

Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörperunterstützten Lipidmembranen

Eine rasterkraftmikroskopische Studie von
Lipid-Protein-Wechselwirkungen und mechanischen Parametern
von Lipiddoppelschichten

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

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

**Stephanie Künneke
geb. in Dortmund**

Mainz, 2003

Datum der mündlichen Prüfung: 30.04.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungen	x
1 Einleitung	1
2 Probensysteme	5
2.1 Membranbestandteile	6
2.1.1 Ganglioside	8
2.2 Lektine	9
2.3 Cholera Toxin B Untereinheit	11
2.4 Farbstoffe	12
3 Methoden	14
3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie	16
3.2 Grundlagen des <i>Pulsed Force Mode</i>	22

4	Realisierung des Bindungsassays	24
4.1	Künstliche Membranen	26
4.1.1	Präparation festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten	27
4.2	Softlithographie	30
4.2.1	Polydimethylsiloxan	35
4.2.2	Präparation des strukturierten Elastomers	36
4.2.3	Hydrophilisierung des PDMS	38
4.3	Präparation der Lipidkompartimente	40
4.3.1	Hydrodynamische Betrachtung	43
4.3.2	Die Wahl der geeigneten Replikatstruktur	60
4.4	Entwicklung und Validierung des Assays	65
4.4.1	Protein–Rezeptor–Bindungsstudien	77
5	Kontaktmechanik an Modellmembranen	84
5.1	Theoretische Grundlagen	85
5.2	Methodik zur Wechselwirkungsanalyse	93
5.2.1	Konventionelle Kraftspektroskopie	93
5.2.2	<i>Pulsed Force Mode</i> –Kraftkurven	98
5.2.2.1	Simulation der PFM–Kraftkurven	99
5.2.2.2	Multiparameteranalyse der PFM–Kraftkurven	108
5.3	Untersuchung der Durchbruchkräfte	113
6	Zusammenfassung	125
A	Strukturen im Silicium–Wafer	128

B Geräte und Materialien	131
Literaturverzeichnis	134

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der mikrostrukturierten Membranarrays zum Protein-Screening und zur Untersuchung der Materialeigenschaften mit dem Rasterkraftmikroskop.	2
2.1	Aufbau von Phosphoglyceriden	6
2.2	Chemische Struktur des Gangliosids G_{M1}	8
2.3	Struktur des Lektins Peanut Agglutinin	10
2.4	Pentagon der B-Untereinheiten des Cholera Toxins komplexiert mit G_{M1}	11
3.1	Wechselwirkungspotential und daraus abgeleitete Kraft als Funktion des Abstandes zwischen Messspitze und Probe.	17
3.2	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops im dynamischen Modus.	18
3.3	Schematischer Verlauf einer PFM-Kraftkurve	23
4.1	Membranmodell nach Singer und Nicolson	26
4.2	Mikroformen in Kapillaren	31
4.3	REM-Aufnahmen von polymeren Mikrostrukturen	32
4.4	Chemische Zusammensetzung von Polydimethylsiloxan (PDMS).	35

4.5	Schematische Darstellung der Erzeugung einer Gussform aus elastomerem Material von einem strukturierten Silicium-Wafer. . . .	37
4.6	Hydroxilierung und Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen zwei PDMS-Oberflächen.	38
4.7	Schematische Darstellung der Mikrostrukturierung von festkörperunterstützten Membransegmenten unterschiedlicher Komposition.	40
4.8	Schematische Abbildung des Raumhalters und Rahmens aus Edelstahl und Schemazeichnung der Struktur 3.	41
4.9	Modell für die Befüllung einer rechteckigen Kapillare mit einer Flüssigkeit aus einem Flüssigkeitstropfen	44
4.10	Abhängigkeit des Kapillardrucks von der Geometrie des Mikrokanals	47
4.11	Abhängigkeit des Kapillardrucks von dem PDMS-Kontaktwinkel θ für verschiedene Substrat-Kontaktwinkel θ' nach Gleichung 4.7.	48
4.12	Nach Gleichung 4.12 berechnetes Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit dem Seitenverhältnis 5:1 ($b = 15 \mu m, c = 3 \mu m$) (A) und dem Seitenverhältnis 1:4 ($b = 1 \mu m, c = 4 \mu m$) (B). . . .	51
4.13	Berechnetes Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit dem Seitenverhältnis 1:4 (Vergrößerung von Abbildung 4.12 B)	52
4.14	Schematische Darstellung der Laufmittelfronten in einer rechteckigen Kapillaren als Funktion der Grenzflächenspannung des Substrats	56
4.15	Profile der Flüssigkeitslauffronten bei der Verwendung von hydrophoben (A) und hydrophilen (B) PDMS-Oberflächen.	57
4.16	Stabilitätsbestimmende Abmessungen des PDMS-Stempels. . . .	61
4.17	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Texas Red-DHPE dotierten DMPC-Lipidsegmenten	65

4.18	Fluoreszenzmikroskopische Momentaufnahmen von Texas Red-DHPE-x-DMPC-Vesikeln, die sich entlang den Kapillaren der Struktur 2 bewegen	67
4.19	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der in Abbildung 4.18 beschriebenen, strukturierten Lipiddoppelschichten auf dem Glassubstrat nach dem Entfernen des PDMS-Stempels (Struktur 2)	69
4.20	Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen (<i>Contact-Mode</i> , Höhenskala 20 nm) von strukturierten DMPC-Lipiddoppelschichten (Struktur 2).	70
4.21	Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen und Höhenanalyse von strukturierten DMPC-Lipiddoppelschichten.	71
4.22	Fluoreszenzmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer Probe aus Bodipy-x-DMPC-Vesikeln	72
4.23	Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen (A-E) (<i>Contact-Mode</i> ; Höhenskala 20 nm) und AFM-Fehlersignalsbild (F) von strukturierten DMPC-Lipidsegmenten (teilweise mit G_{M1} dotiert)	73
4.24	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Bodipy-x-DMPC-Lipidsegmenten (A-C) und von Bodipy-x-DPDPC-Lipidsegmenten (D) nach der Abnahme der PDMS-Stempel	75
4.25	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier Bodipy-x-DMPC-Segmente (oberes Segment mit Rezeptor asialo- G_{M1}) vor (A,B) und nach (C) Zugabe von 0,3 μM TRITC-x-PNA.	77
4.26	Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen von Ausschnitten eines Lipidmembransegments auf einem Glassubstrat (A) vor und (B,C) nach Zugabe von 3 nM Cholera Toxin (B-Oligomer)	78

4.27	Histogramme der in Abbildung 4.26 gezeigten Topographieaufnahmen (A) vor Proteinzugabe und (B) nach der Proteinadsorption .	79
4.28	Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen (A,C) von Ausschnitten verschiedener Lipidmembransegmente auf einem Glassubstrat (A) vor und (C) nach Zugabe von 114 nM FITC-x-Cholera Toxin (B-Oligomer); die korrespondierenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden in B (vor Proteinzugabe) und D (mit Protein) dargestellt.	81
4.29	Histogramme der Intensitäten, die in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen 4.28 B und 4.28 D dargestellt werden.	82
5.1	MYD-Rechnungen für typische Oberflächenladungsdichten von Lipidmembranen	91
5.2	Schematische Darstellung der relevanten Abstandsparameter des modulierten Cantilevers über einer Probe.	94
5.3	Schematische Darstellung der modulierten Bewegung eines Cantilevers über einer Probe.	95
5.4	Instabilität bei der Kraftspektroskopie im <i>Contact-Mode</i>	95
5.5	Typischer Verlauf von Kraft-Abstands-Kurven.	96
5.6	Vergleich von gemessenen und simulierten PFM-Kraftkurven mit unterschiedlicher Anregungsamplitude.	101
5.7	Simulierte PFM-Kraftkurven und PFM-Steifigkeiten für verschiedene Frequenzen und Probensteifigkeiten	103
5.8	Simulierte Piezoauslenkung und Spitze-Probe-Abstand für zwei ausgewählte Probensysteme	104
5.9	Topographie-, Steifigkeits- und Adhäsionsmessungen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin-Mischungen mit dem PFM . .	106

5.10	Kraftkurven gemessen im konventionellen Kraft–Abstands–Modus (links) und im <i>Pulsed Force Mode</i> (rechts) auf POPS–Doppelschichten.	108
5.11	Adhäsion einer POPS–Doppelschicht als Funktion der Durchbruchlänge und der Durchbruchkraft.	110
5.12	Topographie–, Steifigkeits– und Adhäsionsmessungen auf einer POPS–Doppelschicht und Multischicht.	115
5.13	Histogramm der Adhäsionswerte, die mit der gleichen AFM–Spitze auf einer POPS–Doppelschicht (enge Schraffur) und einer bilamellaren POPS–Multischicht (weite Schraffur) gemessen wurden. . . .	116
5.14	PFM–Kraftkurven einer POPS–Doppelschicht (gefüllte Kreise) und einer bilamellaren POPS–Multischicht (Kreise).	118
5.15	Durchbruchkraft einer POPS–Doppelschicht als Funktion der Durchbruchlänge mit Histogrammanalyse.	119
5.16	Probensteifigkeit einer POPS–Doppelschicht als Funktion der Durchbruchkraft.	119
5.17	PFM–Kraftkurven gemessen auf POPS–, POPC–, DMPC–Doppelschichten und auf einer POPC–Multischicht.	121
5.18	PFM–Kraftkurve gemessen auf einer DMPC–Doppelschicht. . . .	122
A.1	Masterstruktur 1 im Silicium–Wafer	128
A.2	Masterstruktur 2 im Silicium–Wafer	129
A.3	Masterstruktur 3 im Silicium–Wafer	129
A.4	Masterstruktur 4, 4A und 4B im Silicium–Wafer	130

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der verwendeten Phospholipide	7
4.1	Berechnung für hydrophiles PDMS($\theta = 0^\circ$)	54
4.2	Berechnung für hydrophobes PDMS ($\theta = 110^\circ$)	54
4.3	Stabilitätsbestimmende Parameter der verwendeten Strukturen . .	61

