der Partikel auf der Oberfläche. Die Paarkorrelationsfunktion  $g(r)$  ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Scheiben pro Einheitsfläche in einem Abstand  $r$  von einer Scheibe im Ursprung, normalisiert auf das *jamming limit*, so dass  $g(\infty) = 1$  gilt (Wang 1994). Für das irreversible RSA Modell ist  $g(r)$  für Abstände  $r = d$  (mit Scheibendurchmesser  $d$ ) unstetig und divergiert für  $r \rightarrow d$ . Es gilt

$$g(r) = c_1 \ln(r-d) + c_2 \quad (3.10)$$

(Swendsen 1981). Zur Verifikation der oben genannten Beziehungen wurden fünf Langzeitsimulationen mit Scheibendurchmesser  $d = 100$  nm auf einer  $4 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup> großen Simulationsfläche durchgeführt. Abb. 3.4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Belegung.



**Abb. 3.4:** A Belegung als Funktion der Zeit in willkürlichen Einheiten in halblogarithmischer Auftragung. Der Einsatz zeigt die Gültigkeit der Federschen Beziehung (s. Text). B Typischer Verlauf der Paarkorrelationsfunktion für das Modell der zweidimensionalen irreversiblen RSA in der Nähe des *jamming limits*. Der Ausschnitt zeigt das logarithmisch divergente Verhalten für  $r \rightarrow d$ . Simulationsparameter:  $A = 4 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>,  $d = 100$  nm.

In Abb. 3.4 A wird die Kinetik des Prozesses dargestellt. Der Mittelwert der Simulationen ergibt für die Belegung  $\Theta^{\text{sim}} = 0.5469 \pm 0.0005$ . Da der Algorithmus nicht für hohe Belegungen optimiert ist, wurde die Simulation nach endlicher Rechenzeit abgebrochen. Zur Ermittlung des *jamming limits* ist es notwendig nachträglich die wenigen verbliebenen freien Stellen aufzufüllen. Dies geschieht mit Hilfe eines Voronoi-Diagramms und wird weiter unten in diesem Abschnitt

erklärt. Nach Auffüllen der freien Plätze ergibt sich für den Grenzwert  $\Theta_{\text{jam}}^{\text{sim}} = 0.5471 \pm 0.0005$  in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Wang 1994) und ist in dem Graphen als horizontale Linie eingezeichnet.

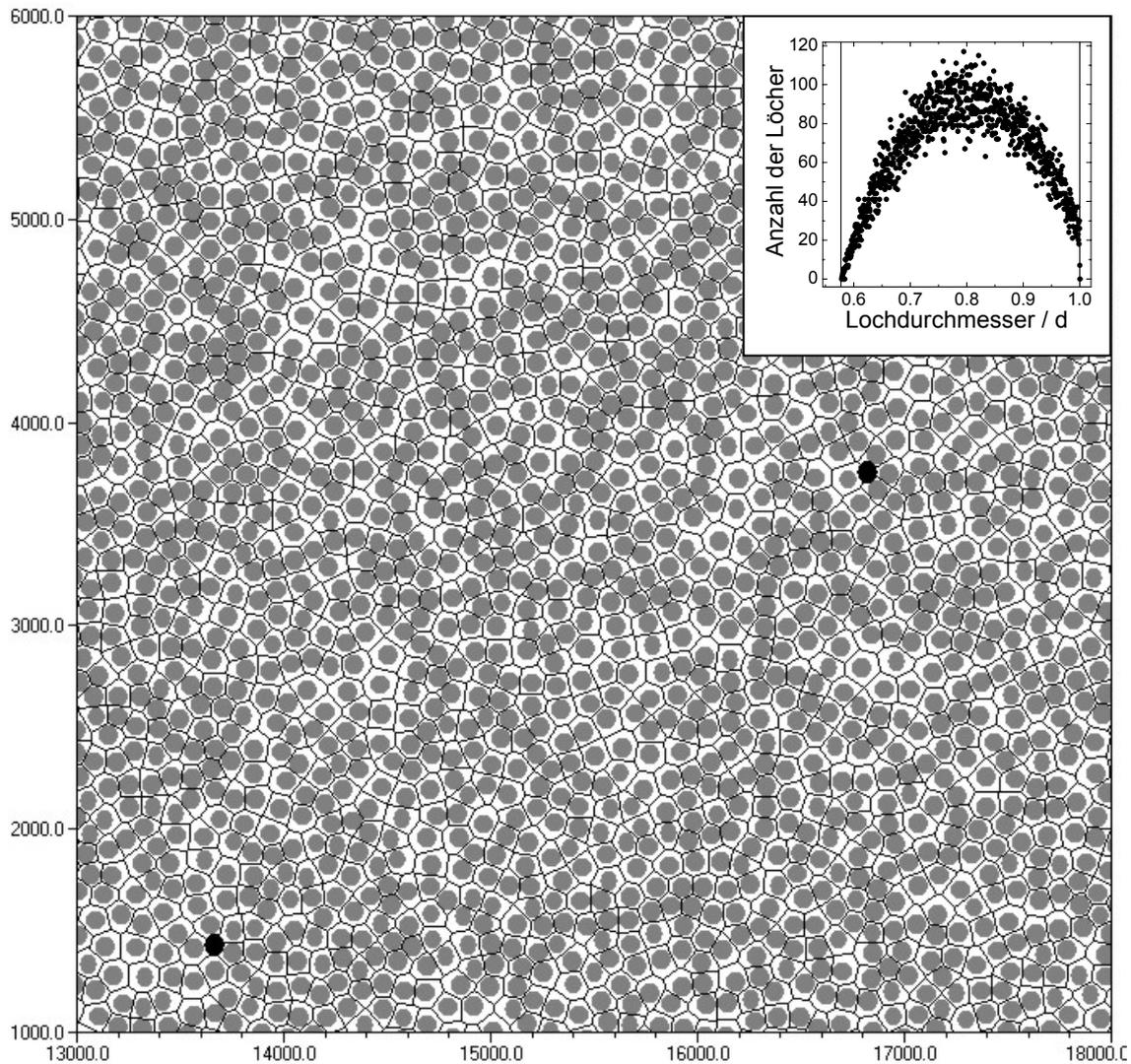
Der Einsatz in Grafik A ist mit vertikalen Linien versehen, die die Belegung anzeigen. Aus der Steigung im Bereich  $\Theta = 0.5..0.54$  wird der Parameter  $p$  in Gleichung (3.9) zu  $p^{\text{sim}} = 0.505 \pm 0.001$  bestimmt, ebenfalls in guter Übereinstimmung mit der Erwartung  $p = 1/2$ . Teilbild B zeigt die Paarkorrelationsfunktion. Dem Bereich  $r < d$ , in dem sich keine weitere Scheibe befinden kann, schließt sich das typisch divergente Verhalten an. Der Bildausschnitt zeigt die natürlich logarithmische Divergenz für  $r \rightarrow d$ . Für  $r > 2d$  gilt näherungsweise  $g(r) = 1$  (Román *et al.* 1997). Die Abweichung von 1 kann mit der geringen Partikelzahl im Vergleich zu unendlich erklärt werden. Wie bereits oben angedeutet ist eine Analyse der Belegung der Simulationsfläche mit Hilfe eines Voronoi-Diagramms möglich (Hinrichsen *et al.* 1986). Dieses ist definiert als Unterteilung einer Ebene mit  $n$  Punkten, den Partikeln, in  $n$  konvexe Polygone, wobei jedes Polygon genau ein Partikel enthält und jeder Punkt innerhalb des Polygons näher zu seinem zentralen Partikel ist, als zu einem anderen. Die Knoten des Voronoi-Diagramms, auch Vertices genannt, haben daher von allen benachbarten Partikeln einen größeren Abstand als die entsprechenden Kanten.

In Abb. 3.5 ist das Voronoi-Diagramm eines Teils der Simulationsfläche mitsamt den adsorbierten Partikeln dargestellt, welches mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Programms „Voronoi-Calculator“ berechnet wurde (siehe Anhang).

Wenn nach endlich langer Simulationszeit nahe des *jamming limits* noch Adsorptionsplätze frei sind, so ist dies nur auf den Knoten möglich. Die Knoten werden daher im Folgenden Löcher genannt. Der Durchmesser der Löcher ist definiert als der kleinste Abstand zu den angrenzenden Partikeln. Ist dieser größer als der Partikeldurchmesser, so ist eine Adsorption möglich. Diese Plätze sind durch schwarze Kreise in der Abbildung dargestellt. Der minimale Durchmesser eines Lochs ergibt sich, wenn drei Partikel so angeordnet sind, dass sie ein gleichseitiges Dreieck bilden. Der Lochdurchmesser dividiert durch den Partikeldurchmesser beträgt aus sterischen Gründen für diesen Fall  $1/\sqrt{3}$ <sup>6</sup>. Der Einsatz oben rechts zeigt ein Histogramm der Größenverteilung der Löcher. Das minimale Verhältnis von Loch- zu Partikeldurchmesser ist links im Graphen als vertikale schwarze Linie eingezeichnet und bildet die untere Schranke der Größenverteilung.

---

<sup>6</sup> Dieser Wert entspricht dem Abstand des Schwerpunktes von den Eckpunkten eines gleichseitigen Dreiecks.

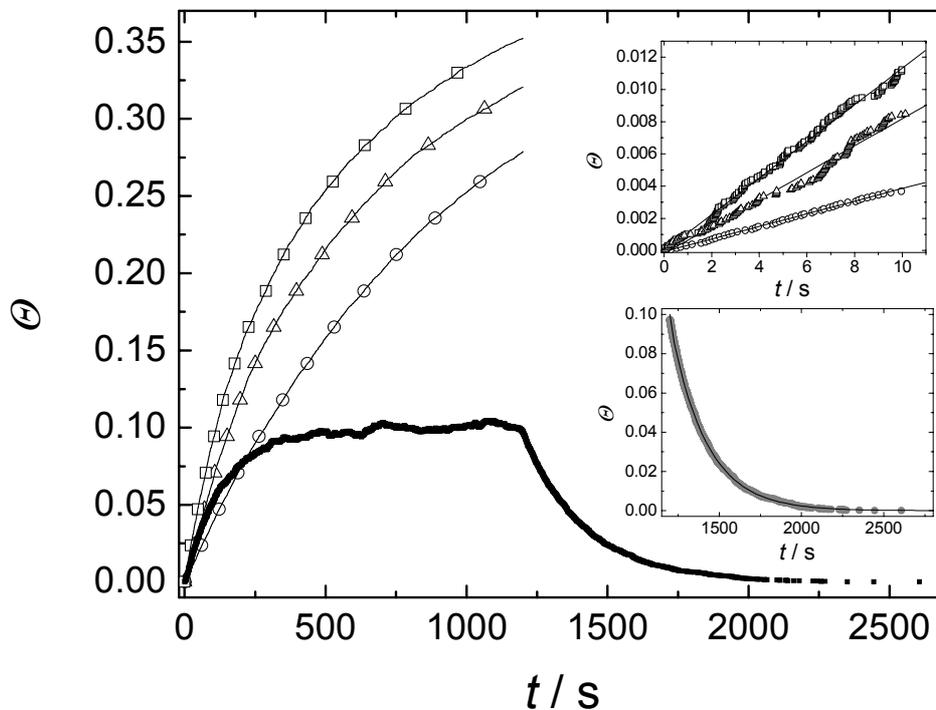


**Abb. 3.5:** Voronoi-Diagramm eines Ausschnitts der Simulationsfläche bei hoher Belegung nahe des *jamming limits*. Zusätzlich zu den Kanten und Vertizes des Diagramms sind die simulierten Partikel (●) und Löcher (●) eingezeichnet. Das Histogramm im Einsatz zeigt die Anzahl der Löcher der gesamten Simulationsfläche aufgetragen gegen den auf den Partikeldurchmesser normierten Durchmesser des Lochs.

Die Anzahl der Löcher gehorcht annähernd einer Gaußverteilung, die rechtsseitig abgeschnitten wird. Dieses Verhalten ist typisch für das *jamming limit*, da im Idealfall keine Plätze mit Durchmesser größer als Partikeldurchmesser mehr vorhanden sind. Die rechte schwarze Linie kennzeichnet den Fall, in dem der Lochdurchmesser gleich dem Partikeldurchmesser ist.

### 3.3.2 Test der Kinetik

Zur Überprüfung der Kinetik werden verschiedene Optionen des Algorithmus, die den zeitlichen Verlauf der Belegung beeinflussen, aktiviert. Um nichtlineare Phänomene durch den Einfluss der ASF bei höherer Belegung nicht berücksichtigen zu müssen, wird die Steigung zu Beginn der Simulation mit berechneten Werten, die sich durch Einsetzen in Gleichung (2.21) ergeben, verglichen. Um den Fehler zu minimieren, muss die Steigung für ein großes Ensemble von simulierten zeitlichen Verläufen ermittelt und durch lineare Regression angepasst werden.



**Abb. 3.6:** Belegungsgrad aufgetragen gegen die Zeit für verschiedene Adsorptionsmodelle. (□) Irreversibles RSA Modell bei heterogener Oberfläche, mit  $k_{\text{on}}=10^{-7}$  m/s auf 75% der Fläche,  $k_{\text{irr}}=3 \cdot 10^{-7}$  m/s auf 25% der Fläche. (Δ) Irreversibles RSA Modell, mit  $k_{\text{on}}=10^{-7}$  m/s. (○) Irreversibles RSA Modell mit Berücksichtigung des Transport,  $k_{\text{on}}=10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{tr}}=10^{-7}$  m/s. (●) Reversibles RSA Modell, am Ende der Simulation wird die Oberfläche gespült,  $k_{\text{on}}=10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{off}}=0.005$  s<sup>-1</sup>. Für die ersten drei Modelle wird die Steigung im Bereich  $t = 0..10$  s linear angepasst. Ein vergrößerter Ausschnitt ist rechts oben dargestellt. Darunter befindet sich die Anpassung der exponentiellen Abnahme von  $\Theta$  für das Modell reversibler RSA. Weitere Parameter:  $A=10^{-10}$  m<sup>2</sup>,  $d = 100$  nm,  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18}$  m<sup>-3</sup>.

Dazu werden für drei relevante Modelle, die irreversible RSA mit und ohne Transport und die

irreversible RSA auf heterogener Oberfläche jeweils 5000 Simulationen durchgeführt und anschließend ausgewertet. Simulationen nach dem Modell der reversiblen RSA liefern aufgrund der Desorptionsereignisse zu große Datenmengen und werden daher nur exemplarisch behandelt. Abb. 3.6 zeigt zeitliche Verläufe der Belegungsgrade dieser Modelle und in dem Einsatz oben rechts die Ergebnisse der linearen Anpassung.

Für die irreversiblen Modelle wird die Anfangssteigung  $m_{\text{fit}}$  im Bereich  $t = 0..10$  s, das entspricht bei diesen Werten Belegungen bis zu ca. 1% (s. Ausschnitt oben rechts in Abb. 3.6), linear angepasst und mit der Steigung  $m_{\text{theo}}$ , die sich aus DGL (2.21) ergibt, verglichen. Die theoretischen Werte ergeben sich unter der Annahme, dass für die ASF  $\Phi(\Theta) = 1$  gilt. Die kinetische Konstante muss daher nur mit der Partikelfläche  $\pi a^2$  und der Teilchendichte in der Lösung multipliziert werden. In der Berechnung für das Modell der heterogenen Oberfläche müssen die Adsorptionsraten gemäß dem prozentualen Anteil der Domänen berechnet werden. Das bedeutet für den dargestellten Verlauf, dass sich für die Adsorptionsrate  $k_{\text{Ads}} = 0.75k_{\text{on}} + 0.25k_{\text{irr}} = 1.5 \cdot 10^{-7}$  m/s ergibt.

Der Verlauf der Belegung der reversiblen RSA ist in der Abbildung exemplarisch dargestellt. Die geringere Anfangssteigung aufgrund der Desorption gegenüber dem einfachen Fall der irreversiblen RSA ist gut zu erkennen. Auch der Abfall durch Desorption reversibel adsorbierter Partikel zu Beginn des simulierten Spülvorgangs nach 20 Minuten ist sichtbar. Eine Anpassung dieses Verlaufs liefert eine einfache Exponentialfunktion mit der vorgegebenen Desorptionsrate  $k_{\text{off}}$  (siehe Bildausschnitt unten rechts in Abb. 3.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefasst und zeigen gute Übereinstimmung zwischen Simulationen und Theorie.

**Tab. 3.1:** Anfangssteigung der Adsorptionskinetik in Abhängigkeit des Modells und der Simulationsparameter. Vergleich der nach Formel (2.21) berechneten Steigung  $m_{\text{theo}}$  mit der Steigung  $m_{\text{fit}}$ , die sich aus der Anpassung von jeweils 5000 Simulationen ergibt.

Modell	$k_{\text{on}} / \text{m/s}$	$k_{\text{tr}} / \text{m/s}$	$k_{\text{irr}} / \text{m/s}$	$m_{\text{theo}} / \text{s}^{-1}$	$m_{\text{fit}} / \text{s}^{-1}$
Irr. RSA	$10^{-7}$	10000	---	$7.85 \cdot 10^{-4}$	$(7.7 \pm 0.8) \cdot 10^{-4}$
Irr. RSA mit Transport	$10^{-7}$	$10^{-7}$	---	$3.93 \cdot 10^{-4}$	$(3.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$
Irr. RSA auf heterog. Fläche*	$10^{-7}$	10000	$3 \cdot 10^{-7}$	$1.18 \cdot 10^{-3}$	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$

\*25% der Oberfläche sind mit Domänen belegt, deren Wechselwirkung mit Partikeln durch  $k_{\text{irr}}$  beschrieben wird.



## 4 MESSMETHODEN

Die den Simulationen zugrunde liegenden Probensysteme sind im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Quarzmikrowaage-Technik untersucht worden. Um neben der Anbindungskinetik und der integralen Belegung auch ein örtlich aufgelöstes Bild von der Verteilung der Partikel auf der Oberfläche zu erlangen, sind ergänzend teilweise rasterkraftmikroskopische in situ Messungen durchgeführt worden. Für diese Untersuchungen standen zwei Rasterkraftmikroskope (Dimension 3100, Veeco; MFP 3d, Asylum Research) zur Verfügung. Eine kurze Abhandlung der Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie findet sich in Abschnitt 4.2. Ausführlicher wird auf die weniger bekannte Quarzmikrowaage-Technik im folgenden Abschnitt eingegangen, da neben der reinen Anwendung auch viele Konstruktions- und Programmierarbeiten zur Optimierung der vorhandenen Messsysteme im Rahmen meiner Tätigkeit notwendig waren.

Quarzmikrowaagemessungen sind mit verschiedenen Aufbauten durchgeführt worden. Die elektronischen Größen der Quarzmikrowaage sind für das Modellsystem der Latex Beads mit Hilfe eines Netzwerkanalysators (8712ET, Agilent) ausgelesen worden. Die dazu notwendige Software wurde von Prof. D. Johannsmann (Technische Universität Clausthal) zur Verfügung gestellt. Messungen an Phospholipidvesikeln wurden hauptsächlich mit einem Phase-Lock-Oszillator-Schaltkreis (PLO-10, Maxtek Inc.) durchgeführt und mit Hilfe eines selbst erstellten LabView Programms ausgelesen. Die Membran-Membran Wechselwirkungen über das Protein Annexin A1 wurden von K. Kastl in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Steinem (Universität Regensburg) mit Hilfe der D-QCM durchgeführt (Janshoff 1997, Kastl *et al.* 2004).

Zuletzt wird im Rahmen dieses Kapitels noch auf die Impedanzspektroskopie eingegangen, die hauptsächlich zur Kontrolle der *self-assembly*-Oberflächen eingesetzt wurde.

## 4.1 Quarzmikrowaage-Technik

Die Quarzmikrowaage-Technik beruht auf der Änderung der Resonanzfrequenz eines zu Dickenschwingungen angeregten Schwingquarzes bei Massenbeladung. Da Frequenzänderungen sehr genau ausgelesen werden können, resultiert daraus eine empfindliche Messmethode zu Wägung dünner Schichten, die unter anderem zur Schichtdickenkontrolle in Vakuumaufdampfanlagen eingesetzt wird. In linearer Näherung ergibt sich nach Sauerbrey für die Grundschwingung<sup>7</sup> des Quarzes

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_Q \tilde{c}_{66,Q}}} \Delta m = -\frac{S_f}{A} \Delta m, \quad (4.1)$$

worin  $f_0$  die Grundfrequenz des unbelasteten Quarzes,  $\rho_Q$  die Dichte des Quarzes,  $\tilde{c}_{66,Q}$  den effektiven Schermodul  $\Delta m / A$  die Massenbeladung pro Fläche und  $S_f$  die Sauerbreykonstante bezeichnet (Sauerbrey 1959).

Biophysikalische Anwendungen entwickelten sich erst nach der Entdeckung, dass eine stabile Oszillation auch unter Flüssigkeiten möglich ist, wobei die Änderung der Resonanzfrequenz sowohl von der Dichte der Flüssigkeit als auch von ihrer Viskosität abhängt (Nomura und Okuhara 1982). Zum Verständnis dieser Phänomene werden im Folgenden allgemeine Eigenschaften von Schwingquarzen behandelt und anschließend ein eindimensionales akustisches Modell zur Beschreibung von Quarzresonatoren bei Beladung vorgestellt.

### 4.1.1 Allgemeine Eigenschaften

Quarzkristalle werden aus verschiedenen Gründen als Sensor in der Quarzmikrowaage-Technik eingesetzt. Voraussetzung ist die Kristallstruktur, denn die Dickenschwingung wird durch den reziproken piezoelektrischen Effekt hervorgerufen, der nur bei Ordnungsstrukturen ohne Inversionszentrum auftritt. Der piezoelektrische Effekt, der 1880 von den Gebrütern Curie entdeckt wurde, beschreibt die Erzeugung elektrischer Ladungen an der Oberfläche eines Kristalls als Resultat seiner Verformung. Durch den inversen Effekt ist es somit möglich, mechanische Bewegungen elektrisch anzusprechen. Abhängig von der Orientierung des Kristallschnitts sind verschiedene Schwingungsmoden möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

---

<sup>7</sup> Für Obertöne gilt  $\Delta f = -2f_0 f_n \Delta m / (A\sqrt{\rho_q \tilde{c}_{66,q}})$  mit  $f_n$  als Frequenz des Obertons (Johannsmann 1991).

so genannte AT-Schnitte<sup>8</sup> von Quarzeinkristallen verwendet, die eine minimale Temperatur-Frequenz-Kopplung aufweisen. Um die Frequenz zu kontrollieren sind eine hohe Güte und eine niedrige elektromechanische Kopplungskonstante, zwei weitere besondere Eigenschaften des Quarzes, wichtig. Die Güte  $Q$ , definiert als

$$Q = 2\pi \frac{\text{Gespeicherte Energie pro Zyklus}}{\text{Dissipierte Energie pro Zyklus}} \quad (4.2)$$

liegt bei ca.  $10^5$  in Luft, der dimensionslose Kopplungsfaktor berechnet sich für AT-Schnitte zu

$$K = \sqrt{\frac{\text{Elastisch gespeicherte Energie}}{\text{Elektrisch gespeicherte Energie}}} = \sqrt{\frac{e_{26}}{\tilde{c}_{66}\tilde{\epsilon}_{33}}} \approx 0.091. \quad (4.3)$$

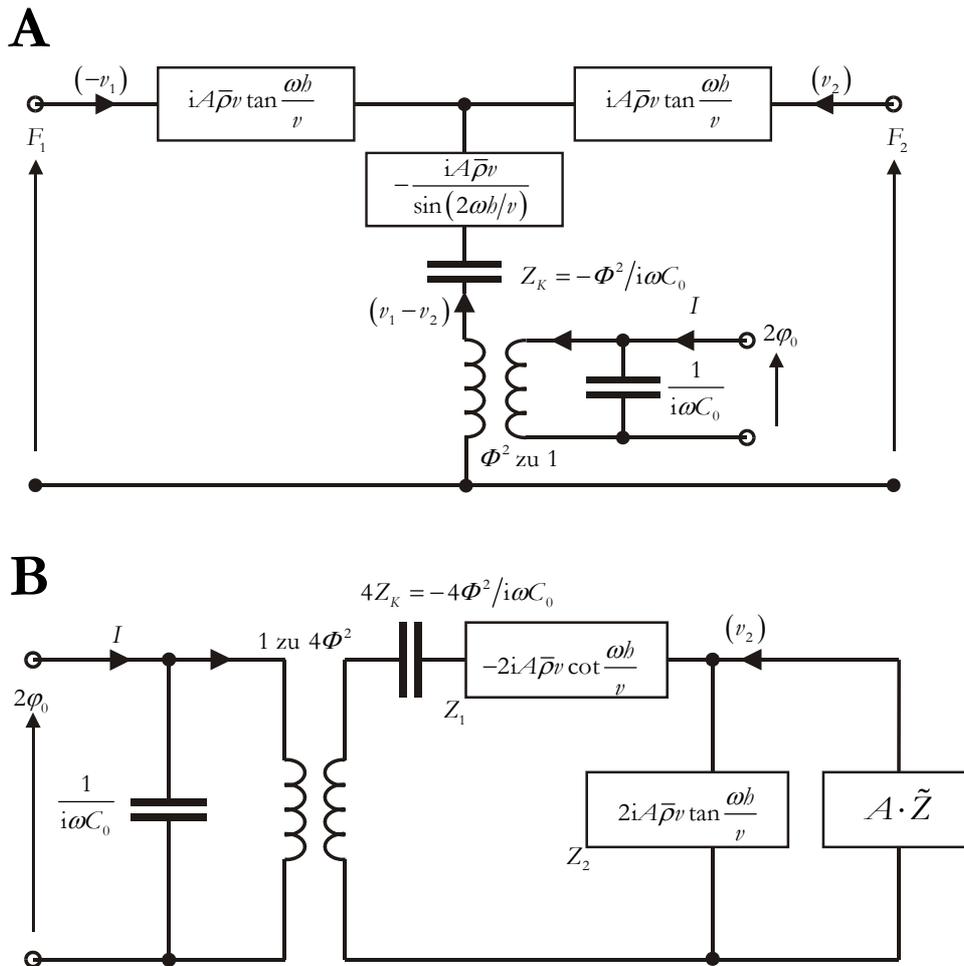
Die maßgeblichen Größen in Gleichung (4.3) setzen sich aus mehreren Tensorkomponenten des piezoelektrischen, elastischen bzw. dielektrischen Tensors zusammen. Dabei bezeichnet  $\tilde{e}_{26} = 9.65 \cdot 10^{-2} \text{ C/m}^2$  den resultierenden Piezo-Koeffizienten,  $\tilde{c}_{66} = 2.93 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$  den Scherkoeffizienten und  $\tilde{\epsilon}_{33} = 4.54 \cdot \epsilon_0$  die effektive Dielektrizität, in der die elektrische Feldkonstante  $\epsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12} \text{ C/(Vm)}$  auftritt (Bottom 1982). Neben diesen besonderen mechanischen und elektronischen Eigenarten ist Quarz chemisch inert und eignet sich daher zum Einsatz in der Sensorik unter Flüssigkeiten. Zuletzt sei noch der kommerzielle Aspekt, gute Qualität bei angemessenem Preis, erwähnt.

## 4.1.2 Elektronische Modellierung

Ziel dieses Abschnittes ist es eine Beziehung zwischen den messtechnisch auslesbaren elektronischen Parametern und den Eigenschaften der an der Elektrodenfläche adhärenen Schicht zu finden. Zur Vereinfachung werden Quarz und Film als lateral unendlich ausgedehnt betrachtet, so dass sich ein eindimensionales Modell ergibt, welches den Formalismus elektrischer Ersatzschaltkreise aus der Theorie der Signalübertragung nahe legt (Johannsmann 1991). Ausgangspunkt der Betrachtungen ist das 3-Pol-Mason Modell, das Ersatzschaltbild eines unendlich ausgedehnten Dickenscherschwingers mit akustisch offenen Enden, siehe Abb. 4.1. (Mason 1958, Rosenbaum 1988).

---

<sup>8</sup> AT-cut Quarze werden aus einem stabförmigen Quarzeinkristall mit einem Winkel von ca.  $35,25^\circ$  zur kristallographischen z-Achse herausgeschnitten.



**Abb. 4.1:** A Ersatzschaltbild des beidseitig akustisch offenen Schwingquarzes. B Ersatzschaltbild bei einseitiger Beladung des Quarzes, welches sich aus A ergibt, wenn ein akustischer Port kurzgeschlossen wird, nach Mason (Mason 1958). Bezeichnungen:  $A$  Elektrodenfläche,  $\bar{\rho}$  mittlere Dichte,  $v$  Teilchengeschwindigkeit,  $\omega$  Kreisfrequenz der stehenden akustischen Welle,  $C_0$  elektrische Kapazität des Kondensators, der durch die Elektroden des Schwingquarzes gebildet wird,  $\Phi$  Übersetzungsverhältnis, welches akustische und elektrische Impedanz verknüpft.

Das Schaltbild besteht aus zwei akustischen und einem elektrischen Eingang. Die akustischen Eingänge entsprechen den Elektrodenoberflächen, während der elektrische Port durch die zwei Kontakte mit diesen gebildet wird. Neben den bekannten elektronischen Bauelementen treten akustische Impedanzen auf. Die akustische Impedanz  $\tilde{Z}$  ist definiert durch das Verhältnis von Impulsstromdichte  $P$ , welche der mechanischen Spannung  $\sigma$  entspricht, zur Geschwindigkeit  $du/dt$  der sich im Medium fortplanzenden akustischen Wellen (Johannsmann 1991):

$$\tilde{Z} = \frac{P}{du/dt} = \frac{\sigma}{du/dt} \quad (4.4)$$

Im homogenen Medium ergibt sich aus Gleichung (4.4) für die akustische Impedanz die Beziehung  $\tilde{Z}_{\text{hom}} = \bar{\rho}v$  mit der mittleren Dichte  $\bar{\rho}$  und der Schallgeschwindigkeit  $v$ . Die in den Schaltbildern verwendete nicht auf die Fläche normierte Impedanz  $Z = A\bar{\rho}v$ , wird manchmal auch als mechanische Impedanz bezeichnet. Die akustischen Impedanzen enthalten trigonometrische Funktionen, die sich aus der Lösung der eindimensionalen Wellengleichung ergeben.

Die Darstellung des Ersatzschaltbildes entspricht der eines elektrischen Schaltbildes, wenn elektrische Spannungen durch mechanische Spannungen<sup>9</sup> und Ströme mit Teilchengeschwindigkeiten  $v_1$  und  $v_2$  übersetzt werden. Der Piezo-Effekt wird durch einen idealen Transformator repräsentiert, der wiederum die mechanischen Größen in elektrische Größen mit dem Verhältnis  $\Phi^2 = (A\tilde{e}_{26}/d_Q)^2$  übersetzt.  $d_Q = 2b$  bezeichnet die Dicke des Quarzes.

Bei einseitiger Belastung des Quarzes, wie es bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit der Fall ist, lässt sich das Schaltbild zu Bild B umformen. Eine detaillierte Beschreibung dieser Netzwerktransformationen findet sich z.B. in (Mason 1958). Hier treten die elektrischen Größen nur noch links von dem Transformator auf und das Übersetzungsverhältnis hat sich zu  $4\Phi^2$  verändert.

Dieses Schaltbild vereinfacht sich, wenn berücksichtigt wird, dass sich im Quarzkristall in der Nähe der Resonanz stehende Wellen ausbilden, die die Bedingung  $d_Q = \lambda(2n+1)/2$  erfüllen. In diesem Fall ist die Kotangens-Funktion Null. Daher wird eine Taylorentwicklung um die Grundfrequenz  $\omega_0 = 2\pi f_0$  zur Linearisierung des Kotangens durchgeführt und ergibt

$$\cot\left(\frac{\omega d_Q}{2v}\right) \approx -\frac{(\omega - \omega_0)d_Q}{2v} = -\frac{\pi \Delta f}{2 f_0}. \quad (4.5)$$

Im Schaltbild ist die Impedanz  $Z_2$  durch den Tangens geprägt, der Polstellen an Stelle der Nullstellen des Kotangens aufweist. Dieser Zweig kann aufgrund der Parallelschaltung gegenüber der akustischen Last  $A\tilde{Z}$  vernachlässigt werden und die verbleibenden in Serie liegenden Impedanzen  $4Z_K$  und  $Z_1$  können durch einen akustischen Serienschwingkreis bestehend aus einer Komplanz  $C_{\text{ak}}$  und einer Last  $L_{\text{ak}}$ , der halben Quarzmasse  $M_Q/2$ , ersetzt

<sup>9</sup> Wegen der Eindimensionalität dürfen an Stelle der mechanischen Spannungen die Kräfte  $F_1$  und  $F_2$  verwendet werden.

werden. Für die akustischen Elemente gelten die Beziehungen

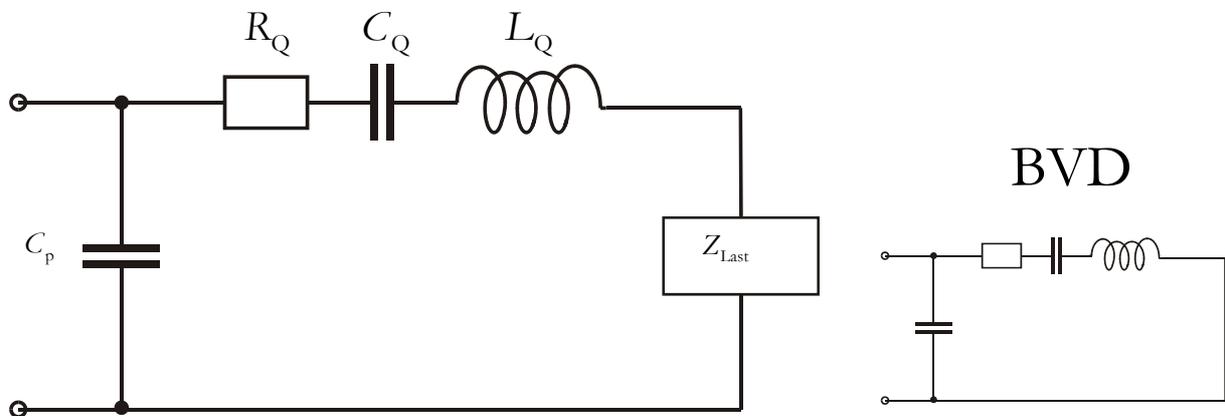
$$L_{\text{ak}} = \frac{d_{\text{Q}} A \rho_{\text{Q}}}{2} = \frac{M_{\text{Q}}}{2} \quad (4.6)$$

und

$$C_{\text{ak}} = \frac{2d_{\text{Q}}}{\pi^2 A \tilde{c}_{66,\text{Q}} (1 - K^2)} \quad (4.7)$$

(Mason 1958), die nur von intrinsischen Eigenschaften des Quarzes abhängen.

Werden die akustischen Elemente durch die entsprechenden elektronischen Elemente ersetzt, so ergibt sich in der Nähe der Resonanz das Ersatzschaltbild in Abb. 4.2.



**Abb. 4.2:** Ersatzschaltbild der Quarzmikrowaage mit Beladung in der Nähe der Resonanz und nebenstehend das BVD-Ersatzschaltbild, welches zur Beschreibung unbelasteter Quarze in der Elektrotechnik dient.

Der zusätzliche Widerstand  $R_Q$  berücksichtigt Energiedissipation innerhalb des Quarzes. Ohne die Impedanz  $Z_{\text{Last}}$  entspricht dieses dem so genannten Butterworth van Dyke (BVD)-Ersatzschaltbild, welches zur Beschreibung unbelasteter Quarze in der Elektrotechnik verwendet wird. Die elektronischen Parameter  $L_Q$  und  $C_Q$  lassen sich aus (4.6) und (4.7) mit Hilfe des Übersetzungsverhältnisses  $\Phi$  berechnen und ergeben

$$L_Q = \frac{d_{\text{Q}}^3 \rho_{\text{Q}}}{8 A \tilde{c}_{26}^2} \quad (4.8)$$

und

$$C_Q = \frac{8A\tilde{e}_{26}^2}{\pi^2 d_Q \tilde{c}_{66,Q} (1-K^2)}. \quad (4.9)$$

Zur Berechnung des Widerstandes  $R$  im Ersatzschaltbild muss die zusätzliche Annahme gemacht werden, dass die Dämpfungskräfte der stehenden Welle innerhalb des Kristalls proportional zur Teilchengeschwindigkeit sind. Mit der Dämpfungskonstante  $\beta$  in den Einheiten  $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-3}$  ergibt sich

$$R_Q = \frac{d_Q^3 \beta}{8A\tilde{e}_{26}^2} \quad (4.10)$$

(Bottom 1982). Die Parallelkapazität entspricht der Kapazität eines idealen Plattenkondensators und gehorcht der Gleichung

$$C_p = \frac{\tilde{\epsilon}_{33} A}{d_Q}. \quad (4.11)$$

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 5 MHz-Quarze mit einer Dicke  $d_Q = 0.33 \text{ mm}$  und Elektrodenflächen von ca.  $20 \text{ mm}^2$  ergeben sich aus den Gleichungen (4.8) bis (4.11) die Werte  $L_Q = 65 \text{ mH}$ ,  $C_Q = 48 \text{ fF}$ ,  $R_Q = 2.46 \cdot 10^{-3} \cdot \beta \ \Omega$  und  $C_p = 2.4 \text{ pF}$ . Die Berechnung des reellen Widerstandes ist nicht ohne weitere Näherungen möglich, da die Dämpfungskonstante alle dissipativen Kräfte enthält, die teilweise auch frequenzabhängig sind. Aufgrund der Annahme eines lateral unendlich ausgedehnten Quarzes weichen die aufgelisteten Größen von den tatsächlich gemessenen Werten ab, geben aber die Größenordnung korrekt wieder. Für ein gegebenes Design eines Dickenschwingers können sie daher sehr gut als erste Abschätzung genutzt werden.

Die Resonanzfrequenz des unbelasteten Schwingkreises lässt sich bei Vernachlässigung des ohmschen Widerstandes einfach mit Hilfe der Kirchhoffschen Maschenregel berechnen und ergibt sich zu

$$f_A = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_Q} \left( \frac{1}{C_Q} + \frac{1}{C_p} \right)}. \quad (4.12)$$

Diese Frequenz wird in der Literatur auch als Antiresonanz bezeichnet, während die Resonanz des oberen Zweiges im Ersatzschaltbild Serienresonanzfrequenz genannt wird. Für sie gilt die Beziehung

$$f_s = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_Q C_Q}}. \quad (4.13)$$

Diese Frequenzen liegen dicht beieinander, da im Allgemeinen die Beziehung  $C_p \gg C_Q$  gilt.