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop/ Rasterkraftmikroskopie (engl.: <i>Atomic Force Microscope/ Microscopy</i>)
Bodipy	β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC
CLSM	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (engl.: <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CTB	Cholera Toxin Untereinheit (B-Oligomer) (<i>Vibrio cholerae</i>)
DMPC	1,2-Dimyristyl-phosphatidylcholin
DMPS	1,2-Dimyristyl-phosphatidylserin
DMT	Derjaguin, Muller und Toporov
DOPC	1,2-Dioleyl-phosphatidylcholin
DPDPC	1,2-Dipentadecyl-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmityl-phosphatidylcholin
DPPS	1,2-Dipalmityl-phosphatidylserin
EDL	elektrische Doppelschicht (engl.: <i>Electrical Double Layer</i>)
5-(6)-FAM	5-(6)-Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FRAP	Fluoreszenzerholung nach dem Photobleichen (engl.: <i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>)
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
JKR	Johnson, Kendall und Roberts
LB	Langmuir Blodgett
MIMIC	Mikroformen in Kapillaren (engl.: <i>Micromolding in Capillaries</i>)
MYD	Muller, Yushchenko und Derjaguin
NeuNAc	N-Acetylneuraminat (Sialinsäure)
PC	Phosphatidylcholin
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFM	<i>Pulsed Force Mode</i>
PNA	Peanut Agglutinin (<i>Arachis hypogaea</i>)
POPC	1-Palmityl-2-oleyl-phosphatidylcholin
POPS	1-Palmityl-2-oleyl-phosphatidylserin
PS	Phosphatidylserin
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	selbstorganisierende Schicht (engl.: <i>Self-Assembled Monolayer</i>)
STM	Rastertunnelmikroskop/ Rastertunnelmikroskopie (engl.: <i>Scanning Tunneling Microscope/ Microscopy</i>)
SUV	kleine unilamellare Vesikel (engl.: <i>Small Unilamellar Vesicles</i>)
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
Texas Red	Texas Red-(582/601)-DHPE
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat

Kapitel 1

Einleitung

Zellmembranen bilden die wichtigste Grenzfläche in biologischen Systemen. Eine Vielzahl von Reaktionen, zu denen z.B. molekulare Erkennungsreaktionen von löslichen Proteinen an Rezeptorlipiden zählen, laufen an dieser einzigartigen Oberfläche ab. Künstliche, festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten sind nicht nur geeignete Modellsysteme, die das Studium bestimmter Reaktionen unter definierten quasi-nativen Bedingungen erlauben, sondern ermöglichen auch den Aufbau von biosensorisch-aktiven Oberflächen mit hochgeordneten Rezeptormolekülen in einer dicht-gepackten Matrix, welche die unspezifische Adsorption von Biomolekülen effizient unterdrückt [1]. Insbesondere die Möglichkeit, native Oberflächen für das Studium und die Analytik membrangebundener Reaktionen bereitzustellen, hebt festkörperunterstützte Membranen von den heute üblichen Sensoroberflächen ab. Meist werden die Rezeptormoleküle kovalent an die sensorisch-aktive Oberfläche gekoppelt, so dass die fehlende Orientierung, die teilweise geringe Oberflächenbelegung und der hohe Grad an unspezifischer Adsorption die Analytik erschweren. Gerade im Hinblick auf analytische Anwendungen, die vom Pharmascreening bis zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von Proteinen und Peptiden reichen, ist eine schnelle und parallele Analyse auch ohne Markierung der Liganden gefragt. Da das zu

untersuchende Biomaterial meist limitiert ist, ist ein Array aus mikrostrukturierten, hochgeordneten sowie individuell adressierbaren Lipidmembransegmenten erforderlich, um vergleichbare Resultate und hohe Durchsatzraten zu gewährleisten [2]. Im Vergleich zu Proteinen und Nukleinsäuren stellt die Strukturierung von Membranen eine besondere Herausforderung dar. Laterale Beweglichkeit, hohe Empfindlichkeit bzgl. der Umgebung, und die Unlöslichkeit der Lipidmonomere in wässrigen Lösungen erschweren die selektive Immobilisierung der selbstorganisierenden Filme. Strukturierungsverfahren für Lipiddoppelschichten auf Basis von Kontaktstempelverfahren beschränken sich lediglich auf die Erzeugung einer sehr geringen Anzahl verschiedener Lipidkompositionen, zumal die einzelne Adressierung der Segmente mit diesem Verfahren nicht möglich ist [3–5].

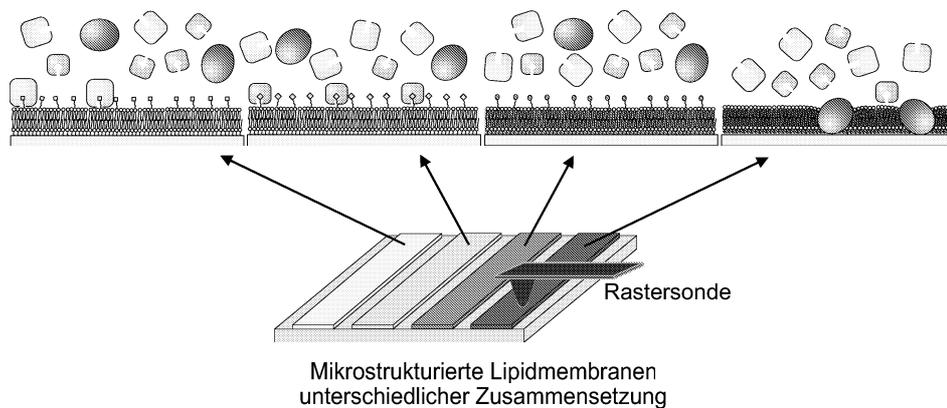


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der mikrostrukturierten Membranarrays zum Protein-Screening und zur Untersuchung der Materialeigenschaften mit dem Rasterkraftmikroskop.

Die vorliegende Arbeit beschreibt unter anderem die Realisierung eines Assays aus mikrostrukturierten und selektiv funktionalisierbaren künstlichen Membransegmenten auf einem Chip, der optischen Charakterisierungsmethoden und Ober-

flächenanalysetechniken zugänglich ist, und veranschaulicht die vielfältige Einsetzbarkeit dieses *Lab-On-A-Chip-Devices* für biosensorische Anwendungen anhand von prominenten Beispielen für spezifische Protein-Rezeptor-Interaktionen. Insbesondere die Verwendung der Rasterkraftmikroskopie zur Visualisierung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen und Materialunterschieden profitiert von einer strukturierten Oberfläche, da die direkte Vergleichbarkeit von Bio-Materialien und die parallele Analyse von Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen an verschiedenen Membranen bzw. Rezeptoren unter identischen Untersuchungsbedingungen auf engstem Raum ermöglicht wird. Die Herstellung eines Membranarrays aus festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten auf Mikrometer-Skala, das schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt ist, beruht darauf, die Vesikelspreittechnik [6] zur Herstellung künstlicher Lipidmembransegmente mit dem *Micro-Fluidic-Network*-Verfahren [7], einer Technik der Softlithographie zur Erzeugung einer Mikrofluidik, zu kombinieren. Die Mikrofluidik bezeichnet im Allgemeinen ein nach den Gesetzen der Hydrodynamik arbeitendes Fluidikelement aus Kanalnetzwerken mit Dimensionen unter 1 mm. Die Verwendung der Mikrofluidik in der biotechnologischen bzw. biomedizinischen Forschung ist besonders vorteilhaft, da das benötigte Flüssigkeitsvolumen der häufig seltenen und kostspieligen Reagenzien und Analyten in der Größenordnung von lediglich einigen Nanolitern liegt. Auch die vergleichsweise günstige Herstellung von Mikrofluidiken trägt dazu bei, dass sie ein vielfältig einsetzbares, auch für die Massenproduktion geeignetes Element für Sensorik und Analytik darstellt.

Neben dem großen Einsatzbereich des beschriebenen Multispotanalyseverfahrens zur Detektion molekularer Erkennungsreaktionen eignet es sich insbesondere für die Materialkontrastuntersuchung. Die systematische Charakterisierung elastischer, elektrostatischer und adhäsiver Probeneigenschaften kann in Kombination mit den angeführten Bindungsstudien die Funktion, sowie physikalische und chemische Eigenschaften von Biomaterialien und deren einzelnen Kompo-

zenten entschlüsseln. Das hierzu eingesetzte Rasterkraftmikroskop [8], das mit einer Krafterlösung von $< 10^{-11}$ N die Messung inter- sowie intramolekularer Wechselwirkungen erlaubt, stellt ein vielseitiges Gerät zur orts aufgelösten Analyse von Materialeigenschaften biologischer Probensysteme und zur Quantifizierung der physikalischen Größen dar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, mechanische Eigenschaften von Lipiddoppelschichten mit Hilfe einer schnellen rasterkraftmikroskopischen Technik zu untersuchen. Viele Fragestellungen richten sich heute an den Einfluss der Lipidmatrix auf die Wechselwirkung von Protein- und Membran-Membran-Interaktionen. Insbesondere Phasenseparation und Domänenbildung wird eine wichtige Rolle bei endocytotischen Prozessen zugesprochen. Eine Identifikation und Charakterisierung dieser spezialisierten Domänenstrukturen ist durch orts aufgelöste Kraftspektroskopie erstmals möglich.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Zielsetzungen verfolgt:

- Realisierung eines Bindungsassays auf der Basis biomimetischer Lipidmembranen im Mikrometer Regime.
- Verifizierung der Anwendbarkeit des Arrays aus mikrostrukturierten Membransegmenten als Biosensor. Im Vordergrund steht die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von spezifischen Protein-Lipid-Interaktionen und von Materialkontrasten.
- Korrelation und Quantifizierung elastischer Eigenschaften von festkörperunterstützten Lipidmembranen. Der Fokus liegt auf der Untersuchung des Einflusses von Lipidkopfgruppe, Kettenlänge und Lamellarität auf die Membranstabilität.

Kapitel 2

Probensysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei prominente Beispiele für Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen verwendet, um die Anwendbarkeit des Arrays aus Membransegmenten als Biosensor zu demonstrieren. Die spezifische Bindung des Lektins Peanut Agglutinin (*Arachis hypogaea*) an asialo- G_{M1} und die spezifische Bindung der B-Untereinheit des bakteriellen Toxins Cholera Toxin (*Vibrio cholerae*) an das Gangliosid G_{M1} eigneten sich aufgrund der hohen Bindungsaffinität und hohen Selektivität hervorragend für diesen Nachweis.

Außerdem wurde die Stabilität von Membranen mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert. Dabei wurden die Kopfgruppen der Lipide und die Kettenlängen systematisch variiert. Im Folgenden werden die strukturellen und chemischen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Proteine, Lipide, Sterole und Farbstoffe vorgestellt.

2.1 Struktur und Eigenschaften der verwendeten Membranbestandteile

Die Komponenten der Membranmatrix lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen, die Phospholipide, Sphingolipide und Sterole.

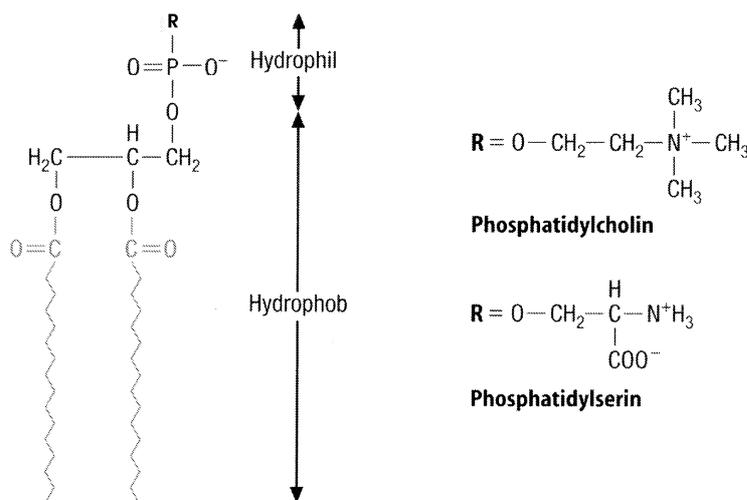


Abbildung 2.1: Aufbau von Phosphoglyceriden (aus [9]).

Abbildung 2.1 zeigt den allgemeinen Aufbau von Phosphoglyceriden und die molekulare Struktur der verwendeten Kopfgruppen Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS). Der hydrophobe Teil des Moleküls besteht aus den Fettsäureresten, die mit zwei der drei Hydroxylgruppen des Glycerins verestert sind. Die dritte Hydroxylgruppe ist mit Phosphorsäure verestert, welche in Form eines Diesters mit den als R bezeichneten Substituenten verknüpft ist. Diese sind für die hydrophilen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich [9]. Während die Phosphatidylcholin-Kopfgruppe zwitterionisch und in einem pH-Bereich von 6 bis 8 netto-ungeladen ist, weist die Phosphatidylserin-Kopfgruppe in dem gleichen pH-Bereich eine negative Nettoladung auf. Die Kettenlänge, der Sättigungsgrad der Acylketten und die Kopfgruppe bestimmen das Phasenverhalten

Lipid	Bez.	Kohlenstoffe	T_m [°C]	Gewicht [$\frac{g}{mol}$]
1,2-Dimyristyl-phosphatidylcholin	DMPC	14:0-14:0	23 [10]	678
1-Palmityl-2-oleyl-phosphatidylcholin	POPC	16:0-18:1	-2 [10]	760,1
1,2-Dioleyl-phosphatidylcholin	DOPC	18:1-18:1	-20 [10]	786,1
1,2-Dipalmityl-phosphatidylcholin	DPPC	16:0-16:0	41 [11]	734,05
1,2-Dimyristyl-phosphatidylserin	DMPS	14:0-14:0	> 35 [11]	701,85
1,2-Dipalmityl-phosphatidylserin	DPPS	16:0-16:0	> 50 [11]	757,96
1-Palmityl-2-oleyl-phosphatidylserin	POPS	16:0-18:1	> 13 [11]	784
1,2-Dipentadecyl-phosphatidylcholin	DPDPC	15:0-15:0	34 [12]	705,99

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Phospholipide.

der Lipide. Eine einkomponentige Lipiddoppelschicht befindet sich bei hohem Wassergehalt oberhalb ihrer Phasenumwandlungstemperatur T_m in der flüssig-kristallinen $L_{\alpha'}$ -Phase, in der die Lipide ungeordnete Acylketten und eine hohe Mobilität aufweisen. Unterhalb von T_m ist die Membran fest, die Fettsäureketten sind geordneter und zeigen eine geringere Mobilität ($L_{\beta'}$). Tabelle 2.1 stellt die gebräuchlichen Kurznamen, die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Fettsäureketten, die Phasenumwandlungstemperaturen [10–12] der Hauptumwandlung von der $L_{\beta'}$ -Phase in die $L_{\alpha'}$ -Phase und das Molekulargewicht der verwendeten Lipide zusammen. Die Schmelzpunkte steigen mit zunehmender Kettenlänge und zunehmendem Sättigungsgrad. So liegt z.B. die Phasenumwandlungstemperatur von 1,2-Dipalmityl-phosphatidylcholin (DPPC), das zwei gesättigte C_{16} -Ketten besitzt, bei $T = 41^\circ C$ und ist bei Raumtemperatur ($T = 25^\circ C$) im Gelzustand, während das 1,2-Dimyristyl-phosphatidylcholin (DMPC) mit zwei gesättigten C_{14} -Ketten, die in all-trans-Konformation vorliegen, eine Phasenumwandlungstemperatur von $T = 23^\circ C$ aufweist und sich so bei Raumtemperatur fluide verhält. Die Phasenumwandlungstemperaturen der PS-Systeme variieren stark je nach verwendetem Puffer. Die in der Tabelle 2.1 angegebenen Werte beziehen sich auf Messungen in EDTA-haltigen Puffern. Die Phasenumwandlungstemperaturen steigen sehr schnell, wenn ein Puffer verwendet wird, der zweiwertige Ionen, z.B. $CaCl_2$, enthält.

Sphingomyelin besitzt als alkoholische Komponente ein Sphingosingerüst, des-

sen Aminogruppe durch eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Die primäre Hydroxylgruppe ist mit Phosphorylcholin verestert [9]. Das in dieser Arbeit verwendete Sphingomyelin-Gemisch (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA) besteht aus Sphingolipiden mit unterschiedlicher Kettenlänge und unterschiedlichem Sättigungsgrad. Die Phasenumwandlungstemperatur lag zwischen $37^{\circ} C$ und $41^{\circ} C$.

Cholesterin, das aus einer Ringstruktur mit nur einer polaren Hydroxylgruppe besteht, gehört zu der Gruppe der Sterole. Es ist ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Membranen und kommt in allen tierischen Geweben vor, besonders häufig im Nervengewebe. Cholesterin reguliert die Membranfluidität. In der fluiden Phase stabilisiert es die Lipiddoppelschicht, indem es die Rotationsfreiheit benachbarter Kohlenwasserstoffketten einschränkt, während es in der Gelphase eine Störung der hochgeordneten Packung der Lipidketten darstellt.

2.1.1 Ganglioside

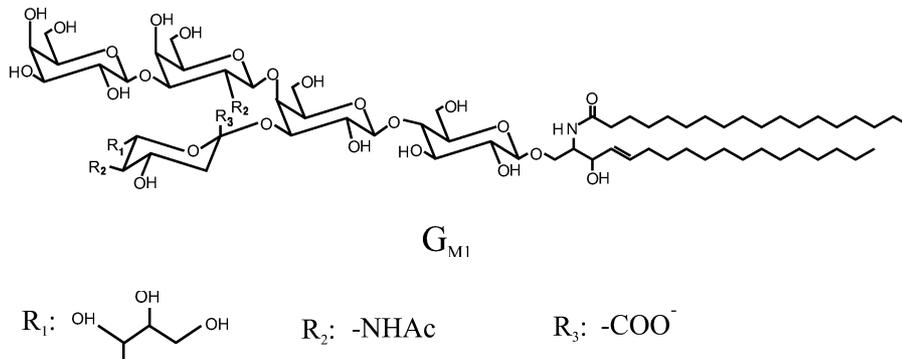


Abbildung 2.2: Chemische Struktur des Gangliosids G_{M1} .

Die in allen eukaryotischen Zellen jedoch nur auf der äußeren Seite auftretenden Ganglioside sind Sphingolipide, bei denen eine Oligosaccharidkette an das Ceramid (N-Acylsphingosin) gebunden ist. Die Saccharidkette muss mindestens

eine Sialinsäure, z.B. N-Acetylneuraminat (NeuNAc), enthalten [13]. Die einzelnen Ganglioside unterscheiden sich in ihrer Kohlenhydratzusammensetzung. Ganglioside sind bekannt für ihre Erkennungsfunktion für Viren, Hormone und bakterielle Toxine. Beispielsweise sind die Ganglioside G_{T1b} , G_{D1b} und G_{Q1b} natürliche Rezeptoren des Tetanus Toxins (*Clostridium tetani*) und G_{T1b} und G_{Q1b} für das Botulinum Toxin (*Clostridium botulinum*). Pertussis Toxin (*Bordetella pertussis*) bindet spezifisch an G_{D1a} und Cholera Toxin (*Vibrio cholerae*), das im Rahmen der eigenen Untersuchungen eingesetzt wurde, an das Gangliosid G_{M1} [14]. In Abbildung 2.2 ist die Struktur des verwendeten Gangliosids G_{M1} (Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GalNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc($\beta 1 \rightarrow 1$)-Ceramid) dargestellt. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit asialo- G_{M1} verwendet, dessen Struktur mit Ausnahme der fehlenden Sialinsäure identisch ist mit der des Gangliosids G_{M1} .