### 4.1.3 Elektronisches Verhalten nach Beladung der QCM

Das Verhalten der Quarzmikrowaage bei Beladung der Sensoroberfläche hängt von der Art der Beladung ab und wird unterschiedlich modelliert. Für eine dünne, starre, fest mit der Sensorfläche verbundene Schicht gilt die Sauerbrey-Beziehung (4.1). Bei großen Schichtdicken, viskosen Flüssigkeiten, elastischen Festkörpern und visko-elastischen Filmen verliert diese ihre Gültigkeit (Janshoff *et al.* 2000). Die Modellierung unterschiedlicher Schichtsysteme wird in der Literatur ausgiebig untersucht, siehe z.B. (Granstaff und Martin 1994, Lucklum *et al.* 1996, Rodahl *et al.* 1996, Lucklum und Hauptmann 1997, Bandey *et al.* 1999, Johannsmann 1999, Martin *et al.* 2000). Das Ergebnis dieser Studien besagt, dass sich die Impedanz der Beladung, die in Abb. 4.2 dargestellt ist, für einfache Schichtsysteme durch eine Kombination einer Induktivität und eines ohmschen Widerstand annähern lässt. Der Widerstand repräsentiert die Energiedissipation, während die Induktivität der mechanischen Energiespeicherung an der Oberfläche durch die zusätzlich mitschwingende Masse entspricht (Bandey *et al.* 1999). Da im Rahmen dieser Arbeit die kinetischen Konstanten des Adsorptionsprozesses verschiedener Probensysteme hauptsächlich aus der Frequenzverschiebung gewonnen werden, genügt es an dieser Stelle, die funktionale Abhängigkeit der Resonanzfrequenz bei Beladung mit einer starren Masse und einer Newtonschen Flüssigkeit zu beschreiben.

Die zusätzliche Induktivität des Schaltbildes, welche durch die Beladung mit einer starren Masse hervorgerufen wird, ergibt sich mit der Filmdicke  $d_M$  und der Filmmasse  $\rho_M$  näherungsweise zu

$$L_M \cong \frac{1}{8K^2 C_p f_0} \frac{d_M \rho_M}{\sqrt{\tilde{\epsilon}_{66} \rho_Q}} \quad (4.14)$$

(Bandey *et al.* 1999).

Für den Einfluss einer halb unendlich ausgedehnten Newtonschen Flüssigkeit gelten nach Bandey *et al.* die Beziehungen

$$L_L \cong \frac{1}{8K^2 C_p f_0} \sqrt{\frac{\rho_L \eta_L}{4\pi f \tilde{\zeta}_{66} \rho_Q}} \quad (4.15)$$

und

$$R_L \cong \frac{1}{8K^2 C_p f_0} \sqrt{\frac{\pi f \rho_L \eta_L}{\tilde{\zeta}_{66} \rho_Q}}, \quad (4.16)$$

wobei  $\rho_L$  die Dichte und  $\eta_L$  die Viskosität der Flüssigkeit bezeichnet.

Der Einfluss dieser Größen auf die Frequenz ist sofort ersichtlich, wenn  $L_Q$  und  $R_Q$  durch  $L = L_Q + L_X$  und  $R = R_Q + R_L$  ersetzt werden. Das Suffix „X“ ist darin stellvertretend für M bzw. L. Bei rein induktivem Anteil senkt sich die Resonanzfrequenz gemäß Gl. (4.13), der Einfluss des Widerstandes geht in zweiter Ordnung über die Gleichung

$$f_{1/2} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{LC_Q}} \left( 1 \pm \frac{C_p R^2}{2L} \right) \quad (4.17)$$

in die Serienresonanzfrequenz ein (Bottom 1982). Die Serienresonanz spaltet sich also symmetrisch in zwei Zweige auf, wobei die Größe der Aufspaltung durch das Verhältnis des Quadrates des ohmschen Gesamtwiderstandes zur Gesamtinduktivität gegeben ist. Der positive Ast entspricht der Frequenz minimaler Impedanz, während der negative Ast den Phasennulldurchgang kennzeichnet und der ausgelesenen Frequenz entspricht.

Bei Betrachtung der Gleichungen (4.14) und (4.15) fällt auf, dass diese für viskose biologische Systeme der vorliegenden Art ungefähr in der gleichen Größenordnung liegen. Der zwischen den Partikeln auf der Oberfläche mitgeführte Wasseranteil wird daher einen großen Einfluss auf die Verschiebung der Resonanzfrequenz haben. Zudem tritt das Problem zu Tage, dass sich adsorbierte Vesikel aufgrund der Viskoelastizität nicht wie eine starre, synchron mitschwingende Masse verhalten und daher die Gleichung (4.14) nicht verwendet werden darf. Die oszillierende Quarzoberfläche übt auf die adhärenen Vesikel eine Scherspannung aus. Die tensoriellen Größen der Deformation  $u_{ik}$  und der Scherspannung  $\sigma_{ik}$  sind an den frequenzabhängigen komplexen Schermodul  $G^*(\omega)$  des Materials über die Beziehung  $\sigma_{ik} = 2G^* u_{ik}$  gekoppelt (Voinova *et al.* 2002). Der Realteil  $G'$  des Schermoduls wird Speichermodul, der Imaginärteil  $G''$  Verlustmodul genannt. Für ein Probensystem mit Schermodul  $G^*(\omega)$  unter einer viskosen Flüssigkeit, welches fest an der Oberfläche adsorbiert ist, lassen sich die Frequenz- und Widerstandsänderung berechnen (Voinova *et al.* 1997). Demnach ergibt sich für die

Frequenzänderung

$$\Delta f = \frac{-2f^2 d_v \rho_v}{\sqrt{\tilde{\epsilon}_{66} \rho_Q}} \left( 1 - \frac{2\pi f \rho_L \eta_L}{\rho_v} \frac{G''}{G'^2 + G''^2} \right) \quad (4.18)$$

und für die Widerstandsänderung

$$\Delta R = \frac{16\pi^2 f^3 d_v \rho_L \eta_L L_Q}{\sqrt{\tilde{\epsilon}_{66} \rho_Q}} \left[ \left( 1 + \frac{2d_v \rho_v \sqrt{\pi f}}{\sqrt{\rho_L \eta_L}} \right) \frac{G'}{G'^2 + G''^2} \right] \quad (4.19)$$

(Voinova *et al.* 2002, Lucklum und Hauptmann 2003), worin  $d_v$  die Dicke der viskosen Schicht und  $\rho_v$  deren Dichte bezeichnet. Auffallend ist in Gleichung (4.18), dass die fluide Phase zu einer Verringerung der Frequenzverschiebung gegenüber der reinen, durch den Film verursachten Frequenzänderung führt. Dieser Effekt wird in der Literatur auch als *missing mass* Effekt bezeichnet und ist unter anderem bei kleinen dicht gepackten unilamellaren Vesikel zu beobachten (Voinova *et al.* 2002).

Für die kinetischen Auswertungen ist jedoch die quantitative Ermittlung über die Gleichungen (4.18) und (4.19) nicht von Bedeutung. Wesentlich ist, dass zusätzlich zur Resonanzfrequenzänderung auch der Serienwiderstand oder die Dissipation ausgelesen wird. Nur über diese Größe ist es möglich zu unterscheiden, ob die Oberfläche mit einer synchron mitschwingenden Lipiddoppelschicht oder mit visko-elastischen Vesikeln belegt ist. Zudem bietet die Größe der Dissipation ein qualitatives Maß zur Abschätzung der Deformation. Soll umgekehrt das Schermodul bestimmt werden, so ist zusätzlich eine Information über die Schichtdicke notwendig.

#### 4.1.4 Messaufbauten und Messgrößen der QCM

Um den Einfluss der ohmschen Verluste von der Induktivität zu trennen, ist es sinnvoll auch die Energiedissipation messtechnisch zu erfassen. Da die drei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Probensysteme mit unterschiedlichen Verfahren elektronisch ausgelesen wurden, ist es notwendig kurz den Zusammenhang der entsprechenden Messgrößen vorzustellen.

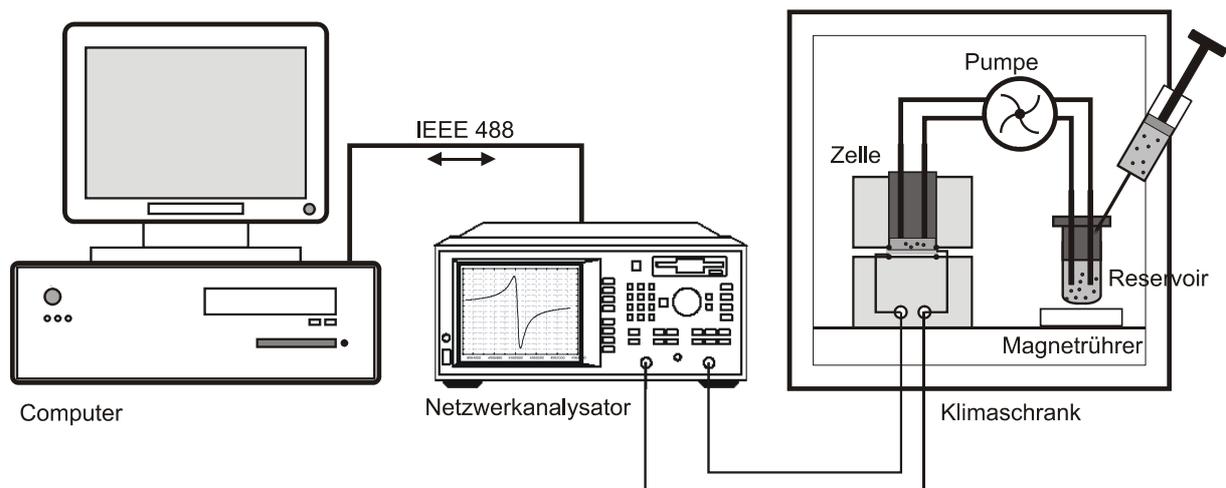
Prinzipiell besteht der Aufbau aus der Messzelle, die sich in einer klimatisierten Umgebung befindet, verschiedenen Geräten die zur Ansteuerung des Schwingquarzes und der Auslese elektronischer Parameter dienen und einem Computer zur Datenerfassung (Abb. 4.3).

Die Verbindung zwischen Messzelle und Ausleseelektronik besteht aus abgeschirmten

Koaxialkabeln, während der Transfer zum Rechner über die GPIB Schnittstelle (IEEE 488), bzw. die serielle Schnittstelle RS232 geregelt ist. Zur Untersuchung der Probensysteme sind drei Verfahren angewandt worden, die sich in der Ansteuerungs- und Ausleseelektronik unterscheiden und im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- **Ansteuerung mit Hilfe eines Netzwerkanalysators**

Bei dieser Methode werden die Resonanzkurven mit Hilfe eines Netzwerkanalysators (ET8712, Agilent) passiv vermessen. Zur Automatisierung wird das Programm „QTZ“ von D. Johannsmann eingesetzt, wobei die Programmierung der Schnittstelle im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Die Anregungsfrequenz wird über den Bereich der Resonanz variiert und die komplexe elektrische Impedanz wird ausgelesen. Der Kehrwert der Impedanz, die Admittanz  $Y$ , wird berechnet und in ihren Realteil, der Akzeptanz, und den Imaginärteil, der Suszeptanz, aufgespalten. Parallel wird an beide Kurven eine Anpassung mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Die physikalisch relevanten Parameter, die Resonanzfrequenz und die halbe Halbwertsbreite, werden ausgegeben.



**Abb. 4.3:** Messaufbau zur Durchführung von Quarzmikrowaage-Messungen. Messzelle, Reservoir und Magnetrührer befinden sich in einem geschlossenen Kreislauf in einem Klimaschrank. Über abgeschirmte Koaxialkabel wird der Quarzresonator durch einen Netzwerkanalysator angesprochen. Zur Datenspeicherung und als Benutzerschnittstelle dient ein Computer. Alternativ zum Netzwerkanalysator kann auch ein phasenstabilisierter Oszillator mit zusätzlicher Ausleseelektronik oder die für D-QCM-Messungen benötigte Elektronik angeschlossen werden.

- **Anschluss an einen phasenstabilisierten Oszillator-Schaltkreis**

Der Quarz wird an einen phasenstabilisierten Oszillatorschaltkreis (PLO-10, Maxtek Inc.) angeschlossen, der für die Anwendung unter viskosen Medien geeignet ist. Dieser regelt die

Frequenz automatisch so ein, dass die Phasendifferenz zwischen Strom und Spannung verschwindet. Der Strom ist dann ein direktes Maß für die Leitfähigkeit des Quarzes. Über ein Multimeter wird eine dem Strom proportionale demodulierte Spannung, die sich in den Widerstand des BVD-Ersatzschaltbildes bei Belastung umrechnen lässt, und über einen Frequenzzähler wird die Frequenz ausgelesen. Beide Geräte werden über einen Computer unter einer eigens entwickelten LabView Umgebung angesprochen.

- **D-QCM**

Bei diesem Verfahren wird der Quarz mit einer Generatorkarte zur Schwingung in der Nähe der Grundschiwingung bei 5 MHz angeregt. Die Anregung wird über ein Relais abgeschaltet und mit Hilfe einer Oszillatorkarte ausgelesen. Die Frequenz verschiebt sich je nach Beschaltung zur Serien bzw. Parallelresonanz und klingt exponentiell ab (Rodahl und Kasemo 1996). Neben der Resonanzfrequenz lässt sich aus der Anpassung einer gedämpften Sinusschwingung an die Messdaten die Relaxationszeit  $\tau_R$  ermitteln. Für diese gilt näherungsweise

$$D = \frac{1}{\pi f_0 \tau_R} = \frac{R}{2\pi f_0 L}, \quad (4.20)$$

worin  $D = 1/Q$  den Dissipationsfaktor bezeichnet, der der reziproken Güte entspricht (Rodahl *et al.* 1995, Rodahl *et al.* 1997). Die Dissipation erlaubt Rückschlüsse auf visko-elastische Beiträge der abgeschiedenen Substanz, über die Resonanzfrequenz lässt sich die Masse ermitteln.

Aus dieser kurzen Betrachtung ist ersichtlich, dass alle Messaufbauten vergleichbare Größen liefern. Neben der Resonanzfrequenz  $f_0$  kann die halbe Halbwertsbreite  $\Gamma$ , der Widerstand  $R$  oder der Dissipationsfaktor  $D$  ermittelt werden. Alle Größen lassen sich auf die entsprechenden Größen des BVD-Ersatzschaltbildes zurückführen. Für den Dissipationsfaktor gilt die Beziehung (4.20), während die halbe Halbwertsbreite mittels

$$R [\Omega] = \frac{\pi d_Q^2 \sqrt{\rho_Q \tilde{\ell}_{66,Q}}}{4 A \tilde{e}_{26}^2} \frac{1}{f_0} \cdot \Gamma [\text{Hz}] \approx 0.8 [\Omega/\text{Hz}] \cdot \Gamma [\text{Hz}] \quad (4.21)$$

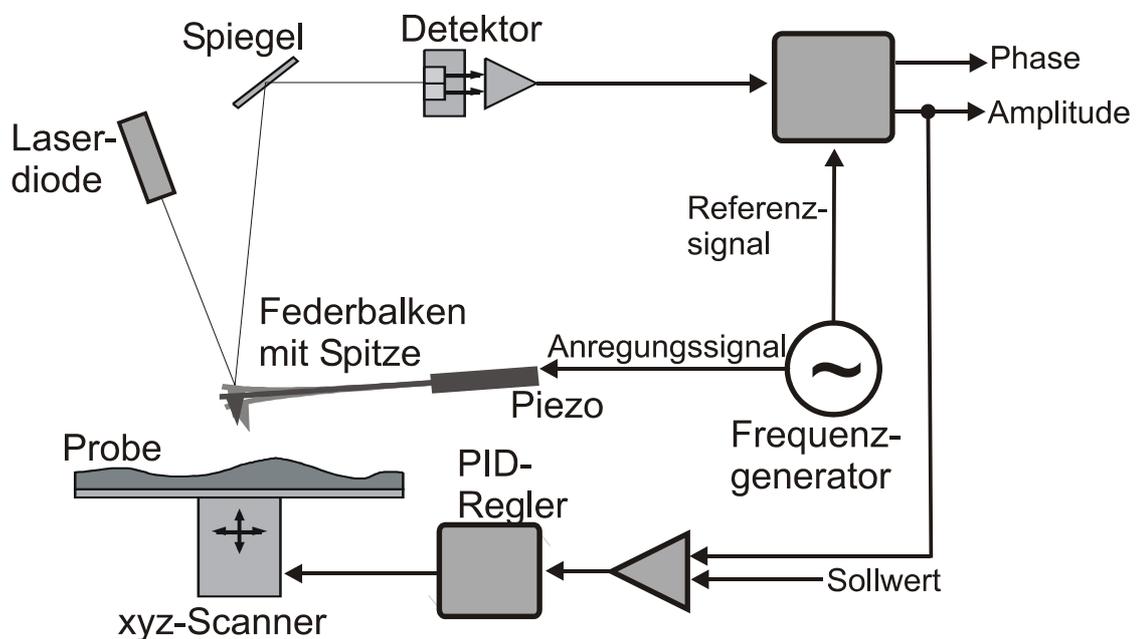
umgerechnet werden kann (Johannsmann 1991).

## 4.2 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM = *atomic force microscopy*) ist seit geraumer Zeit eine in der Biophysik etablierte Messmethode, die aufgrund ihrer Auflösung und ihrer Einsatzmöglichkeiten unter physiologischen Bedingungen häufig zur Charakterisierung von Biomolekülen und Strukturen eingesetzt wird. Eine Übersicht zu dieser Thematik findet sich z.B. in (Radmacher *et al.* 1992, Ikai 1996, Takano *et al.* 1999, Dufrene und Lee 2000, Janshoff *et al.* 2002)

Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Technik zur Abbildung von Partikeln auf festkörperunterstützten Oberflächen eingesetzt, um zusätzlich zu den QCM-Messungen orts aufgelöste Informationen zu erhalten. Die großen Höhenunterschiede zwischen den elastischen, kugelförmigen, bisweilen schwach gebundenen Partikeln und der Substratoberfläche führen allerdings zu Problemen bei der Abbildung der Topographie, da die Lateralkräfte der rasternden Sonde adhäriertes Material verschiebt bzw. zerstört. Eine systematische rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Probensysteme ist daher nicht gelungen.

Das erste Rasterkraftmikroskop geht auf Binnig, Quate und Gerber zurück (Binnig *et al.* 1986). In ihrem Aufbau wurde die Auslenkung des Federbalkens mit Hilfe des Tunneleffekts gemessen. Heutzutage wird hauptsächlich das Lichtzeigerprinzip zur Detektion der Verbiegung des Federbalkens genutzt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus zeigt Abb. 4.4.



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops in der Betriebsart *intermittent-contact-mode*.

Eine Spitze, die an einem Federbalken befestigt ist, wird mit Hilfe von Piezoelementen über die

Oberfläche einer Probe gerastert. Das System aus Spitze und Federbalken wird zumeist auf Wafern aus Silizium mit Hilfe der Halbleitertechnologie in Massenproduktion mit unterschiedlichen Beschichtungen hergestellt. Die Spitzenradien variieren zwischen 2 und 100 nm, während die Federkonstanten im Bereich von 0.001 und 50 N/m liegen. Je nach verwendetem Gerät befinden sich die Piezostellglieder oberhalb der Federbalkenbefestigung oder integriert in den Probenhalter. Die Verbiegung des Federbalkens wird optisch gemessen. Dazu wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Balkens fokussiert und der Reflex über einen Spiegel auf eine Vierquadrantendiode gelenkt. Im dynamischen Modus wird der Federbalken über einen Erregerpiezo und einen Frequenzgenerator zu Schwingungen angeregt und die mittlere Amplitude bzw. die Phase zwischen Anregung und Verbiegung gemessen, während im statischen Modus die Verbiegung des Federbalkens gemessen wird. Die Phaseninformation gibt Aufschluss über die Energiedissipation und kann insofern dazu dienen, Informationen über die Elastizität des Materials zu gewinnen. Im statischen Modus wird die Verbiegung des Federbalkens, welche aufgrund der Wechselwirkung mit der Probe resultiert, detektiert. Die gemessenen Werte werden mit Sollwerten (setpoint) verglichen und der Probe-Sonde-Abstand über das Höhenstellglied des Rasterpiezoelementes (z-Piezo) angepasst. Aus der dort angelegten Spannung lässt sich das Höhenprofil der Probe ermitteln.

Da die AFM-Messungen nicht im Zentrum dieser Arbeit stehen, wird auf eine detaillierte Beschreibung der Messmodi der verwendeten Geräte verzichtet. Für das Verständnis der gezeigten Topographiebilder soll kurz auf den so genannten *intermittent-contact-mode* eingegangen werden. In diesem Betriebsmodus schwingt der Federbalken unter Flüssigkeit bei einer Frequenz von 3 bis 20 kHz mit einer Amplitude von ungefähr 10 bis 100 nm (Hansma und Hoh 1994, Krüger *et al.* 1997, Künneke 2003). Der Federbalken gehorcht für kleine Auslenkungen näherungsweise dem Modell des gedämpften harmonischen Oszillators. Die Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze führt neben der Änderung der mittleren Amplitude zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz und einer Änderung der Phasenverschiebung (Anczykowski 1998). Zur Regelung wird zumeist jedoch die mittlere Amplitude genutzt und der Abstand derart angepasst, dass dieses Signal konstant ist. Die gezeigten Aufnahmen sind in diesem Messmodus aufgenommen worden.

### 4.3 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie ist ein elektrochemisches Analyseverfahren, mit deren Hilfe unter anderem die elektrischen Eigenschaften von Grenzflächen bestimmt werden können. Untersucht wird der komplexe Wechselstromwiderstand des Systems in Abhängigkeit von der Frequenz des Erregersignals. Um die elektrochemischen Eigenschaften des Systems nicht zu beeinflussen liegt die angelegte Spannung in der Größenordnung von 30 mV.

Der Wechselstromwiderstand des Systems, die Impedanz, gehorcht der Beziehung

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t - \varphi)}. \quad (4.22)$$

Hierin bezeichnet  $U(t)$  die momentan anliegende Spannung,  $I(t)$  die momentane Stromstärke und  $\omega$  die Kreisfrequenz. Die Amplituden sind  $U_0$  und  $I_0$ , die um die Phasenverschiebung  $\varphi$  gegeneinander verschoben sind. Zur mathematischen Vereinfachung des Quotienten der trigonometrischen Funktionen eignet sich die komplexe Schreibweise. Unter Verwendung von Polarkoordinaten ergibt sich

$$Z = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i(\omega t - \varphi)}} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi} = |Z| e^{i\varphi}, \quad (4.23)$$

mit  $|Z|$ , dem Betrag der Impedanz. Da die Phasenverschiebung zumeist von der Frequenz abhängt, ist es sinnvoll die Beziehung als Funktion der Frequenz darzustellen. Folglich ergibt sich

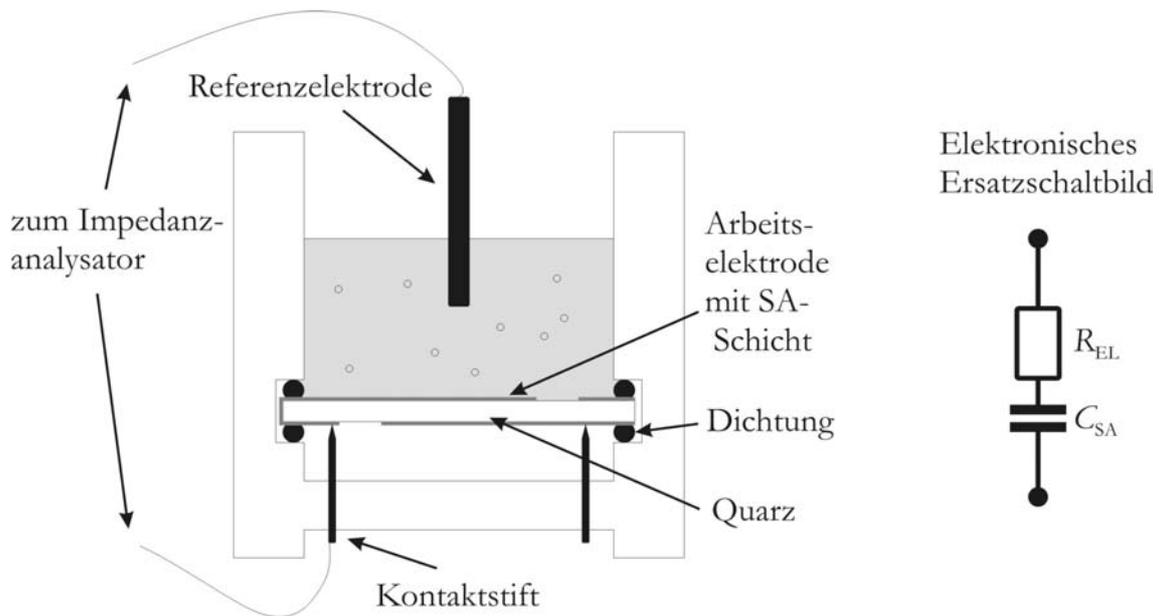
$$Z(\omega) = |Z|(\omega) e^{i\varphi(\omega)}. \quad (4.24)$$

Die komplexe Impedanz wird bei verschiedenen diskreten Frequenzen gemessen und gegen die Frequenz aufgetragen.

Um aus den experimentell bestimmten Werten Informationen über das System zu gewinnen, bedarf es einer geeigneten physikalischen Modellvorstellung, die sich in elektrische Ersatzschaltbilder übersetzen lässt. Hierzu wird mit Hilfe von diskreten Bauelementen (ohmscher Widerstand, Spule, Kondensator) in Parallel- oder Reihenschaltung ein Ersatzschaltbild des Systems erstellt. Aus der Anpassung der Impedanz des Ersatzschaltbildes an die Messwerte lassen sich die elektrischen Parameter bestimmen.

Zum besseren Verständnis ist in Abb. 4.5 die Messzelle zur Aufnahme von Impedanzspektren schematisch dargestellt. Rechts davon befindet sich exemplarisch ein Ersatzschaltbild für den

einfachen Fall einer *self-assembly*-Schicht.



**Abb. 4.5:** Schematische Darstellung der Messzelle für die Aufnahme von Impedanzspektren. Im linken Teil ist das Ersatzschaltbild zur Modellierung von SA-Schichten abgebildet.

Zur Aufnahme der Spektren wird in die QCM-Messzelle an Stelle des Deckels mit Zu- und Ablauf eine Referenzelektrode (DRI-REF 2, World Precision Instruments) eingebracht und die Impedanz des Systems über die obere Arbeitselektrode des Quarzes mit Hilfe eines Impedanzanalysators (SI 1260, Solartron) gemessen. Messdatenerfassung, Anpassung der Daten und Steuerung des Analysators erfolgen computergesteuert über die GPIB Schnittstelle.

Das einfache Ersatzschaltbild im rechten Teil der Abbildung modelliert den Elektrolytwiderstand mit einem ohmschen Widerstand  $R_{EL}$ . Die Kapazität  $C_{SA}$  von SA-Schicht und Goldoberfläche wird durch den in Reihe geschalteten Kondensator berücksichtigt. Für die Impedanz und die Phasenverschiebung dieses Systems ergibt eine einfache Rechnung

$$|Z|(\omega) = \sqrt{R_{EL}^2 + \left(\frac{1}{\omega C_{SA}}\right)^2} \quad (4.25)$$

und

$$\varphi(\omega) = \text{atan} \frac{Z_{\text{im}}}{Z_{\text{real}}} = \frac{1}{R_{EL} \omega C_{SA}} \quad (4.26)$$

worin  $Z_{\text{im}}$  und  $Z_{\text{real}}$  den Imaginär- und den Realteil der Impedanz bezeichnen. Während der

Widerstand neben der Pufferzusammensetzung auch von der Entfernung der Referenzelektrode zur Quarzoberfläche abhängt, existieren für die Kapazitäten der verschiedenen SA-Schichten Vergleichswerte. Das im Rahmen dieser Arbeit benutzte Programm passt die Werte der diskreten Bauelemente mit Hilfe eines Levenberg-Marquardt Algorithmus zur Minimierung der Summe der Abweichquadrate an die Messdaten an und gibt diese aus.



## 5 PRÄPARATIVE METHODEN UND PROBENSYSTEME

Im Folgenden werden vier Probensysteme, die in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen und deren kinetische Konstanten mit Hilfe von MC-Simulationen angepasst werden, vorgestellt. Dazu wird zunächst auf die notwendigen Präparationsschritte zur Vorbereitung von Quarzmikrowaagemessungen, bzw. rasterkraftmikroskopische Untersuchungen, eingegangen. Hierzu gehören die Bereitstellung geeigneter Quarzsensoren, die Erzeugung der *self-assembly*-Schichten und die Herstellung einschaliger Vesikel. Zum größten Teil sind in den experimentellen Studien Liposomen bestehend aus Phospholipiden eingesetzt worden. Daher widmet sich der zweite Abschnitt dieses Kapitels den Eigenschaften der verwendeten Phospholipide.

## 5.1 Präparative Methoden

### 5.1.1 Vorbereitung der Schwingquarze

Vor dem Einsatz der Quarze (5 MHz, plano-plano, poliert, KVG) sind verschiedene Arbeitsschritte notwendig. Zunächst werden die fabrikneuen Quarze in einem Ultraschallbad bei 60 °C abwechselnd in einer 2-prozentigen Detergenzlösung (Hellmanex, Hellma) und in Reinstwasser drei Mal gereinigt. Anschließend werden sie im Stickstoffstrom getrocknet. Die Goldelektroden werden mittels thermischer Verdampfung in einer Aufdampfanlage (BAE 250, Balzers) mit Hilfe von Masken auf die Quarzoberfläche gebracht. Hierzu wird zunächst eine Chromschicht von 5 nm Dicke als Haftvermittler und danach die eigentliche 100 nm dicke Goldschicht aufgedampft.

Bereits im Experiment verwendete Schwingquarze werden mit Hilfe von 80 °C heißer Piranhalösung, die aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 prozentiger Wasserstoffperoxidlösung im Volumenverhältnis 7:3 besteht, von adhärierten organischen Bestandteilen befreit, in Reinstwasser bei 60 °C beschallt und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Behandlung mit Piranhalösung führt unvermeidlich auch zur Abnutzung der Goldoberfläche, so dass nach mehrfachem Einsatz dieses Verfahrens eine komplette Aufreinigung notwendig ist. Die Goldschicht wird dazu in wässriger Iod/Kaliumiodid-Lösung (0.25 mol/l I<sub>2</sub>, 0.5 mol/l KI) und die Chromschicht in alkalischer Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung abgelöst.

### 5.1.2 Präparation der *self-assembly*-Schichten

Die Goldoberfläche wird zuerst 30 Sekunden in Argon-Plasma (Plasmacleaner / Sterilizer Modell PDC-002, Harrick) gereinigt und anschließend 30 Minuten in einer ethanolischen Lösung des gewünschten Thiols (1 mmol/l) inkubiert. An der Grenzfläche zwischen Goldoberfläche und Lösung bildet sich durch diffusionskontrollierte Adsorption ein so genannter *self-assembly*-Film, der aufgrund der hohen Affinität von Schwefelatomen zu Goldatomen langzeitstabil ist. Besteht der Film aus Thioalkanen, so führen die attraktiven van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten zu einer hohen Packungsdichte, die in einer kristallinen Anordnung der chemisorbierten Moleküle resultiert. Bei funktionalisierten Alkanen richten sich die Moleküle senkrecht zur Oberfläche mit endständigen Kopfgruppen aus. Zuletzt wird die Oberfläche gründlich mit Ethanol und nachfolgend mit dem eingesetzten Puffer gespült.

### 5.1.3 Präparation unilamellarer Vesikel

Die Präparation beinhaltet mehrere Schritte. Zuerst werden die Lipide im gewünschten molaren Verhältnis in Chloroform/Methanol (3:1) in einem Reagenzglas vorgelegt. Die Lipidmasse liegt gewöhnlich bei 0.5 bis 1 mg, das Volumen des Lösungsmittels beträgt ungefähr 1 ml. Das Lösungsmittel wird oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids im Stickstoffstrom verdampft, so dass sich ein dünner Lipidfilm an der Glaswand abscheidet. Anschließend werden die Lösungsmittelreste im Film durch Lagerung im Vakuumtrockenschrank oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur für mindesten 3 Stunden entfernt. Unilamellare Vesikel wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Extrusionsmethode hergestellt. Hierzu wird der Film mit 500 µl bis 1 ml der entsprechenden Pufferlösung versetzt, so dass eine Lipidkonzentration von 1 mg/ml resultiert. Oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids wird die Lösung für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 20 Sekunden mit Hilfe eines Vortexers (REAX top, Heidolph) geschüttelt, wodurch sich eine Suspension multilamellarer Vesikel bildet. Mit Hilfe eines Miniextruders (LiposoFast®, Avestin) wird diese 31 Mal durch eine Polycarbonatmembran gedrückt. Dabei bilden sich unilamellare Vesikel, deren Durchmesser minimal größer als der mittlere Porendurchmesser der Membran ist (MacDonald *et al.* 1991).

## 5.2 Probensysteme

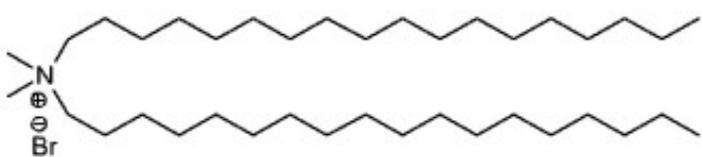
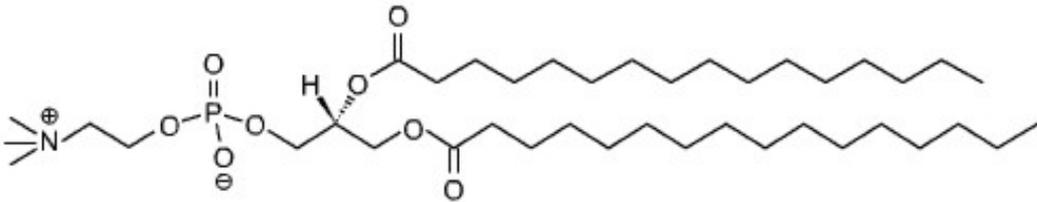
### 5.2.1 Übersicht der verwendeten Phospholipide

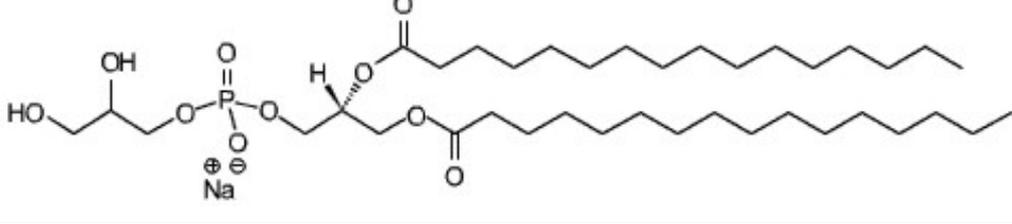
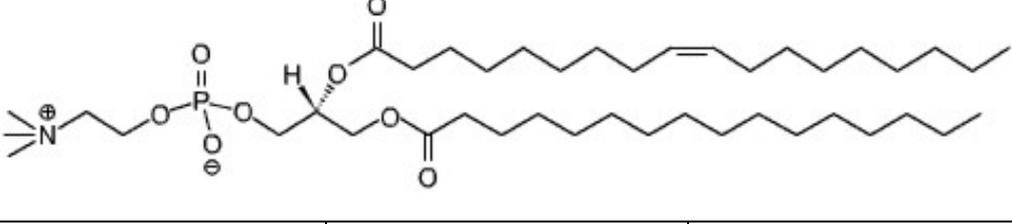
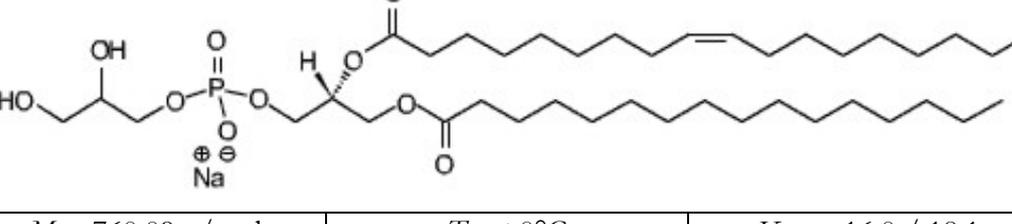
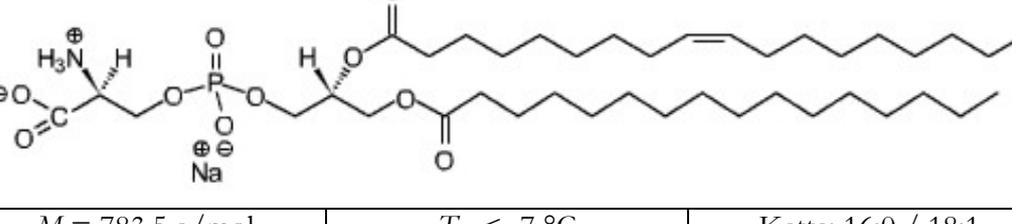
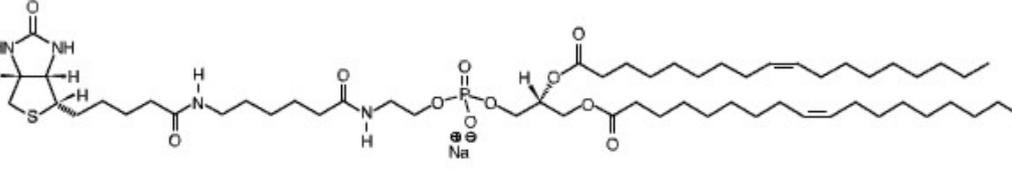
Drei der vier vorgestellten Probensysteme basieren auf dem Einsatz von Phospholipidvesikeln. Aus diesem Grund wird in diesem Abschnitt eine tabellarische Übersicht der verwendeten Lipide gegeben.

Phospholipide sind amphiphile Moleküle bestehend aus einer hydrophoben Kette und einer hydrophilen Kopfgruppe. Aufgebaut sind sie aus Glycerin, welches mit einem Phosphorsäureester und zwei Fettsäuren verestert ist. In Vesikeln richten sich die hydrophoben Kohlenstoffketten aus entropischen Gründen zueinander aus, während die hydrophilen Kopfgruppen in Kontakt mit der wässrigen Phase stehen.

Die nachfolgende Tabelle enthält die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen, die Strukturen sowie die molaren Massen  $M$  und die Hauptphasenumwandlungstemperaturen  $T_M$ . Außer den Phospholipiden ist auch das artifizielle Lipid Dimethyldioctadecylammoniumbromid aufgelistet, da es im Rahmen experimenteller Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurde.

**Tab. 5.1:** Übersicht der verwendeten Phospholipide, Strukturformeln und physikalischen Eigenschaften (Avanti Polar Lipids, Lipidat).