2.2 Lektine

Lektine (von lat. *legere* = auswählen) sind Proteine, die spezifisch an Mono- und Oligosaccharide binden und daher als Sonden zur Aufklärung der Struktur von Zelloberflächen und als Tumormarker eingesetzt werden können. Sie sind di- oder polyvalent, da sie zwei oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrate enthalten, die für die Agglutination von Zellen wie Erythrocyten verantwortlich sind [13]. Neben der Zellagglutination können Lektine, die in den meisten Organismen wie Viren, Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Tieren vorkommen, auch Polysaccharide oder Glycoproteine in Lösung untereinander verbrücken und so zum Ausfall dieser Moleküle führen [15]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das aus der Erdnuss isolierte Lektin Peanut Agglutinin (PNA) (*Arachis hypogaea*) verwendet, das große Bedeutung durch seinen weitläufigen Einsatz zur Identifikation von tumorspezifischen Antigenen auf eukaryotischen Zelloberflächen erhält [16]. Es besitzt ein

Molekulargewicht von 110 *kDa* und bindet spezifisch an das z.B. in dem Gangliosid G_{M1} vorkommende Disaccharid $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}$, wobei es allerdings im Gegensatz zu den anderen Vertretern dieser Lektin-Gruppe N-Acetylgalactosamin (GalNAc) allein nicht bindet [15]. Lektine aus Hülsenfrüchten weisen, wie das tetramere PNA, typischerweise zwei bis vier nahezu identische Untereinheiten von je 25–30 *kDa* auf, die alle eine Kohlenhydrat-Bindungsstelle mit der gleichen Spezifität besitzen. Es wurde kein kooperatives Zusammenwirken der Untereinheiten beobachtet. Abbildung 2.3 zeigt die von Banerjee *et al.* [17] bestimmte Struktur des Lektins Peanut Agglutinin mit einem mittleren Durchmesser von 8,3 *nm* in der Aufsicht. Da die Bindungseigenschaften von PNA an die Ganglioside G_{M1} und asialo- G_{M1} , bei dem die Sialinsäure fehlt (s. 2.1.1), intensiv untersucht wurde, eignen sich diese Protein-Rezeptor-Paare als Testsysteme, um die Anwendbarkeit des konzipierten Biosensors zu demonstrieren. Swamy *et al.* und Neurohr *et al.* fanden bei ihren Untersuchungen eine achtfach höhere Bindungskonstante bei der Bindung von PNA an asialo- G_{M1} als an G_{M1} und führten dieses Ergebnis auf den störenden Einfluss der negativen Ladung der Sialinsäure zurück. Die höhere Affinität zu asialo- G_{M1} als zu G_{M1} lässt sich dadurch erklären, dass dieser saure Zucker bei dem asialo- G_{M1} fehlt [18–21].

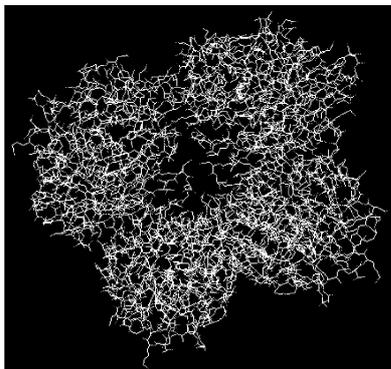


Abbildung 2.3: Struktur des Lektins Peanut Agglutinin.

2.3 Cholera Toxin B Untereinheit

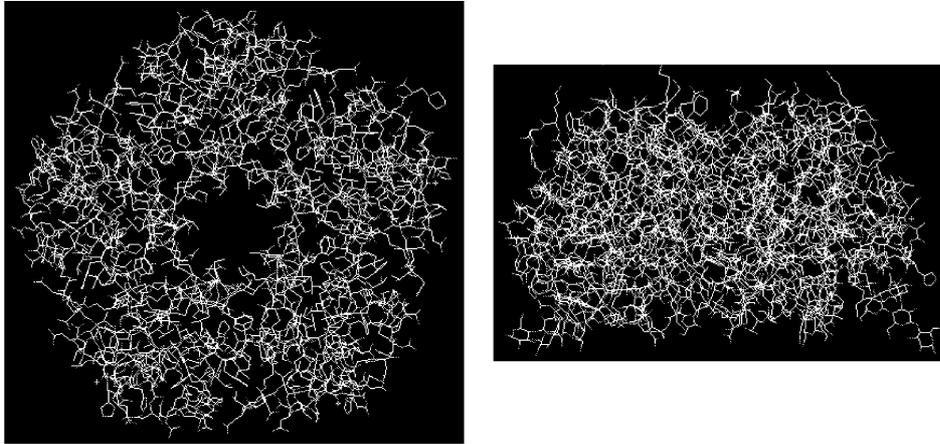


Abbildung 2.4: Pentagon der B–Untereinheiten des Cholera Toxins komplexiert mit G_{M1} ; links: Aufsicht; rechts: Seitenansicht.

Die durch den Erreger *Vibrio cholerae* hervorgerufene Krankheit Cholera, die häufig durch verunreinigte Lebensmittel bedingt wird, ist eine Erkrankung des Intestinaltraktes, die sich durch vehemente Mineral– und Flüssigkeitsverluste äußert. Das Cholera Toxin, bestehend aus fünf identischen B–Untereinheiten in pentagonaler Anordnung und einer A–Untereinheit, die sich wiederum aus den Bereichen A1 und A2 zusammensetzt, bindet spezifisch an das Gangliosid G_{M1} . Die B–Untereinheit bildet den rezeptorbindenden Teil des Proteins, während die A1–Untereinheit den enzymatisch aktiven Bereich darstellt, der nach der Bindung des Enterotoxins an die Membran von der Untereinheit A2 abgespalten wird und in die Zelle eindringt. Merritt *et al.* [22] geben einen weitreichenden Überblick über die chemischen Eigenschaften der Bindung zwischen der B–Untereinheit und dem Gangliosid G_{M1} . Die linke Abbildung 2.4 zeigt die Aufsicht auf das Pentamer der B–Untereinheiten, die jeweils mit den Pentasacchariden des Gangliosids G_{M1} komplexiert sind und ein charakteristisches Loch in der Mitte bilden. Die rechte Abbildung ist die Seitenansicht. Die Daten wurden röntgendiffraktome-

trisch von E.A. Merritt *et al.* bestimmt [22]. Die Untereinheit weist bei einem Molekulargewicht von 55 *kDa* einen mittleren Durchmesser von 6,2 *nm* und eine mittlere Höhe von 3,5 *nm* auf. Die spezifische Bindung des Cholera Toxins an das Gangliosid G_{M1} eignet sich besonders gut zur Demonstration der spezifischen Protein-Rezeptorwechselwirkung, da sie bereits ausgiebig mit verschiedenen Charakterisierungsmethoden (TEM [23], AFM [24], CLSM [14], FRAP [25]) untersucht wurde und ausreichend Ergebnisse vorliegen, um verlässliche Aussagen bezüglich der biosensorischen Anwendbarkeit des entwickelten Bindungsassays treffen zu können. Die Cholera Toxin- G_{M1} -Erkennungsreaktion wird auch von anderen Arbeitsgruppen zur Demonstration alternativer Konzepte für Biosensoren, z.B. als Fluoreszenzimmunoassay, verwendet [14, 26, 27].

2.4 Farbstoffe

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Lipidfilme in dem gewünschten Molverhältnis mit Phospholipiden dotiert, deren Acylketten Fluorophore enthielten. Je nach Wellenlängenbereich wurde wahlweise 2-(4,4-Difluor-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecyl)-1-hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC)(Bodipy) (Molecular Probes, USA) oder Texas Red 1,2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammonium Salz (Texas Red-(582/601)-DHPE) (Texas Red) (Molecular Probes, USA) eingesetzt. Die Werte 500/510 bzw. 582/601 bezeichnen die Maxima des Anregungs- bzw. Emissionsspektrums in *nm*, gemessen in Methanol. Das Spektrum der Fluorophore kann nach der Inkorporation in die Membran durchaus davon abweichen. Das unpolare β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC ist gut für die Anregung mit der 488 *nm*-Linie eines Argon-Ionen-Lasers geeignet und besitzt eine hohe Photostabilität und eine hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute von 0,9 (nach Herstellerangaben) in fluiden

Lipiddoppelschichten. Die Kombination der Farbstoffe Bodipy und Texas Red, das im grünen Wellenlängenbereich absorbiert und im roten Wellenlängenbereich emittiert, bietet hier die Möglichkeit, die Fluoreszenzinformation unterschiedlich markierter Lipide und Proteine in einem Experiment durch die Verwendung entsprechender Filtersätze getrennt zu detektieren. Dabei muss der Energie-transfer von Bodipy- zu Texas-Red-Farbstoffmolekülen berücksichtigt werden. Die verwendeten Proteine sind mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) oder Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC) gelabelt, deren Absorptions- bzw. Emissionsmaxima bei 494/519 nm (FITC) und 543/571 nm (TRITC) liegen.

Für die Untersuchung des hydrodynamischen Flusses in der Mikrokapillaren wurde der wasserlösliche Farbstoff 5-(6)-Carboxyfluorescein (5-(6)-FAM) (Molecular Probes, USA) verwendet, der ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum von 517 nm bei $pH = 9$ zeigt, und daher ebenso wie Bodipy und FITC geeignet für die Anregung mit der 488 nm-Linie eines Argon-Ionen-Lasers und die Verwendung des FITC-Filtersatzes ist.

Kapitel 3

Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lipidsysteme wurden optisch und rasterkraftmikroskopisch charakterisiert. Die Messungen der Fluoreszenzintensitäten wurden mit den konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen Bio-Rad MRC 600 (Bio-Rad, München, Deutschland) und einem Leica DM IRE2 (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) durchgeführt. Für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen standen die Systeme Dimension 3100 mit Pulsed Force Box (WITec GmbH, Ulm, Deutschland) und Nanoscope IIIa+A/D Controller und ein Bioscope mit Nanoscope IIIa Controller (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) zur Verfügung. Grundsätzlich werden mit den beiden abbildenden Charakterisierungstechniken unterschiedliche Ziele verfolgt, die sich durchaus gut ergänzen. Sie werden im Folgenden kurz aufgeführt. Das konfokale Laser-Raster-Mikroskop bietet die Möglichkeit, ein zentimetergroßes Areal der Probe in einer Messung zu untersuchen und optische z-Schnitte der Probe anzufertigen. Ein Vorteil besteht darin, dass das konfokale Laser-Raster-Mikroskop, von den Bleichvorgängen der Fluorophore abgesehen, zerstörungsfrei arbeitet, während man bei der Rasterkraftmikroskopie auf den direkten Kontakt der Rastersonde mit den Lipidmolekülen angewiesen ist. Das Rasterkraftmikroskop (AFM) ermöglicht die Messung von Topographiekontrasten mit molekularer Auflösung und bietet die Möglich-

keit, die Adsorption einzelner Proteine an Rezeptoren visualisieren zu können, während die zur Verfügung stehenden konfokalen Mikroskope lediglich integrale Informationen über die Wechselwirkung der Liganden mit den membranständigen Rezeptoren liefern. Außerdem müssen die Proben für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit entsprechenden Farbstoffen dotiert werden, worauf bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung verzichtet werden kann. Adhäsive Eigenschaften und mechanische Eigenschaften wie z.B. elastische Deformation oder Steifigkeit können mit dem Rasterkraftmikroskop detektiert werden. Ein weiterer Vorteil des AFMs im Hinblick auf die Untersuchung von Lipidmembranen ist die Möglichkeit, aus der Höheninformation mit Auflösung im Å-Bereich sicherzustellen, dass planare Lipiddoppelschichten vorliegen, während die optische Untersuchung nur wenige Informationen über die Fusion der Vesikel auf dem Substrat gibt. Aus der alleinigen Messung der Fluoreszenz kann häufig nicht beurteilt werden, ob Lipiddoppelschichten, Multischichten oder Vesikelanhäufungen vorliegen (s. Kapitel 4.4).

3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie

Das 1986 von Binnig, Quate und Gerber [8] vorgestellte Rasterkraftmikroskop (AFM) gehört zu einer Familie von Rastersondenmikroskopen, deren Entwicklung aus der Rastertunnelmikroskopie¹ (STM) hervorging. Das Messprinzip des Rasterkraftmikroskops beruht darauf, dass die in xy -Richtung über die Probe gerasterte Messspitze mit dieser in Wechselwirkung tritt und eine Biegung des mit ihr verbundenen Federbalkens (engl.: *Cantilever*) bewirkt. Diese Auslenkung wird detektiert und kann dann zusammen mit dem Raster zur Erzeugung von Abbildungen genutzt werden. Typischerweise betragen die Federkonstanten der Cantilever, die häufig aus Silicium oder Siliciumnitrid bestehen, $0,01 \frac{N}{m}$ bis $1 \frac{N}{m}$. Die Spitzenradien variieren von ca. 2 nm bis 100 nm . In den meisten Betriebsmodi wird ein Rückkopplungsmechanismus verwendet, um den jeweiligen Regelparameter bei der Abbildung der Probe konstant zu halten. So wird z.B. im *Contact-Mode* im *Constant Force*-Betrieb auf einen konstanten Wert der Kraft geregelt, während beim *Intermittent-Contact-Mode* meist die Amplitude bzw. Phase konstant gehalten wird. Zur Detektion der Cantileverauslenkung werden verschiedenste Techniken eingesetzt, wie die Interferometrie, die Piezoelektrizität, die Piezoresistivität, die Messung des Tunnelstroms oder die Veränderung der Kapazität. Die populärste, weil kommerzialisierte Detektionsmethode verwendet die Ablenkung eines Lichtstrahls auf der Rückseite des Cantilevers zur Auslenkungsbestimmung. Mit Hilfe des Lichtzeigerprinzips und einer positionsempfindlichen Photodiode lassen sich neben dem Fehlersignal auch laterale Verbiegungen des Federbalkens messen, aus denen die Reibung, die sich in der Torsion des Cantilevers äußert, analysiert werden kann.

Während sich die Messspitze im *Contact-Mode* im ständigen repulsiven Kontakt mit der Probe befindet und in diesem Modus die quasistatische Auslenkung des

¹Binnig und Rohrer wurden 1986 für die Erfindung des Rastertunnelmikroskops mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet.

die entsprechenden Messbereiche. Die Abbildung zeigt die typischen Verläufe des Wechselwirkungspotentials $V(z)$ und der daraus berechneten Kraft $F(z) = -\frac{dV}{dz}$ als Funktion des Spitze–Probe–Abstands z und verdeutlicht, dass sich der Cantilever im *Contact-Mode* im quasistatischen, repulsiven Bereich des Potentials befindet, während er im *Non-Contact-Mode* mit geringer Amplitude ($< 10 \text{ nm}$) im attraktiven Potentialbereich oszilliert. Im *Intermittent-Contact-Mode* durchläuft der Cantilever in einem Oszillationszyklus attraktive und repulsive Bereiche des Wechselwirkungspotentials.

Der allgemeine Aufbau eines Rasterkraftmikroskops mit Lichtzeigerprinzip im

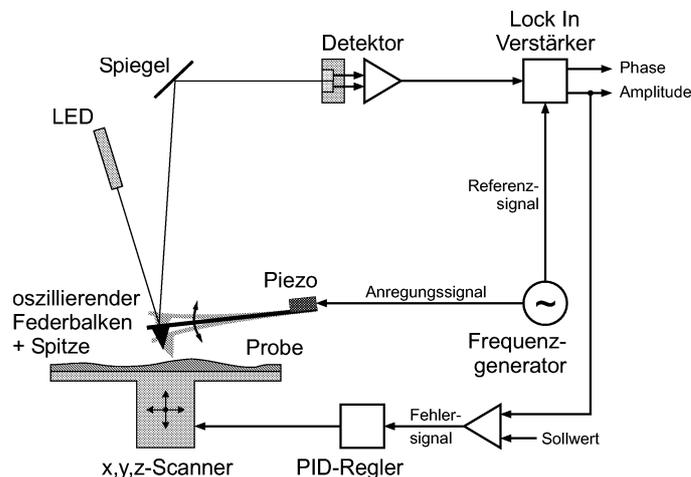


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops im dynamischen Modus.

dynamischen Modus wird anhand von Abbildung 3.2 veranschaulicht. Der Lichtstrahl einer Laserdiode wird an der Oberseite des Cantilevers reflektiert, der von einem Frequenzgenerator über ein piezoelektrisches Stellglied (Piezo) zur Schwingung angeregt wird. Der Detektor (hier: Vierquadrantendiode) registriert die mit der momentanen Auslenkung des Cantilevers korrelierte Position des reflektierten Lichtstrahls und gibt dieses Detektionssignal an einen Lock-In-Verstärker weiter, mit dem die relative Änderung der Amplitude und Phase zum Anregungssignal

bestimmt wird. Während in dem in Abbildung 3.2 dargestellten Aufbau die Probe über eine xyz-Rasterelektronik bewegt wird, kommt es häufig vor, dass der Messkopf, bestehend aus Cantilever und Anregungspiezo, gerastert wird. Grundsätzlich kann mit dem Rasterkraftmikroskop seit der Einführung der Frequenzmodulationstechnik [29] routinemäßig atomare Auflösung [30] bei der Messung im Ultrahochvakuum erzielt werden. Die Auflösung bei einer AFM-Messung an Luft oder in Flüssigkeiten ist jedoch deutlich geringer.

Da die meisten, im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Topographiebilder im *Intermittent-Contact-Mode* und ausschließlich in Flüssigkeiten aufgenommen wurden, soll dieser Modus ausführlicher beschrieben werden. Der Cantilever wird in diesem Betriebsmodus durch eine z -Modulation des Piezos nahe der Eigenfrequenz des Systems im Bereich von 3–20 kHz (in Flüssigkeiten) angeregt und oszilliert typischerweise mit einer Amplitude von $A = 10–100\text{ nm}$. Bei kleinen Auslenkungen kann das Gesamtsystem durch das Modell eines angeregten, gedämpften harmonischen Oszillators mit der effektiven Federkonstante k_{eff} und der effektiven Masse m_{eff} beschrieben werden. Die Wechselwirkung mit der Probe führt zur Verschiebung der Resonanzfrequenz ω_{res} des dynamischen Gesamtsystems, wobei ein positiver Kraftgradient ($dF_z/dz > 0$) durch die Abnahme der effektiven Federkonstante zur Verringerung der Resonanzfrequenz ω_{res} führt und entsprechend ein negativer Kraftgradient ($dF_z/dz < 0$) die Resonanzfrequenz ω_{res} erhöht. Für die Phasenverschiebung im Bereich der netto-attraktiven Wechselwirkung gilt $\phi < 90^\circ$, im Bereich der repulsiven Wechselwirkung gilt $\phi > 90^\circ$ [31]. Wegen der nichtlinearen Anteile der Wechselwirkungskräfte können die Bewegungsgleichungen im *Intermittent-Contact-Mode* aufgrund der relativ hohen Schwingungsamplituden nur numerisch gelöst werden [32, 33]. Die von Anczykowski [31] durchgeführten Simulationsrechnungen zeigten, dass beim Übergang von der netto-attraktiven zur repulsiven Wechselwirkung der Betrag der Kraft stark zunimmt. Um biologische Proben weitgehend zerstörungsfrei abbilden zu können, sollte das Gesamtsystem folglich möglichst im netto-attraktiven Wechselwirkungsbereich

arbeiten, da hier die von der Messspitze auf die Probe ausgeübten Kräfte minimiert werden [31]. Für eine ausführliche Darstellung der explizit auftretenden Spitze–Probe–Wechselwirkungen und ihrer experimentellen Untersuchung durch die Kraftspektroskopie³ sei an dieser Stelle auf Kapitel 5 verwiesen.

Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über die Verwendung des Rasterkraftmikroskops zur Untersuchung von Biomaterialien anhand von Literaturbeispielen. Das Rasterkraftmikroskop ist ein vielseitiges und häufig eingesetztes Werkzeug in der Biotechnologie geworden, um Fragen mit biologischen, biochemischen bzw. biophysikalischen oder medizinischen Hintergründen aufzuklären. Das von V.J. Morris , A.R. Kirby und A.P. Gunning veröffentlichte Buch „*Atomic Force Microscopy for Biologists*“ [34] und die Übersichtsartikel von Takano *et al.* [35], Ikai [36], Dufrene *et al.* [37] und Radmacher *et al.* [38] geben einen sehr guten Überblick über die weitreichenden Einsatzmöglichkeiten des AFMs auf diesen Gebieten. Hier seien nur einige Beispiele der zahlreichen *in situ* oder *in vivo* Untersuchungen an Biomolekülen aufgeführt. Proteine, DNA [39] und native und artifizielle Biomembranen [40, 41] können mit molekularer Auflösung unter quasi–physiologischen Bedingungen (wässrige Umgebung, Raumtemperatur) abgebildet werden. Auch die mechanischen Eigenschaften der biologischen Proben und die Interaktionen der Moleküle untereinander, wie Enzymaktivitäten [42] oder Antikörper–Antigen–Wechselwirkungen [43], können mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht werden. Die Kraftspektroskopie an Biomolekülen [44] dient der Erforschung intermolekularer sowie intramolekularer Wechselwirkungen wie z.B. der strukturellen Aufklärung von Proteinfaltungen. Speziell bei der Untersuchung festkörperunterstützter Lipidmembranen hat sich das AFM als bewährtes Instrument erwiesen, um neben der Morphologie der Lipiddoppelschichten [45–49] auch Domänenformationen [50–52], mechanische Eigenschaften [53–55] und die

³Bei der Kraftspektroskopie wird zur Analyse der Spitze–Probe–Wechselwirkungskräfte die Auslenkung des Cantilevers als Funktion der Piezobewegung gemessen. Dieser Modus wird ausführlich in Abschnitt 5.2.1 beschrieben.