Abkürzung	Name, Strukturformel und Eigenschaften des Lipids		
DDAB	Dimethyldioctadecylammonium (Bromid-Salz)		
			
	$M = 629.55 \text{ g/mol}$	$T_M > 40^\circ\text{C}$	Kette: 18:0 / 18:0
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin		
			
	$M = 734.05 \text{ g/mol}$	$T_M = 41^\circ\text{C}$	Kette: 16:0 / 16:0

Abkürzung	Name, Strukturformel und Eigenschaften des Lipids		
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)] (Natrium Salz)		
			
$M = 744.96 \text{ g/mol}$		$T_M \geq 35.6^\circ\text{C}$	Kette: 16:0 / 16:0
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin		
			
$M = 760.09 \text{ g/mol}$		$T_M = -2^\circ\text{C}$	Kette: 16:0 / 18:1
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)] (Natrium Salz)		
			
$M = 760.09 \text{ g/mol}$		$T_M < 0^\circ\text{C}$	Kette: 16:0 / 18:1
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-l-serin] (Natrium Salz)		
			
$M = 783.5 \text{ g/mol}$		$T_M < -7^\circ\text{C}$	Kette: 16:0 / 18:1
B-X-DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-N-(cap-biotinoyl-phosphoethanolamin)		
			
$M = 1104.69 \text{ g/mol}$		$T_M$ nicht bekannt	Kette: 18:1 / 18:1

### 5.2.2 Latex Beads (Polymer-Kolloide) auf funktionalisierter Goldoberfläche

Ein stark reduziertes Modellsystem für die Adhäsion und Adsorption von Biomolekülen und Lipidvesikeln stellt die Adsorption von Latex Beads an funktionalisierte Goldoberflächen dar, da weder Deformation, noch ein Spreiten der Partikel auftritt (Xia *et al.* 2000, Adamczyk *et al.* 2002, Adamczyk *et al.* 2003). Die Latex Kugeln bestehen aus carboxylatmodifiziertem Polystyrol (Sigma Aldrich) und sind damit negativ geladen. Für eine positiv geladene Goldoberfläche sorgt eine 11-Amino-1-undecanthiol (AUT) *self-assembly*-Schicht (Probior). Deren endständige Aminogruppen sind unter den Bedingungen des eingesetzten Puffers (0.5 mM Natriumcitrat, 0.5 mM EDTA) bei pH = 6 positiv geladen. Ein Schema dieses Systems befindet sich in Abb. 5.1 A.

### 5.2.3 Unilamellare Phospholipidvesikel auf funktionalisierter Goldoberfläche

Das zweite System besteht aus unilamellaren Lipidvesikeln in Wechselwirkung mit einer positiv geladenen Oberfläche. Im Gegensatz zur Adsorption von Latex Beads zeigen Vesikel bei Wechselwirkung mit der Oberfläche verschiedene Phänomene, wie z.B. die Deformation und das Spreiten als Funktion der Adhäsionsenergie (Seifert und Lipowsky 1990, Seifert 1991, Seifert 1997).

Um Einfluss auf die Adhäsionsenergie zu nehmen und so die Deformation und das Spreiten zu kontrollieren werden sowohl Vesikel mit unterschiedlicher elektrischer Ladungsdichte, als auch mit unterschiedlicher Hauptphasenumwandlungstemperatur verwendet. Aus diesem Grund bestehen die Vesikel zum einen aus DPPC/DPPG, zum anderen aus POPC/POPG mit variierendem PG-Gehalt.

Die Präparation der Goldoberfläche beruht auf der im vorigen Abschnitt beschriebenen *self-assembly*-Technik unter Einsatz von AUT. Um die PG Kopfgruppen der Lipide zu deprotonieren wurde ein wässriger Puffer (5 mM Natriumcitrat, 0.5 mM EDTA) bei pH = 5 verwendet. EDTA bildet mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen stabilen Chelatkomplex, verhindert somit die Verbrückung der PG-Kopfgruppen über freie Calciumionen und sichert die Fluidität der POPG/POPC-Membranen. Abb. 5.1 B zeigt schematisch einen nicht deformierten Vesikel auf einem AUT SA-Film auf einer Goldoberfläche.

### 5.2.4 Biotindotierte unilamellare Vesikel auf einer Avidinschicht

Ein typisches Beispiel eines Ligand-Rezeptorsystems ist das Biotin-Avidin System. Avidin ist ein tetrameres basisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 67 kg/mol. Aufgrund der hohen Bindungskonstanten von  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  zu Biotin findet das Biotin-Avidin System in der Forschung zahlreiche Anwendungen (Janshoff 1997, Pignataro *et al.* 2000).

Das System aus biotindotierten Vesikeln auf einer mit Avidin funktionalisierten Oberfläche ist ein Ligand-Rezeptorsystem, welches der Zelladhäsion ähnelt. Um es für Adsorptionsexperimente einzusetzen wird zuerst eine Avidinschicht, deren isoelektrischer Punkt bei  $pI = 11$  liegt, auf eine Mercaptopropionsäure (MPA) *self-assembly*-Oberfläche abgeschieden (Janshoff 1997). Diese ist unter den vorherrschenden Pufferbedingungen (1 mM Tris/HCl) bei  $pH = 8$  negativ geladen. Die Vesikel werden wie im vorigen Abschnitt beschrieben hergestellt. In diesem Fall setzen sich die Liposomen aus DPPC bzw. POPC mit variierendem Biotingehalt zusammen um die Adhäsionsenergie zu steuern. Das Biotin wird in Form des biotinylierten Lipids (Biotin-X-DOPE) zugegeben. Der Spacer (6-Aminohexansäure) zwischen Biotin und Phospholipidgrundkörper ermöglicht eine bessere Bindung an die tiefe Avidin-Bindungstasche. Die Bestandteile dieses Probensystems sind in Abb. 5.1 C schematisch wiedergegeben.

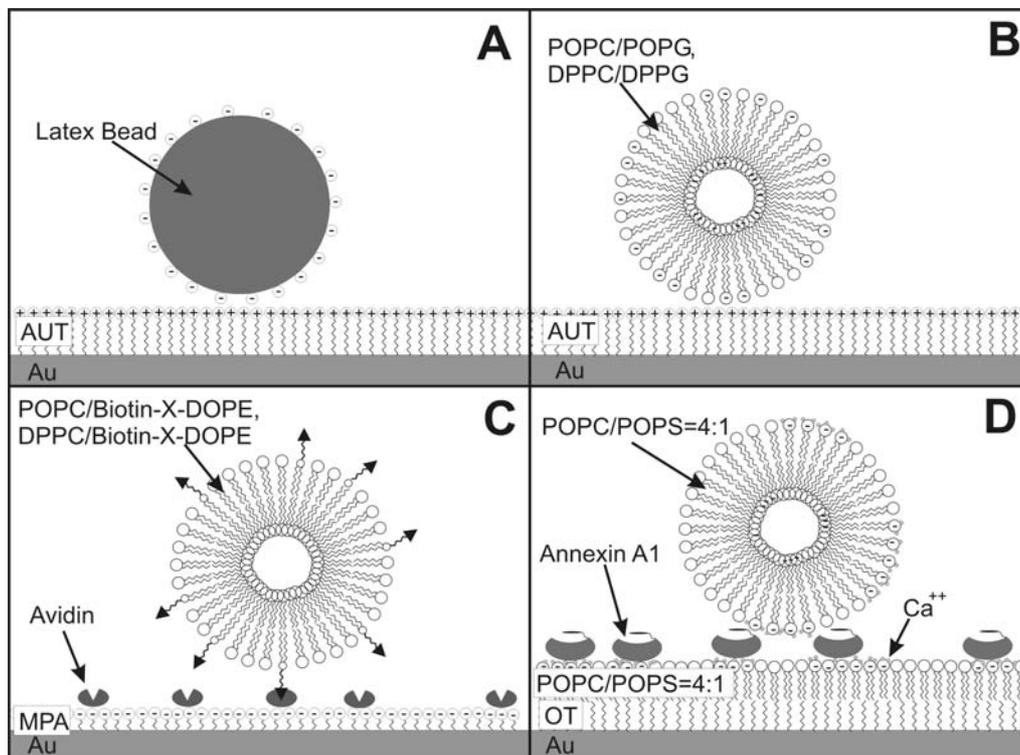


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der untersuchten Probensysteme

### 5.2.5 Membran-Membran Wechselwirkung vermittelt durch Annexin A1

Annexine gehören zu einer Familie strukturell verwandter eukariotischer Proteine, die abhängig vom Calciumgehalt der Umgebung reversibel an Membranen mit anionischen Phospholipiden binden. Die Proteinklasse ist durch ihre charakteristische Struktur, bestehend aus einem hochkonservativen Kern von vier oder acht Domänen mit jeweils 70 Aminosäuren, die fünf  $\alpha$ -Helizes und einen N-Terminus variabler Länge formen, gekennzeichnet. Dieser scheint für die Regulierung verschiedener Annexin-Funktionen verantwortlich zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass Annexine nicht nur eine einzelne Funktion besitzen, sondern sie in verschiedenen zellulären Prozessen involviert sind. So interagieren sie mit einer Vielzahl von Liganden innerhalb und außerhalb der Zelle. Ihnen werden regulatorische Funktionen im Bereich der Entzündung, der Immunsuppression und des Membrantransports zugesprochen. Das Protein liegt löslich im Cytosol vor und bindet reversibel durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol an Membranstrukturen, wie z.B. an die Plasmamembran.

Zur Untersuchung der Membran-Membran Wechselwirkung vermittelt durch Annexin A1 wird zuerst eine Lipidmonoschicht gewünschter Zusammensetzung über einen Vesikelspreitprozess auf einer hydrophoben OT SA-Schicht auf eine Goldoberfläche gebracht. Auf dieser so genannten Hybridmembran wird die Annexin-Anbindung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen gemessen. Der letzte Schritt besteht darin, Vesikelanbindung bei verschiedenen Pufferzusammensetzungen zu beobachten. Dazu wird die Ionenstärke über den Natriumchloridanteil kontrolliert, während die Variation des Calciumgehaltes des Puffers Rückschlüsse über den Mechanismus der Membran-Membran Wechselwirkung vermittelt durch Annexin A1 erlaubt. Sowohl die festkörpergestützte Membran, als auch die Membran der Vesikel besteht aus einem POPC/POPS = 4:1 Lipidgemisch. Einen Überblick über die Komponenten dieses Systems gibt die schematische Abbildung 5.1 D.

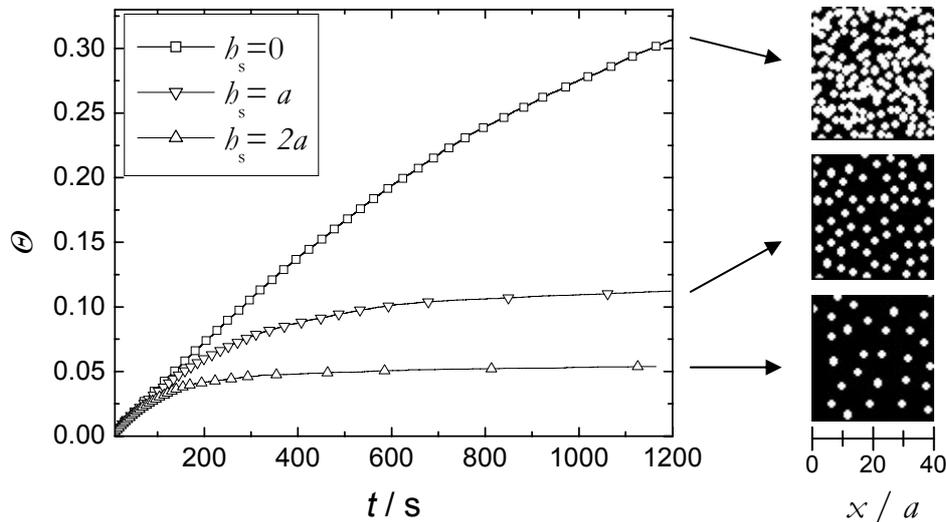
## 6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In diesem Kapitel werden die Daten der in Kapitel 5 vorgestellten Probensysteme an MC-Simulationen angepasst, um kinetische Konstanten zu extrahieren. Die vorgestellten experimentellen Daten sind größtenteils im Rahmen systematischer Studien entstanden und finden sich teilweise in Publikationen wieder (Lüthgens *et al.* 2003, Faiß *et al.* 2004, Kastl *et al.* 2004, Kastl *et al.* 2005). Der Hauptteil meiner Arbeit bestand neben der Messtechnik darin, das Simulationsprogramm an die immer neuen Anforderungen und Eigenschaften der unterschiedlichen Probensysteme durch geeignete Modellannahmen anzupassen, mit dem Ziel, die Kinetik biologischer Prozesse direkt zu quantifizieren.

Zunächst wird anhand des Modellsystems der Latex Beads auf funktionalisierter Goldoberfläche der Einfluss des Massentransports auf den Adsorptionsprozess experimentell nachgewiesen und durch Anpassung von MC-Simulationen an die Adsorptionsisothermen die theoretische Abschätzung der Transportrate nach Gleichung (2.27) überprüft. Im nächsten Abschnitt wird der Einfluss der Simulationsparameter auf den zeitlichen Verlauf der Frequenzverschiebungen dargelegt und daraus ein Verfahren zur Anpassung der Simulationen an experimentelle Daten bei Adsorption von Vesikeln abgeleitet. Anschließend wird exemplarisch das Vorgehen zur Messung des Adsorptionsverhaltens am Beispiel von DDAB/DPPC-Vesikeln an einer mit MPA funktionalisierten Goldoberfläche betrachtet. Der Einfluss der Variation der elektrischen Nettoladung und der Hauptphasenumwandlungstemperatur der Liposomen auf das Verhalten nach der Adsorption wird über den Anteil des geladenen Lipids DPPG, bzw. POPG in DPPC/DPPG-, bzw. POPC/POPG-Vesikeln systematisch untersucht. Die darauf folgenden Abschnitte widmen sich der Adsorption biotinylierter Liposomen bei variierendem Biotingehalt und der Membran-Membran Wechselwirkung vermittelt durch Annexin A1. Die Eigenschaften der genannten Probensysteme werden charakterisiert und eine Anpassung an die aus Simulationen gewonnenen Daten wird versucht. Zuletzt wird auf die Signifikanz der ermittelten kinetischen Konstanten eingegangen.

## 6.1 Adsorption von Latex Beads

Latex Beads bieten gegenüber den anderen im Rahmen dieser Arbeit genutzten Probensystemen den Vorteil, dass sie abgesehen von minimaler Deformation keine weiteren Modifikationen nach Adsorption an der Oberfläche erfahren. Insofern können aus der Anpassung des Adsorptionsverlaufs an eine simulierte Adsorptionsisotherme sowohl die Transport-, als auch die Wechselwirkungskonstante sehr gut extrahiert werden. Problematisch ist die Abschätzung der Gesamtbelegung der Oberfläche mit Latexkugeln. Aufgrund der Coulombwechselwirkung stoßen sich die Latex Beads bei hohen Debyelängen  $\kappa^{-1}$  voneinander ab, was zu einer Vergrößerung des effektiven Radius nach dem in Kapitel 2.3.1 vorgestellten *hard particle* Konzept und einer Verringerung der Belegung führt. Zur Veranschaulichung ist dieser Effekt in Abb. 6.1 dargestellt.

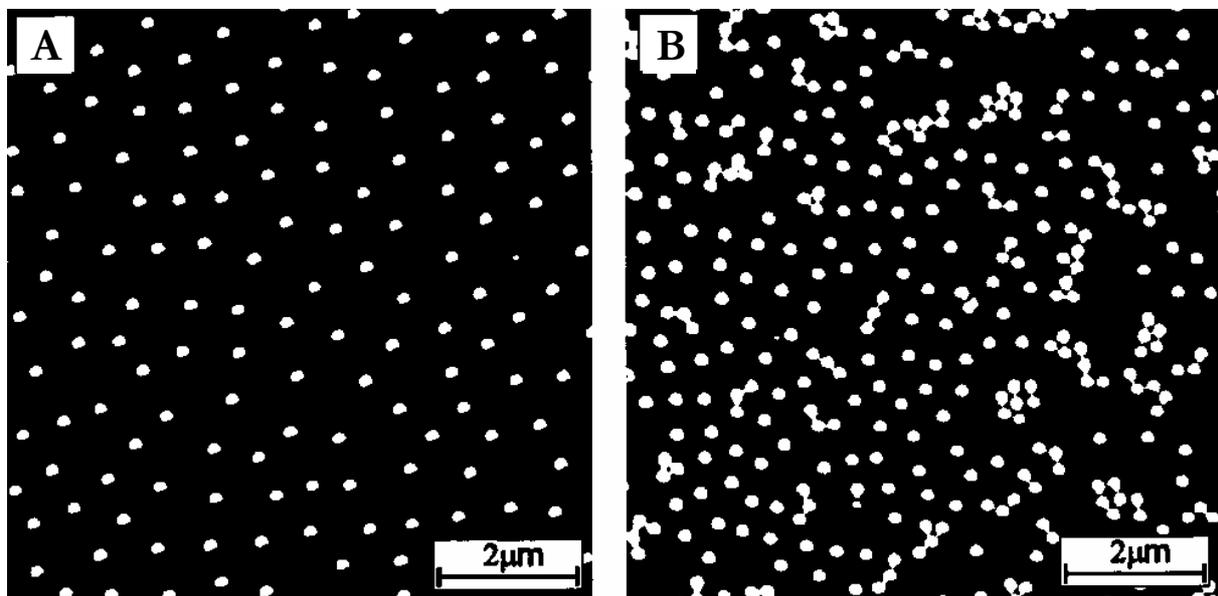


**Abb. 6.1:** Simulierter zeitlicher Verlauf der Belegung bei Berücksichtigung des Corona Effektes. Die Partikel erhalten nach dem *hard particle* Konzept einen Radius  $a^*=a+h_s$ . Aufgrund der effektiven Vergrößerung des Radius sinkt das *jamming limit* für  $h_s = a$  auf  $0.547/4$  und für  $h_s = 2a$  auf  $0.547/9$ . Ausschnitte der zugehörigen Belegungen am Ende der Simulation sind rechts dargestellt. Die Kantenlänge ist in Einheiten des Partikelradius gegeben. Simulationsparameter:  $\rho_{\text{bulk}} = 1.8 \cdot 10^{15} \text{ m}^{-3}$ ,  $k_{\text{tr}} = 3.7 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$ ,  $k_{\text{on}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$ ,  $a = 0.5 \text{ }\mu\text{m}$ .

Aufgetragen ist der simulierte zeitliche Verlauf der Belegung für unterschiedliche effektive Partikelradien. Die Änderung des Belegungsgrades in Abhängigkeit von der Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkung ist für die drei Fälle  $h_s = 0$ ,  $h_s = a$  und  $h_s = 2a$  deutlich erkennbar. Ist die Reichweite Null so liegt eine gewöhnliche RSA Simulation vor. Für die beiden

anderen Fälle verdoppelt bzw. verdreifacht sich der Gesamtdurchmesser wegen der Beziehung  $a^* = a + b_s$ . Daher ändert sich auch die mögliche maximale Belegung. Rechnerisch ergibt sich aufgrund der gewählten effektiven Radien für unendlich lange Simulationszeiten im RSA-Modell eine Belegung von  $\Theta_\infty = 0.547/4$  für  $b_s = a$  und  $\Theta_\infty = 0.547/9$  für  $b_s = 2a$ . Die drei Kurven unterscheiden sich daher stark in ihrem Verlauf. Für die beiden letztgenannten Fälle ist nach der Simulationszeit  $t = 1200$  s schon fast ein Sättigungszustand erreicht, der sich in einer geringen Steigung der zeitlichen Belegung äußert. Die Belegung für den Fall der gewöhnliche RSA ist zu diesem Zeitpunkt hingegen noch weit entfernt vom *jamming limit*. Nebenstehend sind Ausschnitte der zugehörigen Oberfläche nach der Simulationszeit  $t = 1200$  s mit einer Skala in Partikelradien gegeben. Die Ausschnitte zeigen deutlich die abnehmende Dichte der adsorbierten Partikel mit zunehmendem effektiven Radius.

Diese Betrachtung lässt vermuten, dass für Latexkugeln, die eine elektrische Nettoladung tragen, der Belegungsgrad in Sättigung geringer als 0.547 ist. Adamczyk und Warszynski, sowie Semmler et al., zeigen jedoch für ähnliche Systeme, dass unter den während der Messung vorherrschenden Ionenstärken das *jamming limit* fast erreicht werden kann (Adamczyk und Warszynski 1996, Semmler et al. 1998). In der zuletzt genannten Arbeit finden sich die in Abb. 6.2 gezeigten rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen von positiv geladenen Latex Beads auf einer Glimmeroberfläche.

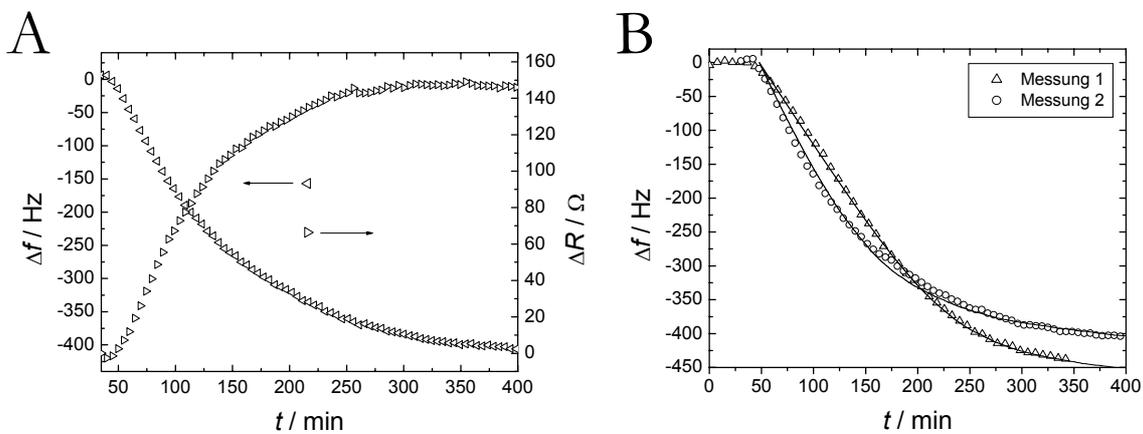


**Abb. 6.2:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von positiv geladenen Latex Beads auf einer Glimmeroberfläche bei verschiedenen Ionenstärken (Semmler et al. 1998). A  $I \approx 10^{-5}$  M, B  $I \approx 10^{-4}$  M.

Die Aufnahmen sind nach Spülen mit Reinstwasser und Trocknen bei  $60^\circ$  C durchgeführt

worden. Bild A zeigt eine repräsentative Aufnahme nach Adsorption von Beads bei einer Ionenstärke von ungefähr  $10^{-5}$  M, Bild B ist nach Adsorption bei einer Ionenstärke von  $10^{-4}$  M entstanden. Deutlich erkennbar ist die zunehmende Dichte der Latexkugeln mit zunehmender Ionenstärke. Zudem liegen in Bild B teilweise Beads direkt nebeneinander. Dies tritt nur ein, wenn die Debyelänge so gering ist, dass die elektrische Ladung der Beads direkt abgeschirmt ist. Die im Vergleich mit Abb. 6.1 (Ausschnitt der Oberfläche oben rechts) geringere Dichte der Partikel lässt sich mit der zugegebenen Latexkugelmenge erklären. Die den Experimenten der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Ionenstärken liegen bei ungefähr  $10^{-3}$  M, so dass die repulsiven Wechselwirkungen der Latex Beads hier vernachlässigt werden können und die Beads beliebig dicht auf der Oberfläche liegen können.

Die Beads werden im Experiment im Überschuss zugegeben, so dass für die Simulationen von einer vollen Belegung ausgegangen wird. Zur Kontrolle der Transportkonstante  $k_{tr}$  sind Messungen mit unterschiedlichen Pumpraten durchgeführt worden. Eine typische Messung zeigt Abb. 6.3 A. Aufgetragen ist die Verschiebung der Resonanzfrequenz (linke Skala) und die Änderung des Widerstandes (rechte Skala), der mit Hilfe von Gl. (4.21) aus der halben Halbwertsbreite ermittelt wurde, gegen die Zeit.



**Abb. 6.3:** A Quarzmikrowaagemessungen der Adsorption von Latex Beads ( $d = 500$  nm) an einer mit AUT funktionalisierten Goldoberfläche aufgenommen mit einem Netzwerkanalysator. Sowohl die Resonanzfrequenz, als auch der Widerstand zeigen große Verschiebungen. B Frequenzverschiebungen bei unterschiedlichen Transportraten  $k_{tr} = 6.1 \cdot 10^{-8}$  m/s ( $\blacktriangle$ ) und  $k_{tr} = 3.7 \cdot 10^{-7}$  m/s ( $\bullet$ ) nach Gl. (2.27) und dazugehörige Simulationen (durchgezogenen Linien) mit den Parametern  $\rho_{bulk} = 7.3 \cdot 10^{15} \text{ m}^{-3}$ ,  $k_{tr} = 3 \cdot 10^{-8}$  m/s und  $k_{on} = 8 \cdot 10^{-7}$  m/s für Messung 1 und  $\rho_{bulk} = 1.8 \cdot 10^{15} \text{ m}^{-3}$ ,  $k_{tr} = 2 \cdot 10^{-7}$  m/s und  $k_{on} = 8 \cdot 10^{-7}$  m/s für Messung 2.

Auffallend sind die hohen Resonanzfrequenz- und Widerstandsänderungen, die nur erklärt werden können, wenn angenommen wird, dass das zwischen den Kugeln befindliche Wasser zur Masse beiträgt. Zur weiteren Auswertung werden nur die Frequenzverschiebungen zu Rate gezogen. In Teil B der Abbildung sind diese für zwei verschiedene Messungen durch Symbole dargestellt und zusätzlich Simulationen mit Parametern, die die Kurvenform am besten wiedergeben, eingebracht (durchgezogene Linien). Die Messungen sind mit unterschiedlichen Pumpsystemen betrieben worden. Während Messung 1 mit einer Spritzenpumpe (Syringe Pump Model R-99 E, Razel Scientific Instruments) bei sehr geringem Vortrieb (0.25 ml/h) betrieben wurde und die aus der Zelle herausfließende Lösung dem System verloren geht, ist Messung 2 mit einer pulsationsfreien Perestaltikpumpe (Perimax 16 Antipuls, Spetec) mit einer Pumprate von 28 ml/h in einem geschlossenen Kreislauf durchgeführt worden. Durch geeignete Wahl der Dichte der Latex Beads in Lösung sind dennoch ähnliche Verläufe zu erreichen. Werden die Pumpraten bei entsprechendem Zuleitungsdurchmesser in Gleichung (2.27) eingesetzt und der dimensionslose Parameter  $\alpha_0$  mit Hilfe von Gleichung (2.28) berechnet, so lassen sich die theoretischen Konstanten mit den aus Simulationen erhaltenen Parametern vergleichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tab. 6.1:** Zusammenfassung der kinetischen Konstanten aus der Anpassung von MC-Simulationen an die Adsorptionskinetiken von Latex Beads bei verschiedenen Pumpraten und Teilchendichten und Vergleich mit theoretischen Werten.

<b>Pumprate</b>	<b>Dichte</b>	$k_{tr-theo}$	$k_{tr}$	$k_{on}$
ml/h	$m^{-3}$	m/s	m/s	m/s
0.25	$7.3 \cdot 10^{15}$	$6.1 \cdot 10^{-8}$	$(4.5 \pm 1.5) \cdot 10^{-8}$	$(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$
28	$1.8 \cdot 10^{15}$	$3.7 \cdot 10^{-7}$	$(2.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-7}$	$(1.4 \pm 0.6) \cdot 10^{-6}$

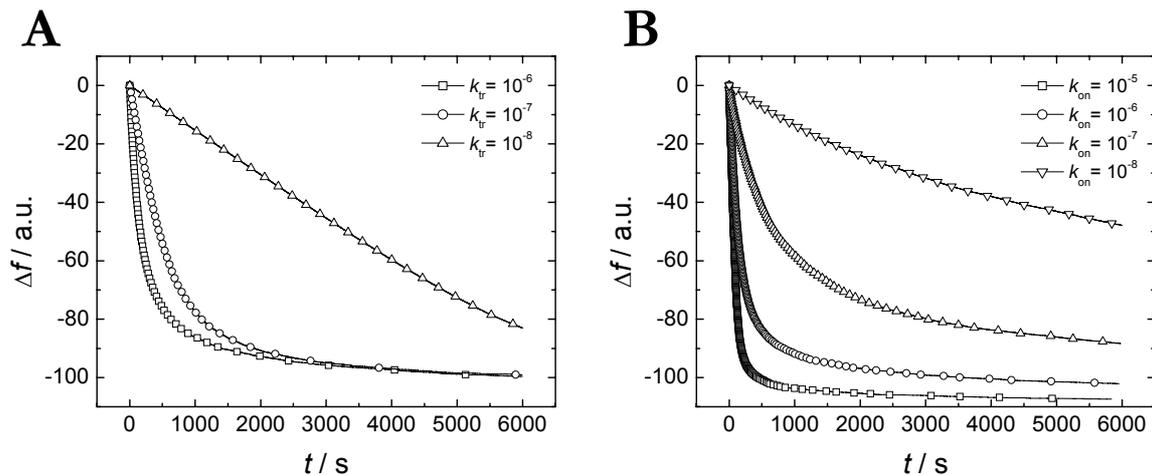
Es zeigt sich, dass die für den Transport ermittelten Werte aus der Simulation kleiner als die nach Gleichung (2.27) berechneten Werte sind. Da diese Gleichung wegen einiger Näherungen, wie bereits im Theorieteil erwähnt, eine Abschätzung für die maximale Transportkonstante ist, ist die geringe Abweichung in Richtung kleinerer Transportwerte zu erwarten. Zudem muss beachtet werden, dass die Staupunktgeometrie bei den vorliegenden Abmessungen der Flüssigkeitszelle (Radius des Zuflusses  $R = 0.5$  mm, Radius der oberen Arbeitselektrode  $R_A = 2.5$  mm) streng genommen nur für den mittleren Teil der Quarzoberfläche zutrifft, während die äußeren Bereiche eher durch eine horizontale Flüssigkeitsbewegung relativ zur Oberfläche zu beschreiben

ist. Da die Sensitivität des Quarzes in der Mitte jedoch größer ist, wird dieser Effekt wiederum verringert.

Bei Betrachtung und Vergleich der experimentellen und berechneten Tabellenwerte zeigt sich, dass die Adsorption von Latex Beads mit Hilfe eines RSA Modells und des in Kapitel 2.3.2 vorgestellten *mean-field*-Ansatzes zur Berechnung der Transportrate akkurat beschrieben werden kann.

## 6.2 Einfluss der Simulationsparameter

Nach den im vorigen Abschnitt präsentierten Messungen von Latexkugeln auf funktionalisierter Oberfläche stellt sich die Frage, wie der zeitliche Verlauf der Frequenzverschiebung bei Adsorption von Liposomen, oder allgemeiner von visko-elastischen Körpern, modelliert werden kann. Hierzu wird zunächst gezeigt, welchen Einfluss die Simulationsparameter auf den simulierten zeitlichen Verlauf der Adsorption haben. Hauptaugenmerk wird dabei auf die Adsorptionskonstante  $k_{\text{on}}$  und auf die Transportkonstante  $k_{\text{tr}}$  gelegt. Zudem wird auch der Einfluss der Spreitkonstante  $k_{\text{rup}}$  dargestellt und gezeigt, dass diese verantwortlich ist für den Übergang von einer streng monoton abfallenden Charakteristik der Frequenzverschiebung zu einem Verlauf, der ein definiertes Minimum in der Frequenzverschiebung aufweist. Die Desorptionskonstante  $k_{\text{off}}$  ist für die in den folgenden Abschnitten präsentierten Messungen nicht relevant, da von irreversiblen Bindungen ausgegangen wird. Der Einfluss dieser Konstante auf den Verlauf der Adsorptionsisothermen erschließt sich in Kapitel 7.



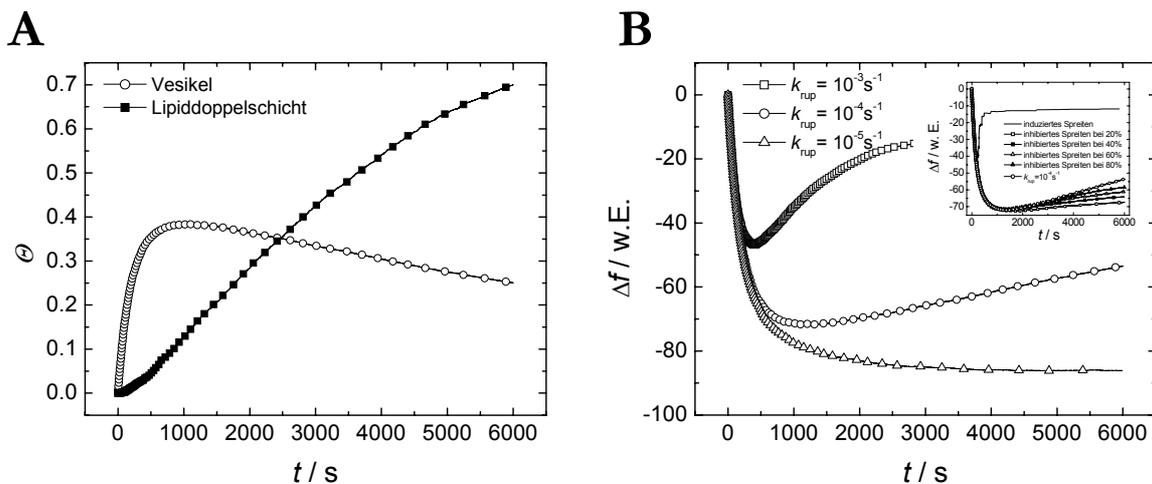
**Abb. 6.4:** Einfluss der kinetischen Konstanten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{tr}}$  auf den zeitlichen Verlauf der Frequenzverschiebung. A Variation der Transportrate bei fester Adsorptionsrate  $k_{\text{on}} = 5 \cdot 10^{-7}$  m/s. B Variation der Adsorptionsrate bei fester Transportrate  $k_{\text{tr}} = 5 \cdot 10^{-7}$  m/s. Weitere Simulationsparameter:  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18}$  m<sup>-3</sup>,  $A = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>,  $d = 100$  nm.

Die Änderung der Frequenzverschiebung bei Variation der kinetischen Konstanten ist in Abb. 6.4 gezeigt. Durch die Transportkonstante wird die Anfangssteigung geprägt. Dies folgt schon aus der Algorithmusbeschreibung in Kapitel 3.2, denn die Simulationszeit wird nur bei erfolgreichen Adsorptionsversuchen um den Transportfaktor inkrementiert, d.h. nahe des

*jamming limits* ist der Einfluss von  $k_{tr}$  vernachlässigbar. Da  $k_{tr}$  reziprok in das Zeitinkrement eingeht, äußert sich ein kleiner Wert in einer langsamen Kinetik, in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass bei langsamer Partikelzufuhr die Oberflächenreaktion fast ausschließlich von der Transportrate abhängt. Strebt  $k_{tr}$  hingegen gegen unendlich, so bestimmt allein die Adsorptionsrate die Kinetik. Deren Einfluss auf die Adsorptionskinetik ist in Teil B der Abbildung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der Übergang der anfangs schwachen Linkskrümmung der Kurve hin zu einer Form, die durch eine starke Krümmung gefolgt von einem nahezu plateauartigen Bereich gegeben ist.

Da die Transportrate hauptsächlich die Anfangssteigung bestimmt und ihr Einfluss mit zunehmender Belegung abnimmt, während die Adsorptionskonstante auch noch in diesem Bereich deutlichen Einfluss hat, lassen sich die beiden Parameter bei der Anpassung der Simulationsdaten an die experimentellen Werte voneinander trennen.

Deutlich andere zeitliche Verläufe lassen sich erreichen, wenn auch das Spreiten oder andere konformative Änderungen von adsorbierten Vesikeln in Betracht gezogen werden. Abb. 6.5 verdeutlicht dies.



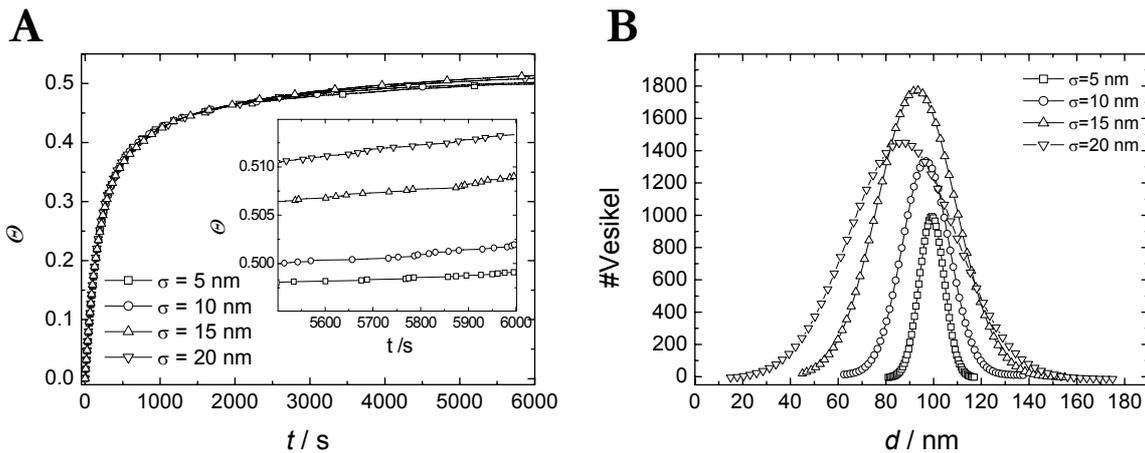
**Abb. 6.5:** Einfluss des Vesikelspreitprozesses auf den zeitlichen Verlauf der Adsorptionsisotherme. A Belegung durch Vesikel (O) und Lipiddoppelschicht (■) aufgetragen gegen die Zeit für  $k_{rup} = 10^{-4} s^{-1}$ . B Resultierende Frequenzverschiebung für verschiedene Spreitkonstanten  $k_{rup}$  mit der Annahme, dass eine vollständige Belegung mit Vesikeln 100 Hz bewirkt und eine komplette Lipiddoppelschicht 11.5 Hz. Weitere Parameter:  $k_{on} = 5 \cdot 10^{-7} m/s$ ,  $k_{tr} = 5 \cdot 10^{-7} m/s$ . Der Einsatz zeigt den Verlauf für die Spreitrate  $k_{rup} = 10^{-4} s^{-1}$  für den Fall des inhibierten Spreitens und des durch Lipiddoppelschichten induzierten Spreitens.

Teilbild A zeigt die Belegung der Oberfläche aufgetragen gegen die Zeit für  $k_{rup} = 10^{-4} s^{-1}$ . Die

Anzahl der adsorbierten Vesikel nimmt zunächst zu, da zeitlich mehr Vesikel durch Transport zur Oberfläche gelangen als durch Spreiten verloren gehen. Nach Durchlauf eines Maximums nimmt deren Anzahl stetig ab, da ein Großteil der Oberfläche mit Vesikeln und Doppelschicht belegt ist und somit nur noch wenige Vesikel adsorbieren können. Der Prozess des zeitlichen induzierten Spreitens hingegen führt zu einem stetigen Anwachsen der Fläche, die durch eine Lipiddoppelschicht belegt ist. Ist die Frequenzverschiebung für eine nur mit Vesikeln belegte Oberfläche bekannt, so lässt sich die Gesamtänderung der Frequenz abschätzen, wenn für die Doppelschicht ein Wert nach dem Sauerbrey-Modell einer starren, synchron mitschwingenden Schicht angenommen wird. In diesem Fall (Teilbild B) ist für eine vollständige Belegung mit Vesikeln eine Verschiebung von 100 Hz angenommen worden, während eine Lipiddoppelschicht lediglich einen Beitrag von 11.5 Hz leisten soll. Neben der sich aus Bild A ergebenden Kurve für  $k_{\text{rup}} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  sind noch zwei weitere hypothetische Verläufe für  $k_{\text{rup}} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{\text{rup}} = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  simuliert worden, die zeigen, wie sich die Frequenzverschiebung als Funktion der Zeit bei zunehmender Spreitkonstante verändert. Bei kleinen Werten dieser Konstante unterscheidet sich die Kurvenform kaum sichtbar von den in Abb. 6.4 gezeigten Adsorptionsisothermen aufgrund des geringen Effektes, den eine Lipiddoppelschicht auf die Frequenzverschiebung hat. Erst bei größeren Werten, d.h. in diesem Fall ab  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , ändert sich der Verlauf sichtlich. Für die später durchgeführten Anpassungen an die experimentellen Daten bedeutet dies, dass die Variation der Spreitrate nur schwer greifbar ist, da nur bei hohen Raten der Einfluss signifikant ist. Zusätzlich ist in dem Ausschnitt der Abbildung für eine Spreitrate für verschiedene Spreitkonstanten  $k_{\text{rup}} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  der Einfluss der Optionen des inhibierten Spreitens und des durch Lipiddoppelschicht induzierten Spreitens auf den Verlauf der Adsorptionsisotherme dargestellt. Das induzierte Spreiten äußert sich in einer sprunghaften Adsorptionsisotherme, da das Aufplatzen einzelner Vesikel zu einer Kette von instantanen Spreitereignissen führt. Der Einfluss des inhibierten Spreitens hebt sich nicht so deutlich von den typischen Adsorptionsisothermen mit nachfolgenden Spreitereignissen ab. Die gezeigten Verläufe entsprechen den Fällen, bei denen Vesikel, die zeitlich induziert aufplatzen sollen, durch angrenzende Lipiddoppelschichten daran gehindert werden. Vor dem Aufplatzen wird die an den Vesikel angrenzende Adsorptionsoberfläche untersucht. Wenn die Belegung mit einer Lipiddoppelschicht einen gewissen Grad  $\gamma$  übersteigt, ist das Spreiten inhibiert. Abgebildet sind Fälle bei denen  $\gamma$  zwischen 20% und 80% liegt. Der Fall  $\gamma = 100\%$  entspricht daher in seinem Verlauf einer Adsorptionsisotherme mit gewöhnlichem zeitlich induzierten Spreiten. Von dieser weicht die Kinetik der Adsorptionprozesses bei Aktivierung der Option

des inhibierten Spreitens anfangs nicht ab. Nachdem die ersten Liposomen aufgeplatzt sind, führt der Einfluss der Lipiddoppelschicht in Abhängigkeit von  $\gamma$  immer wieder zur Inhibition von Spreitereignissen. Besonders deutlich erkennbar ist dies für den Fall  $\gamma = 20\%$ . Mit zunehmendem  $\gamma$  wird der Effekt immer geringer.

Von theoretischem Interesse ist noch der Einfluss der Polydispersität auf die Adsorptionsisotherme. Einen kurzen Einblick in diese Thematik gibt Abb. 6.6.



**Abb. 6.6:** Einfluss der Polydispersität der Partikel auf die Belegung. A Belegung gegen die Zeit für Partikel mit mittlerem Durchmesser  $d = 100$  nm und verschiedenen Standardabweichungen  $\sigma$ . Die Werte sind der Legende zu entnehmen. B Größenverteilung der Partikel auf der Oberfläche am Ende der in A gezeigten Simulationen.

Teilbild A zeigt typische Adsorptionsisothermen für Partikel, deren Durchmesser einer gaußschen Größenverteilung unterliegen. Unterschiede in der Belegung werden erst nahe des *jamming limits* sichtbar und sind im Einsatz vergrößert dargestellt. Wird der Durchmesser der adsorbierten Partikel am Ende der Simulation gegen deren Anzahl aufgetragen, so ergibt sich wieder eine Gaußverteilung, wobei das Maximum der Verteilung mit zunehmender Standardabweichung sinkt. So liegen die Maxima im gezeigten Fall bei 99.3 nm für  $\sigma = 5$  nm, bei 96.7 nm für  $\sigma = 10$  nm, bei 92.8 nm für  $\sigma = 15$  nm und bei 87 nm für  $\sigma = 20$  nm. Die gezeigten Phänomene äußern sich erst nahe des *jamming limits*, da dann die Adsorption von Partikeln deren Durchmesser linksseitig des Maximums der Gaußverteilung liegen, bevorzugt stattfindet. Zudem erhöht sich die maximal mögliche Belegung mit zunehmender Standardabweichung. Für die den Anpassungen der Messergebnisse zugrunde liegenden Simulationen ist dieser interessante Effekt vernachlässigbar, da die Polydispersität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Liposomen

aufgrund der Herstellung mit Hilfe der Extrusionsmethode in dem gezeigten Bereich liegt. Eine ausführliche Untersuchung des Einflusses der Polydispersität auf MC-Simulationen nach dem Modell der RSA haben Adamczyk und Mitarbeiter durchgeführt (Adamczyk *et al.* 1997).

Zuletzt soll hier noch kurz auf das in Kapitel 3.2.3 vorgestellte Modell der heterogenen Oberfläche eingegangen werden. Im Rahmen der Simulationen wird diese Option eingesetzt, um Bereiche auf der Goldoberfläche zu berücksichtigen, auf denen die Funktionalisierung Defekte aufweist. Dadurch haben diese Regionen eine andere Adsorptionsrate und das Spreiten von Vesikeln ist unter Umständen inhibiert, da die Adhäsion nicht ausreicht. Die Aktivierung dieser Option führt jedoch bei mangelnder Information über die Oberflächenverteilung zu einem Normierungsproblem bei der Anpassung der Simulationsdaten an die Adsorptionsisotherme. Um dies zu beleuchten wird zunächst die Methode vorgestellt, mit der die Parameter der Simulation bestimmt werden.

Das Verfahren ist im Prinzip ein „Versuch und Irrtum“ Verfahren. Zunächst werden aus den Daten des Messprotokolls die notwendigen Werte entnommen bzw. berechnet. Ist keine Größenbestimmung der Vesikel, z.B. mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung, durchgeführt worden, so wird der nominelle Durchmesser der Löcher in der Polycarbonatmembran als Vesikeldurchmesser mit einer Standardabweichung von 20% angenommen. Aus dem Durchmesser und der Masse der eingesetzten Lipide sowie dem Volumen des Kreislaufs der Messapparatur ergibt sich die Dichte der Vesikel in Lösung. Mit Hilfe der Gleichungen (2.25) und (2.27) und der Pumprate kann dann der Transport abgeschätzt werden. Für die Adsorptionsrate wird ein Wert angenommen, der in der Größenordnung liegt, die durch die beiden Gleichungen (2.24) und (2.26) gegeben ist. Anschließend werden die gewünschten Optionen des Simulationsprogramms festgelegt und die Simulation gestartet. Bei einer Simulation werden die prozentuale Belegung der Oberfläche mit Vesikeln und Lipiddoppelschicht, sowie ein Bild der Verteilung auf der Oberfläche ausgegeben. Für den Fall intakter Vesikel auf der Oberfläche wird angenommen, dass die Oberfläche nach Adsorption der Vesikel nahezu vollständig belegt ist, so dass eine Normierung mit einem Faktor von ungefähr  $-\Delta f/0.547$  zur gewünschten Isotherme führt. Zeigen Messwerte und simulierte Daten schlechte Übereinstimmung, so wird versucht, die Anfangssteigung durch Optimierung von  $k_{tr}$  anzupassen und den Gesamtverlauf mit Hilfe von  $k_{on}$  in Übereinstimmung zu bringen.

Sobald die Option des Spreitens aktiviert ist, treten Normierungsprobleme auf. Zunächst wird aus dem simulierten prozentualen Anteil der Lipiddoppelschicht deren Einfluss auf die Frequenzverschiebung nach dem Modell der starren synchron mitschwingenden Masse berechnet (s. Abschnitt 4.1.3). Die durch intakte Vesikel verursachte Frequenzänderung ist dann die

Differenz aus der gemessenen Frequenzverschiebung und der der Doppelschicht zuzurechnenden Änderung. Da keine simultanen AFM Bilder der Oberfläche vorliegen, können nur Annahmen über die zu erwartenden Oberflächenanteile von Vesikeln und Doppelschicht gemacht werden. Wegen des zusätzlichen Spreitparameters beeinflussen nun die drei Variablen,  $k_{on}$ ,  $k_{tr}$ ,  $k_{rup}$  und ein Normierungsfaktor die Anpassung. Die Bestimmung der Adsorptions- und der Transportkonstante verliert daher an Genauigkeit, so dass in diesem Fall nur die Größenordnung zuverlässig bestimmt werden kann.

Wenn zusätzlich noch die Option der heterogenen Oberfläche aktiviert wird, sind für elastische Partikel ohne weitere Informationen keine Aussagen mehr möglich. Über die Stärke der Deformation auf den unterschiedlichen Regionen der Fläche und die räumliche Verteilung, sowie die prozentualen Anteile von Doppelschicht und intakten Partikeln, kann in diesem Fall nur spekuliert werden.

## 6.3 Adsorption von elektrisch geladenen unilamellaren Vesikeln

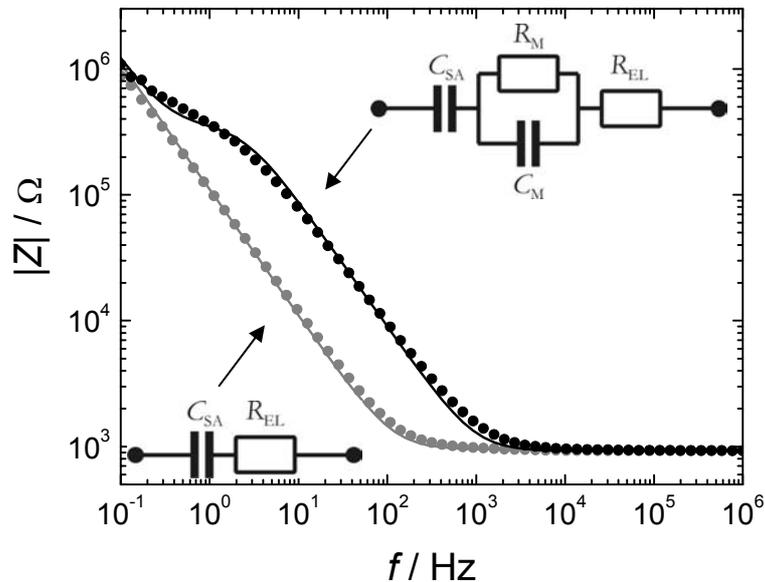
In diesem Abschnitt werden Adsorptionskinetiken von elektrisch geladenen Liposomen, die aus gelphasen-Lipiden bestehen, untersucht. Als Einstieg werden typische experimentelle Phänomene an Hand des Systems von DDAB/DPPC-Vesikeln vorgestellt. Neben der Kinetik, aufgenommen mit Hilfe der Quarzmikrowaage-Technik, wird auch kurz auf die impedanzspektroskopische Analyse der Funktionalisierung und der Oberfläche nach Vesikeladsorption eingegangen. Für eine systematische Untersuchung des Adsorptionsprozesses geladener Liposomen wird an Stelle des geladenen artifiziellen Lipids DDAB das Phospholipid DPPG in DPPC/DPPG-Vesikeln verwendet. Um den Einfluss der Fluidität des Lipidsystems zu beleuchten, bietet sich ein Vergleich mit POPC/POPG Liposomen an. Bei gleichen Kopfgruppen befinden sich diese wegen der auftretenden Doppelbindung in der Ölsäure bei Raumtemperatur im fluiden Zustand.

### 6.3.1 Experimentelle Phänomene bei Adsorption von Vesikeln

Die Liposomen der nachfolgend präsentierten Messungen bestehen aus DDAB, bzw. einem Gemisch von DDAB und DPPC. Über den molaren Anteil des einfach positiv geladenen artifiziellen Lipids DDAB ist es möglich die Nettoladung der Vesikel zu kontrollieren. Unter Pufferbedingungen (Tris/HCl, NaCl bei  $\text{pH} = 7$ ) werden sie von den teilweise deprotonierten Carbonsäuregruppen der MPA Schicht angezogen.

Vor Beginn eines typischen Adsorptionsexperimentes mit Hilfe der Quarzmikrowaage wird zunächst die Präparation der MPA *self-assembly*-Schicht auf der Goldelektrode überprüft. Zur Charakterisierung wird eine Impedanzanalyse der Grenzfläche im Frequenzbereich von 0.1 Hz bis 1 MHz durchgeführt. Ein typisches Spektrum einer gelungenen Funktionalisierung zeigt Abb. 6.7. Die Messpunkte (●) werden sehr gut durch die Übertragungsfunktion (graue durchgezogene Linie) des Ersatzschaltbildes (unten links in der Abbildung) angepasst. Der Betrag der Impedanz ist durch den Einfluss der Grenzflächenkapazität und des Elektrolytwiderstandes charakterisiert. Für Frequenzen größer als 100 Hz zeigt sich hauptsächlich der Einfluss des Widerstandes, der von der Pufferzusammensetzung und dem Abstand von Oberfläche und Gegenelektrode abhängt (s. a. Abb. 4.5). Geringere Frequenzen führen aufgrund der Frequenzabhängigkeit des kapazitiven Anteils zu einem Anstieg der Impedanz.

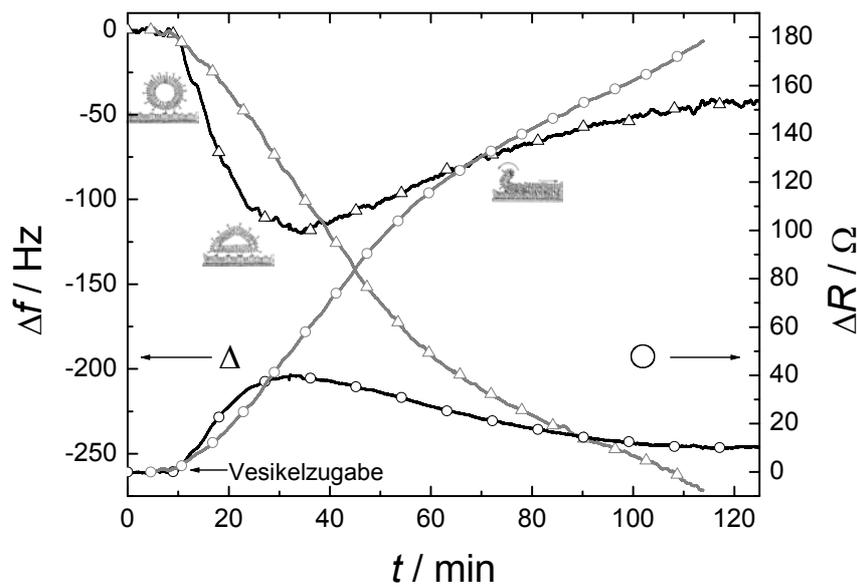
Die aus der Anpassung nach Gleichung (4.25) ermittelte Kapazität von  $C_{SA} = 7.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  stimmt mit Literaturwerten überein und spricht daher für eine erfolgreiche Funktionalisierung (Steinem 1997). Die zweite in der Abbildung dargestellte Kurve wird später diskutiert.



**Abb. 6.7:** Impedanzspektrum einer MPA *self-assembly*-Schicht (●) auf einer Goldoberfläche und nach Zugabe von DDAB/DPPC = 9:1 Vesikeln (●) in doppelt logarithmischer Auftragung. Die experimentellen Daten für die *self-assembly*-Oberfläche zeigen gute Übereinstimmung mit der Übertragungsfunktion einer Reihenschaltung eines Widerstandes und eines Kondensators (—). Für die Kapazität ergibt eine Anpassung nach Gleichung (4.25)  $C_{SA} = 9.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Die Bildung einer Lipiddoppelschicht wird in der Übertragungsfunktion durch eine Parallelschaltung eines Widerstandes und einer Kapazität berücksichtigt. Die Anpassung an das gezeigte Schaltbild ergibt  $R_M = 6.2 \cdot 10^4 \Omega\text{cm}^2$  und  $C_M = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Liegt der Wert der Kapazität im erwarteten Bereich, so wird die Zelle in den Pumpkreislauf zur Vorbereitung der QCM Messung eingebaut. Andernfalls wird die Probe verworfen.

Die folgende Abbildung zeigt Quarzmikrowaagemessungen des Systems, wobei zum einen die Vesikel aus reinem DDAB (schwarze Linie) bestehen, zum anderen aus einem Gemisch von DDAB und DPPC im molaren Verhältnis 7:3 (graue Linie). Aus den theoretischen Betrachtungen des Kapitels 4.1 ist bei einer Quarzmikrowaagemessung eine Frequenzabnahme und eine Widerstandszunahme zu erwarten.



**Abb. 6.8:** Quarzmikrowaagemessung der Adsorption von DDAB/DPPC Vesikeln ( $d=100$  nm) an einer mit MPA funktionalisierten Goldoberfläche. Die linke Skala zeigt die Verschiebung der Resonanzfrequenz, die rechte Skala die Widerstandsänderung. Die schwarze Line entspricht Liposomen aus reinem DDAB, die graue Linie einem Gemisch von DDAB und DPPC im molaren Verhältnis 7:3. Schematisch ist der Zustand der Liposomen auf der Oberfläche (Adsorption, Adhäsion und Spreiten) dargestellt und der Adsorptionsisotherme der reinen DDAB Vesikel zugeordnet (Liebau *et al.* 2001).

Beide Messkurven entsprechen im Anfangsbereich den Erwartungen. Die Resonanzfrequenzen sinken, die Widerstände steigen und die höhere Nettoladung der reinen DDAB Liposomen äußert sich in einer schnelleren Bindungskinetik im Vergleich zu den DDAB/DPPC Liposomen. An Stelle der Nettoladung ist es sinnvoll die Ladungsdichte  $\sigma_v$  der Lipiddoppelschicht der Vesikel zu berechnen, da zunächst nur ein Teil des Vesikels an der Oberfläche adsorbiert. Diese berechnet sich zu  $\sigma_v = 0.16 \text{ C/m}^2$  für DDAB/DPPC = 7:3 Vesikel und zu  $\sigma_v = 0.23 \text{ C/m}^2$  für reine DDAB Vesikel unter der Annahme, dass die Fläche der Kopfgruppen von DPPC und DDAB  $0.7 \text{ nm}^2$  beträgt. Der Verlauf der Adsorptionsisotherme der reinen DDAB Vesikel ändert sich jedoch nach ungefähr 20 min: Nach Durchlauf eines Minimums in der Resonanzfrequenz steigt diese, bis sich ein Gleichgewichtswert einstellt. Das gleichzeitige Sinken des Widerstandes spricht für eine Verringerung der Energiedissipation. Das Gesamtverhalten lässt sich daher als Adsorption mit nachfolgender Deformation und anschließendem Spreiten, gemäß dem in der Abbildung dargestellten Schema, deuten. Dieser charakteristische Kurvenverlauf findet sich auch

bei einer systematischen Untersuchung des Adsorptions- und Spreitprozesses in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit, des Vesikeldurchmessers und der Temperatur für *sn*-glycero-Phosphocholinvesikel von Reimhult und Mitarbeitern und wird auf die gleiche Weise interpretiert (Reimhult *et al.* 2003). Gegen einen geschlossenen Lipidfilm und für teilweise intakte Vesikel in Koexistenz mit planaren Lipiddoppelschichten spricht bei der hier gezeigten Messung hingegen die hohe absolute Frequenzverschiebung von fast 45 Hz nach 120 Minuten. Eventuell befinden sich daher sowohl Vesikel als auch eine Lipiddoppelschicht auf der Oberfläche. Aufschluss darüber kann die Quarzmikrowaagemessung allein nicht geben. Simultane AFM Messungen sind wegen des geschlossenen Aufbaus der Messzelle in Staupunktgeometrie nicht möglich. Die fehlende Information über die Oberflächenverteilung der Liposomen ist ein generelles Problem bei der Interpretation der kinetischen Daten.

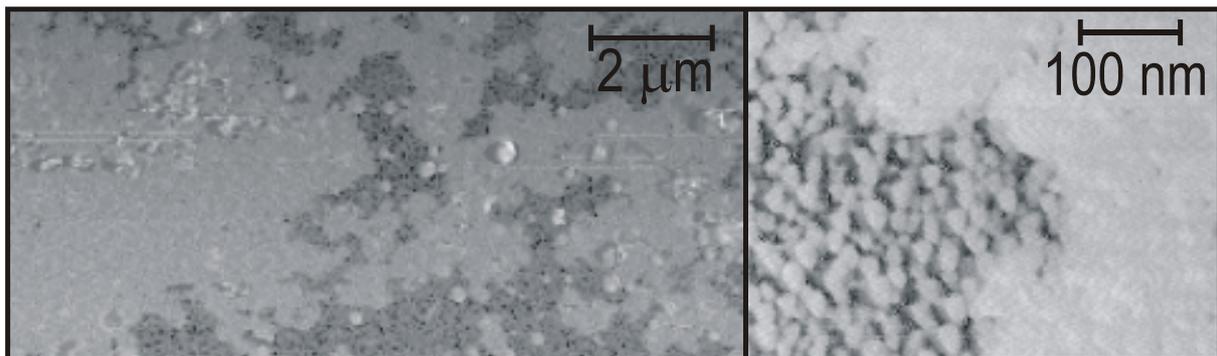
Eine Möglichkeit an zusätzliche Informationen über die Grenzfläche zu gelangen, besteht darin, nach Abschluss der Messung eine Impedanzanalyse vorzunehmen. Für den Fall einer geschlossenen Lipiddoppelschicht auf der Goldelektrode verändert sich das Impedanzspektrum aufgrund des hohen Transmembranwiderstandes  $R_M$ . Die elektronische Modellierung des Systems nach erfolgter Adsorption und Spreiten der Vesikel enthält neben der Serienschaltung aus dem Elektrolytwiderstand und der Kapazität der funktionalisierten Oberfläche eine Parallelschaltung von Membranwiderstand  $R_M$  und Membrankapazität  $C_M$  (s. Abb. 6.7). Ein typisches Spektrum mit relativ hohem Membranwiderstand  $R_M = 62000 \Omega\text{cm}^2$  nach Adsorption und Spreiten von Vesikeln der Zusammensetzung DDAB/DPPC = 9:1 zeigt Abb. 6.7. Die Übertragungsfunktion (durchgezogene schwarze Linie)

$$|Z| = \sqrt{\left( R_{\text{EL}} + \frac{R_M}{1 + (\omega C_M R_M)^2} \right)^2 + \left( \frac{1}{\omega C_{\text{SA}}} + \frac{\omega C_M R_M^2}{1 + (\omega C_M R_M)^2} \right)^2} \quad (6.1)$$

zeigt gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Dieses Verfahren ist hilfreich, wenn die Oberfläche zu einem großen Teil mit einer geschlossenen Lipiddoppelschicht belegt ist. Bei geringer Belegung sind die Änderungen in der Impedanz vor und nach der Adsorption der Vesikel nur schwer messbar, da der hohe Membranwiderstand der gespreiteten Liposomen dann parallel zum reinen Elektrolytwiderstand liegt und bei der reziproken Addition der Widerstände vernachlässigbar wird.

In separat durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen dieses Systems bestätigt sich das Ergebnis der Impedanzanalyse. Im Gegensatz zur kinetischer Untersuchung in Staupunktgeometrie wird in diesem Fall die Vesikelsuspension in geringer Konzentration der

Pufferlösung zugesetzt und für einige Stunden inkubiert. Die Vesikel adsorbieren dann diffusionskontrolliert an der Oberfläche. Um überschüssige Liposomen aus der Lösung zu entfernen wird die Probe abschließend mit Puffer gespült. Abb. 6.9 zeigt die Phase im *intermittent-contact-mode* in Graustufen nach Adsorption von DDAB/DPPC = 9:1 Vesikeln (Durchmesser  $d = 100$  nm) an einer funktionalisierten Goldoberfläche. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich die untersuchte Oberfläche aufgrund der gemessenen Energiedissipation zu unterscheiden. Im großen Ausschnitt links ist die Oberfläche zu einem großen Teil mit einer Lipiddoppelschicht belegt. Vereinzelt heben sich größere sphärische Strukturen ab, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um intakte Vesikel handelt. Neben der Doppelschicht (hellgrau) zeigen unbedeckte Bereiche die Goldoberfläche. Die körnige Struktur der aufgedampften Schicht ist im rechten Bild gut zu erkennen. Die vorliegenden AFM-, QCM- und Impedanzmessungen ergeben zusammen mit weiteren hier nicht gezeigten Messungen, dass adsorbierte Vesikel der Zusammensetzung DDAB/DPPC bis zu einem Verhältnis von 9:1 nahezu vollständig Spreiten (Lüthgens *et al.* 2003).



**Abb. 6.9:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht eines DDAB/DPPC = 9:1 Gemisches auf einer MPA *self-assembly*-Oberfläche im *intermittent-contact-mode*. Gezeigt ist die Phase aufgenommen bei hohen Amplituden. Deutlich erkennbar sind im rechten Bild die körnige Goldoberfläche und die Lipiddoppelschicht. Das linke Bild zeigt, dass neben geschlossenen Bereichen und der reinen Oberfläche auch weitere vermutlich intakte Vesikel anhaften.

An Hand des Probensystems DDAB/DPPC zeigt sich exemplarisch, wie sich QCM-, AFM- und Impedanzmessungen ergänzen und Grundlage für eine fundierte Interpretation der aufgenommenen Adsorptionsisotherme bilden.

Diesen Abschnitt schließend soll darauf hingewiesen werden, dass die mit der QCM aufgenommenen Isothermen identischer Systeme zum Teil große Abweichungen voneinander zeigen, da sie den typischen experimentellen apparativen und präparativen Fehlerquellen unterliegen. Präparativ ist zum einen die variierende Qualität der SA-Schicht zu nennen, zum

anderen ist selten eine Kontrolle der Vesikel nach Darstellung durch Extrusion durchgeführt worden, so dass hier eine Unsicherheit bezüglich Durchmesser und Anzahl vorliegt. Apparativ sind elektronische Störungen, Variation der Pumpgeschwindigkeit durch Abnutzung der Schläuche und Temperaturschwankungen durch automatisches Ein- und Ausschalten der Ventilation des Klimaschranks zu nennen (Faiß 2003).

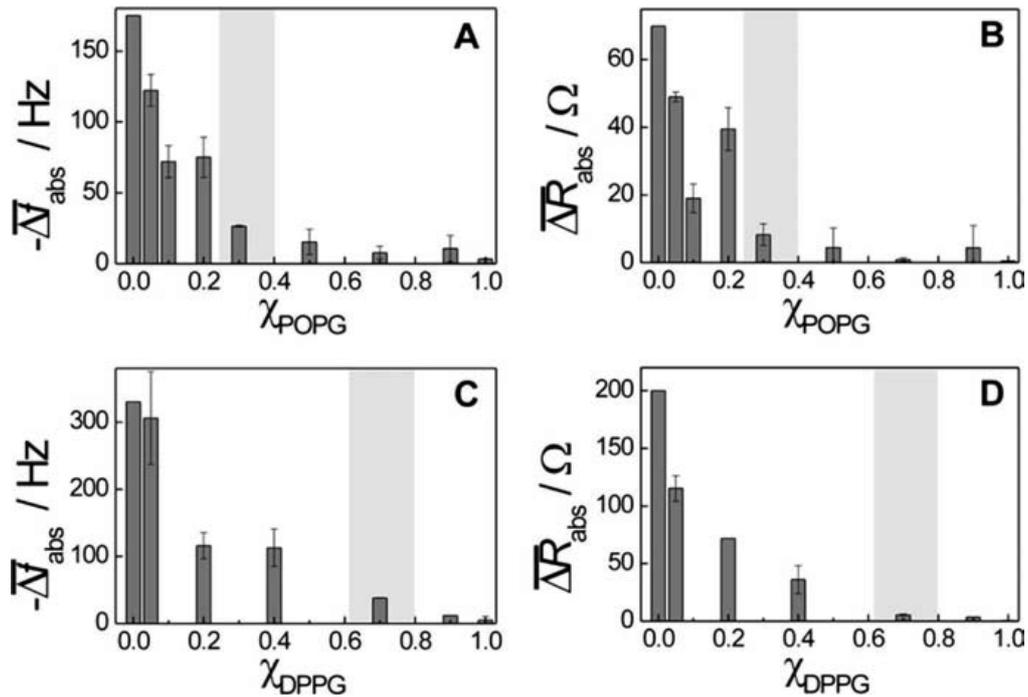
### 6.3.2 Adsorption von Phospholipidvesikeln

Nach der einführenden Betrachtung des vorherigen Kapitels soll in diesem Abschnitt die Kinetik von den physiologisch relevanteren Systemen DPPC/DPPG und POPC/POPG untersucht werden. Die vorgestellten Messungen sind zu einem Großteil im Rahmen einer systematischen Untersuchung des Anbindungsverhaltens von Phospholipidvesikeln auf geladenen Oberflächen und Bildung planarer festkörpergestützter Lipiddoppelschichten durchgeführt worden (Faiß *et al.* 2004). Um die Abhängigkeit des Adsorptionsverhaltens von der Phasenumwandlungstemperatur zu untersuchen, werden zum einen POPC/POPG-Vesikel, deren Phasenumwandlungstemperatur deutlich unterhalb der Raumtemperatur liegt, zum anderen DPPC/DPPG-Vesikel, deren Hauptumwandlungstemperatur bei ungefähr 40 °C und somit weit oberhalb der Raumtemperatur liegt, verwendet. Zur Variation der Oberflächenladungsdichte der Vesikel wird der Anteil des geladenen Lipids (PG) variiert. Über diesen Parameter lässt sich die Adhäsion der Vesikel als Funktion der Wechselwirkung der geladenen festkörpergestützten Oberfläche und der Vesikelladung kontrollieren. Dieses Probensystem eignet sich daher hervorragend um die Adhäsion und das Spreiten von Vesikeln zu untersuchen.

Während im Rahmen der Veröffentlichung von Faiß *et al.* der Schwerpunkt auf der Präsentation dieses Probensystems und seiner Charakterisierung mit Hilfe der Quarzmikrowaage-Technik, sowie der Impedanzspektroskopie liegt (Faiß *et al.* 2004), wird an dieser Stelle mit Hilfe der Simulationen der Versuch unternommen, die Kinetik des Adsorptions- und Spreitprozesses quantitativ auszuwerten. Ein Überblick über die charakteristischen Eigenschaften dieses Systems lässt sich mit Hilfe von Abb. 6.10 gewinnen.

Gezeigt sind die gemittelten Frequenzverschiebungen und die zugehörigen Widerstandsänderungen nach Adsorption von DPPC/DPPG bzw. POPC/POPG Vesikeln mit einem Durchmesser von 1 µm. Deutlich zu erkennen ist eine Abnahme der Frequenzverschiebung in Teilbild A und C mit zunehmendem molarem Anteil des geladenen Lipids. Für POPC/POPG-Vesikel führt eine geringe Erhöhung des molaren POPG Anteils von

$\chi_{\text{POPG}} = 0$  bis zu  $\chi_{\text{POPG}} = 0.3$  zu einer Verringerung der mittleren Frequenzverschiebung um ungefähr 150 Hz, während eine weitere Erhöhung des molaren Anteils nur noch zu geringen Änderungen führt (Teilbild A). Die DPPC/DPPG-Liposomen zeigen die gleiche Tendenz, jedoch sind die absoluten durchschnittlichen Frequenzverschiebungen bei jeweils gleichen molaren PG Anteilen viel größer als für POPC/POPG-Vesikel. So lassen sich aus dem Histogramm z.B. die Werte  $\overline{\Delta f_{\text{abs}}} = -165$  Hz für  $\chi_{\text{POPG}} = 0$  und  $\overline{\Delta f_{\text{abs}}} = -320$  Hz für  $\chi_{\text{DPPG}} = 0$  ablesen.



**Abb. 6.10:** Ergebnisse der QCM-Messungen von Faiß und Mitarbeitern (Faiß *et al.* 2004). A Durchschnittliche Frequenzverschiebung gegen den molaren Anteil  $\chi_{\text{POPG}}$  nach Anbindung von POPC/POPG Vesikeln, B Durchschnittliche Änderung des Widerstandes. C Durchschnittliche Frequenzverschiebung gegen den molaren Anteil  $\chi_{\text{DPPG}}$  nach Anbindung von DPPC/DPPG Vesikeln. D Durchschnittliche Änderung des Widerstandes.

Ein weiterer Unterschied der beiden Systeme besteht in dem Schwellwert, ab welchem die Frequenzverschiebungen in den Bereich von  $\overline{\Delta f_{\text{abs}}} \approx -10$  Hz abfallen. Dieser liegt, wie oben erwähnt, für POPC/POPG-Vesikel bei  $\chi_{\text{POPG}} = 0.3$  (grau unterlegt), während er für DPPC/DPPG-Vesikel  $\chi_{\text{DPPG}} = 0.7$  (grau unterlegt) beträgt. Die durchschnittlichen Widerstandsänderungen zeigen ein analoges Verhalten. Da die molaren Massen von POPC und DPPC bzw. POPG und DPPG sich kaum unterscheiden, muss dieser Effekt eine andere Ursache

haben.

### 6.3.2.1 Interpretation der QCM-Daten

Alle Phänomene, d.h. die Unterschiede in den absoluten durchschnittlichen Frequenzverschiebungen und Widerstandsänderungen von dem DPPC/DPPG-System und dem POPC/POPG-System und die niedrigen Frequenzverschiebungen und Widerstandsänderungen beider Systeme für hohe PG-Gehalte, können qualitativ auf die Coulomb-Wechselwirkung von Vesikel und funktionalisierter Oberfläche zurückgeführt werden. Zu diesem Zweck wird im Folgenden der Ansatz von Seifert, der die Adhäsion und das Spreiten von Vesikeln ausführlich diskutiert, wiedergegeben (Seifert 1997): Unter Einfluss des Potentials  $\Phi$  adsorbieren Vesikel an der Oberfläche. Da der Vesikelradius  $a = 500$  nm viel größer als die Debyelänge ist, genügt es zur Berechnung an Stelle des allgemeinen Potentials das Kontaktpotential  $\mathcal{W}$  für den mittleren Abstand der Membran von der Oberfläche zu verwenden. Wenn Vesikel und Oberfläche eine gemeinsame Kontaktfläche  $A^*$  aufweisen, führt dies bei Adhäsion zu einem Gewinn an Adhäsionsenergie

$$U_A = -\mathcal{W}A^* . \quad (6.2)$$

Die Krümmung des Vesikels  $1/a_1$  am Rand der Kontaktfläche ist durch die Beziehung

$$\frac{1}{a_1} = \sqrt{\frac{2\mathcal{W}}{\kappa_{\text{Lipid}}}} \quad (6.3)$$

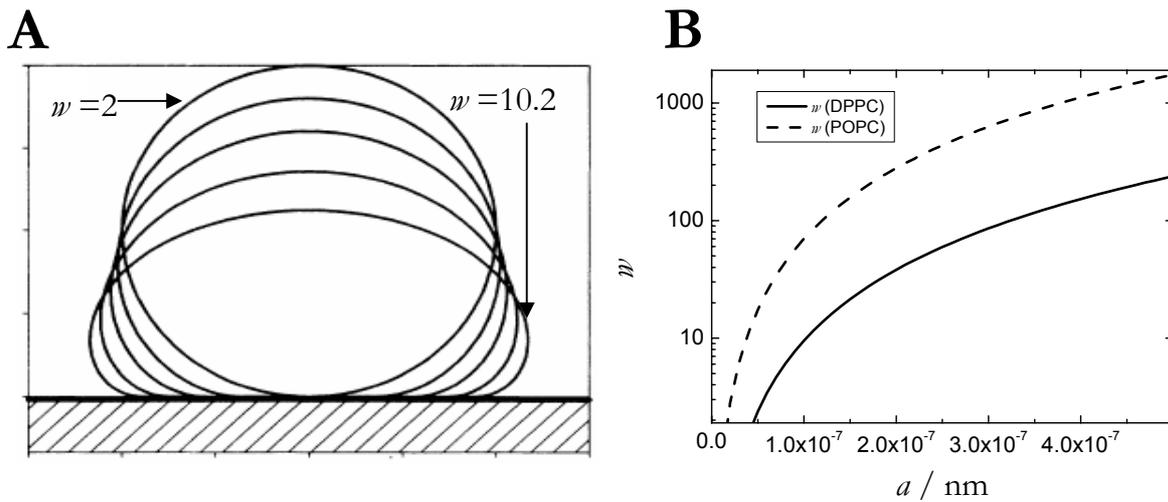
gegeben (Seifert und Lipowsky 1990), worin  $\kappa_{\text{Lipid}}$  die Biegesteifigkeit des Lipids bezeichnet. Mit Gleichung (6.2), der Randbedingung (6.3) und der Annahme, dass die Fläche des Vesikels konstant ist, lässt sich numerisch unter Berücksichtigung der lokalen Krümmungsenergie die Form der Vesikel auf der Oberfläche berechnen. Sie hängt in diesem Fall nur von dem reduzierten dimensionslosen Potential  $w$ , welches die Form

$$w = \frac{\mathcal{W}a^2}{\kappa_{\text{Lipid}}} \quad (6.4)$$

hat, ab. Die Deformation des Vesikels auf der Oberfläche in Abhängigkeit von dem reduzierten Potential, welches Werte im Intervall  $w = [2..10.2]$  annimmt, zeigt Abb. 6.11 A in zweidimensionaler Darstellung.

Starke Adhäsion, damit ist ein Kontaktpotential im Bereich von  $\mathcal{W} = 1$  mJ/m<sup>2</sup> gemeint, führt zur

Dehnung der Membran und schließlich zum Aufplatzen des Vesikels. Teilbild B zeigt den



**Abb. 6.11:** A Formen von adsorbierten Vesikel in zweidimensionaler Darstellung für verschiedene reduzierte dimensionslose Potentiale  $w = 2, 2.9, 4.1, 6.4, 10.2$  nach Seifert (Seifert und Lipowsky 1990). B Dimensionsloses Kontaktpotential  $w$  für den Fall starker Adhäsion als Funktion des Vesikelradius  $a$  in halblogarithmischer Darstellung.

Verlauf des dimensionslosen Kontaktpotentials als Funktion des Vesikelradius für den Fall starker Adhäsion nach Gleichung (6.4). Aufgrund der quadratischen Radiusabhängigkeit spreiten größere Vesikel nach diesem Modell schneller als kleinere. Die berechneten Werte liegen für  $a > 100$  nm deutlich über den in Teilbild A dargestellten Fällen. Zur Berechnung des Schwellwertes, von dem an adsorbierte Vesikel aufplatzen, wird die Energiebilanz von Adhäsionsenergie und elastischer Energie

$$U_e = \frac{k}{2} \frac{(A - A_0)^2}{A_0} \quad (6.5)$$

betrachtet. Hierin ist  $k$  der Flächenkompressibilitätsmodul,  $A_0$  die Vesikeloberfläche vor und  $A$  die Vesikeloberfläche nach der Dehnung.

Gleichsetzen von Adhäsions- und elastischer Energie führt unter der Annahme, dass die Kontaktfläche in der Größenordnung der Flächenänderung liegt, zu der Beziehung

$$W \approx k \frac{A - A_0}{A_0}. \quad (6.6)$$

Die rechte Seite der Gleichung ist die elastische Spannung, die für den Fall starker Adhäsion proportional zum Kontaktpotential ist. Überschreitet diese die Lysisspannung, so spreiten die

Vesikel. Der experimentell bestimmte Grenzwert für den Übergang von Adhäsion zu Spreiten ergibt sich zu  $k(A-A_0)/A_0 = 0.03k$  (Evans und Needham 1987).