Organisation von Rezeptoren in einer Lipidmembran [56–58] aufzuklären. Auch der Spreitprozess von Lipidvesikeln auf festen Substraten [59–62] wurde rasterkraftmikroskopisch charakterisiert. Zudem werden molekulare Protein–Rezeptor–Erkennungsreaktionen [24, 63–66] und Konformationsänderungen mit dem Kraftmikroskop untersucht, da die Bindungsspezifitäten und Funktionen der Proteine auf molekularer Ebene ohne vorhergehende Denaturierung bestimmt werden können.

3.2 Grundlagen des *Pulsed Force Mode*

Die Pulsed Force Box [67–70] erlaubt als Erweiterungsmodul des Rasterkraftmikroskops die Messung elastischer, elektrostatischer und adhäsiver Probeneigenschaften im *Intermittent-Contact-Mode* und profitiert so von den Vorteilen der dynamischen Modi, die durch die kurze Kontaktzeit $t_{contact}$ (Pulsed Force Modus: $t_{contact} \approx 10 \mu s$, quasistatische Kraftspektroskopie: $t_{contact} > 10 ms$ [71]) und die Minimierung der lateral wirkenden Kräfte zur Abbildung biologischer Proben ausgesprochen geeignet sind.

Die Elektronik der Pulsed Force Box erzeugt eine sinusförmige Modulation des z-Piezos im Frequenzbereich von $100 Hz$ bis $2 kHz$ und somit eine nichtresonante Schwingung der Messspitze mit einer Amplitude von $A = 5 - 500 nm$. Der über die Probe gerasterte Cantilever führt an jedem Punkt eine vollständige Kraft-Abstands-Kurve aus. Abbildung 3.3 zeigt schematisch die Kraft (durchgezogene Linie), die auf den Cantilever wirkt und sich beim Heranführen an die Oberfläche und beim Zurückziehen nach dem Kontakt mit der Probe in der Auslenkung des Federbalkens äußert. Die unterbrochene Linie gibt die Modulationsspannung des Piezos an. Solange während der Annäherung keine Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe zur Auslenkung des Cantilevers führt, und die Dämpfung zu vernachlässigen ist, zeigt die Kraftkurve einen horizontalen Verlauf (Basislinie, engl.: *Baseline*). Im Bereich der attraktiven Wechselwirkung schnellt die Messspitze auf die Probe („*Snap On*“), sobald der Kraftgradient der Wechselwirkung größer als die Federkonstante k_c des Cantilevers wird, und erfährt bei der weiteren Annäherung des Piezos an die Probe im Bereich der repulsiven Wechselwirkung (Kontaktbereich) eine Durchbiegung bis die Kraft am Regel-punkt (F_{max}) erreicht ist, die durch den gewählten Arbeitspunkt (engl.: *Setpoint*) vorgeben wird. Bewegt sich der Piezo von der Probe weg, gelangt die Messspitze vom repulsiven in den attraktiven Wechselwirkungsbereich und verliert schließlich den Kontakt zur Probe, wenn die rücktreibenden Kräfte die Adhäsionskraft

überwiegen. Die anschließende freie Oszillation des Cantilevers wird durch die Luft gedämpft bis der horizontale Verlauf bei entsprechender Entfernung zwischen Spitze und Probe erreicht ist. Bei der Messung in wässriger Lösung wird die abklingende Oszillation aufgrund der hohen Dämpfung durch das Medium nicht beobachtet. Durch geeignete Wahl der Triggerpositionen können aus der Kraftkurve gemessen im *Pulsed Force Mode* (PFM) an jedem Punkt der gestarteten Probe materialspezifische Parameter der Probe extrahiert und zusätzlich zu der Aufnahme der Topographie zu einem Bild verarbeitet werden. Zum Einstellen der Triggerpositionen wird das Auslenkungssignal auf einem Oszilloskop abgebildet.

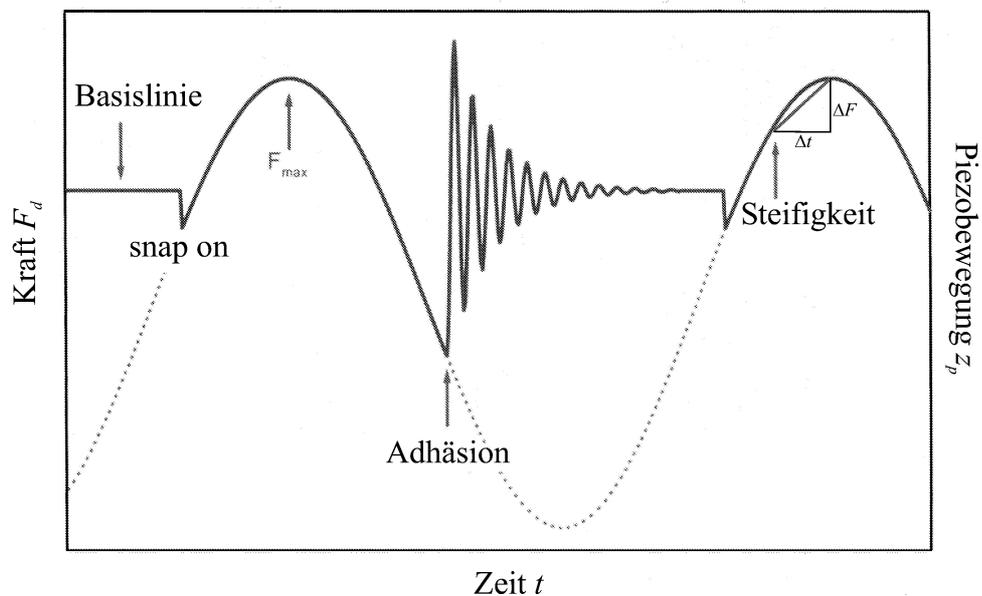


Abbildung 3.3: Schematischer Verlauf einer PFM-Kraftkurve. Die durchgezogene Linie zeigt die Auslenkung des Federbalkens beim Annähern an die Probe und beim Zurückziehen der Spitze von der Probe. Die unterbrochene Kurve gibt die Spannung an, mit der der Piezo moduliert wird.

Kapitel 4

Realisierung eines Bindungsassays auf der Basis biomimetischer Lipidmembranen

In diesem Kapitel wird zunächst das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren beschrieben, selektiv funktionalisierte Lipiddoppelschichtsegmente zu erzeugen. Diese Strukturierungstechnik stellt eine Kombination der beiden Methoden der Vesikelspreittechnik und der Softlithographie dar, die zunächst einzeln vorgestellt werden. Ausgehend von der Beschreibung der künstlichen biologischen Membran wird zunächst die Präparationsmethode zur Erzeugung einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht erläutert. Nach der Zusammenstellung der präparativen Einzelheiten, der Einsatzmöglichkeiten und Grenzen der softlithographischen Strukturierungsmethode, die auch einen Überblick über den derzeitigen Stand der Forschung bezüglich der Strukturierung von Biomaterialien umfasst, wird schließlich eingehend erläutert, wie sich aus der Kombination dieser Techniken ein elegantes Verfahren ableiten lässt, mikrostrukturierte Membransegmente zu erzeugen. Anschließend werden unter Berücksichtigung des hydrodynamischen Flusses in einer rechteckigen Mikrokavität und der

Stabilitätskriterien des Stempels Auswahlkriterien bezüglich der Geometrie und des Designs zusammengestellt, die der eigenen Entwicklung neuer Masterstrukturen zugrunde lagen. Anschließend werden die mit dem Bindungsassay durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen und rasterkraftmikroskopischen Protein-Rezeptor-Bindungsstudien vorgestellt.

4.1 Künstliche Membranen

Die Grundstruktur aller zellulären und intrazellulären Membranen ist die Lipiddoppelschicht mit membranassoziierten Steroiden, Proteinen und Kohlenhydraten. In der Doppelschicht richten sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der amphiphilen Lipide zueinander aus, während die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase weisen. Die in natürlichen Membranen hauptsächlich auftretenden Lipidkomponenten sind die Phosphoglyceride mit den Kopfgruppen Cholin, Serin, Ethanolamin, Glycerol und Inositol, sowie Sphingolipide, hier besonders Sphingomyelin, sowie Cerebroside, Sulfatide und Ganglioside. Singer und Nicolson entwickelten ein Modell für den Aufbau einer biologischen Membran, schematisch dargestellt in Abbildung 4.1, das die Membran als zweidimensionale Flüssigkeit beschreibt [13]. Diese besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus Phosphoglyceriden und Sphingolipiden, die von Integralproteinen durchspannt wird und periphere Proteine nur an einer Seite der Membran angelagert sind. Die Kohlenhydratseitenketten der Glycoproteine befinden sich immer auf der extrazellulären Seite der Membran.

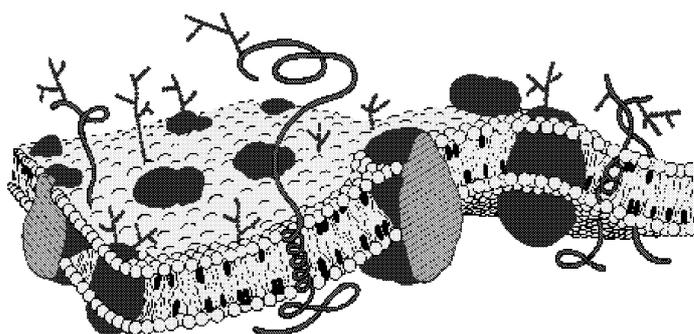


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Membranmodells nach Singer und Nicolson.