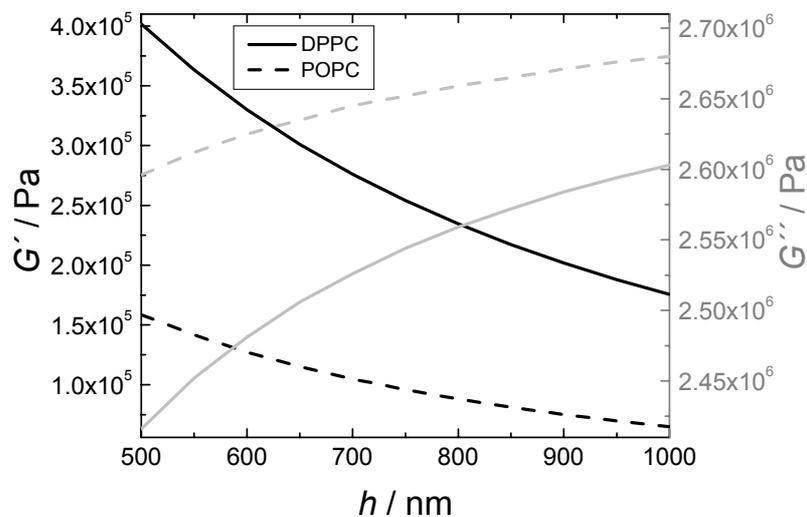
Mit Hilfe dieser Betrachtung lassen sich die gemessenen absoluten durchschnittlichen Frequenzverschiebungen interpretieren. Die Vesikel adsorbieren an der Oberfläche und werden bei geringem PG-Gehalt nur eine schwache Adhäsion und damit auch eine geringe Deformation erfahren. Die Frequenzverschiebungen sind dabei nicht nur auf die Masse der Vesikel zurückzuführen. Auch die mitschwingende Flüssigkeit zwischen den Liposomen muss berücksichtigt werden und erschwert eine theoretische Modellierung. Ein Erklärungsansatz für die Differenz der Frequenzverschiebungen zwischen den POPC/POPG und DPPC/DPPG Vesikeln bieten die um fast eine Zehnerpotenz voneinander abweichenden Biegesteifigkeiten,  $\kappa_{\text{DPPC}} = 10.5 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  für DPPC und  $\kappa_{\text{POPC}} = 1.43 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  für POPC (Frisken *et al.* 2000, Lee *et al.* 2001). Diese führen bei gleicher Ladungsdichte der Vesikel zu unterschiedlicher Adhäsion. Somit erfahren die POPC/POPG Liposomen eine stärkere Deformation aufgrund der Beziehungen (6.3) und (6.4). Bei Vernachlässigung visko-elastischer Effekte skaliert die Massenbelegung pro Einheitsfläche bei der Quarzmikrowaage mit der mittleren Höhe der adsorbierten Schicht. Bei stärkerer Deformation aufgrund der größeren Elastizität ist sowohl die Belegung als auch der Wassereinschluss geringer. Betrachtet man die adhärenen Vesikel stark vereinfacht als Rotationsellipsoide, so ergibt sich bei einer Stauchung von 50% in der Höhe bei der Annahme, dass die Oberfläche der Vesikel konstant bleibt, eine um ca. 35% verringerte Anzahl an Vesikeln. Qualitativ ist daher eine geringere Frequenzverschiebung zu erwarten.

Wird der PG-Gehalt in den Vesikeln weiter erhöht, so wächst das Kontaktpotential und folglich auch die Adhäsionsenergie. Die Deformation der Vesikel nimmt zu, bis die Lysisspannung erreicht wird und die Vesikel schließlich Spreiten. Wegen  $k \propto \kappa_{\text{Lipid}}$  wird die Lysisspannung für POPC/POPG-Vesikel eher überschritten (Goetz *et al.* 1999). Die Grenze zwischen reiner Adhäsion und Spreiten liegt daher für POPC/POPG-Vesikel bei niedrigeren PG-Gehalten im Vergleich mit DPPC/DPPG-Vesikeln.

Mechanisch verhält sich eine planare festkörperunterstützte Lipiddoppelschicht wie eine starre synchron mitschwingende Masse, deren Frequenzverschiebung mit Hilfe der Sauerbrey Beziehung (4.1) berechnet werden kann. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quarze ergibt sich für eine vollständige Belegung eine Frequenzverschiebung von 11.5 Hz. Die durchschnittlichen Frequenzverschiebungen der Messungen nach Adsorption von POPC/POPG-Vesikeln mit  $\chi_{\text{POPG}} > 0.3$  liegen genauso wie die Messungen nach Adsorption von DPPC/DPPG-Vesikeln mit  $\chi_{\text{DPPG}} > 0.7$  in diesem Bereich und legen somit die Vermutung

nahe, dass sich bei diesen molaren Verhältnissen Lipiddoppelschichten ausgebildet haben. Unterstützt wird diese Interpretation durch die Widerstandsveränderungen (Teilbilder B und D) für diesen molaren Bereich. Für eine starre synchron mitschwingende Masse sollte nach Kapitel 4.1.3 keine Widerstandsänderung auftreten. Die gemessenen Änderungen liegen bei ungefähr  $5 \Omega$  und können mit verbliebenen nicht aufgeplatzten Vesikeln erklärt werden. Zudem deuten hier nicht gezeigte impedanzspektroskopische Messungen darauf hin, dass eine nahezu geschlossene Lipiddoppelschicht bei den hohen Anteilen von DPPG bzw. POPG vorliegt (Faiß *et al.* 2004).

Aus den gemessenen Frequenz- und Widerstandsänderungen lassen sich auch Werte für den komplexen Schermodul  $G^*$  bei der Resonanzfrequenz  $f = 5$  MHz des Quarzes abschätzen. Für diesen Frequenzbereich finden sich in der Literatur bisher keine experimentellen Daten. Wenn die Vesikel am Ende des Adsorptionsprozesses dicht gepackt und fest auf der Oberfläche haften, kann die in Abschnitt 4.1.3 vorgestellte Theorie des *missing mass* Effektes zur Berechnung verwendet werden (Voinova *et al.* 2002). Da keine experimentellen Informationen über den Grad der Deformation vorliegen, bietet es sich an, den Schermodul gegen die Höhe  $h$  der Vesikelschicht aufzutragen.



**Abb. 6.13:** Komplexer Schermodul  $G^*$  als Funktion der Höhe  $h$  der Vesikelschicht. Die Werte sind aus den Frequenz- und Widerstandsänderungen reiner DPPC (durchgezogene Linie) und POPC Vesikel (gestrichelte Linie) mit Hilfe einer nichtlinearen Anpassung aus den Gleichungen (4.18) und (4.19) berechnet. Schwarze Linien geben den Verlauf des Realteils, graue Linien den Verlauf des Imaginärteils des Schermoduls.

Die Werte lassen sich durch eine nichtlineare Anpassung mit Hilfe des Levenberg-Marquardt Algorithmus aus den Gleichungen (4.18) und (4.19) bei Vorgabe der Frequenz- und

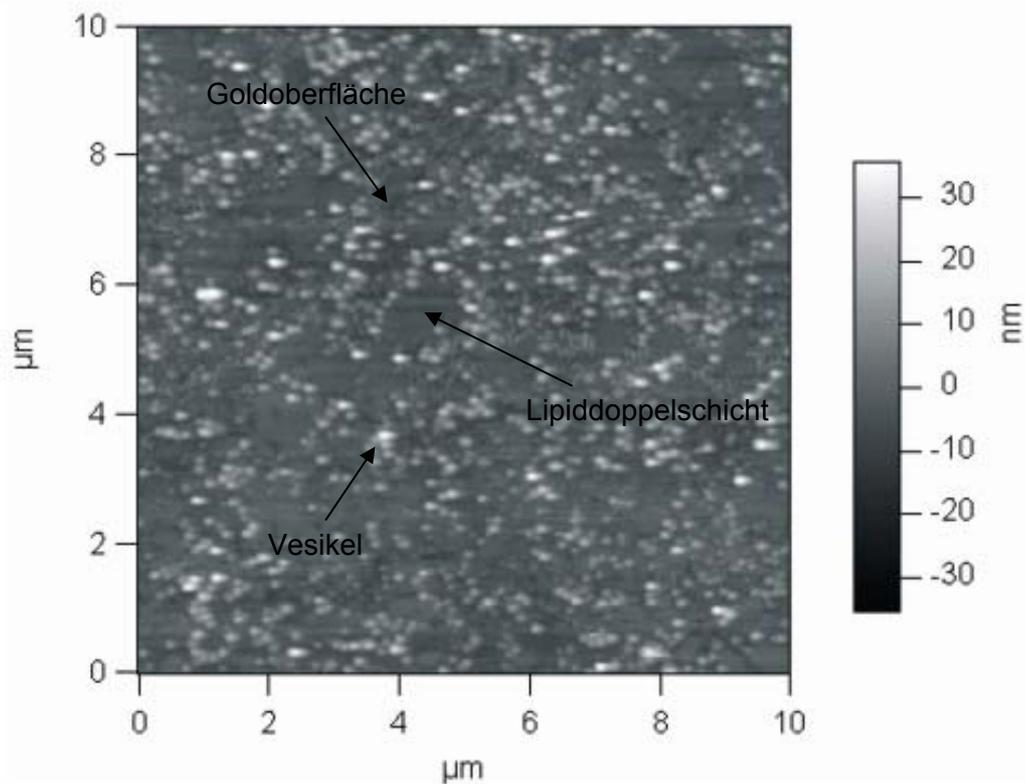
Widerstandsänderung ermitteln. Für reine DPPC- und POPC-Vesikel ergeben sich die in Abb. 6.13 dargestellten Abhängigkeiten.

Die ermittelten Werte für den Realteil des Schermoduls liegen für eine DPPC-Vesikelschicht im Bereich von 0.2 MPa bis 0.4 MPa, für POPC zwischen 0.06 MPa und 0.16 MPa. Die Werte für den Imaginärteil hingegen liegen für DPPC zwischen 2.42 MPa und 2.6 MPa und für eine POPC Vesikelschicht zwischen 2.60 MPa und 2.68 MPa. Das höhere Speichermodul und geringere Verlustmodul von DPPC entspricht aufgrund der unterschiedlichen Viskoelastizitäten den Erwartungen. Die Werte können jedoch wegen der begrenzten Anwendbarkeit des mathematischen Modells vorerst nur als grobe Abschätzung für den Schermodul bei dieser Frequenz gesehen werden (s. Abschnitt 4.1.3).

### 6.3.2.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Um die kinetischen Konstanten der Probensysteme zu extrahieren, müssen die MC-Simulationen an die gemessenen Isothermen angepasst werden. Dazu ist eine zeitlich aufgelöste rasterkraftmikroskopische Messreihe bei verschiedenen PG-Gehalten wünschenswert. Dieses Projekt stößt jedoch wegen der extremen Topographie der Vesikel mit einem Durchmesser von 1000 nm gepaart mit der hohen Fluidität, insbesondere der POPC/POPG Liposomen, an seine Grenzen. Um eine Vorstellung von der Oberflächenverteilung von Phospholipidvesikeln zu gewinnen wird eine typische Messung nach Adsorption von DPPC/DPPG = 9:1 Vesikeln mit einem Durchmesser von 100 nm gezeigt (Abb. 6.14).

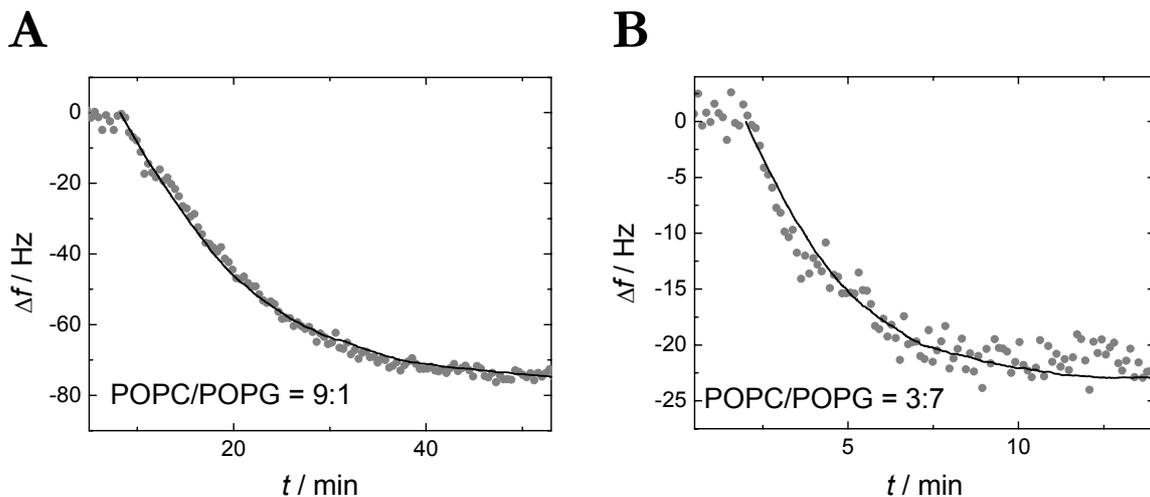
Die Aufnahme zeigt die Koexistenz von Vesikeln und Bereichen die mit einer Lipiddoppelschicht bedeckt sind (s. Markierungen in der Abbildung). Aufgrund der mit dem AFM gemessenen Topographien und der mit der QCM aufgenommenen zeitlichen Verläufe ist das Modell des durch Lipiddoppelschicht induzierten Spreitens nicht passend. Zum einen zeigen die Adsorptionskinetiken keine Sprünge sondern einen stetigen Verlauf, zum anderen sind auf der gezeigten rasterkraftmikroskopischen Aufnahme eine Vielzahl von Lipiddoppelschichtbereichen, die direkt an intakte Vesikel angrenzen, zu erkennen. Die Simulationen sind daher mit dem Modell des spontanen Aufplatzens simuliert worden. Durch Defekte in der Goldoberfläche oder der Funktionalisierung können unbedeckte Regionen bzw. Bereiche entstehen, in denen Vesikel lediglich adhärieren, die elektrostatische Wechselwirkung jedoch stark reduziert ist, so dass ein Spreiten verhindert wird. Da diese Bereiche unabhängig von den zugegebenen Vesikeln entstehen, sollte deren Prozentsatz bei allen Messungen in etwa die gleiche Größe haben und wird für die folgenden Simulationen dieses Abschnittes nicht berücksichtigt.



**Abb. 6.14:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von DPPC/DPPG=9:1 Vesikeln mit Durchmesser 100 nm. Neben intakten Vesikeln sind glatte Bereiche, die Lipiddoppelschichten, von dunkleren Bereichen, der Oberfläche, zu unterscheiden.

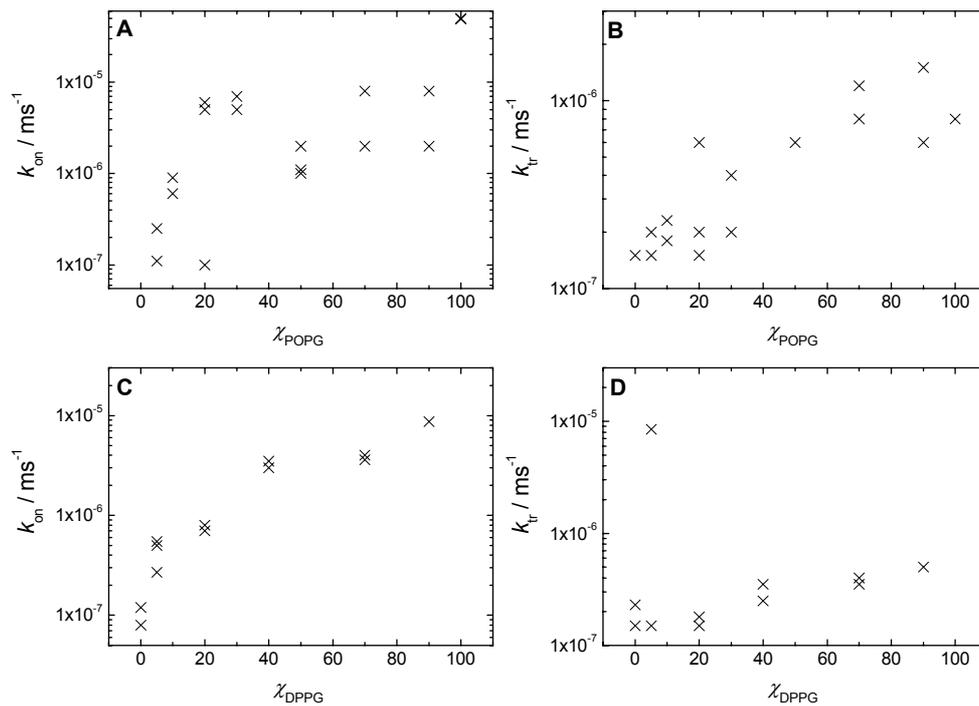
Neben der unzureichenden Information der Oberflächenverteilung besteht ein weiteres Problem der Bestimmung der kinetischen Konstanten darin, dass zusätzlich zu dem Transport und der Anbindung auch das zeitlich exponentialverteilte Spreiten der Vesikel berücksichtigt werden muss (s. Abschnitt 6.2). Die Normierung ist daher so durchgeführt worden, dass der aus der Simulation gewonnene prozentuale Anteil an Lipiddoppelschicht mit 11.5 Hz - dieser Wert entspricht der berechneten Frequenzverschiebung für eine vollständig geschlossene Lipiddoppelschicht - multipliziert und von der Gesamtfrequenzverschiebung subtrahiert wurde. Die Differenz wurde den deformierten Vesikeln zugeschrieben. Bei Frequenzverschiebungen kleiner als 11.5 Hz ist die Annahme gemacht worden, dass ein geschlossener Lipidfilm vorliegt. Für die sehr großen Frequenzänderungen bei niedrigen PG-Gehalten in Abb. 6.10 lässt sich der Anteil an Lipiddoppelschicht aus den Simulationen nicht bestimmen, da geringe prozentuale Lipidbelegungen den Kurvenverlauf nicht signifikant beeinflussen. Die den Spreitprozess bestimmende Rate  $k_{\text{rup}}$  ist daher sehr variabel und lässt sich aus den vorliegenden Daten bei niedrigen PG-Gehalten nicht gewinnen.

Abb. 6.15 zeigt zwei QCM-Messungen nach Zugabe von POPC/POPG-Vesikeln mit nominellem Durchmesser von  $1\ \mu\text{m}$  und unterschiedlichen molaren PG-Gehalten (10% bzw. 70%). In Übereinstimmung mit Abb. 6.10 zeigt sich eine größere Frequenzverschiebung bei niedrigerem molarem Anteil von POPG. Zudem fällt bei Betrachten der Zeitachse die schnellere Anbindung der Vesikel mit höherem PG-Gehalt auf. Da die Pumpgeschwindigkeit und die Anfangskonzentration der Vesikel in Lösung ( $\rho_{\text{bulk}} = 3.8 \cdot 10^{15}\ \text{m}^{-3}$ ) für beide Messungen identisch ist, muss dieser Effekt auf die stärkere elektrostatische Wechselwirkung aufgrund höherer Nettoladung der Liposomen zurückgeführt werden.



**Abb. 6.15:** QCM-Messungen nach Zugabe von Vesikeln mit der molaren Zusammensetzung POPC/POPG = 9:1 (A) und POPC/POPG = 3:7 (B). Die durchgezogenen Linien sind Daten aus Simulationen mit den Parametern  $\rho_{\text{bulk}} = 3.8 \cdot 10^{15}\ \text{m}^{-3}$ ,  $d = 1\ \mu\text{m}$  und  $k_{\text{tr}} = 1.8 \cdot 10^{-7}\ \text{m/s}$ ,  $k_{\text{on}} = 9 \cdot 10^{-7}\ \text{m/s}$ ,  $k_{\text{rup}} = 2 \cdot 10^{-5}\ \text{s}^{-1}$  (A), sowie  $k_{\text{tr}} = 8 \cdot 10^{-7}\ \text{m/s}$ ,  $k_{\text{on}} = 2 \cdot 10^{-6}\ \text{m/s}$ ,  $k_{\text{rup}} = 1.5 \cdot 10^{-2}\ \text{s}^{-1}$  (B).

Obwohl die Parameter  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{tr}}$  prinzipiell unabhängig sind (s. Abschnitt 6.2) und auch bei den anderen angepassten experimentellen Daten dieses Kapitels keine Korrelation zwischen den beiden Größen beobachtet wird, zeigt sich bei diesen Simulationen, dass sowohl bei dem DPPC/DPPG System, als auch bei dem POPC/POPG System der Wert der Transportrate mit zunehmendem PG-Gehalt steigt. Die Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  wächst in der gezeigten Abbildung von  $k_{\text{on}} = 9 \cdot 10^{-7}\ \text{m/s}$  für  $\chi_{\text{POPG}} = 0.1$  auf  $k_{\text{on}} = 2 \cdot 10^{-6}\ \text{m/s}$  für  $\chi_{\text{POPG}} = 0.7$ , während sich die Transportrate für diesen Fall ungefähr vervierfacht. Ähnliche Tendenzen zeigten sich auch bei weiteren Simulationen und sind in Abb. 6.16 grafisch dargestellt.



**Abb. 6.16:** Adsorptions- und Transportraten in halblogarithmischer Auftragung ermittelt durch Anpassung von Simulationen an QCM-Messungen nach Adsorption von POPC/POPG-, bzw. DPPC/DPPG-Vesikeln mit variierendem PG-Gehalt. A Adsorptionsrate  $k_{on}$  gegen  $\chi_{POPG}$ . B Massentransport  $k_{tr}$  gegen  $\chi_{POPG}$ . C Adsorptionsrate  $k_{on}$  gegen  $\chi_{DPPG}$ . D Transportrate  $k_{tr}$  gegen  $\chi_{DPPG}$ .

Die Adsorptionsrate wächst also von  $k_{on} \approx 10^{-7}$  m/s bei  $\chi_{PG} = 0$  bis zu  $k_{on} \approx 10^{-5}$  m/s bei  $\chi_{PG} = 1$  für beide Systeme. Eine theoretische Berechnung dieser Rate als Funktion der Oberflächenladungsdichte ist nur numerisch möglich, da die hohen Oberflächenladungsdichten von Vesikel und funktionalisierter Oberfläche in der Größenordnung  $1 \text{ C/m}^2$  eine Linearisierung der Exponentialfunktion in der Poisson-Boltzmann Gleichung verhindern (Israelachvili 1992). Die Transportraten hingegen liegen bis auf einen Ausreißer im Intervall  $[1.5 \cdot 10^{-7} \dots 1.5 \cdot 10^{-6}] \text{ s}^{-1}$ , wobei sich tendenziell höhere Werte des Massentransports für das POPG/POPC System ergeben.

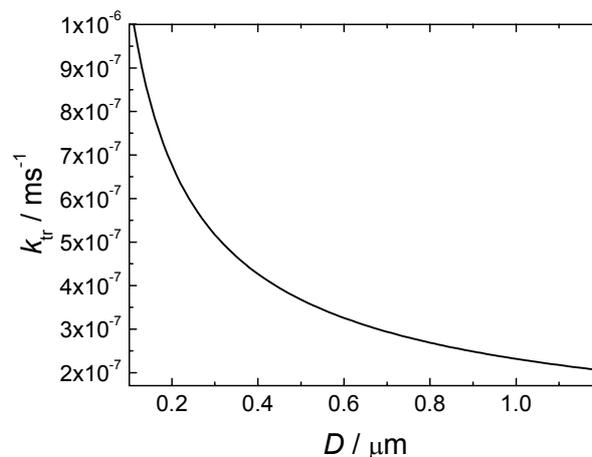
Die Adsorptionsrate liegt in dem nach Kapitel 2.3.1 erwarteten Bereich. Die obere Grenze entspricht den Werten, die nach dem *hard particle* Konzept gemäß Gleichung (2.24) in der Größenordnung  $10^{-5}$  m/s liegen, während sich bei einer parabolischen Potentialbarriere laut Gleichung (2.26) Werte um  $5 \cdot 10^{-7}$  m/s ergeben.

Die größeren Werte der Transportrate für POPG/POPC-Vesikel gegenüber den DPPC/DPPG-

Vesikeln lassen sich anschaulich verstehen, wenn angenommen wird, dass die Fluidität des Lipids zu einem Übergang von der Kugelform zu der Form eines verlängerten Rotationsellipsoids führt. Dieser hat einen geringeren Querschnitt und unterliegt daher einer höheren Transportrate in Richtung Oberfläche. Für die steigende Transportkonstante beider Systeme kann, nur eine spekulative Erklärung geliefert werden.

In die Gleichung für die Transportkonstante geht der Selbstdiffusionskoeffizient  $D_\infty$  ein. Dieser wird für kugelförmige Teilchen mit Hilfe von Gleichung (2.25) berechnet. Der Radius der Vesikel wurde im Rahmen dieser Untersuchung vor Zugabe der Vesikel in die QCM-Messzelle nicht kontrolliert und der nominelle Radius der Polycarbonatmembran des Extruders angenommen.

Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich bei höheren PG-Gehalten bei der Extrusionsmethode kleinere Vesikel bilden, da ein kleinerer Radius zu größerer Krümmung und somit größerer Entfernung der PG-Kopfgruppen führt. Ein kleinerer Radius hingegen führt zu einem größeren Diffusionskoeffizienten. Abb. 6.17 zeigt dieses Verhalten. Demnach führt eine Variation des Vesikeldurchmessers von 100 nm bis zu 1  $\mu\text{m}$  zu den beobachteten Änderungen in der Transportrate.



**Abb. 6.17:** Abhängigkeit des Massentransports vom Durchmesser des Vesikels.

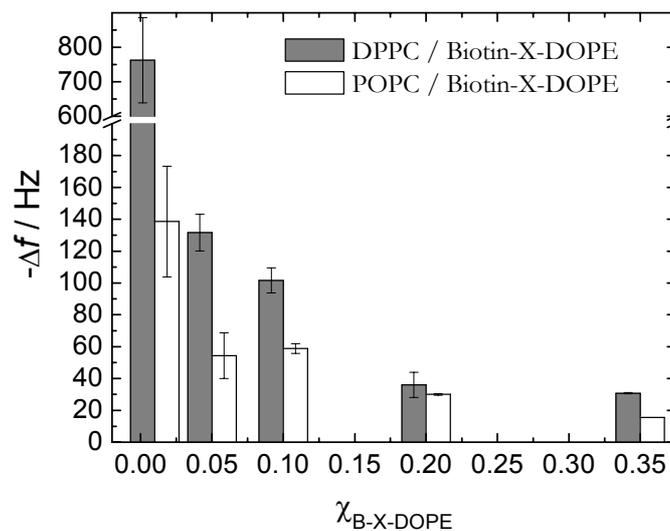
Abschließend lässt sich festhalten, dass die Simulationen zu plausiblen Werten für die Größenordnung der Adsorptionsrate  $k_{on}$  führen. Um den Einfluss der Transportrate zu untersuchen sind weitere Messungen notwendig. Zudem muss mit Hilfe einer systematischen Messreihe, z.B. mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung, die Rolle des Vesikeldurchmessers untersucht werden. Eine Aussage über die Kinetik des Spreitprozesses lässt sich aus diesen Messungen nur schwerlich treffen. Werte für die Spreitrate  $k_{rup}$  erstrecken sich über mehrere

Zehnerpotenzen von  $k_{\text{rup}} = 0 \text{ s}^{-1}$  für reine POPC- oder DPPC-Vesikel bis hin zu  $k_{\text{rup}} = 1 \text{ s}^{-1}$  für hohe PG-Gehalte (größer 90%). Verglichen mit den Werten der Transportrate und der Adsorptionsrate entsprechen derart große Werte in der Größenordnung  $1 \text{ s}^{-1}$  einem instantanen Aufplatzen bei Kontakt mit der Oberfläche.

## 6.4 Adsorption von unilamellaren biotindotierten Vesikeln

Das in diesem Abschnitt vorgestellte System weist ähnliche Charakteristika wie die im vorigen Abschnitt gezeigten Messungen an elektrisch geladenen Phospholipidvesikeln auf. An Stelle der Variation des PG-Gehaltes wird der Anteil des biotinylierten Lipids DOPE in den DPPC-, bzw. POPC-Vesikeln variiert und somit die spezifische kurzreichweitige molekulare Wechselwirkung von Biotin und Avidin untersucht. Aufgrund der hohen Bindungskonstante von Biotin und Avidin wird dieses System unter anderem als Modell der Zelladhäsion verwendet (Reiss *et al.* 2003). Die starke molekulare Wechselwirkung der Proteine sollte sich in einer großen Adsorptionsrate widerspiegeln.

Im Rahmen der Diplomarbeit von M. Janke findet sich eine systematische Untersuchung des Einflusses des Biotingehalts auf das Adsorptionsverhalten mit Hilfe der Quarzmikrowaage-Technik (Janke 2004). Ein Teil der Ergebnisse dieser Studie zeigt Abb. 6.18. Die Messungen untermauern frühere Studien, die besagen, dass mit zunehmenden Biotingehalt die Vesikel die Tendenz zeigen sehr schnell zu spreiten (Pignataro *et al.* 2000, Lüthgens *et al.* 2003).

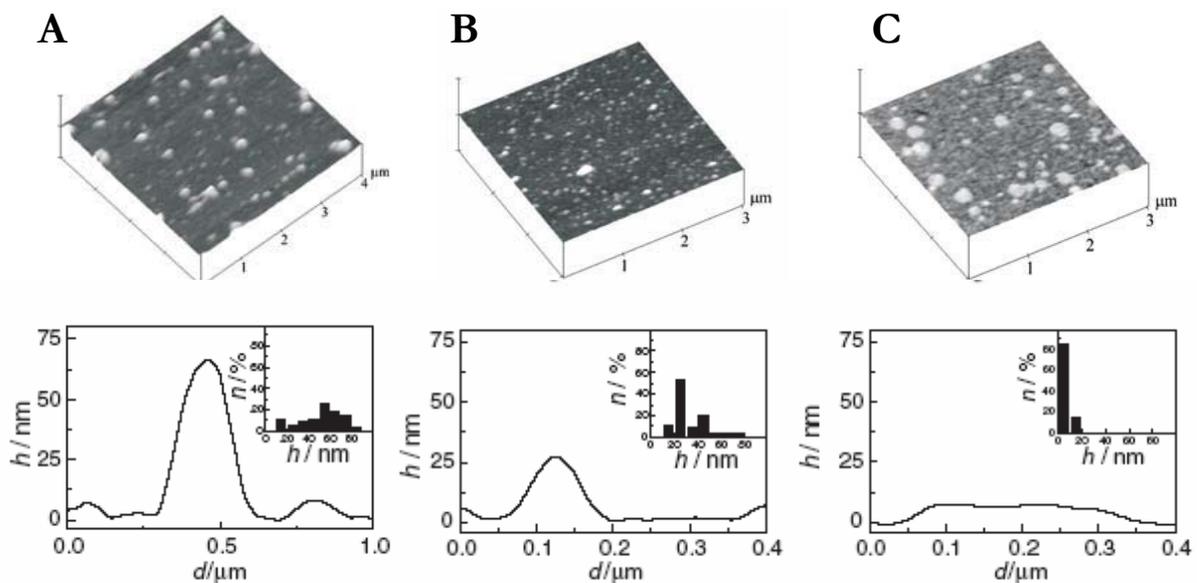


**Abb. 6.18:** Frequenzverschiebung nach Adsorption von DPPC/Biotin-X-DOPE, bzw. POPC/Biotin-X-DOPE gegen den molaren Anteil des biotinylierten Lipids (Janke 2004).

Die Abbildung zeigt sinkende Frequenzverschiebungen mit zunehmendem Biotingehalt. Die hier nicht aufgeführten Messungen mit höheren molaren Anteilen von Biotin-X-DOPE zeigen ähnliche Frequenzverschiebungen wie die hier aufgeführte für  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.35$ .

### 6.4.1 Interpretation der QCM-Daten

Zur Interpretation bietet sich wieder das Modell der Vesikel an, die mit steigendem molaren Anteil an biotindotiertem Lipid zunächst deformiert werden und bei weiterer Erhöhung des Gehaltes spreiten. In diesem Fall wird diese Hypothese durch eine rasterkraftmikroskopische Studie von Pignataro und Mitarbeitern gestützt, die in Abb. 6.19 wiedergegeben ist.

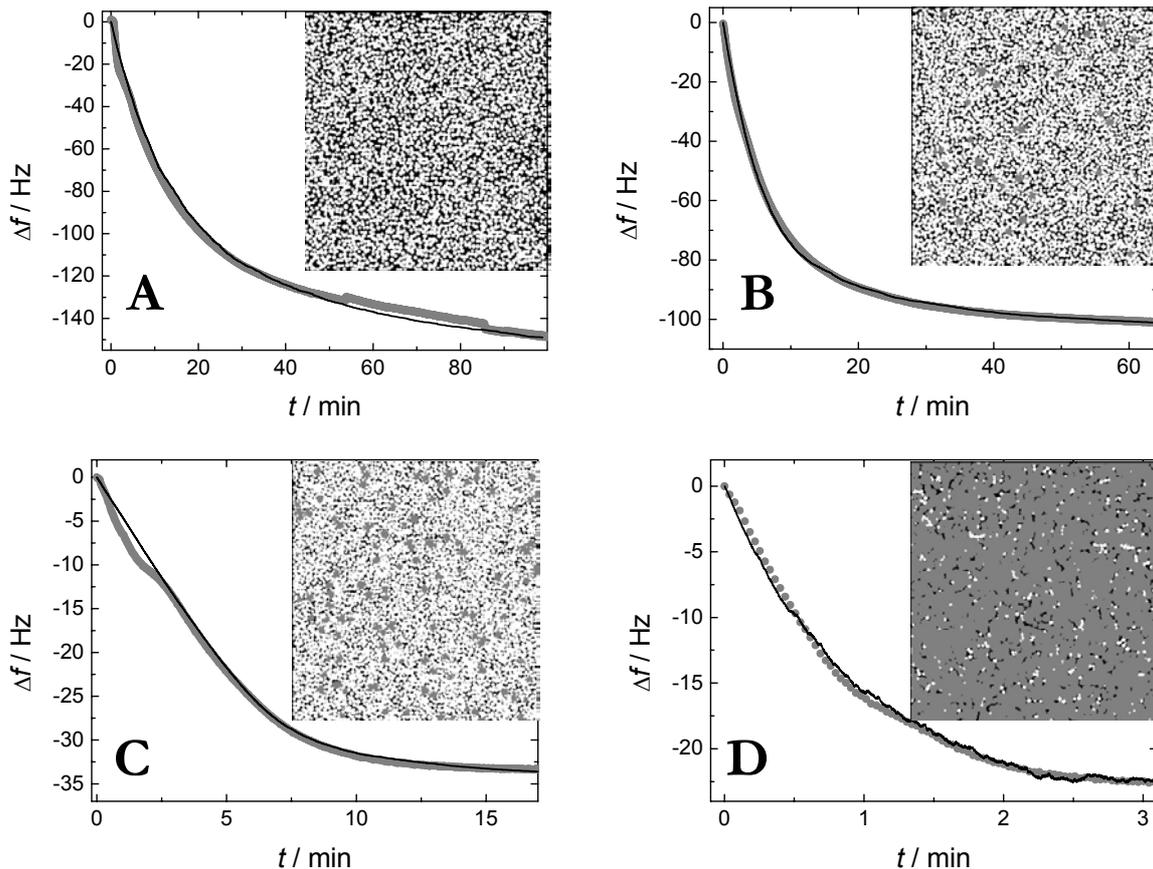


**Abb. 6.19:** AFM-Messungen nach Adsorption von DPPC/Biotin-X-DHPE auf einer mit Streptavidin bedeckten Glimmeroberfläche bei unterschiedlichen molaren Anteilen von Biotin-X-DHPE: A 10 mol%, B 20 mol% und C 30 mol%. In der unteren Reihe sind die Höhenprofile einzelner Vesikel bei entsprechenden Biotingehalten abgebildet. Die Einsätze zeigen Histogramme der Höhenverteilung. Für den Fall A liegen hauptsächlich intakte leicht deformierte Vesikel vor, Bild B zeigt sowohl intakte stärker deformierte Vesikel als auch gespreitete Vesikel, in C ist die Oberfläche hauptsächlich durch gespreitete Liposomen bedeckt (aus Pignataro *et al.* 2000).

Zu sehen sind die Höhenprofile einzelner Vesikel mit verschiedenen molaren Anteilen von Biotin-X-DHPE. Während bei niedrigem Anteil (10 mol%) des biotinylierten Lipids die Vesikel intakt und leicht deformiert auf der Oberfläche adhärirt sind (Bild A), bewirkt ein höherer Anteil von 20 mol% bereits eine stärkere Deformation sowie vereinzelt Spreiten der Liposomen. Dieses Verhalten lässt sich gut aus der Höhenverteilung in den Einsätzen der unteren Bildreihe ablesen. Vesikel, die einen Anteil von 30 mol% an biotinyliertem Lipid aufweisen, sind fast ausschließlich gespreitet.

### 6.4.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Messungen aus dieser Studie unterscheiden sich hinsichtlich des eingesetzten biotinylierten Lipids, der Dichte der Vesikel auf der Oberfläche und der Oberflächenbeschaffenheit, die empfindlich das Adsorptionsverhalten beeinflusst (Reimhult *et al.* 2002, Reimhult *et al.* 2003), von den vorliegenden QCM Messungen.

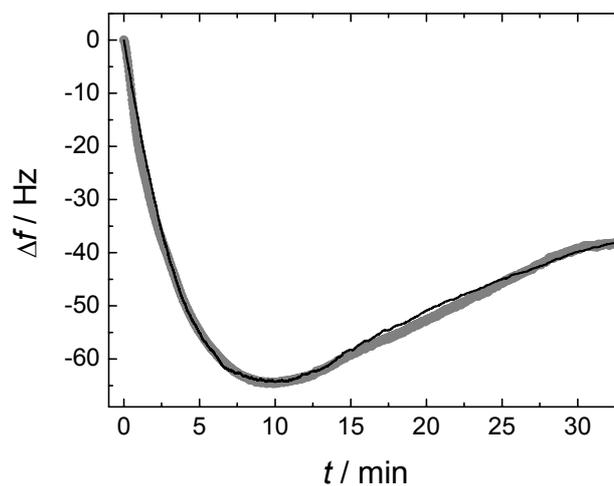


**Abb. 6.20:** Frequenzverschiebungen aufgenommen mit der Quarzmikrowaage ( $\bullet$ ) nach Zugabe von DPPC/Biotin-X-DOPE-Vesikeln mit unterschiedlichem molarem Anteil an Biotin-X-DOPE und die dazugehörigen simulierten Daten ( $\text{—}$ ). Die Einsätze zeigen die Oberflächenverteilung der Vesikel auf einer  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  Simulationsfläche am Ende der Simulation. Daten und Simulationsparameter: A  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.02$ ,  $k_{\text{on}} = 2.4 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$  und  $k_{\text{tr}} = 3 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$ . B  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.1$ ,  $k_{\text{on}} = 1.3 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$ ,  $k_{\text{tr}} = 4.5 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$  und  $k_{\text{rup}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , C  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.2$ ,  $k_{\text{on}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$ ,  $k_{\text{tr}} = 4 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$  und  $k_{\text{rup}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  und D  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.35$ ,  $k_{\text{on}} = 4.2 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$ ,  $k_{\text{tr}} = 4.4 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$  und  $k_{\text{rup}} = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Für die Quarzmikrowaagestudie ist die Oberfläche eine mit MPA bedeckte Goldoberfläche, an die Avidin adsorbiert ist, während den rasterkraftmikroskopischen Daten eine mit Streptavidin

belegte Glimmeroberfläche zugrunde liegt. Wegen der vergleichbar hohen Bindungskonstanten von Avidin und Streptavidin werden die rasterkraftmikroskopischen Daten als Ausgangspunkt für die Simulationen genutzt (Janshoff 1997).

Abb. 6.20 zeigt vier typische Messungen mit vergleichbaren molaren Anteilen des biotinylierten Lipids. Teilbild A zeigt eine Adsorptionsisotherme ohne Berücksichtigung des Spreitprozesses. Die simulierte Oberflächenverteilung im Einsatz zeigt daher ausschließlich intakte Vesikel (weiß) auf der Oberfläche. Wegen der Zugabe der Vesikellösung im Überschuss ist die Dichte der Liposomen im Vergleich zu den oben gezeigten AFM Bildern sehr hoch. Die Erhöhung der Spreitkonstante führt zu einer Erhöhung der sich bildenden Doppelschicht (grau). Der prozentuale Anteil der Lipiddoppelschicht an der Gesamtfläche wächst von 0% für  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.02$  (A) auf 1.9% für  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.1$  (B), 5.3% für  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.2$  (C) bis hin zu 82.3% für  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.35$  (D) und liegt damit in vergleichbarer Größenordnung mit den Werten der Histogramme in den Einsätzen von Abb. 6.19. Auch das Bild der Oberflächenverteilung ähnelt dem Ausschnitt der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme. Die Adsorptionsrate wächst in diesem Bereich von  $k_{\text{on}} = 2.4 \cdot 10^{-7}$  m/s auf  $k_{\text{on}} = 4.2 \cdot 10^{-4}$  m/s und liegt damit um mehr als eine Größenordnung über den Werten für reine PG-Vesikel aus Abschnitt 6.3.2. Die Transportrate hingegen liegt relativ stabil zwischen  $k_{\text{tr}} = 3 \cdot 10^{-7}$  m/s und  $k_{\text{tr}} = 4.5 \cdot 10^{-7}$  m/s in der Nähe des errechneten Wertes ( $k_{\text{tr}} = 3.1 \cdot 10^{-7}$  m/s).



**Abb. 6.21:** Frequenzverschiebung aufgenommen mit der Quarzmikrowaage (●) nach Zugabe von POPC/Biotin-X-DOPE-Vesikeln mit  $\chi_{\text{B-X-DOPE}} = 0.05$  und die zugehörige Simulation mit den Parametern  $k_{\text{on}} = 9.5 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{tr}} = 4 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{irr}} = 9.5 \cdot 10^{-7}$  m/s und  $k_{\text{rup}} = 9 \cdot 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>.

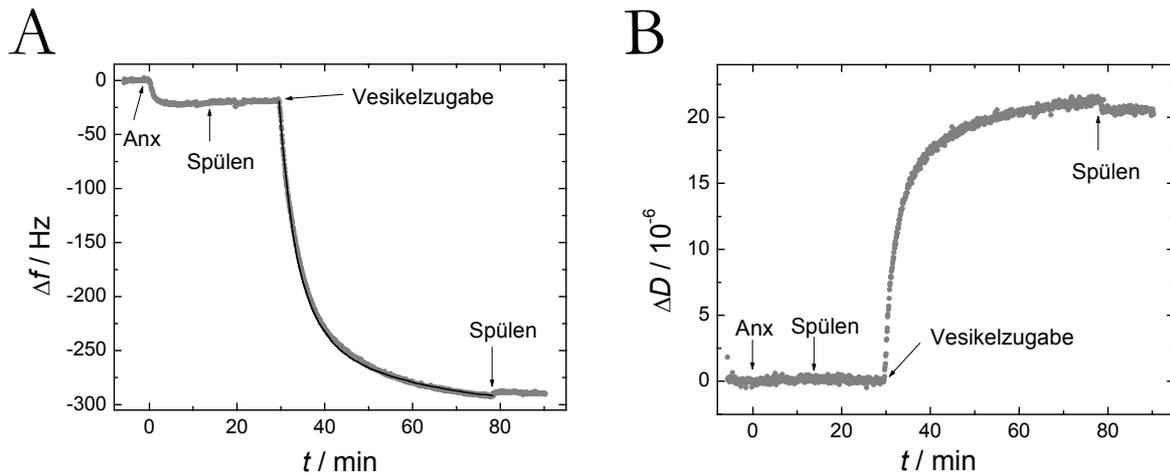
Ein Vergleich der kinetischen Konstanten mit Werten von Simulationen aus der Diplomarbeit von M. Janke zeigt sehr gute Übereinstimmung in der Transportrate, Abweichungen hingegen in der Adsorptionsraten (Janke 2004). Diese Abweichungen sind zum einen mit einer leichten Modifikation des Simulationsprogramms zu erklären, zum anderen wohl auf das Anpassungsverfahren und die Modellierung zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit sind z.B. keine heterogenen Adsorptionsplätze auf der Oberfläche angenommen worden. Werden diese in Betracht gezogen, so stellt sich z.B. die Frage, welche Adsorptionsrate auf diesen Bereichen gilt. Eine Anpassung der Messdaten der Liposomen bestehend aus POPC und Biotin-X-DOPE war ohne die Zuhilfenahme dieser weiteren Variablen nicht möglich. Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 6.21.

Gezeigt ist die Frequenzverschiebung nach Zugabe von POPC/Biotin-X-DOPE Liposomen zu einer mit Avidin beschichteten Oberfläche aufgenommen mit der Quarzmikrowaage. Die Kurve weist ein definiertes Minimum auf und zeigt zum Ende hin die Tendenz in ein Gleichgewichtszustand überzugehen. Im Gegensatz zu den DPPC/Biotin-X-DOPE-Vesikeln zeigt dieses System schon bei geringeren Anteilen des biotindotierten Lipids die Tendenz zum Spreiten. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf den bei Raumtemperatur fluiden Zustand von POPC zurückzuführen. Dennoch ist die absolute Frequenzverschiebung von 40 Hz viel zu hoch für eine Lipiddoppelschicht. Deshalb ist ein Anteil von 15% der Oberfläche für die Simulation angenommen worden, auf dem Vesikel irreversibel ohne aufzuplatzen adhäreren. Mit Hilfe dieser Option, ist es möglich, den Verlauf zumindest angenähert zu simulieren. Die weiteren Simulationsparameter sind der Bildunterschrift zu entnehmen. Die Adsorptionskonstante liegt mit  $k_{\text{on}} = 9.5 \cdot 10^{-7}$  m/s im erwarteten Bereich und auch die Transportkonstante  $k_{\text{tr}} = 4 \cdot 10^{-7}$  m/s ist vergleichbar mit dem DPPC/Biotin-X-DOPE System. Allerdings sind sowohl der oben genannte Anteil irreversibler Plätze von 15% als auch die für diesen Bereich gültige Bindungskonstante reine Spekulation. Eine systematische Untersuchung der vorliegenden Quarzmikrowaagemessungen ist daher nur möglich, wenn Informationen über die Oberflächentopologie in Erfahrung gebracht werden können.

## 6.5 Annexin A1 vermittelte Adsorption von Liposomen an Lipiddoppelschichten

Die Verbindung von Membranen ist ein fundamentaler biologischer Prozess, der z.B. bei der Endo- und Exocytose auftritt. Um die kontrollierte Anbindung zu untersuchen, eignet sich das System festkörpergestützter Membranen, an die Annexin A1 adsorbiert. Einige Studien zeigen, dass Annexine in den Membranverkehr eingreifen und somit eine Rolle bei der Aggregation von Membranen spielen (Bitto und Cho 1998, Bitto und Cho 1999). Das Protein verfügt über zwei potentielle Bindungsstellen. Der konvexe Kern bietet Plätze für Calciumionen, welche mit den Kopfgruppen der Phospholipide wechselwirken. Es wird vermutet, dass dieser Teil an die primäre Membran bindet, während der N-Terminus mit der zweiten Membran wechselwirkt und so eine Verbindung zwischen zwei Lipiddoppelschichten herstellt (de la Fuente und Parra 1995, Rosengarth *et al.* 2001).

Im Rahmen dieser Untersuchung wird zunächst eine Hybridmembran erzeugt, indem eine Lipidmonoschicht mit Hilfe eines Spreitprozesses auf eine OT SA-Oberfläche gebracht wird. Das Spreiten zu einer Lipidschicht ist wegen der hydrophoben Oberfläche energetisch begünstigt. Anschließend wird Annexin A1 adsorbiert, die Probe gespült und zuletzt eine Vesikelsuspension hinzugefügt. Dieses festkörpergestützte System bietet im Gegensatz zu reinen Vesikelassays die Möglichkeit die Bindungsprozesse von Annexin an die Lipiddoppelschicht und an die Vesikel getrennt zu untersuchen und die kinetische Konstanten beider Bindungsprozesse zu extrahieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch nur auf das zweite Bindungsereignis eingegangen. Die Wechselwirkung wird mit Hilfe der dynamischen QCM folgendermaßen untersucht. Zuerst werden die Annexin A1 Moleküle an die festkörpergestützte Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC/POPS (4:1) angebunden. Anschließend wird die Messzelle mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. An die so gebildete Schicht aus Membran und Protein werden in einem weiteren Schritt Vesikel mit einem Durchmesser von 120 nm angebunden. Die nachfolgende Abbildung zeigt eine typische Messung.



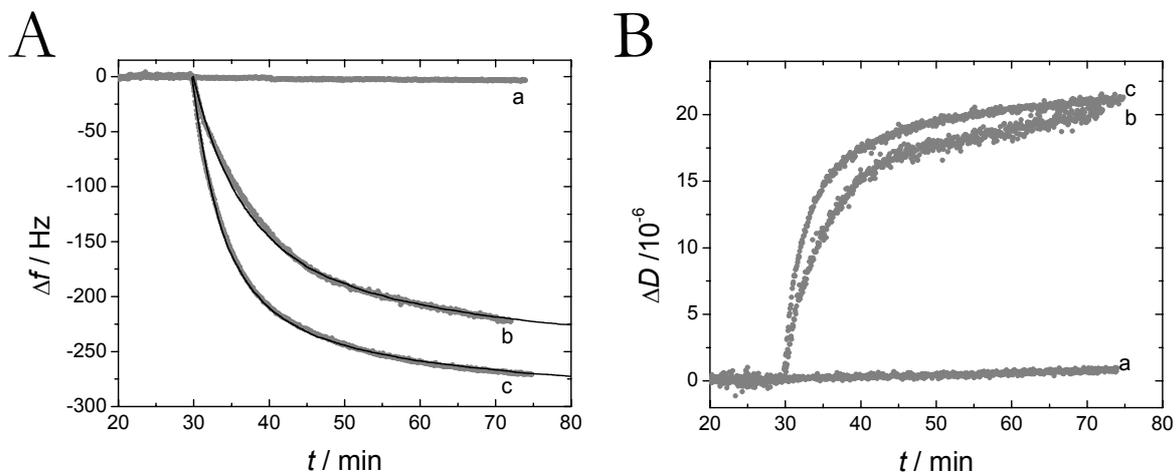
**Abb. 6.22:** D-QCM Messungen der Adsorption von Annexin an eine festkörpergestützte POPC/POPS = 4:1 Lipiddoppelschicht mit nachfolgender Anbindung von Vesikeln mit einem Durchmesser von 120 nm. A Frequenzverschiebung nach Zugabe von  $0.3 \mu\text{M}$  Annexin (Anx). Nach dem Spülen werden Vesikel zugegeben. Das letzte Spülen mit Puffer, der  $1\text{mM CaCl}_2$  enthält, zeigt, dass die Vesikelanbindung nahezu irreversibel ist. Die durchgezogene Linie entspricht einer Simulation mit den kinetischen Konstanten  $k_{\text{tr}} = 4.5 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$  und  $k_{\text{on}} = 5.4 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$ , sowie einem Vesikeldurchmesser von  $d = (120 \pm 10) \text{ nm}$ . B Zugehörige Dissipationsänderung.

Gut zu erkennen ist die geringe Frequenzverschiebung von ungefähr 20 Hz nach Anbindung des Annexin in Teil A der Abbildung. Zusammen mit der kaum sichtbaren Dissipationsantwort in Teil B lässt sich die Adsorption des Proteins als Anbindung nach dem Modell der starren synchron mitschwingenden Masse interpretieren (s. Abschnitt 4.1.3). Die Konzentration von  $0.3 \mu\text{M}$  des Proteins ist so gewählt, dass die Oberfläche nach der Adsorption nahezu vollständig bedeckt ist. Die Bindung der Vesikel an diese Schicht zeigt eine große Frequenzerniedrigung von ca. 250 Hz und eine Erhöhung des Dissipationsfaktors um mehr als  $2 \cdot 10^{-5}$ . Die Messungen legen die Interpretation der Adsorption von wenig deformierten intakten Vesikeln an die mit Annexin A1 belegte Membran nahe und rechtfertigen die gezeigte RSA-Simulation mit kugelförmigen Partikeln. Für die kinetische Konstante ergibt sich nach Anpassung der MC-Simulationen  $k_{\text{on}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$ . Eine systematische Untersuchung ist notwendig, da die Bindung von verschiedenen Faktoren abhängig ist. So verändert der Calciumgehalt des Puffers die Reversibilität der Bindung des Annexin an die POPC/POPS Lipiddoppelschicht. Die Variation der Calciumkonzentration im Bereich von 0 bis 1 mM führt zu dem Ergebnis, dass bei einer Pufferzusammensetzung ohne Calcium mehr als 85% des Annexin A1 desorbiert. Verbleibende Proteine werden als unspezifisch gebunden interpretiert (Kastl *et al.* 2004, Kastl *et al.* 2005).

Neben der Calciumkonzentration des Puffers muss der Einfluss der gebundenen Proteinmenge und der Elektrostatik bzw. der Ionenstärke auf den zweiten Bindungsprozess untersucht werden.

### 6.5.1 Einfluss der Annexinbelegung

Um den Einfluss der Proteinbelegung auf die Membran-Membran Wechselwirkung zu untersuchen, wird die zugegebene Annexinkonzentration variiert und anschließend der zeitliche Verlauf der Anbindung aufgenommen. Die zugehörigen Messungen zeigen Abb. 6.23 A und B.



**Abb. 6.23:** A Zeitlicher Verlauf der Frequenzverschiebung nach Zugabe von POPC/POPS = 4:1 Vesikeln zu einer POPC/POPS = 4:1 Lipiddoppelschicht, zu der zuvor (a) 0  $\mu\text{M}$ , (b) 0.045  $\mu\text{M}$  bzw. (c) 0.3  $\mu\text{M}$  Annexin A1 zugegeben wurde. Die resultierende Annexinbelegung wurde mit Hilfe von Frequenzmessungen errechnet und ergibt für (b) ungefähr (30 $\pm$ 10)% unter der Voraussetzung, dass die Oberfläche für (c) voll belegt ist (Kastl *et al.* 2004). Die durchgezogenen Linien sind Resultate von Simulationen mit  $k_{\text{tr}} = 4.5 \cdot 10^{-7}$  m/s, (b)  $k_{\text{on}} = 2.2 \cdot 10^{-7}$  m/s und (c)  $k_{\text{on}} = 5.4 \cdot 10^{-7}$  m/s und einem Partikeldurchmesser von  $d = (120 \pm 10)$  nm. B Verläufe der zugehörigen Dissipationsänderungen.

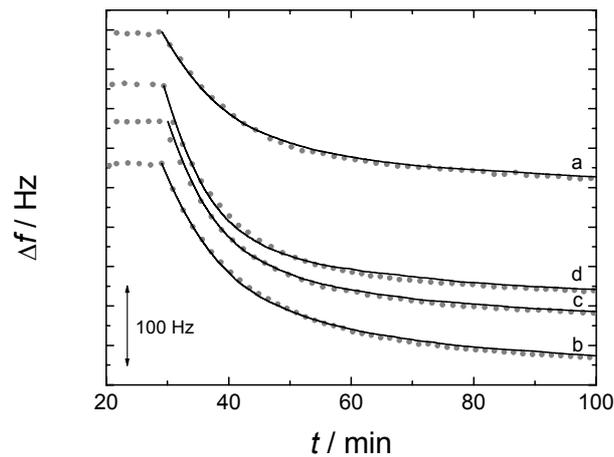
Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Frequenz- und Dissipationsänderung. Wie aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zweier negativ geladener Membranen zu erwarten ist, zeigt sich keine Frequenzänderung nach Zugabe von Liposomen, wenn die Lipiddoppelschicht nicht mit Annexin A1 belegt ist (Abb. 6.23 A (a)). Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass das Annexin für die Verbindung zweier Membranen verantwortlich ist. Die Datensätze (b) und (c) zeigen den zeitlichen Verlauf für den Fall, dass die Oberfläche zu ungefähr 30% bzw. voll belegt ist. Die Messungen zeigen, dass eine bestimmte Menge von Annexin notwendig ist, um

eine vollständige Belegung mit Vesikeln zu erzielen. Die Anzahl der angebotenen Vesikel ist jedoch nicht proportional zur gebundenen Proteinmenge. Mit Hilfe der RSA-Simulation lassen sich aus diesen Messungen auch die kinetischen Konstanten extrahieren. Wie in Abb. 6.23 A zu sehen, stimmen die aus Simulationen gewonnenen Adsorptionskurven sehr gut mit den Messdaten überein. Die Adsorptionsrate für Vesikel mit gaußverteilten Durchmessern  $d = (120 \pm 10)$  nm (diese Verteilung entspricht Messungen des Durchmessers mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung) ergibt für die Kurve (b)  $k_{\text{on}} = 2.2 \cdot 10^{-7}$  m/s und für die Kurve (c)  $k_{\text{on}} = 5.4 \cdot 10^{-7}$  m/s bei konstanter Transportrate  $k_{\text{tr}} = 4.5 \cdot 10^{-7}$  m/s. Die Anzahl der Annexine scheint somit signifikant die Bindung zweier Lipiddoppelschichten zu beeinflussen. Um den weiteren Einfluss des N-Terminus zu untersuchen wurden zusätzliche Experimente mit Annexin mit abgetrenntem N-Terminus durchgeführt, die eine stark reduziertes Anbindungsverhalten zeigen und somit belegen, dass dieser hauptsächlich für die zweite Bindung verantwortlich ist (Kastl *et al.* 2004). Zudem ersetzen die Autoren POPS durch POPG in den zugegebenen Vesikeln bei intakten Annexinen und erhielten ähnliche Adsorptionsisothermen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die zweite Bindungsstelle nicht spezifisch an POPS bindet, sondern lediglich ein negativ geladenes Lipid als Bindungspartner benötigt.

## 6.5.2 Einfluss der Elektrostatik

Um den Einfluss der elektrischen Ladung weiter zu untersuchen, wird zum einen der PS-Gehalt der zugegebenen Vesikel variiert, zum anderen die Ionenstärke des verwendeten Puffers über die NaCl-Konzentration gesteuert.

Eine Variation des PS-Gehaltes zwischen 10% und 30% führt nur zu geringen, wenig signifikanten Änderungen in der Adsorptionskinetik, während Messungen nach Zugabe reiner POPC-Vesikel eine wesentlich langsamere, wenig reproduzierbare Anbindung zeigen, so dass eine Abhängigkeit der Bindung von der Ladung der Vesikel vermutet werden kann (Messungen sind hier nicht gezeigt). Wird die Ionenstärke des Puffers variiert, so ändert sich die Abschirmlänge und damit auch die Anziehung. Abb. 6.24 zeigt den zeitlichen Verlauf der Adsorption von POPC/POPS = 4:1 Vesikeln auf einer POPC/POPS = 4:1 Lipidschicht bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen eines 20 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM NaN<sub>3</sub> Puffers (pH = 7.4) mit zusätzlich (a) 500 mM NaCl, (b) 100 mM NaCl, (c) 10 mM NaCl und (d) 0 mM NaCl. Die Anbindung des Annexins wurde unter den gleichen Pufferbedingungen wie die nachfolgende Membrananbindung durchgeführt.



**Abb. 6.24:** Zeitlicher Verlauf der Frequenzverschiebung nach Zugabe von POPC/POPS = 4:1 Vesikeln bei verschiedenen Ionenstärken. Sowohl die Anbindung des Annexins als auch die Anbindung der Vesikel fand unter gleichen Pufferbedingungen statt: 20 mM TRIS/HCl, 1 mM CaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub> und (a) 500 mM NaCl (b) 100 mM NaCl, (c) 10 mM NaCl und (d) 0 mM NaCl. Die durchgezogenen Linien sind Resultate von Simulationen mit Vesikeldurchmesser  $d = (120 \pm 10)$  nm und  $\kappa_{tr} = 4.2 \cdot 10^{-7}$  m/s unter Einbeziehung des Corona Effektes in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Die weiteren Parameter sind (a)  $\kappa_{on} = 5.8 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $h_s = 0.5$  nm, (b)  $\kappa_{on} = 5.4 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $h_s = 1$  nm, (c)  $\kappa_{on} = 7.5 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $h_s = 1.5$  nm und (d)  $\kappa_{on} = 9 \cdot 10^{-7}$  m/s,  $h_s = 2$  nm.

Die Messdaten zeigen Frequenzverschiebungen von ungefähr -240 Hz bis -270 Hz mit Ausnahme der am höchsten konzentrierten Lösung (500 mM NaCl). Hier ergibt sich eine Frequenzverschiebung von -190 Hz. Auch die Dissipationsänderung für diese Messung ist geringer (nicht gezeigt). Der geringere Betrag der Frequenzverschiebung kann mit der vorhergehenden Annexinanbindung erklärt werden. Aus den Frequenzverschiebungen für die Adsorption des Annexins lässt sich auf eine nur zu ungefähr 20% mit Protein belegte Fläche für die hochkonzentrierte Pufferlösung schließen. Somit sind weniger Bindungsplätze auf der Oberfläche vorhanden und es werden weniger Vesikel gebunden.

Die Resultate der MC-Simulationen sind mit durchgezogenen Linien in die Abbildung eingezeichnet und geben die Verläufe sehr gut wieder. Um die Kurven anzupassen und die Abschirmung mit zu berücksichtigen wurde in diesem Fall der Corona Effekt über das *hard particle* Konzept mit einbezogen. Die Durchmesserergrößerung ist dabei vereinfachend aus der Debyelänge für die jeweilige Ionenstärke berechnet worden, da das Potential zur Berechnung von  $h_s$  in Gleichung (2.22) nicht bekannt ist. Für diese ergibt sich 4 nm für 0 mM NaCl, 3.2 nm für 10 mM NaCl, 1.8 nm für 100 mM NaCl, und 0.8 nm für 500 mM NaCl. Die Unterschiede in der

Durchmesservergrößerung zwischen 0 und 10 mM NaCl Lösung fallen aufgrund der 20 mM Tris/HCl Konzentration also gering aus. Diese Änderungen von weniger als 5% führen nur zu kleinen Vergrößerungen der Ausschlussfläche des jeweiligen Vesikels und beeinflussen daher nur geringfügig die Simulationen. Die Transportrate ergibt sich aus der Pumpgeschwindigkeit der Messzelle und ist konstant bei  $k_{tr} = 4.2 \cdot 10^{-7}$  m/s für alle Messungen. Die ermittelten Adsorptionsraten der Simulationen variieren zwischen  $5.4 \cdot 10^{-7}$  m/s und  $9 \cdot 10^{-7}$  m/s, wobei die höheren Werte bei geringen Ionenstärken auftreten. Zusammenfassend sind sie in Tab. 6.2 aufgelistet. Die Tendenz der Bindungsrate entspricht der Erwartung, dass höhere Ionenstärken Ladungen besser abschirmen und daher eine langsamere Kinetik aufweisen.

**Tab. 6.2:** Parameter der in Abb. 6.24 dargestellten simulierten Kurven in Abhängigkeit von der berechneten Ionenstärke, bzw. der NaCl-Konzentration.

$c(\text{NaCl}) / \text{mM}$	$I / \text{mM}$	$h_s / \text{nm}$	$k_{on} / 10^{-7} \text{m/s}$
0	22	2.0	9.0
10	32	1.6	7.5
100	122	0.9	5.4
500	522	0.4	5.8

### 6.5.3 Interpretation der QCM-Daten und der Monte Carlo-Simulationen

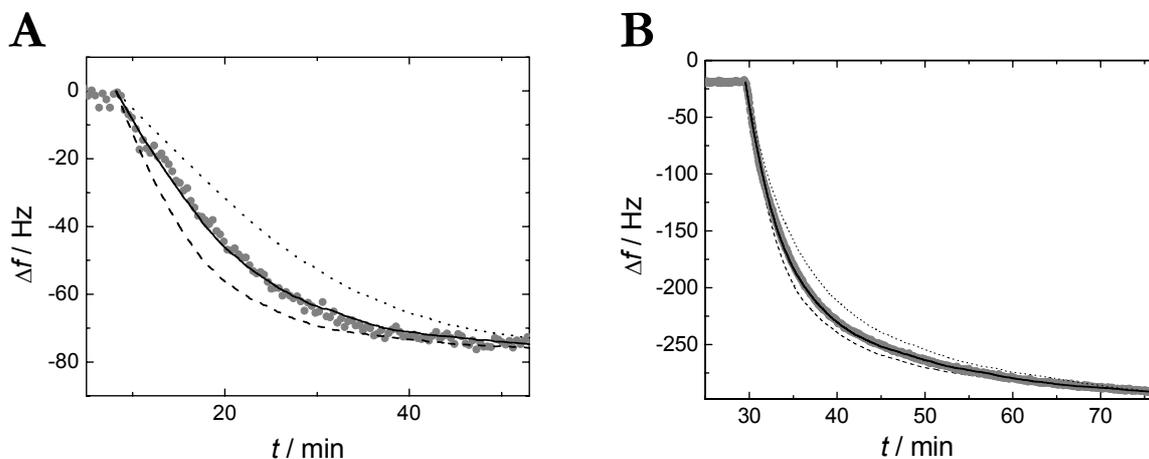
Die Messungen zeigen zusammen mit den Ergebnissen aus den Simulationen, dass das zweite Bindungsereignis, die Anbindung der Vesikel an eine Annexinschicht, ein irreversibler Anbindungsprozess intakter Vesikel ist. Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Systemen von biotindotierten Vesikeln auf Avidin und geladenen Phospholipidvesikeln auf einer funktionalisierten Goldoberfläche führen die Bindungskräfte scheinbar nicht oder nur sehr langsam zum Aufreißen und Spreiten der Liposomen. Sowohl die Frequenzverschiebungen im Bereich von -240 Hz bis -270 Hz gemeinsam mit den Dissipationsänderungen in der Größenordnung von  $2 \cdot 10^{-5}$ , als auch der simulierte zeitliche Verlauf der Adsorption sprechen für eine Adsorption intakter Vesikel. Die Größe der Änderungen legt die Vermutung nahe, dass die Vesikel nur wenig deformiert auf der Oberfläche vorliegen. Betrachtet man die Größe der Kontaktfläche der anhafteten Vesikel mit Durchmesser von 120 nm im Vergleich mit der Größe des Annexin A1 Moleküls von ungefähr  $7.4 \text{ nm}^2$ , so ist ersichtlich, dass mehrere Proteine einen

Vesikel binden können. Folglich kann nicht direkt geschlossen werden, dass die Bindung an ein Annexin irreversibel ist, jedoch die Bindung mehrerer Proteine an ein Vesikel legt eine irreversible Bindung nahe. Die in Abb. 6.23 gezeigten Messungen stützen diese Hypothese. Nimmt man an, dass ein einziges Annexin einen Vesikel binden kann, so würde bei den angegebenen Größen eine Proteinbedeckung von 0.5% vollständig ausreichen um maximale Vesikelbelegung zu erreichen. Die dargestellten Messungen zeigen jedoch, dass auch bei 30%iger Annexinbelegung noch keine maximale Frequenzverschiebung bei Vesikelanbindung erreicht werden kann. Zusammen mit den steigenden Adsorptionsraten für eine zunehmende Annexinmenge lässt sich folgendes Modell formulieren: Eine gewisse Anzahl von Annexinen muss aggregieren, um die elektrostatische Abstoßung der POPS Lipide zu überwinden und eine Bindungsstelle für Vesikel durch Umladung der Membran zu bieten. Finden sich mehr Proteine zusammen, so äußert sich dies in einer stärkeren Bindung mit schnellerer Kinetik. Die Verbindung der Membranen über Annexin kann somit anschaulich als Bindung über eine Potentialbarriere verstanden werden. Die ermittelten Bindungskonstanten um  $5 \cdot 10^{-7} \text{m/s}$  stimmen mit dem Modell einer Potentialbarriere der Höhe  $5k_{\text{B}}T$  nach Gleichung (2.26) gut überein und sprechen für dieses Modell. Wie der Mechanismus des zweiten Bindungsereignisses funktioniert und auf dessen elektrostatischen Anteil kann aus den oben gezeigten Daten nicht geschlossen werden. Die Messungen der Adsorption bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und die Anpassung der dazugehörigen Simulationen (s. Abb. 6.24) weisen tendenziell auf einen elektrostatischen Anteil hin, da mit abnehmender Ionenstärke und somit auch abnehmender Abschirmung größere Bindungskonstanten auftreten. Auch die geringe schlecht, reproduzierbare Bindung reiner POPC Vesikel unterstützt diese These.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Annexin vermittelte Vesikelanbindung mittels des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modells sehr gut simuliert werden kann. Die aus den Simulationen gewonnenen Werte passen gut zu den präsentierten Modellvorstellungen und rechtfertigen somit den gewählten Ansatz.

## 6.6 Signifikanz der kinetischen Konstanten

Zum Abschluss des Kapitels wird an dieser Stelle auf die Signifikanz der ermittelten kinetischen Konstanten eingegangen. Natürlich hängt die Aussagekraft der Parameter in erster Linie von der Güte und Reproduzierbarkeit der vorliegenden Messungen ab. Generell lässt sich die Aussage treffen, dass Adsorptionsmessungen an SA-Oberflächen auf Gold eine schlechtere Reproduzierbarkeit aufweisen, als die experimentellen Untersuchungen in denen die festkörpergestützte Schicht aus Lipidmembranen (POPC/POPS) oder Proteinen (Avidin) besteht. Auch auf die Rolle der fehlenden Informationen bezüglich der Gesamtbelegung und der orts aufgelösten Oberflächenverteilung der Partikel und deren Einfluss auf die Normierung der Anpassung der Simulationen ist in den vorigen Abschnitten schon angeklungen. Fernab von den experimentellen Problemen stellt sich die Frage, wie genau die kinetischen Konstanten bestimmt werden können, wenn eine gelungene Messung vorliegt. Zur Klärung dieser Frage sind in Abb. 6.25 zwei Messungen aus den vorigen Kapiteln gezeigt. Neben der optimalen Anpassung sind jeweils zwei Adsorptionsverläufe bei Variation der kinetischen Konstanten  $k_{tr}$  bzw.  $k_{on}$  dargestellt.



**Abb. 6.25:** Einfluss der Abweichung der kinetischen Konstanten von ihrem optimalen Wert. A Variation der Transportrate für die Adsorption von POPC/POPG = 9:1 Vesikeln auf AUT aus Abb. 6.15. Neben der Anpassung durch  $k_{tr} = 1.8 \cdot 10^{-7}$  m/s (durchgezogene Linie) sind zwei weitere hypothetische Verläufe für  $k_{tr} = 1 \cdot 10^{-7}$  m/s (gepunktet) und  $k_{tr} = 3 \cdot 10^{-7}$  m/s (gestrichelt) wiedergegeben. B Variation der Adsorptionsrate der Simulation nach Abb. 6.22A. Zusätzlich zur ursprünglichen Anpassung mit  $k_{on} = 5.4 \cdot 10^{-7}$  m/s (durchgezogene Linie) sind zwei weitere Verläufe für  $k_{on} = 3.5 \cdot 10^{-7}$  m/s (gestrichelt) und  $k_{tr} = 6.5 \cdot 10^{-7}$  m/s (gepunktet) dargestellt.

Der Einfluss der Variation der entsprechenden Raten ist deutlich sichtbar. Während in Teilbild A die Transportrate variiert wird, zeigt Teilbild B den Effekt, den eine Änderung in  $k_{on}$  bewirkt. Die Abbildung belegt, dass die kinetischen Konstanten sehr genau extrahiert werden können. Der Fehler, der bei dieser Anpassung auftritt, ist minimal, da schon kleine Änderungen in  $k_{tr}$  und  $k_{on}$  selbst in diesem Maßstab offensichtlich sind. Verglichen mit den Ergebnissen der Simulationen, die eine Variation von  $k_{tr}$  für die Adsorptionsexperimente der Phospholipidvesikel auf AUT um mehrere Größenordnungen aufweisen, ist die hier zur Visualisierung gewählte Abweichung gering. Ebenso decken die ermittelten Werte der Adsorptionsrate für Phospholipidvesikel fast drei Größenordnungen ab, während hier schon eine Variation von ca. 50% deutlich sichtbar ist. Somit lässt sich abschließend sagen, dass die Fehler in der Bestimmung der kinetischen Konstanten im Vergleich mit den experimentellen Unwägbarkeiten vernachlässigbar sind.



## 7 FLUKTUATIONSSPEKTROSKOPIE: MÖGLICHE SENSORAPPLIKATIONEN

Die reversible Adsorption von Proteinen spielt eine Schlüsselrolle in vielen biologischen Prozessen, wie z.B. bei der Signalübermittlung oder bei molekularen Erkennungsreaktionen von bakteriellen Toxinen. In den Biowissenschaften ist es daher von Interesse effiziente und sensitive Untersuchungsmethoden zu finden, um die Proteinadsorption und Desorption an natürlichen und artifiziellen Oberflächen zu charakterisieren.

Die Raten der Adsorption und Desorption werden im Allgemeinen mit Hilfe von empfindlichen oberflächensensitiven Methoden quantifiziert. Zu nennen sind hier unter anderem SPR, ELL, RfS, IS, QCM und eine relativ junge Untersuchungsmethode mit Hilfe von Cantilever Arrays (Collings und Caruso 1997, Leatherbarrow und Edwards 1999, Janshoff *et al.* 2000, Arntz *et al.* 2003).

Ein typisches Adsorptionsexperiment gestaltet sich wie folgt: Die Sensoroberfläche wird mit Molekülen funktionalisiert, so dass sich Bindungsstellen für die Proteine der Lösung bilden. Anschließend wird die Sensoroberfläche der Lösung mit dem zu untersuchenden Protein ausgesetzt und die Adsorption gemessen, indem die Änderung der Oberflächenbelegung mit Hilfe der entsprechenden Messgröße, z.B. der optischen Dichte (SPR, ELL, RfS) oder der Frequenzverschiebung (QCM), als Funktion der Zeit aufgezeichnet wird (Collings und Caruso 1997, Leatherbarrow und Edwards 1999, Janshoff *et al.* 2000).

Die Ratenkonstanten von Adsorption und Desorption werden anschließend bestimmt, indem die zugehörige Ratengleichung, im Idealfall die Langmuirgleichung, gelöst wird und deren Parameter an die experimentellen Daten angepasst werden. Aus vier Gründen ist diese Vorgehensweise unhandlich und fehleranfällig.

Erstens ist der Massentransport zur Oberfläche in den meisten Experimenten nicht schnell genug, als dass er ignoriert werden darf (Vgl. Gleichung (2.21)). Dies führt dazu, dass die Geschwindigkeit des Adsorptionsprozesses durch den Einfluss von Konvektion und Diffusion begrenzt wird und die eigentliche Adsorptionsrate nicht zu ermitteln ist.

Zweitens verhindern abgesehen vom Massentransport experimentelle Gegebenheiten die exakte Bestimmung der Adsorptionsrate. Zum einen ist häufig eine elektronische Drift, welche nur schwer vom eigentlichen Messsignal zu trennen ist, zu beobachten, zum anderen führen bei kleinen Messvolumina Verarmungseffekte zu einer Änderung der Adsorptionsrate während des Messprozesses.

Drittens führt der Einfluss der ASF zu einer belegungsabhängigen Kinetik, die nicht durch eine analytische Funktion wiedergegeben werden kann (s. Abschnitt 2.1). Eine Näherung, z.B. mit Hilfe des Modells der RSA, so wie im Rahmen dieser Arbeit verwendet, ist daher unerlässlich.

Viertens verändert sich die Charakteristik für Belegungsgrade oberhalb des *Jamming Limits*. In diesem Fall zeigt die Adsorption eine zweischrittige Kinetik, in der sich jedoch der Gleichgewichtszustand abhängig von der Desorptionsrate erst nach experimentell nicht tragbarer Zeit einstellt. Dieses Verhalten ist kürzlich für den eindimensionalen Fall von Nowak und Mitarbeitern gezeigt worden (Nowak *et al.* 1998).

In diesem Kapitel wird daher ein neues Detektionsverfahren vorgestellt, welches sich zur Bestimmung der Adsorptions- und Desorptionsrate eignet und die Probleme des Massentransports, der elektronischen Drift, der hohen Belegung und der Verarmung der zu detektierenden Moleküle in Lösung bei Adsorptionsexperimenten umgeht.

Die Idee besteht darin, die zeitabhängigen Fluktuationen der Belegung im Gleichgewichtszustand bei reversiblen Adsorptionsexperimenten bei mittlerer Belegung (20 %) zu messen. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten dynamischen RSA Programms wird die Realisierbarkeit des Verfahrens gezeigt, wobei im Gegensatz zu den im vorigen Kapitel vorgestellten Simulationen Desorptionseignisse mit einbezogen werden. Die daraus resultierenden Schwankungen um den Gleichgewichtswert werden im Hinblick auf die sensorische Anwendung untersucht.