Die Funktionen und Eigenschaften der einzelnen Komponenten, wie z.B. Trans-

port, Signaltransduktion, Zell-Zell-Kontakt, Abwehr, Membranstabilisierung und Elastizität sind vielfältig, aber leider auch weitgehend ungeklärt. Da jedoch die native Zellmembran, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Lipide aufgebaut ist und deren Proteingehalt je nach Zelltyp zwischen 20 % und 80 % variiert [9], ein hoch komplexes System darstellt, ist es sinnvoll, die Funktionen und Eigenschaften der Einzelkomponenten an künstlich hergestellten Membranen zu studieren, die aus einer reduzierten Anzahl an Membranbestandteilen bestehen. Häufig verwendet werden festkörperunterstützte Modellmembranen [2], die bei geringem präparativen Aufwand den Vorteil bieten, dass die laterale Mobilität der Membranbestandteile gewährleistet ist und hochorientiert in die Lipiddoppelschicht inkorporierte Rezeptoren in einer quasi-natürlichen Umgebung untersucht werden können.

4.1.1 Präparation festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten

Die prominenten Methoden zur Präparation festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten sind die Langmuir-Blodgett-Technik (LB), die damit verwandte Langmuir-Schäfer-Technik und die Vesikelspreittechnik, die übersichtlich z.B. von McConnell *et al* [72] beschrieben werden. Bei der ersten Methode wird zunächst ein an der Luft-Wasser-Grenzfläche eines Langmuir-Trogs gespreiteter Lipidmonolayer auf einem hydrophilen Substrat deponiert und anschließend durch Übertrag einer zweiten Monoschicht eine Lipiddoppelschicht auf dem Substrat erzeugt. Vorteilhaft ist, dass große Bereiche des Substrates mit der Membran bedeckt werden können, Lipidkompositionen verwendet werden können, die als Vesikel aus thermodynamischen Gründen nicht spreiten können, und dass im Vergleich zur Vesikelspreittechnik meist eine geringe Defektdichte in der Doppelschicht auftritt. Leider kann bei der ersten übertragenen Monoschicht kein Lipid in der fluiden Phase verwendet werden. Außerdem ist die Kooperativität

der beiden Monoschichten bei diesem Verfahren nicht gewährleistet. Im Hinblick auf die Strukturierung der Membran eignet sich dieses Präparationsverfahren lediglich zur Herstellung mikrostrukturierter Doppelschichtsegmente z.B. durch Mikrokontaktdruckverfahren (vgl. Abschnitt 4.2), die jedoch nicht selektiv funktionalisierbar sind. Die Vesikelspreittechnik [73, 74], bei der die Liposomen durch Adhäsion an einer festen Oberfläche aufplatzen, lässt sich zur Herstellung einzeln adressierbarer, mikrostrukturierter Lipidsegmente einsetzen und wird im Folgenden näher beschrieben.

Zur Präparation planarer, mit Rezeptormolekülen dotierter Lipiddoppelschichten durch das Spreiten von Vesikeln auf einem festen Substrat werden zunächst die in einem Chloroform–Methanol–Gemisch (1:1, ν/ν) gelösten Lipide, die teilweise Rezeptormoleküle und Fluorophore tragen, in dem gewünschten molaren Verhältnis in einem Reagenzglas gemischt. Im Stickstoffstrom oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids wird das Lösungsmittel verblasen. Auch die nachfolgenden Präparationsschritte werden oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der höchstschmelzenden Lipidkomponente durchgeführt. Der Lipidfilm wird für weitere 3 h im Vakuumwärmeschrank getrocknet und anschließend in dem gewünschten Puffer aufgenommen, so dass eine Lipidkonzentration von $1 \frac{mg}{ml}$ bis $2 \frac{mg}{ml}$ resultiert. Während der anschließenden 15-minütigen Inkubation im Wärmebad, wobei jeweils nach 5 min für 30 s mit einem Vortexer geschüttelt wird, löst sich der Lipidfilm im Puffer und bildet multilamellare Vesikel (MLVs). Um unilamellare Vesikel (SUVs) zu erhalten, wird die Suspension in einem Extruder (LiposoFast, Avestin, Kanada) insgesamt 31 mal durch eine Polycarbonatmembran gedrückt. Die mittlere Porengröße der Membran beträgt 50 nm für die Präparation der strukturierten Lipiddoppelschichten und sonst 100 nm. Häufig wird die Vesikelsuspension zusätzlich zur Extrusion mit einem Tip Sonifier (Labsonic U, Braun, Deutschland) beschallt. Um planare, unstrukturierte Membranen zu erhalten wird die Vesikelsuspension der SUVs zunächst mit dem entsprechenden Puffer auf $0,1 \frac{mg}{ml}$ verdünnt. Es werden je-

weils 200 μl der Vesikelsuspensionen auf frisch gespaltetem Glimmer über Nacht bei $T = 4^\circ \text{C}$ inkubiert. Die lange Inkubationszeit bewährt sich besonders bei hochschmelzenden Lipiden, da so eine gute Bedeckung mit geringer Defektdichte erzielt werden kann. Nach mindestens 12 h Inkubationszeit wird der Puffer vorsichtig getauscht, um die überschüssigen Vesikel aus der Lösung, nicht aber die auf dem Glimmer adhärerten Vesikel, zu entfernen. Anschließend wird die Probe für 45 min oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids geheizt, wobei die auf dem Glimmer adhärerten Vesikel spreiten und zu einer geschlossenen, planaren Lipiddoppelschicht fusionieren. Nach einer 15-minütigen Abkühlzeit wird die Probe erneut mit dem entsprechenden Puffer gespült, um jegliche nicht aufgeplatzte Vesikel zu entfernen. Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Mechanik und Thermodynamik des Spreitvorgangs wurden z.B. von I. Reviakine *et al.* [60], von J. Nissen *et al.* [75], von Z.V. Leonenko [59] und von C.A. Keller *et al.* [76] veröffentlicht.

Alle Experimente wurden, sofern es nicht explizit angegeben ist, in 150 mM NaCl, 10 mM Tris, $pH = 7,4$ Puffer durchgeführt.

Im Strukturierungsprozess, bei dem vorwiegend niedrigschmelzende Lipide verwendet werden, inkubieren die über ihre Phasenumwandlungstemperatur geheizten Vesikel lediglich für ca. 10 min auf Glas, adhäreren und spreiten dort. Anschließend wird die Probe mit dem entsprechenden Puffer gespült. Das Glassubstrat wird vorher bei $T = 70^\circ \text{C}$ im Ultraschallbad zunächst für 2 mal 15 min in Hellmanex-Lösung und anschließend für 2 mal 15 min in Reinstwasser gereinigt.

4.2 Softlithographie

Gegenwärtig bedeutet die Entwicklung neuer elektronischer, magnetischer oder optischer Geräte häufig ein Umgestalten bestehender Strukturen in immer niedriger dimensionierte Versionen. Konventionelle Strukturierungsmethoden wie auch fortgeschrittene Lithographietechniken wie z.B. Elektronenstrahl-, Röntgen- oder Proximal-Sondenlithographie, die Nanostrukturierung ermöglichen, sind kostspielig, meist aufwendig und weitgehend auf die Erzeugung zweidimensionaler Strukturen aus einer begrenzten Anzahl von Materialien auf planaren Substraten beschränkt.

Die Softlithographie, die von George M. Whitesides an der Universität Harvard entwickelt wurde, ist ein Konzept, auf großer Fläche schnell und wirtschaftlich verschiedenste Materialien strukturieren zu können. Die Softlithographie bezeichnet eine Reihe von alternativen Techniken zur Herstellung von Mikro- und Nanostrukturen, die ursprünglich ein Verfahren beschreiben, das einen Elastomer als Stempel oder Gussform zur Strukturierung von Materialien wie selbstorganisierende Schichten (SAMs), organische Polymere, Kolloide, anorganische Feststoffe, Proteine oder Zellen verwendet. Die erzeugten Strukturen finden heute Anwendung in den unterschiedlichsten Bereichen wie beispielsweise in der Mikroelektronik [77], bei mikroanalytischen Systemen (engl.: *Microscale Total Analysis Systems*) [78–80], mikroelektromechanischen Systemen (MEMS), Biooberflächen und -materialien [81, 82], in der Mikrosensorik oder in der Mikrooptik. Auch mikromechanische Systeme mit Ventilen und Pumpen wurden mit Hilfe der Softlithographie hergestellt [83, 84].

Zur Zeit liegt die untere kritische Grenze bei der Herstellung von Nanostrukturen mit Methoden der Softlithographie bei 30 nm [7, 85]. Die gängigsten Verfahren werden im Folgenden kurz aufgeführt. Eine ausführliche Übersicht über diese alternativen Strukturierungsmethoden werden in den Artikeln [7, 85, 86] dargestellt.

Mikrokontakt–Drucken μCP (engl.: *Microcontact Printing*): Ein strukturierter Stempel wird nach dem Kontakt mit dem aufzuprägenden Material (häufig SAM) auf ein Substrat gedrückt, wobei nur die mit dem Substrat in Kontakt tretenden Stellen das zu strukturierende Material abgeben.

Replikat–Gießen (engl.: *Replica Molding*): Das von einer starren Masterstruktur abgeossene Elastomer dient selbst als Gussform zur Vervielfältigung der Replikatstrukturen.

Mikroformen in Kapillaren MIMIC (engl.: *Micromolding in Capillaries*): Durch den Kontakt eines strukturierten Elastomers mit einer glatten Oberfläche entsteht ein Netzwerk leerer Kanäle, die mit unterschiedlichen Suspensionen bzw. Lösungen befüllt werden können. Dieses Verfahren wird schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt und ausführlich in Kapitel 4.3 beschrieben.

Mikrotransfer–Gießen μTM (engl.: *Microtransfer Molding*): Die strukturierte Oberfläche eines elastomeren Stempels wird mit einem Polymervorläufer gefüllt und der Stempel wird auf ein glattes Substrat aus dem gleichen Polymer aufgedrückt. Nach dem Aushärten des Polymers und dem Entfernen des Stempels erhält man die invers strukturierte Polymeroberfläche.