## 7.1 Theoretische Grundlagen der Fluktuationsspektroskopie am Beispiel einer einfachen reversiblen Reaktion

Eine elegante Methode die Wechselwirkungskonstanten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  zu ermitteln, besteht in der Analyse des Fourierpektrums der Fluktuation der Belegung nach Erreichen des Gleichgewichts. Dieses Verfahren ist aus der chemischen Kinetik bekannt, aber bisher noch nicht auf Oberflächenprozesse angewandt worden. Für den Fall einer einfachen reversiblen Reaktion



mit  $N_A$  Molekülen in Zustand A,  $N_B$  Molekülen in Zustand B und den kinetischen Konstanten  $k_{12}$  sowie  $k_{21}$  ist die zeitliche Änderung der Anzahl von Molekülen durch die Gleichung

$$N_A(t) = N \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \left( 1 - \exp\left[-(k_{12} + k_{21})t\right] \right) \quad (7.2)$$

gegeben (s. Abb. 7.1). Die Gesamtzahl der Moleküle bezeichnet  $N = N_A + N_B$  und die Anfangsbedingung ist durch  $N_A(t=0) = 0$  gegeben. Nach einer Störung wird das System demnach exponentiell gemäß  $\exp(-t/\tau)$  mit der reziproken Relaxationszeit  $\tau^{-1} = k_{12} + k_{21}$  zurück zum Gleichgewichtswert streben. Für die Autokorrelationsfunktion wird daher die Proportionalitätsbeziehung

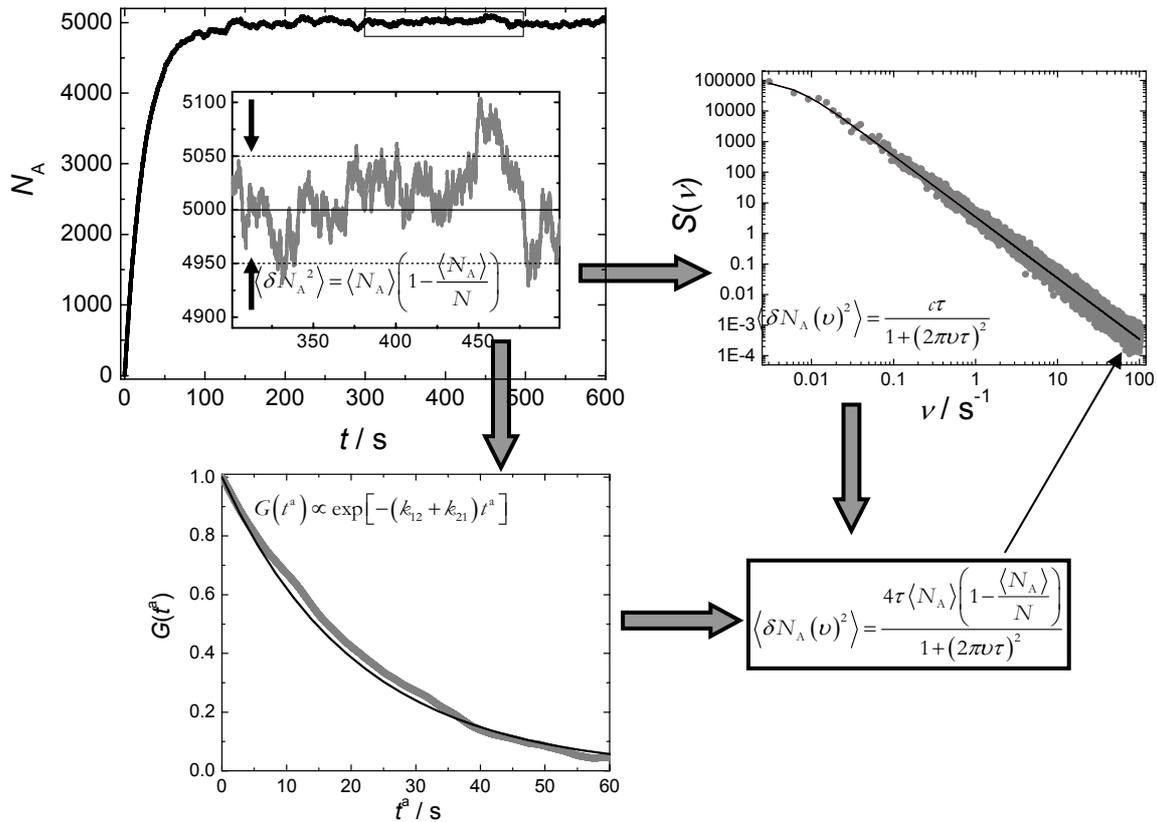
$$\left\langle \delta N_A(t) \delta N_A(t+t^a) \right\rangle \propto \exp\left[-(k_{12} + k_{21})t^a\right] \quad (7.3)$$

gelten, worin  $\delta N_A(t)$  die Standardabweichung von  $N_A$  und  $t^a$  den zeitlichen Versatz bezeichnet. Laut dem Wiener-Chintschin-Theorem, welches besagt, dass die Korrelationsfunktion und die Spektraldichte eines stochastischen Prozesses ein Paar von Fourier-Transformierten bilden (s. z.B. (Vojta und Vojta 2000)), wird eine exponentielle Autokorrelationsfunktion zu einer Spektraldichte mit Gestalt einer Lorentzkurve

$$\left\langle \delta N_A(\nu)^2 \right\rangle = \frac{C}{1 + (2\pi\nu\tau)^2} \quad (7.4)$$

führen (Fehrer und Weissman 1973). Um die Konstante  $C$  zu ermitteln, wird die Wahrscheinlichkeit  $P$ , ein Molekül zu einem beliebigen Zeitpunkt im Zustand  $X = A$  vorzufinden, betrachtet. Diese ist durch die Beziehung  $P(X = A) = k_{21} / (k_{12} + k_{21})$  gegeben

(Machlup 1954).



**Abb. 7.1:** Prinzip der Fluktuationsspektroskopie. Zahl der Moleküle im Zustand A aufgetragen gegen die Zeit. Die Daten entstammen einer MC-Simulation mit  $N=10000$  Molekülen und  $k_{12} = |k_{21}| = 0.02$  auf Basis der FRM. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt einen Teil des Spektrums, gestrichelte horizontale Linien grenzen den Bereich der Standardabweichung ein, die der Standardabweichung des Urnenmodells einer Binomialverteilung gleicht. Spektraldichte und Autokorrelation werden aus den zeitlichen Fluktuationen berechnet. Aus der Standardabweichung und dem exponentiellen Abfall der Autokorrelation lässt sich die Form der Lorentzkurve (7.6) als Funktion von  $\tau$  berechnen. Diese wird an die FFT angepasst und führt zu den kinetischen Konstanten.

Die Fluktuationsamplitude der Anzahl der Moleküle im Zustand A lässt sich daher einfach als Varianz einer Binomialverteilung ermitteln. Es folgt

$$\langle \delta N_A^2 \rangle = N \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \left( 1 - \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \right) = \langle N_A \rangle \left( 1 - \frac{\langle N_A \rangle}{N} \right). \quad (7.5)$$

Anwendung des Parseval-Theorems auf Gleichungen (7.4) und (7.5) führt schließlich zu

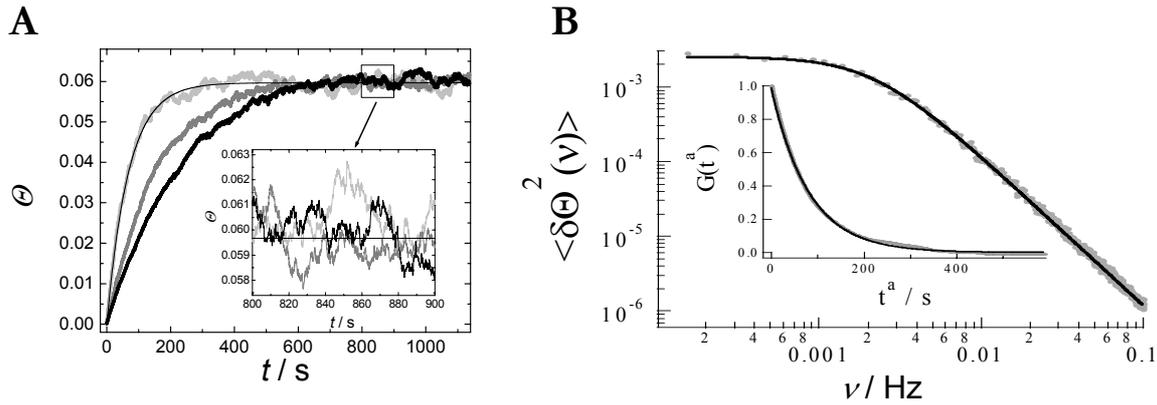
$$\langle \delta N_A(\nu)^2 \rangle = \frac{4\tau \langle N_A \rangle (1 - \langle N_A \rangle / N)}{1 + (2\pi\nu\tau)^2} \quad (7.6)$$

(Fehrer und Weissman 1973). Aus der Spektraldichte lassen sich daher neben den kinetischen Konstanten auch die mittlere Zahl der Moleküle in den jeweiligen Zuständen entnehmen. Abb. 7.1 zeigt zusammenfassend das oben beschriebene Prinzip: Ausgehend von den Teilchenzahlfluktuationen, welche mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Programms „AB-Fluc“ (siehe Anhang) erhoben wurden, werden die Spektraldichte und die Autokorrelation berechnet. Aufgrund der exponentiell abfallenden Charakteristik der Autokorrelation und der binomialverteilten Schwankung lässt sich die Spektraldichte in Form von Gleichung (7.6) bestimmen. Eine Anpassung der Parameter zeigt gute Übereinstimmung mit den Parametern, die der MC-Simulation zugrunde liegen.

## 7.2 Anwendung der Fluktuationsspektroskopie auf Oberflächenreaktionen

Um die im vorigen Abschnitt vorgestellte Methode der Fluktuationsspektroskopie auf Oberflächenreaktionen anwenden zu können, müssen zwei Fragen geklärt werden: 1. Wie wirkt sich der Massentransport auf die Kinetik der Fluktuationen aus? 2. Welchen Einfluss hat die ASF auf das Spektrum?

Die erste Frage lässt sich leicht beantworten. Da das Fluktuationsspektrum im Gleichgewicht aufgenommen wird, befinden sich zahlreiche Partikel in der Grenzschicht von Oberfläche und Lösung. Pro Zeiteinheit werden Partikel der Grenzschicht an der Oberfläche adsorbieren und eben so viele die Oberfläche verlassen. Der Transport beeinflusst die Dicke der Grenzschicht, indem er Material aus der Lösung mit konstanter Konzentration nachführt und abtransportiert. Transportphänomene werden daher die Messung durch oberflächensensitive Messmethoden nicht stören, sofern sich eine Grenzschicht von Partikeln bilden kann. Dieses Verhalten spiegelt Abb. 7.2 wider. Gezeigt sind Simulationen des zeitlichen Verlaufs der Belegung für drei verschiedene Transportraten. Zum einen ist ein Fall dargestellt, in dem der Massentransport durch Wahl einer extrem hohen Transportrate  $k_{tr} = 10^5$  m/s vernachlässigt werden kann. Die anderen beiden Adsorptionskurven sind im zeitlichen Verlauf bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes geprägt von der Wahl der Transportrate (s. Teilbild A). Gut zu erkennen ist die Unabhängigkeit des Gleichgewichtswertes in der Belegung von der Transportrate. Mit Hilfe der oben entwickelten Gleichung (2.10), in die die Transportrate nicht eingeht, lässt sich daher der gesamte Verlauf der ersten Adsorptionsisotherme sehr gut anpassen. Der berechnete Gleichgewichtswert in der Belegung stimmt für alle drei Kurven überein. Um dies zu verdeutlichen zeigt der Ausschnitt eine Vergrößerung der Fluktuationen in der Belegung um den berechneten Wert. Aus dem Plateaubereich lässt sich mit Hilfe einer FFT die Adsorptions- und Desorptionsrate berechnen. Teilbild B zeigt die Spektraldichte der Fluktuation in der Belegung für  $k_{tr} = 10^5$  m/s. Die Spektraldichten des Plateaubereichs der beiden anderen Adsorptionsisothermen sind von diesem Verlauf nicht zu unterscheiden und daher nicht separat abgebildet. Den weiteren Ausführungen vorgreifend zeigt die Abbildung auch eine Anpassung der Spektraldichte an die später hergeleitete Gleichung (7.14). Dies bestätigt den zeitlich exponentiellen Zerfall des Nichtgleichgewichtszustandes des Systems. Der Ausschnitt zeigt die entsprechende Autokorrelationsfunktion mit monoexponentieller Anpassung.



**Abb. 7.2:** A Simulation des zeitlichen Verlaufs der Belegung für verschiedene Transportraten: ohne Berücksichtigung des Transports (hellgrau),  $k_{tr} = 10^{-7}$  m/s (grau) und  $k_{tr} = 10^{-8}$  m/s (schwarz). Die durchgezogene Linie ist die Anpassung der Parameter von Gl. (2.10). Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Gleichgewichtsfuktuationen. Weitere Simulationsparameter:  $k_{on} = 10^{-7}$  m/s,  $k_{off} = 10^{-2}$  s $^{-1}$ ,  $\rho_{bulk} = 10^{18}$  m $^{-3}$ ,  $A = 10^{-10}$  m $^2$ . B Spektraldichte der Fluktuation in der Belegung ohne Berücksichtigung des Transports bei gleichen kinetischen Konstanten. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach Gleichung (7.14). Der Ausschnitt zeigt die entsprechende Autokorrelationsfunktion mit monoexponentieller Anpassung.

In der Transportunabhängigkeit liegt ein großer Vorteil, denn häufig ist der Massentransport schlecht definiert. Zudem ist es schwierig bei der üblichen Vorgehensweise, bei der die kinetischen Konstanten aus der Anfangssteigung ermittelt werden, den Einfluss des Transports zur Oberfläche von der Wechselwirkungskinetik zu trennen.

Noch zu klären ist der Einfluss der ASF auf die Spektren. Die ASF bestimmt die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Adsorptionsversuchs und modifiziert daher sowohl die Fluktuationsamplitude der Belegung als auch die Relaxationszeit des Systems. Bei hohen Belegungen verhält sich aus diesem Grund das System nicht mehr ideal, d.h. es muss auf die numerische Lösung der Mastergleichung statt auf die Ratengleichungen zurückgegriffen werden. Um die kinetischen Konstanten der Adsorption und Desorption zu bestimmen, ist es deshalb notwendig einen funktionalen Zusammenhang zwischen der Fluktuationsamplitude und der ASF, bzw. der Relaxationszeit und der ASF, zu finden. Zur Berechnung der Standardabweichung der Fluktuation finden sich in der Literatur verschiedene Ansätze, die auf das Modell der irreversiblen RSA zurückgreifen, z.B. (Senger *et al.* 1994, Schaaf *et al.* 1995a, Adamczyk *et al.* 1996, Bafaluy *et al.* 1997, Román *et al.* 1997). Eine Möglichkeit besteht darin, die Fluktuationsamplitude der Belegung mit Hilfe der aus der Thermodynamik bekannten Beziehung

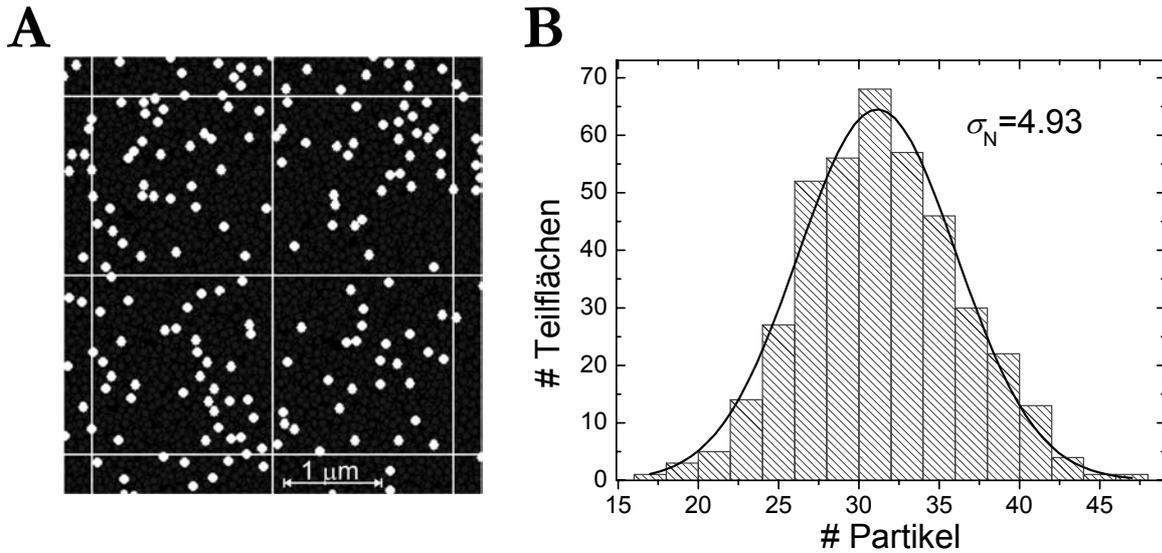
$$\langle \delta\Theta^2 \rangle = \frac{\pi a^2}{A} \langle \Theta \rangle \left[ 1 + 2 \langle \Theta \rangle \int_0^\infty (g(\bar{r}) - 1) 2\pi \bar{r} d\bar{r} \right] \quad (7.7)$$

zwischen Varianz und zweidimensionaler Paarkorrelation zu berechnen (Landau und Lifschitz 1978, Adamczyk *et al.* 1996). Hierin bezeichnet  $\bar{r} = r/a$  den dimensionslosen radialen Abstand. Für die Paarkorrelationsfunktion ist jedoch im Gegensatz zum eindimensionalen Fall keine analytische Darstellung bekannt, so dass die Berechnung des Integrals nur näherungsweise durchgeführt werden kann (Bonnier *et al.* 1994, Schaaf *et al.* 1995a). Zudem lässt sich die Paarkorrelationsfunktion experimentell bei geringen Belegungsgraden nur sehr ungenau bestimmen (Wojtaszczyk *et al.* 1995).

Eine andere Möglichkeit nutzt die Ergodizität des Systems. An Stelle der zeitlichen Fluktuationen der Belegung wird die Fläche in mehrere Untereinheiten aufgeteilt und die Schwankung der Belegung in den verschiedenen Teilflächen ermittelt. Dies lässt sich experimentell z.B. durch ein automatisiertes Auszählungsverfahren mit Hilfe eines angepassten Bildverarbeitungsprogramms realisieren. Aus der Schwankung  $\sigma_N$  der Teilchenzahl ergibt sich dann über die Beziehung

$$\langle \delta\Theta^2 \rangle = \left( \frac{\pi a^2}{A_U^2} \cdot \frac{1}{\sqrt{N_{A_U}}} \sigma_N \right)^2 \quad (7.8)$$

die Fluktuationsamplitude. Die Fläche der Untereinheit bezeichnet  $A_U$ , die Anzahl der Untereinheiten  $N_{A_U}$ . Dieses Verfahren wird in Abb. 7.3 verdeutlicht.



**Abb. 7.3:** A Teilausschnitt einer Fläche, die in Teilflächen mit Kantenlänge  $1 \mu\text{m}$  gegliedert ist. Das Auszählen der Partikel pro Untereinheit ergibt das Histogramm in B. Aus diesem lässt sich die Standardabweichung ermitteln. Gezeigt ist eine Gaußkurve mit Standardabweichung  $\sigma_N = 4.93$ . Simulationsparameter:  $k_{\text{on}} = 10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{off}} = 10^{-2}$  s $^{-1}$ ,  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18}$  m $^{-3}$ ,  $1.6 \cdot 10^{-9}$  m $^2$ . Die Gliederung der Simulationsoberfläche und Auszählung der Partikel erfolgt mit dem Programm „Distribution-Calculator“ (s. Anhang).

Gezeigt ist ein Ausschnitt einer Fläche nach Ende einer MC-Simulation der in Teilflächen mit Kantenlängen von jeweils  $2 \mu\text{m}$  unterteilt ist. Die Auswertung der Gesamtfläche ergibt das Histogramm in Teilbild B. Zur Verdeutlichung der Standardabweichung ist eine zur Verteilung passende Gaußkurve eingezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit dient dieses Verfahren zur Kontrolle der aus den Fluktuationen der Adsorptionsisotherme ermittelten Standardabweichung und kann im Umkehrschluss zeigen, dass sich das System für geringe bis mittlere Belegungsgrade ergodisch verhält.

Für den Fall der irreversiblen RSA ergibt sich, dass die ASF proportional zur Fluktuationsamplitude ist (Schaaf *et al.* 1995a, Schaaf *et al.* 1995b, Adamczyk *et al.* 1996). Für kleine Belegungen ( $\Theta < 10\%$ ) gilt daher

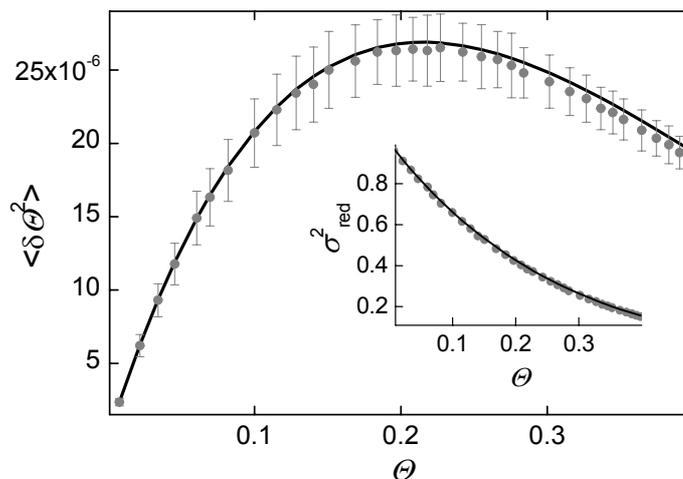
$$\langle \delta\Theta^2 \rangle = \frac{\pi a^2}{A} \langle \Theta \rangle (1 - 4 \langle \Theta \rangle). \quad (7.9)$$

Der Nachteil von Gl.(7.9) liegt in der begrenzten Gültigkeit. Für höhere Belegungen weichen die ASF von reversibler und irreversibler RSA voneinander ab. Die in den oben genannten Literaturstellen mit Hilfe der irreversiblen RSA ermittelten Beziehungen können deshalb nicht

unmittelbar auf das vorliegende reversible System angewandt werden. Eine gute Näherung für die Fluktuationen im Gleichgewicht kann mit Hilfe der Zustandfunktion einer zweidimensionalen Flüssigkeit konvexer Partikel im Zusammenhang mit der SPT hergeleitet werden (Boublik 1975). Es ergibt sich dann für runde Partikel

$$\langle \delta\Theta^2 \rangle = \frac{\pi a^2}{A} \langle \Theta \rangle \frac{(1 - \langle \Theta \rangle)^3}{1 + \langle \Theta \rangle} \quad (7.10)$$

(Adamczyk und Weronski 1997). Entgegen der natürlichen Annahme, dass die Fluktuationen in der Belegung für eine zur Hälfte gefüllte Oberfläche ( $\Theta = 0.547/2$ ) maximal sind, liegt das Maximum bei einer Belegung von  $\Theta = (\sqrt{7} - 2)/3 \approx 0.215$ . Dieser Sachverhalt ist in Abb. 7.4 dargestellt. Gezeigt ist die mittlere quadratische Schwankung der Belegung als Funktion der Belegung. Die Daten stammen aus jeweils 100 MC-Simulationen, wobei nur die Adsorptionsrate systematisch variiert wurde, um verschiedene Belegungsgrade zu erzielen. Die verwendeten Simulationsparameter sind der Bildunterschrift zu entnehmen.



**Abb. 7.4:** Mittlere quadratische Schwankung der Belegung als Funktion der Belegung. Die Punkte mit Fehlerbalken stammen aus jeweils 100 MC-Simulationen mit folgenden Parametern:  $k_{\text{on}} = 10^{-8} \cdot 10^{-5}$  m/s,  $k_{\text{off}} = 0.01$  s $^{-1}$ ,  $A = 2.5 \cdot 10^{-11}$  m $^2$ ,  $a = 50$  nm,  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18}$  m $^{-3}$ . Die durchgezogene Linie zeigt die aus der SPT hergeleitete Beziehung (7.10). Der Ausschnitt zeigt die dimensionslose reduzierte Varianz bei gleichen Parametern.

Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach Gleichung (7.10). In der Literatur ist häufig die entsprechende dimensionslose Größe, die reduzierte Varianz  $\sigma_{\text{red}}^2$ , anzutreffen:

$$\sigma_{\text{red}}^2 = \frac{(1 - \langle \Theta \rangle)^3}{1 + \langle \Theta \rangle}. \quad (7.11)$$

Der Ausschnitt zeigt daher die dimensionslose reduzierte Varianz bei gleichen Parametern mit der entsprechend genormten Anpassung.

In Hinblick auf eine Sensorapplikation ist es für ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis daher sinnvoll, die Konzentration der Partikellösung so zu wählen, dass die Oberfläche zu ungefähr 21.5% belegt ist.

Für die Fluktuationsspektroskopie von Oberflächenreaktionen ist die Relaxationszeit in Gl. (7.6) von entscheidender Bedeutung. Sie wird durch die ASF über die DGL (2.4) beeinflusst. Für geringe Belegungen ( $\langle \Theta \rangle < 10\%$ ) ergibt sich eine dem Langmuir Ansatz (s. Gl. (2.2)) ähnliche Form

$$\tau = \frac{1}{4\pi a^2 \rho_{\text{bulk}} k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}, \quad (7.12)$$

während für mittlere Belegungen ( $\langle \Theta \rangle < 25\%$ ) Terme der Ordnung  $\langle \Theta \rangle^2$  mit einbezogen werden müssen. Bei Vernachlässigung der 1 im Nenner von Gleichung (2.10) führt dies zu der Näherung

$$\tau = \frac{1}{\pi a^2 \rho_{\text{bulk}} k_{\text{on}} \sqrt{\left(4 + \frac{k_{\text{off}}}{\pi a^2 \rho_{\text{bulk}} k_{\text{on}}}\right)^2 - \frac{24\sqrt{3}}{\pi}}}. \quad (7.13)$$

Die Einschränkung auf mittlere Belegungsgrade ist auch wegen des günstigen Signal-Rausch-Verhältnisses bei  $\langle \Theta \rangle = 0.215$  wünschenswert und experimentell leicht über Einstellung der Partikelkonzentration zu realisieren.

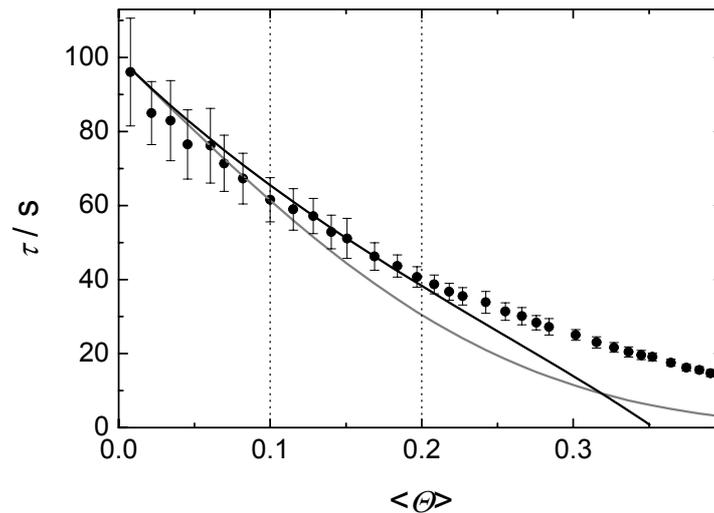
Zur Anwendung der Fluktuationsspektroskopie müssen an Stelle der Zahl der Moleküle in Gleichung (7.6) die entsprechenden Größen der Belegung eingeführt werden. Diese führt zu der Beziehung

$$\langle \delta\Theta(\nu)^2 \rangle = \frac{4\tau \frac{\pi a^2}{A} \langle \Theta \rangle \frac{(1 - \langle \Theta \rangle)^3}{1 + \langle \Theta \rangle}}{1 + (2\pi\nu\tau)^2} = \frac{c\tau}{1 + (2\pi\nu\tau)^2}. \quad (7.14)$$

Die kinetischen Konstanten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  lassen sich mit Hilfe von Gl. (7.13) und der Näherung  $\langle \Theta \rangle = \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} / (4\pi a^2 \rho_{\text{bulk}} + k_{\text{off}})$  nach Anpassung von Gl. (7.14) an die Spektren ermitteln (s. Abb. 7.2 B). Somit genügt ein Spektrum, um die volle Information über die Kinetik des Systems

zu erlangen.

Zur Überprüfung der Beziehung (7.14) werden reversible RSA Simulationen durchgeführt, wobei die Desorptionsrate  $k_{\text{off}} = 0.01 \text{ s}^{-1}$  konstant gehalten und die Adsorptionsrate  $k_{\text{on}}$  zwischen  $10^{-8} \text{ m/s}$  und  $10^{-5} \text{ m/s}$  variiert wird. Die Belegung der Oberfläche nimmt bei entsprechender Wahl der Dichte der Partikel in Lösung Werte zwischen 1% und 40% an. Um der Statistik zu genügen werden pro Adsorptionsrate 100 Simulationen durchgeführt.



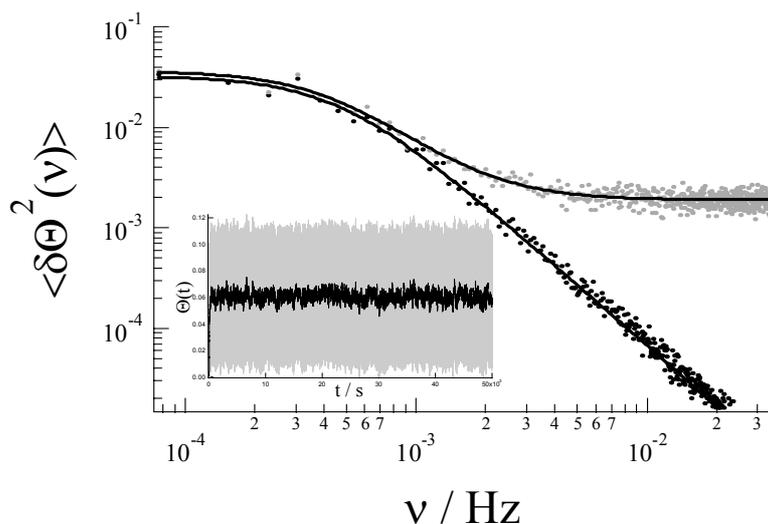
**Abb. 7.5:** Intrinsische Zeitkonstante  $\tau$  als Funktion der Gleichgewichtsbelegung  $\langle \Theta \rangle$ . Die Datenpunkte sind Mittelwerte von jeweils 100 Simulationen mit den Parametern  $k_{\text{on}} = 10^{-8} \dots 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$ ,  $k_{\text{off}} = 0.01 \text{ s}^{-1}$ ,  $A = 2.5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$ ,  $a = 50 \text{ nm}$  und  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18} \text{ m}^{-3}$ . Für geringe Belegungen  $\Theta < 10\%$  kann die Zeitkonstante gut durch Gl. (7.12) angepasst werden (graue Linie), während für höhere Belegungen zwischen 10% und 20% Gl. (7.13) (schwarze Linie) die Zeitkonstante gut wiedergibt.

Aus den Adsorptionsspektren wird mit Hilfe der FFT die Spektraldichte errechnet. Die FFT wird aus den Fluktuationen im Gleichgewicht der Adsorptionsisotherme gebildet, wobei dieser Bereich aufgrund der hohen Anzahl an Werten nochmals unterteilt wird. Die Teilbereiche werden transformiert und der Mittelwert der Transformationen als Spektraldichte ausgegeben. Zur Bewältigung der Datenmengen ist im Rahmen dieser Arbeit das Programm „DaPro“ zur automatisierten Auswertung entwickelt worden (s. Anhang). Dieses liest nacheinander die Adsorptionsisothermen ein und trennt jeweils den Anfangsbereich ab. Zur Durchführung der FFT wird die Abfolge der Adsorptions- und Desorptionsereignisse in äquidistante Zeitschritte zerlegt, wobei die Belegungswerte linear interpoliert werden. Je nach Anzahl der Simulationenwerte wird der Plateaubereich anschließend in Teilabschnitte gespalten, die jeweils transformiert

werden. Die Spektraldichte wird als arithmetisches Mittel der Fouriertransformierten ausgegeben. Aus den Spektraldichten lassen sich letztlich die intrinsischen Zeitkonstanten durch eine Anpassung an Gleichung (7.14) ermitteln. Abb. 7.5 zeigt die Ergebnisse dieses Verfahrens.

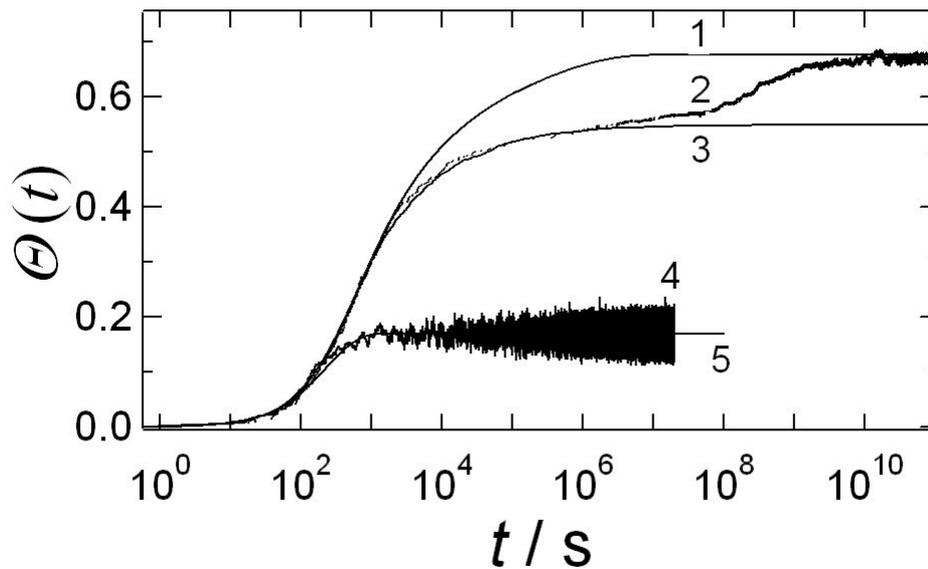
Für geringe Belegungen bis 10% wird die Zeitkonstante  $\tau$  noch durch den Langmuir-ähnlichen Ansatz angepasst (schwarze Linie). Mittlere Belegungen bis zu 20% können gut durch die analytische Lösung bis zur Ordnung  $\Theta^2$ , gegeben durch Gleichung (7.13), modelliert werden, während höhere Belegungen aufgrund des nichtlinearen Einflusses der ASF starke Abweichungen zeigen. Dennoch lassen sich die Simulationsdaten bis zu  $\Theta = 0.4$  gut mit Hilfe von Gleichung (7.14) anpassen.

Wie gut diese Anpassung selbst bei externen störenden Einflüssen funktioniert, zeigt Abb. 7.6 exemplarisch. Zu den zeitlichen Gleichgewichtsfluktuationen ist ein zehnfach höheres weißes Rauschen addiert (im Ausschnitt dargestellt). Dennoch lässt sich die Kinetik mit Hilfe von Gleichung (7.13) mit Addition einer Konstanten, die den Rauschuntergrund berücksichtigt, sehr gut ermitteln. Die berechnete Zeitkonstante für das gestörte Signal (graue Punkte) ergibt sich zu  $\tau = 367 \pm 7$  s und weicht trotz eines Signal-Rausch-Verhältnisses von ungefähr 0.1 nur geringfügig von dem ungestörten Signal mit berechnetem  $\tau = 350 \pm 5$  s ab.



**Abb. 7.6:** Spektraldichten von Fluktuationen in der Belegung mit (graue Punkte) und ohne Rauschuntergrund (schwarze Punkte). Die Belegungsspektren sind im Ausschnitt dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt die reine Fluktuation mit Standardabweichung  $\sqrt{\langle \delta\theta^2 \rangle} = 0.004$ , während die graue Kurve die Fluktuation mit zusätzlichem weißem Rauschen mit nahezu zehnfacher Varianz  $\sqrt{\langle \delta\theta^2 \rangle} = 0.03$  zeigt. Die Spektraldichten zeigen gute Übereinstimmung mit der Anpassung durch Gleichung (7.14).

Zum Abschluss dieses Kapitels wird auf den Fall der reversiblen RSA mit geringer Desorption eingegangen, d.h. für das Verhältnis  $\xi$  der kinetischen Konstanten gilt die Beziehung  $\xi = k_{\text{off}} / (k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}}) \ll 1$ . Entgegen der Annahme, dass der Gleichgewichtswert des Systems mit abnehmendem  $\xi$  kontinuierlich gegen das *jamming limit*, den Grenzwert der irreversiblen RSA, strebt, wird dieser überschritten. Daraus folgt eine Unstetigkeit in der Gleichgewichtsbelegung als Funktion der Desorptionskonstanten für  $k_{\text{off}} \rightarrow 0$ . Das Verhalten bei Belegungen jenseits von 50% wird im Folgenden anhand von Abb. 7.7 beschrieben.



**Abb. 7.7:** Halblogarithmische Darstellung eines Langzeitfluktuationsspektrums (2) eines „kalten“ Systems, welches durch eine Belegung jenseits des *jamming limits* (gegeben durch Kurve (3)) charakterisiert ist. Der Verlauf zeigt deutlich zwei Plateaus. Das erste wird durch den Grenzwert der irreversiblen Adsorption beschrieben, während das später erreichte dem Gleichgewichtswert der numerischen Lösung von Gl. (7.15) entspricht. Kurve (4) hingegen zeigt das typische Verhalten eines „heißen“ Systems zusammen mit der numerischen Lösung von Gl. (2.4). Simulationsparameter:  $k_{\text{on}} = 10^{-7}$  m/s,  $k_{\text{off}} = 10^{-8}$  s $^{-1}$  (2) und  $k_{\text{off}} = 2 \cdot 10^{-3}$  s $^{-1}$  (4),  $A = 4 \cdot 10^{-12}$  m $^2$ ,  $a = 50$  nm und  $\rho_{\text{bulk}} = 10^{18}$  m $^{-3}$ .

Die simulierten Daten der Kurve (2) zeigen den Verlauf der Belegung der reversiblen RSA mit einem Gleichgewichtswert von  $\Theta \approx 68.33\%$ . Die durchgezogene Linie (3) entspricht einer Simulation mit gleichem  $k_{\text{on}}$  nach dem Modell der irreversiblen RSA und zeigt, dass der erste Teil der simulierten Adsorptionsisotherme (2) bis zur Zeit  $t = 10^6$  s gut durch die Kinetik des irreversiblen Prozesses wiedergegeben wird. Danach weichen die Kurven voneinander ab, da das *jamming limit* im irreversiblen Fall nicht überschritten werden kann. Der Gleichgewichtswert des reversiblen Prozesses, der schließlich in einem zweiten Schritt bei  $t > 10^9$  s erreicht wird, kann durch den Verlauf der durchgezogenen Linie (1) approximiert werden. Diese entspricht der numerischen Lösung<sup>10</sup> von Gleichung (2.4) unter Verwendung der ASF (2.10) aus der SPT, d.h. der Lösung der DGL

<sup>10</sup> Gleichung (7.15) wurde numerisch mit Hilfe des Runge-Kutta Verfahrens integriert.

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} (1 - \Theta) \exp \left[ -3 \frac{\Theta}{1 - \Theta} - \left( \frac{\Theta}{1 - \Theta} \right)^2 \right] - k_{\text{off}} \Theta. \quad (7.15)$$

In gewöhnlichen experimentellen Anwendungen ist der Gleichgewichtswert, der in einem zweiten Schritt erreicht wird, nicht zugänglich. Dieses Langzeitverhalten ist für ein eindimensionales System bereits untersucht worden (Kolan *et al.* 1999). In diesem Fall wird zwischen einem „kalten“ System mit hoher Belegung und einem „heißem“ ergodischen System, in dem der Gleichgewichtswert schnell erreicht wird, unterschieden. Das „heiße“ System ist durch eine einzige Zeitkonstante charakterisiert, während das „kalte“ System wenigstens zwei Zeitkonstanten beinhaltet, die eine Klassifizierung in eine langsame und eine schnelle Dynamik erlaubt. Kurve (4) zeigt den Verlauf eines „heißen“ Systems, welches seinen Gleichgewichtswert bei geringer bis mittlerer Belegung ( $\Theta \approx 16\%$ ) hat. Eine gute Übereinstimmung mit der SPT (Kurve (5)) ist offensichtlich. Die schnelle Dynamik des reversiblen Prozesses kann durch das Zusammenspiel nahezu unabhängiger Telegrafmoden beschrieben werden, während die langsame Dynamik auf kollektive Adsorptions- und Desorptionsereignisse zurückgeführt werden kann (Machlup 1954, Krapivsky und Ben-Naim 1994, Nowak *et al.* 1998). Es ist offensichtlich, dass diese kollektiven Reorganisationsprozesse auf der Oberfläche stattfinden müssen, um den hohen Gleichgewichtswert jenseits des Grenzwertes der RSA zu erreichen. Für das Prinzip der Fluktuationsspektroskopie ist dieser Fall jedoch nicht zu berücksichtigen, da die Methode wegen der maximalen Sensitivität bei  $\Theta = 0.215$  auf mittleren Belegungen basieren sollte.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit verfolgte die Zielsetzung, ein Simulationsprogramm zu schaffen, welches es ermöglicht, die Kinetik von Adsorptionsprozessen und nachfolgende konformative Änderungen der adsorbierten Partikel auf der Oberfläche unter realistischen physikalischen Randbedingungen zu beschreiben. Dazu wurde eine MC-Simulation auf Grundlage eines RSA Mechanismus erstellt. Die zunächst pragmatische Vorgehensweise führte zu einem Algorithmus, der die Prinzipien der *random selection method* und der *first reaction method* miteinander kombiniert. Der Massentransport zur Oberfläche wurde über einen *Mean-Field*-Ansatz als Transportrate basierend auf einer laminaren Staupunktströmung beschrieben und somit auf die Geometrie der experimentell verwendeten Messzellen angepasst. Um eine Vielzahl spezifischer biologischer Fragestellungen bearbeiten zu können wurden in das Simulationsprogramm zusätzliche Optionen implementiert, mit denen konformative Änderungen, elektrostatische Abstoßung und die Desorption von Partikeln modelliert werden können. Zusätzlich zu den kinetischen Informationen gibt die graphische Ausgabe Aufschluss über die Oberflächenverteilung der Partikel, wie z.B. die Paarkorrelationsfunktion.

Nach Vorstellung der Messmethoden in Kapitel 4, wurde in Kapitel 5 auf die präparativen Methoden und die Probensysteme eingegangen. Zunächst wird an Hand des Modellsystems der Latex Beads gezeigt, wie trefflich die theoretische Modellierung der Transportrate ist. Dies ist Grundvoraussetzung für die korrekte Bestimmung der Adsorptionsrate.

Die Untersuchung weiterer Probensysteme offenbart die Vielseitigkeit des Programms, da hier sämtliche Optionen des Algorithmus genutzt wurden, zeigten aber auch die Grenzen der Anwendbarkeit auf. So war es möglich, die Adsorptionsrate der Annexin A1 vermittelten Wechselwirkung von Vesikeln mit einer Lipiddoppelschicht in Abhängigkeit von der Ionenstärke bzw. der Calciumkonzentration sehr genau zu bestimmen. Prozesse, die das Spreiten der Vesikel beinhalten, können zwar angepasst werden, die Resultate sind aber spekulativ, wenn sie nicht durch weitere Informationen, wie z.B. die Oberflächentopographie, gestützt werden. Diese Problematik war bei der Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von biotindotierten Liposomen an einer mit Avidin beschichteten Oberfläche ersichtlich.

Bei der Untersuchung von Systemen, in denen die Adsorption reversibel ist und infolge dessen Desorptionsprozesse eine wichtige Rolle spielen, wurde mit Hilfe des Simulationsprogramms ein völlig neuartiges Sensorkonzept in Aussicht gestellt. Es wurde gezeigt, dass aus der Analyse des Leistungsspektrums der Fluktuationen in der Belegung die Kinetik von Adsorption und

Desorption ermittelt werden kann. Dies ist aus sensorischer Sicht interessant, da eine Vielzahl störender Einflüsse, wie z.B. der Massentransport und die elektronische Drift in diesem Fall nicht berücksichtigt werden müssen.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld des Simulationsprogramms findet sich, wenn die festkörpergestützte Oberfläche eine Domänenstruktur aufweist. Mit der Implementierung einer Option in den Programmcode, die heterogene Bereiche, die sich hinsichtlich der Reversibilität der Bindung unterscheiden, auf der Adsorptionsfläche erschafft, gelang es das calciumabhängige Bindungsverhalten von Annexin A1 zu simulieren. In diesem hier nicht gezeigten Fall gelang es, die Größe der Domänen mit dem molaren Calciumanteil des Puffers zu korrelieren (Kastl *et al.* 2005).

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamczyk, Z. (2000) Kinetics of diffusion-controlled adsorption of colloid particles and proteins  
*J. Coll. Int. Sci.* 229, 477-489
- Adamczyk, Z. (2003) Particle adsorption and deposition: role of electrostatic interactions  
*Adv. Coll. Int. Sci.* 100, 267-347
- Adamczyk, Z., Musial, E., Jachimska, B., Szysk-Warszynska, L. und Kowal, A. (2002) Polystyrene latex adsorption at the gold/electrolyte interface  
*J. Coll. Int. Sci.* 254, 283-286
- Adamczyk, Z., Senger, B., Voegel, J.-C. und Schaaf, P. (1999) Irreversible adsorption/deposition kinetics: A generalized approach  
*J. Chem. Phys.* 110, 3118-3128
- Adamczyk, Z., Siwek, B. und Musial, E. (2003) Latex particle adsorption at heterogeneous surfaces  
*Coll. Surf. A* 214, 219-229
- Adamczyk, Z., Siwek, B., Szyk, L. und Zembala, M. (1996) Fluctuations in the number of particles adsorbed under the influence of diffusion and flow  
*J. Chem. Phys.* 105, 5552-5561
- Adamczyk, Z., Siwek, B., Warszynski, P. und Musial, E. (2001) Kinetics of particle deposition in the radial impinging-jet cell  
*J. Coll. Int. Sci.* 242, 14-24
- Adamczyk, Z., Siwek, B., Zembala, M. und Weronki, P. (1997) Influence of polydispersity on random sequential adsorption of spherical particles  
*J. Coll. Int. Sci.* 185, 236-244
- Adamczyk, Z. und Warszynski, P. (1996) Role of electrostatic interactions in particle adsorption  
*Adv. Coll. Int. Sci.* 63, 41-149
- Adamczyk, Z. und Weronki, P. (1997) Density fluctuations in irreversible adsorption processes: hard ellipses in two dimensions  
*J. Chem. Phys.* 107, 3691-3697
- Adamczyk, Z. und Weronki, P. (1999) Application of the DLVO theory for particle deposition problems  
*Adv. Coll. Int. Sci.* 83, 137-226
- Anczykowski, B. (1998) Experimentelle und theoretischen Untersuchungen zur dynamischen

Rasterkraftmikroskopie  
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Arntz, Y., Seelig, J. D., Lang, H. P., Zhang, J., Hunziker, P., Ramseyer, J. P., Meyer, E., Hegner, M. und Gerber, C. (2003) Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array  
*Nanotechnology* 14, 86-90

arxiv.org - An introduction to Monte Carlo simulations of surface reactions  
<http://www.arxiv.org>

Avanti Polar Lipids  
<http://www.avantilipids.com>

Bafaluy, J., Schaaf, P., Senger, B., Voegel, J. und Pagonabarraga, I. (1997) Density fluctuations of assemblies of irreversibly deposited particles on solid surfaces  
*J. Chem. Phys.* 107, 2089-2095

Bandey, H. L., Martin, S. J., Cernosek, R. W. und Hilman, A. R. (1999) Modeling the responses of thickness-shear mode resonators under various loading conditions  
*Anal. Chem.* 71, 2205-2214

Barker, J. A. und Henderson, D. (1967) Perturbation theory and equation of state for fluids. II. A successful theory of liquids  
*J. Chem. Phys.* 47, 4714-4721

Binnig, G., Quate, C. F. und Gerber, C. (1986) Atomic force microscope  
*Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933

Bitto, E. und Cho, W. (1998) Roles of individual domains of annexin I in its vesicle binding and vesicle aggregation: a comprehensive and mutagenesis study  
*Biochemistry* 37, 10231-10237

Bitto, E. und Cho, W. (1999) Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I  
*Biochemistry* 38, 14094-14100

Bonnier, B., Boyer, D. und Viot, P. (1994) Pair correlation function in random sequential adsorption processes  
*J. Phys. A* 27, 3671-3682

Bottom, V. E. (1982) *Introduction to quartz crystal unit design*  
Van Nostrand Reinhold Co., New York

Boublik, T. (1974) Hard convex body equation of state  
*J. Chem. Phys.* 63, 4084

Boublik, T. (1975) Two-dimensional convex particle liquid

- Mol. Phys.* 29, 421-428
- Collings, A. F. und Caruso, F. (1997) Biosensors: Recent advances  
*Rep. Prog. Phys.* 60, 1379-1445
- Dabros, T. und van de Ven, T. G. M. (1983) A direct method for studying particle deposition onto solid surfaces  
*Coll. Pol. Sci.* 261, 694-707
- de la Fuente, M. und Parra, A. V. (1995) Vesicle aggregation by annexin I: role of a secondary membrane binding site  
*Biochemistry* 34, 10393-10399
- Dufrene, Y. F. und Lee, G. U. (2000) Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope  
*Biochim. Biophys. Acta* 1509, 14-41
- Evans, E. A. und Needham, D. (1987) Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions.  
*J. Phys. Chem.* 91, 4219-4228
- Faiß, S. (2003) Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Phospholipidvesikeln mit Hilfe der Quarzmikrowaage und Herstellung eines Gradientenmischers für festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten  
Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Faiß, S., Lüthgens, E. und Janshoff, A. (2004) Adhesion and rupture of liposomes mediated by electrostatic interaction monitored by thickness shear mode resonators  
*Eur. Biophys. J.* 33, 555-561.
- Feder, J. (1980) Random sequential adsorption  
*J. Theor. Biol.* 87, 237-254
- Fehrer, G. und Weissman, M. (1973) Fluctuation spectroscopy: determination of chemical reaction kinetics from the frequency spectrum of fluctuations  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 870-875
- Fichthorn, K. A. und Weinberg, W. H. (1991) Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations  
*J. Chem. Phys.* 95, 1090-1096
- Friskens, B. J., Asman, C. und Paddy, P. J. (2000) Studies of vesicle extrusion  
*Langmuir* 16, 928-933
- Gelten, R. J. (1999) Monte Carlo simulations of catalytic surface reactions  
Dissertation, Technische Universität Eindhoven

- Gillespie, D. T. (1976) A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions  
*J. Comp. Phys.* 22, 403-434
- Gillespie, D. T. (1977) Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions  
*J. Chem. Phys.* 81, 2340-2361
- Goetz, R., Gompper, G. und Lipowsky, R. (1999) Mobility and elasticity of self-assembled membranes  
*Phys. Rev. Lett.* 82, 221-224
- Granstaff, V. E. und Martin, S. J. (1994) Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers  
*J. Appl. Phys.* 75, 1319-1329
- Hansma, H. G. und Hoh, J. H. (1994) Biomolecular imaging with the atomic force microscope  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 115-139
- Hillman, A. R. und Jackson, A. (2001) The problem of uniqueness of fit for viscoelastic films on thickness-shear mode resonator surfaces  
*Anal. Chem.* 73, 540-549
- Hinrichsen, E. L., Feder, J. und Torstein, J. (1986) Geometry of random sequential adsorption  
*J. Stat. Phys.* 44, 793-827
- Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Scott, K. und Elwing, H. (2001) Variation in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study  
*Anal. Chem.* 73, 5796-5804
- Höök, F., Rodahl, M., Brzezinski, P. und Kasemo, B. (1998) Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance  
*Langmuir* 14, 729-734
- Ikai, A. (1996) STM and AFM of bio/organic molecules and structures  
*Surf. Sci. Rep.* 26, 261-332
- Israelachvili, J. (1992) *Intermolecular and surface forces*  
Academic Press Inc., London
- Janke, M. (2004) Molekulare Kontrolle der Adsorption, Adhäsion und Deformation von Liposomen auf funktionalisierten Oberflächen  
Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität
- Janshoff, A. (1997) Präparation, Charakterisierung und Anwendung biofunktionalisierterter

- Goldoberflächen  
Dissertation, Westfälische Wilhelms Universität Münster
- Janshoff, A., Galla, H.-J. und Steinem, C. (2000) Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren?  
*Angew. Chem.* 112, 4164-4195
- Janshoff, A., Galla, H.-J. und Steinem, C. (2002) Quantification of the Raf-C1-interaction with solid supported membranes  
*ChemBioChem* 3, 190-197
- Johannsmann, D. (1991) Einsatz von Quarz-Resonatoren und Ellipsometrie zur visko-elastischen Charakterisierung von dünnen Schichten und Adsorbaten  
Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Johannsmann, D. (1999) Viscoelastic analysis of organic thin films on quartz resonators  
*Macromol. Chem. Phys.* 200, 501
- Johannsmann, D. (2001) Derivation of the shear compliance of thin films on quartz resonators from comparison of the frequency shifts on different harmonics: a perturbation analysis  
*J. Appl. Phys.* 89, 6356-6364
- Kastl, K., Herrig, A., Lüthgens, E., Janshoff, A. und Steinem, C. (2004) Scrutiny of annexin A1 mediated membrane-membrane interaction by means of a thickness shear mode resonator and computer simulations  
*Langmuir* 20, 7246 - 7253
- Kastl, K., Menke, M., Lüthgens, E., Faiß, S., Gerke, V., Janshoff, A. und Steinem, C. (2005) Calcium-dependent interaction of annexin A1 with solid supported membranes  
*ChemBioChem, im Druck*
- Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. und Kasemo, B. (2000) Formation of supported membranes from vesicles  
*Phys. Rev. Lett.* 84, 5443-6.
- Knuth, D. E. (2000) *The art of computer programming, Vol. 2 :Seminumerical algorithms*  
Addison-Wesley, Boston
- Kolan, A. J., Nowak, E. R. und Tkachenko, A. V. (1999) Glassy behavior of parking lot model  
*Phys. Rev. E* 59, 3094-3099
- Krapivsky, P. L. und Ben-Naim, E. (1994) Collective properties of adsorption-desorption processes  
*J. Chem. Phys.* 100, 6778-6782
- Krüger, D., Anczykowski, B. und Fuchs, H. (1997) Physical properties of dynamic force microscopy in contact and noncontact operation

- Ann. Phys.* 6, 341-363
- Künneke, S. (2003) Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörperunterstützten Lipidmembranen  
Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Landau, L. D. und Lifschitz, E. M. (1978) *Statistische Physik*  
Akademie-Verlag, Berlin
- Langmuir, I. (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum  
*J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361-1403
- Leatherbarrow, R. J. und Edwards, P. R. (1999) Analysis of molecular recognition using optical biosensors  
*Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 544-547
- Lee, C.-H., Lin, W.-C. und Wang, J. (2001) All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions  
*Phys. Rev. E* 64, 020901-1-4
- Liebau, M., Hildebrand, A. und Neubert, R. H. H. (2001) Bioadhesion of supramolecular structures at supported planar bilayers as studied by the quartz crystal microbalance  
*Eur. Biophys. J.* 30, 42-52
- Lipidat Database  
<http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>
- Lucklum, R., Behling, C., Cernosek, R. W. und Martin, S. J. (1996) Determination of complex shear modulus with thickness shear mode resonators  
*J. Phys. D* 30, 346-356
- Lucklum, R. und Hauptmann, P. (1997) Determination of polymer shear modulus with quartz crystal resonators  
*Faraday Discussions* 107, 123-140
- Lucklum, R. und Hauptmann, P. (2000) The quartz crystal microbalance: mass sensitivity, viscoelastic and acoustic amplification  
*Sensors and Actuators B* 70, 30-36
- Lucklum, R. und Hauptmann, P. (2003) Transduction mechanism of acoustic-wave based chemical and biochemical sensors  
*Meas. Sci. Technol.* 14, 1854-1864
- Lüthgens, E., Herrig, A., Kastl, K., Steinem, C., Reiss, B., Wegener, J., Pignataro, B. und Janshoff, A. (2003) Adhesion of liposomes: a quartz crystal microbalance study  
*Meas. Sci. Technol.* 14, 1865-1875

- Lüthgens, E. und Janshoff, A. (2005) Equilibrium coverage fluctuations: A new approach to quantify reversible adsorption of proteins  
*ChemPhysChem* 3, 444-448
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B., Takeshita, K., Subbarao, M. und Hu, L. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles  
*Biochim. Biophys. Acta* 1061, 297-303
- Machlup, S. (1954) Noise in semiconductors: Spectrum of a two-parameter random signal  
*J. Appl. Phys.* 25, 341-343
- Martin, S. J., Bandey, H. L., Cernosek, R. W., Hillman, A. R. und Brown, M. J. (2000) Equivalent-circuit model for the thickness-shear mode resonator with a viscoelastic film near film resonance  
*Anal. Chem.* 72, 141-149
- Mason, W. P. (1958) *Electromechanical transducers and wavefilters*  
Van Nostrand Company, Princeton
- Nomura, T. und Okuhara, M. (1982) Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic solvents  
*Anal. Chim. Acta* 142, 281-284
- Nowak, E. R., Knight, J. B., Ben-Naim, E., Jaeger, H. M. und Nagel, S. R. (1998) Density fluctuations in vibrated granular materials  
*Phys. Rev. E* 57, 1971-1982
- Parsegian, V. A. und Gingell, D. (1972) On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges  
*Biophys. J.* 12, 1192-1204
- Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H. J., Fuchs, H. und Janshoff, A. (2000) Specific adhesion of vesicles monitored by scanning force microscopy and quartz crystal microbalance  
*Biophys. J.* 78, 487-98.
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T. und Flannery, B. P. (1992) *Numerical recipes in C++ - The art of scientific computing*  
Cambridge University Press, Cambridge
- Rädler, J. und Sackmann, E. (1992) On the measurements of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy  
*Langmuir* 8, 848-853
- Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M. und Gaub, H. E. (1992) From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope  
*Science* 257, 1900-1905

- Reimhult, E., Höök, F. und Kasemo, B. (2002) Vesicle adsorption on SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>: Dependence on vesicle size  
*J. Chem. Phys.* 117, 7401-7404
- Reimhult, E., Höök, F. und Kasemo, B. (2003) Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure  
*Langmuir* 19, 1681-1691
- Reiss, B., Janshoff, A., Steinem, C., Seebach, J. und Wegener, J. (2003) Adhesion kinetics of functionalized vesicles and mammalian cells: a comparative study  
*Langmuir* 19, 1816-1823
- Reiss, H., Frisch, H. L. und Lebowitz, J. L. (1959) Statistical mechanics of rigid spheres  
*J. Chem. Phys.* 11, 369-380
- Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C. A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M. und Kasemo, B. (1997) Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion  
*Faraday Discuss.* 107, 229-246
- Rodahl, M., Höök, F. und Kasemo, B. (1996) QCM operation in liquids: An explanation of measured variations in frequency and Q-factor with liquid conductivity  
*Anal. Chem.* 68, 2219-2227
- Rodahl, M., Höök, F., Krozer, A., Brzezinski, P. und Kasemo, B. (1995) Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments  
*Rev. Sci. Instrum.* 66, 3924-3930
- Rodahl, M. und Kasemo, B. (1996) A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance  
*Rev. Sci. Instrum.* 67, 3238-3241
- Román, F. L., White, J. A. und Velasco, S. (1997) Fluctuations in the random sequential adsorption of discs and parallel squares: finite size effects at low coverages  
*J. Chem. Phys.* 106, 4196-4203
- Rosenbaum, J. F. (1988) *Bulk acoustic wave theory and devices*  
Artech House Inc., London
- Rosengarth, A., Gerke, V. und Lücke, H. (2001) X-ray structure of full-length Annexin 1 and implications for membrane aggregation  
*J. Mol. Biol.* 306, 489-498
- Rowlinson, J. S. (1963) The virial expansion in two dimensions  
*Mol. Phys.* 7, 593-594

- Ruckenstein, E. (1978) Reversible rate of adsorption or coagulation of Brownian particles - effect of shape of the interaction potential  
*J. Coll. Int. Sci.* 66, 531-543
- Sackmann, E. (1996) Supported membranes: scientific and practical applications  
*Science* 271, 43-48
- Salamon, Z., Wang, Y., Soulages, J. L., Brown, M. F. und Tollin, G. (1996) Surface plasmon resonance spectroscopy studies of membrane proteins: transducin binding and activation by rhodopsin monitored in thin membrane films  
*Biophys. J.* 71, 283-294
- Sauerbrey, G. (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung  
*Z. Phys.* 155, 206-222
- Schaaf, P. und Talbot, J. (1989a) Kinetics of random sequential adsorption  
*Phys. Rev. Lett.* 62, 175-178
- Schaaf, P. und Talbot, J. (1989b) Surface exclusion effects in adsorption processes  
*J. Chem. Phys.* 91, 4401-4409
- Schaaf, P., Voegel, J.-C. und Senger, B. (1998) Irreversible deposition/adsorption processes on solid surfaces  
*Ann. Phys. Fr.* 23, 1-89
- Schaaf, P., Wojtaszczyk, P., Mann, E. K., Senger, B., Voegel, J. und Bedeaux, D. (1995a) Fluctuation of the number of adsorbed particles analyzed by a virial expansion: Comparison between experiment and theory  
*J. Chem. Phys.* 102, 5077-5081
- Schaaf, P., Wojtaszczyk, P., Senger, B., Voegel, J. und Reiss, H. (1995b) Fluctuation of the number of particles adsorbed on surfaces under the influence of gravity  
*Phys. Rev. E* 51, 4292-4295.
- Schuck, P. (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 541-566
- Schuck, P. und Minton, A. P. (1996) Analysis of mass transport limited binding kinetics in evanescent wave biosensors  
*Anal. Biochem.* 240, 262-272
- Seifert, U. (1991) Adhesion of vesicles in two dimensions  
*Phys Rev A* 43, 6803-6814
- Seifert, U. (1997) Configurations of fluid membranes and vesicles

- Adv. Phys.* 46, 13-137
- Seifert, U. und Lipowsky, R. (1990) Adhesion of vesicles  
*Phys. Rev. A* 42, 4768-4771
- Semmler, M., Mann, E. K., J., R. und Borkovec, M. (1998) Diffusional deposition of charged latex particles on water-solid interfaces at low ionic strength  
*Langmuir* 14, 5127-5132
- Senger, B., Schaaf, P., Voegel, J., Wojtaszczyk, P. und Reiss, H. (1994) Fluctuations of the number of particles deposited on a flat surface by a random sequential adsorption mechanism  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10029-10033
- Steinem, C. (1997) Ionentransport in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten  
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität
- Stelzle, M., Weissmüller, G. und Sackmann, E. (1993) On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection  
*J. Phys. Chem.* 97, 2974-2981
- Stryer, L. (1999) *Biochemistry*  
W. H. Freeman and Co., New York
- Swendsen, R. H. (1981) Dynamics of random sequential adsorption  
*Phys. Rev. A* 24, 504-508
- Takano, H., Kenseth, J. R., Wong, S., O'Brien, J. C. und Porter, M. D. (1999) Chemical and biochemical analysis using scanning force microscopy  
*Chem. Rev.* 99, 2845-2890
- Tamm, L. K. und McConnell, H. M. (1985) Supported phospholipid bilayers  
*Biophys. J.* 47, 105-113
- v. Smoluchowski, M. (1916) Theorie der Koagulation  
*Phys. Z.* 17, 585-599
- van Kampen, N. G. (1992) *Stochastic processes in physics and chemistry*  
North-Holland, Amsterdam
- Voinova, M. V., Jonson, M. und Kasemo, B. (1997) Dynamics of viscous amphiphilic films supported by elastic solid substrates  
*J. Phys. Cond. Mat.* 9, 7799-7808
- Voinova, M. V., Jonson, M. und Kasemo, B. (2002) 'Missing mass' effect in biosensor's QCM applications  
*Biosens. Bioelectr.* 17, 835-841

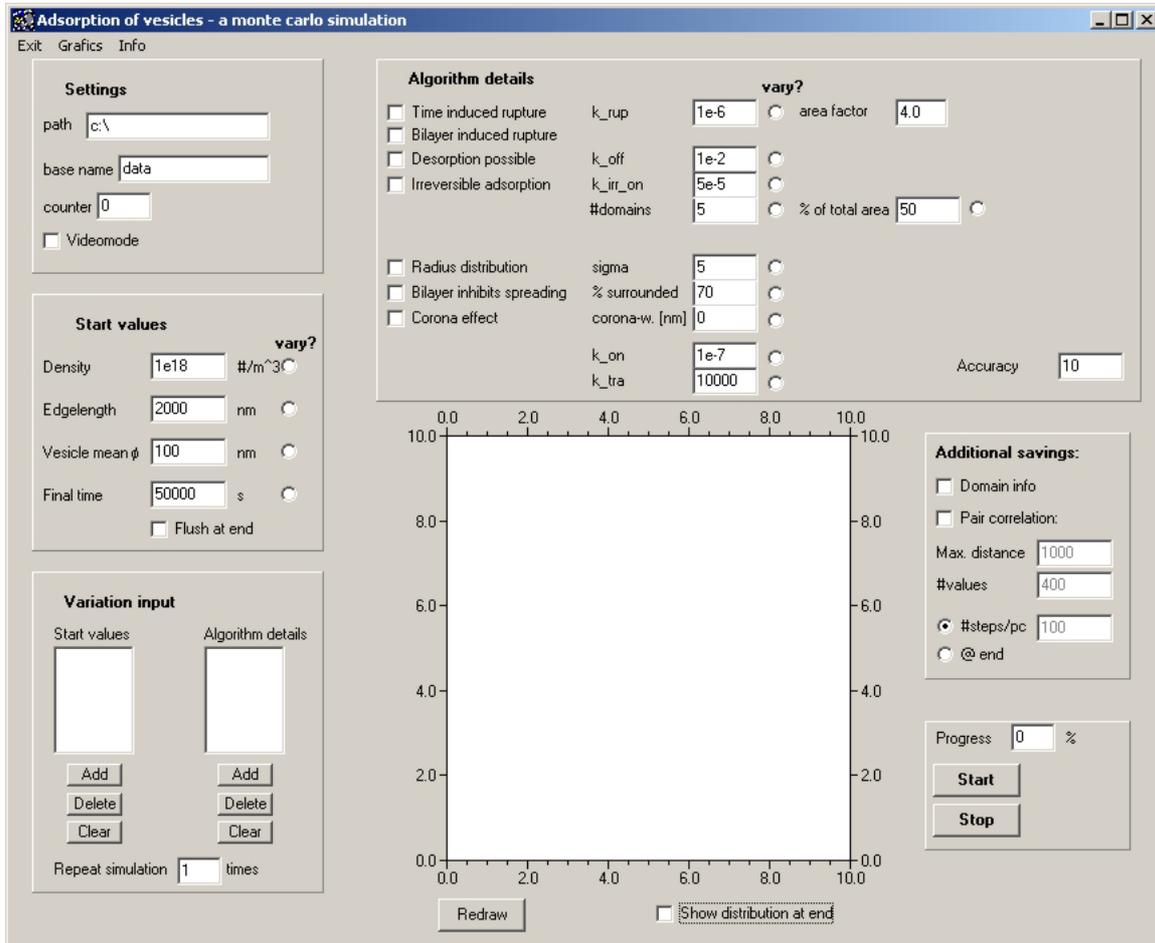
- Vojta, G. und Vojta, M. (2000) *Taschenbuch der statistischen Physik*  
Teubner, Stuttgart
- Wang, J. (1994) A fast algorithm for random sequential adsorption of discs  
*Int. J. Mod. Phys.* 5, 707-715
- Widom, B. (1963) Some topics in the theory of fluids  
*J. Chem. Phys.* 39, 2808-2812
- Wojtaszczyk, P., Mann, E. K., Senger, B., Voegel, J. C. und Schaaf, P. (1995) Statistical properties of surfaces covered by deposited particles  
*J. Chem. Phys.* 103, 8285-8295
- Xia, Y., Gates, B., Yin, Y. und Lu, Y. (2000) Monodispersed colloidal spheres: old materials with new applications  
*Adv. Mater.* 12, 693-713
- Zhdanov, V. P. und Kasemo, B. (1998) Kinetics of irreversible adsorption of deformable proteins  
*J. Chem. Phys.* 109, 6497-6501
- Zhdanov, V. P., Keller, C. A., Glasmästar, K. und Kasemo, B. (2000) Simulation of adsorption kinetics of lipid vesicles  
*J. Chem. Phys.* 112, 900-909



## 10 ANHANG

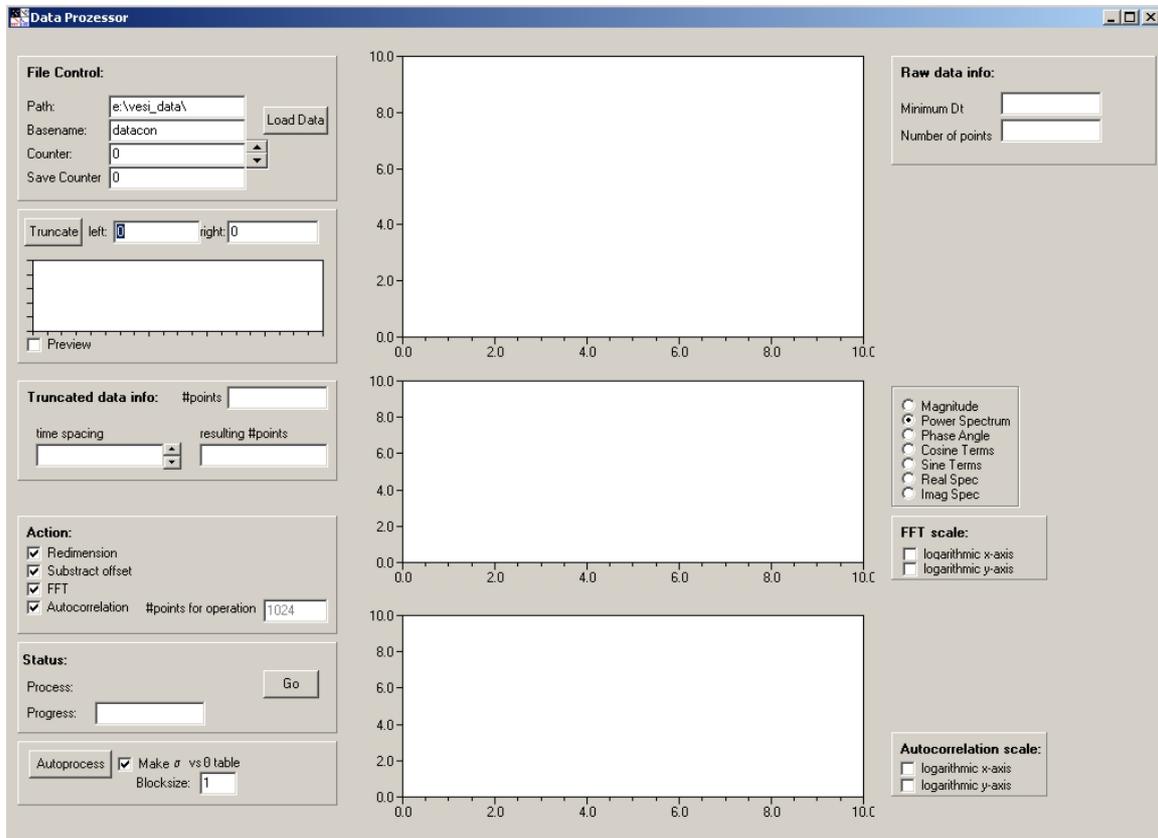
## 10.1 Benutzeroberflächen der erstellten Delphi-Programme

### 10.1.1 VESAD



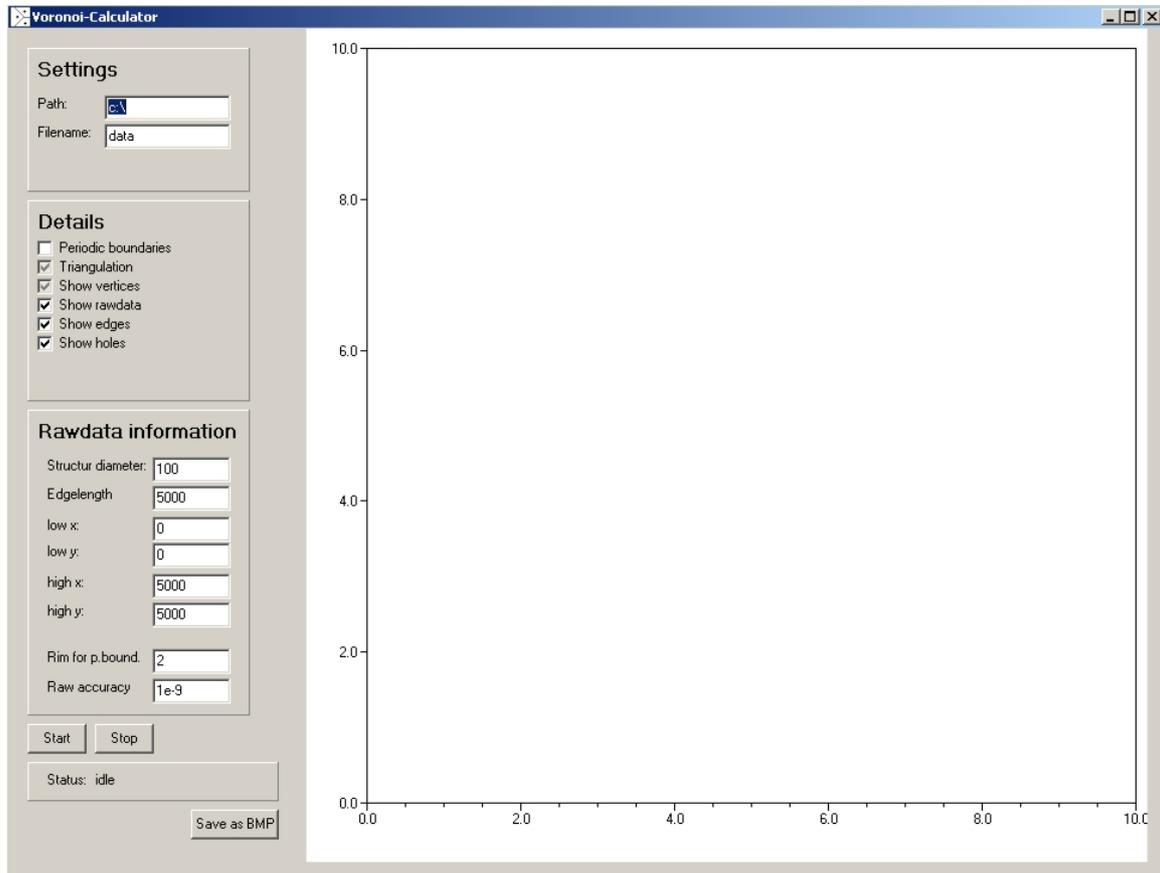
**Abb. 10.1:** GUI des Simulationsprogramms „VESAD“. Das Programm ermöglicht dynamische MC-Simulationen auf Basis eines RSA-Algorithmus nach Benutzervorgaben.

## 10.1.2 DaPro



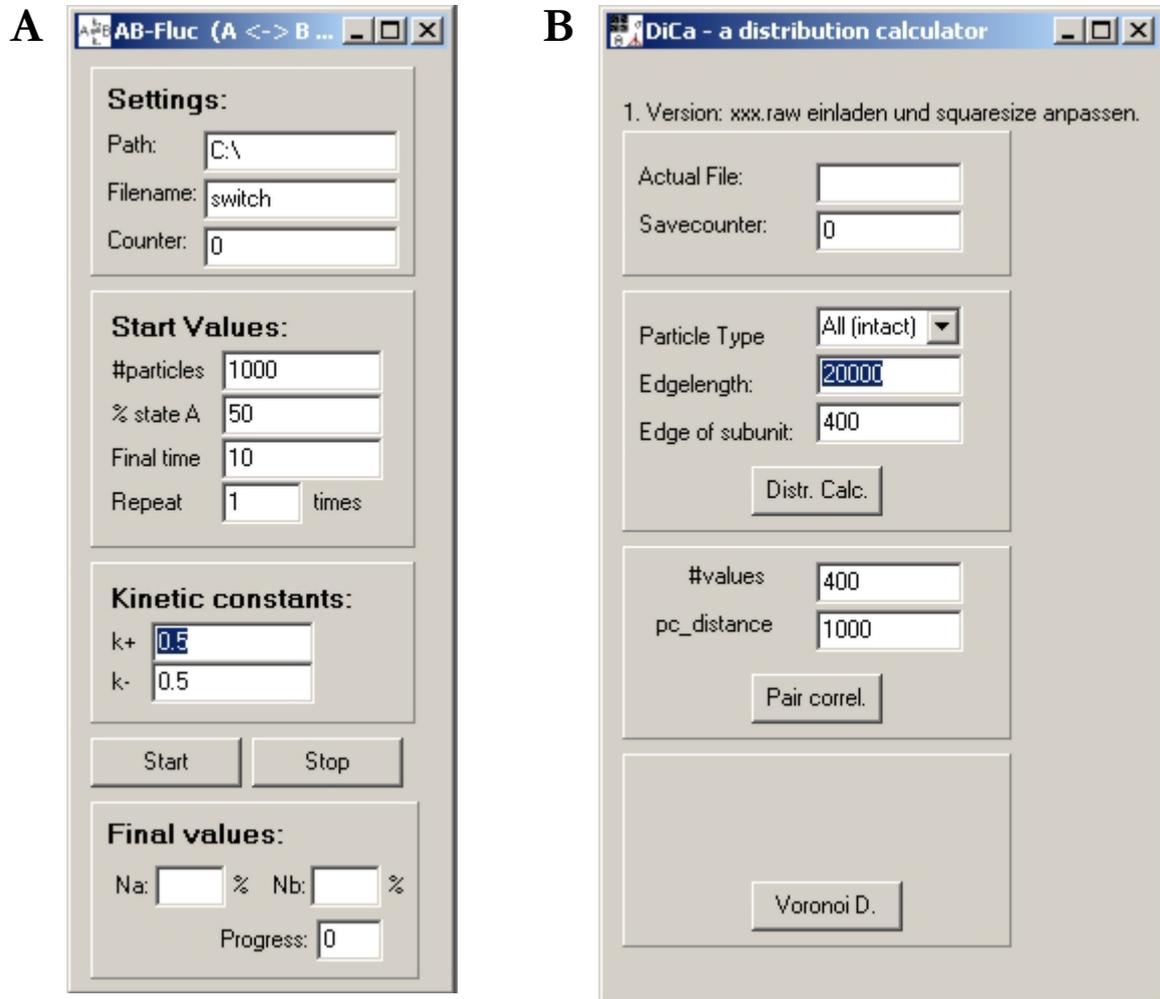
**Abb. 10.2:** GUI des Programms „DaPro“. Das Programm liefert mathematische Werkzeuge zur Auswertung von Fluktuationsdaten, wie z.B. die Berechnung der FFT und der Autokorrelationsfunktion.

### 10.1.3 Voronoi-Calculator



**Abb. 10.3:** GUI des Programms „Voronoi-Calculator“. Das Programm berechnet Voronoi-Diagramme zweispaltiger Datensätze auf Basis eines *Sweep*-Algorithmus.

## 10.1.4 DiCa und AB-Fluc



**Abb. 10.4:** GUI der Programme „AB-Fluc“ (A) und „Dica“ (B). AB-Fluc ermöglicht Simulationen der Gleichgewichtsfluktuationen einer reversibeln Reaktion mit zwei Zuständen auf Basis der FRM. DiCa ordnet Partikel, die auf einer Oberfläche verteilt sind, nach Benutzervorgaben unterschiedlichen Teilflächen zu. Zudem ermöglicht das Programm eine Berechnung der Paarkorrelationsfunktion.