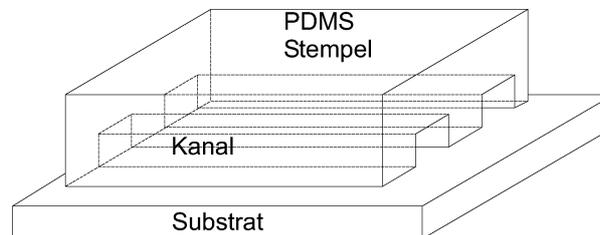


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Strukturierungsmethode des Mikroformens in Kapillaren.

Lösungsmittel unterstütztes Mikrokontakt–Formen SAMIM (engl.: *Solvent assisted Microcontact Molding*): Ein strukturierter, mit Lösungsmittel benetzter Stempel wird auf eine Polymeroberfläche gestellt. Das Polymer wird an den Kontaktstellen mit dem Stempel von dem Lösungsmittel gelöst. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird der Stempel entfernt und man erhält eine invers strukturierte Oberfläche.

Abbildung 4.3 (aus [85]) zeigt Rasterelektronenmikroskop–Aufnahmen (REM–Aufnahmen) von polymeren Mikrostrukturen, die durch das MIMIC–Verfahren hergestellt wurden. Sie veranschaulichen die Vielseitigkeit der Strukturierung und die hohe Flexibilität der Filme [7, 87].

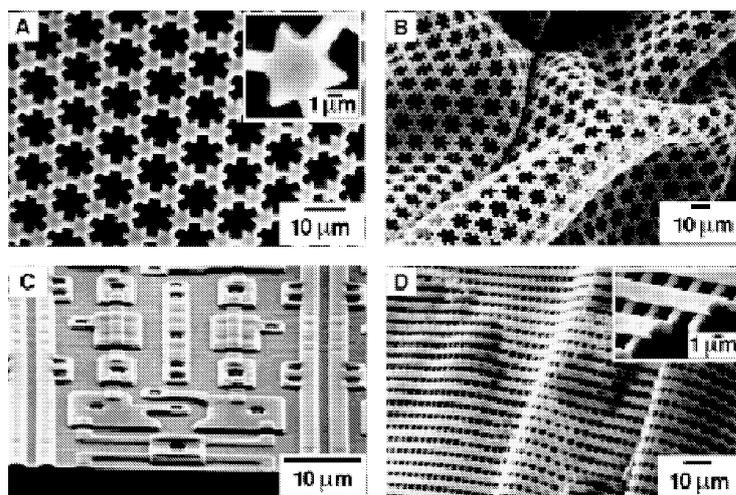


Abbildung 4.3: REM–Aufnahmen von polymeren Mikrostrukturen, die durch MIMIC hergestellt wurden (aus [85]).

Der folgende Abschnitt soll eine kurze Übersicht über den aktuellen Stand der Forschung bezüglich der Verwendung der Softlithographie zur Strukturierung von Biomaterialien geben.

Häufig wird das Mikrokontakt–Drucken (μCP) oder Variationen dieses Verfahrens verwendet, um beispielsweise mikrostrukturierte Proteinkompartimente auf einer

Oberfläche zu erzeugen [88–94]. Mikroformen in Kapillaren wird eingesetzt, um Immunoassays aus mikrostrukturierten, immobilisierten Immunglobulinsegmenten herzustellen [95, 96], wobei mit diesem Verfahren auch Konzentrationsgradienten von Proteinen auf einer Oberfläche erzeugt werden können [97]. Ein Fluoreszenzassay aus Mikrokanälen wurde von Mao *et al.* [98] zur enzymkinetischen Untersuchung vorgestellt.

Die Strukturierung von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten erfolgt meistens auf Basis von Kontaktdruckverfahren [3, 4]. Morigaki *et al.* beschreiben einen Ansatz, die Struktur durch photochemische Polymerisation des Lipids (Diacetylen–phosphatidylcholin) in die Lipiddoppelschicht einzuschreiben [5].

Diese Verfahren beschränken sich lediglich auf die Erzeugung einer sehr geringen Anzahl verschiedener Lipidkompositionen. Auch die einzelne Adressierung der Segmente ist mit diesen Verfahren nicht möglich. Das *erstmalig* von uns beschriebene [99], in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren ist zur Herstellung mikrostrukturierter, *selektiv funktionalisierbarer* und *zahlreicher* Lipidkompartimente geeignet. Die Anzahl der möglichen unterschiedlichen Lipidsegmente in der streifenförmigen Anordnung ist zur Zeit nur durch die Handhabbarkeit der manuellen Injektion von Vesikellösungen beschränkt. Dieses Verfahren wird inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet und ist parallel zu dieser Arbeit im Hinblick auf unterschiedliche Forschungsziele weiterentwickelt worden [100].

Zur Zeit beschäftigen sich im Wesentlichen zwei Arbeitsgruppen intensiv mit der Strukturierung von Lipiddoppelschichten. Die Arbeitsgruppe von Steven G. Boxer [81, 101–109] an der Stanford University verwendet hauptsächlich Strukturierungstechniken, die auf dem Mikrokontaktdruckverfahren beruhen. In den Arbeiten von Paul S. Cremer, Texas A&M University, wurden zunächst softlithographisch hergestellte Mikrokavitäten zur Strukturierung von Lipiden eingesetzt [103, 110] während die neueren ebenso wie die vorliegende Arbeit auf der MIMIC–Technik [98, 100] basieren. Im Gegensatz zu den eigenen Arbeiten wurden

die von Cremer *et al.* strukturierten Membranen lediglich fluoreszenzmikroskopisch und nicht rasterkraftmikroskopisch untersucht, so dass der Nachweis über die Ausbildung von planaren Membranen in dem Fall nicht gegeben ist. Dieser wichtige Aspekt wird in Abschnitt 4.4 eingehend erläutert.

4.2.1 Polydimethylsiloxan

Das am häufigsten in der Softlithographie verwendete Elastomer ist Polydimethylsiloxan (PDMS) *SylgardTM 184* (Dow Corning, West Midland, USA), dessen chemische Struktur in Abbildung 4.4 dargestellt ist. Das zweikomponentige Kit besteht aus dem flüssigen PDMS-Präpolymer (Basis) und dem Härter, der aus einem Platin-Komplex und Copolymeren aus Methylhydrosiloxan und Dimethylsiloxan besteht. Eine Pt-katalysierte Additionsvernetzung durch Hydrosilylierung ist für das Aushärten verantwortlich [7].

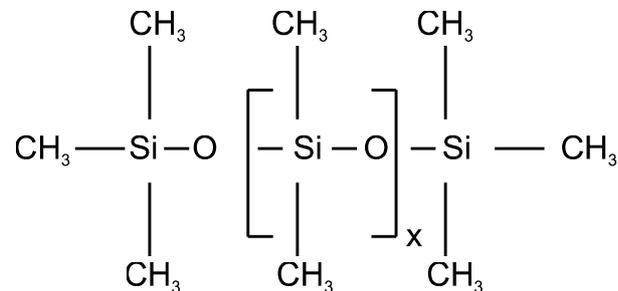


Abbildung 4.4: Chemische Zusammensetzung von Polydimethylsiloxan (PDMS).

PDMS vereint in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften gegenüber anderen Materialien eine Vielzahl an Vorteilen, die seinen Einsatz in der Softlithographie begründen. Neben seiner optischen Transparenz, die im kurzwelligen Spektralbereich bis zu einer Wellenlänge von $\lambda \approx 230 \text{ nm}$ [111] reicht, und der hohen thermischen Stabilität zeigt das Material nur geringe Elastizitätsänderungen über einen weiten Temperaturbereich. Es ist chemisch inert, homogen, isotrop, dielektrisch, permeabel für viele Flüssigkeiten und Gase und besitzt eine niedrige Oberflächenspannung ($\approx 22 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$) [112]. Die elastischen Eigenschaften (Young Modulus $E \approx 1 \text{ MPa}$ [113]) und die geringe Oberflächenrauigkeit erlauben eine gute Haftung auf zahlreichen glatten und gebogenen Oberflächen [87].

Das Material ist biokompatibel (es wird z.B. für Kontaktlinsen verwendet [84]), kostengünstig (ca. 40 US\$ pro 0,5 kg Kit) und die Replikatstrukturen sind wieder-

verwendbar. Xia *et al.* [85] berichten, dass keine Leistungsabnahme nach 100facher Gebrauch beobachtet wurde. Allerdings zeigte sich in der eigenen Untersuchung eine Qualitätsabnahme der strukturierten Stempel nach ca. 10-15maligem Gebrauch.

Die Oberflächeneigenschaften von PDMS können beispielsweise durch Plasma-behandlung verändert werden, um die reversible oder irreversible Haftung von PDMS an einem entsprechenden Substrat zu erreichen. Diese Hydrophilisierungsreaktion wird ausführlich in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Die Modifikation der PDMS-Oberfläche reguliert auch die Durchflusseigenschaften (s. Kapitel 4.3.1) und bestimmt die Sorption und Adsorption von Substanzen. Durch die Hydrophobie der PDMS-Oberfläche wechselwirkt sie stark mit apolaren Analyten. Linder *et al.* [114] beschreiben, dass kleine Moleküle, wie Toluol in den Elastomer diffundieren und große Moleküle mit apolaren Gruppen an der Oberfläche adsorbieren. Die Hydrophilisierung des PDMS durch O_2 -Plasmabehandlung ist zeitlich nicht stabil und die Oberfläche geht langsam wieder in den hydrophoben Zustand über [115]. Es gibt verschiedene Ansätze, die unkontrollierte Adsorption an der PDMS-Oberfläche dauerhaft zu unterdrücken, wie z.B. die Silanisierung der oxidierten Oberfläche [116] oder das Spreiten von Phospholipid-Doppelschichten auf der PDMS-Oberfläche [100].

Als Substrate eignen sich beispielsweise Si/SiO₂, Glas, Au, Au/SAM, Ag/AgO, Pt, Cu/CuO, Ti/TiO₂ oder Polymere wie z.B. Polystyren [117].

4.2.2 Präparation des strukturierten Elastomers

Die Stempel, Gussformen oder Masken der Softlithographie werden durch das Verfahren des Replikatformens erzeugt, das schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt wird. Das flüssige PDMS wird im Verhältnis 10:1 (Basis:Härter) gemischt und über die photolithographisch strukturierte Oberfläche eines Silicium-

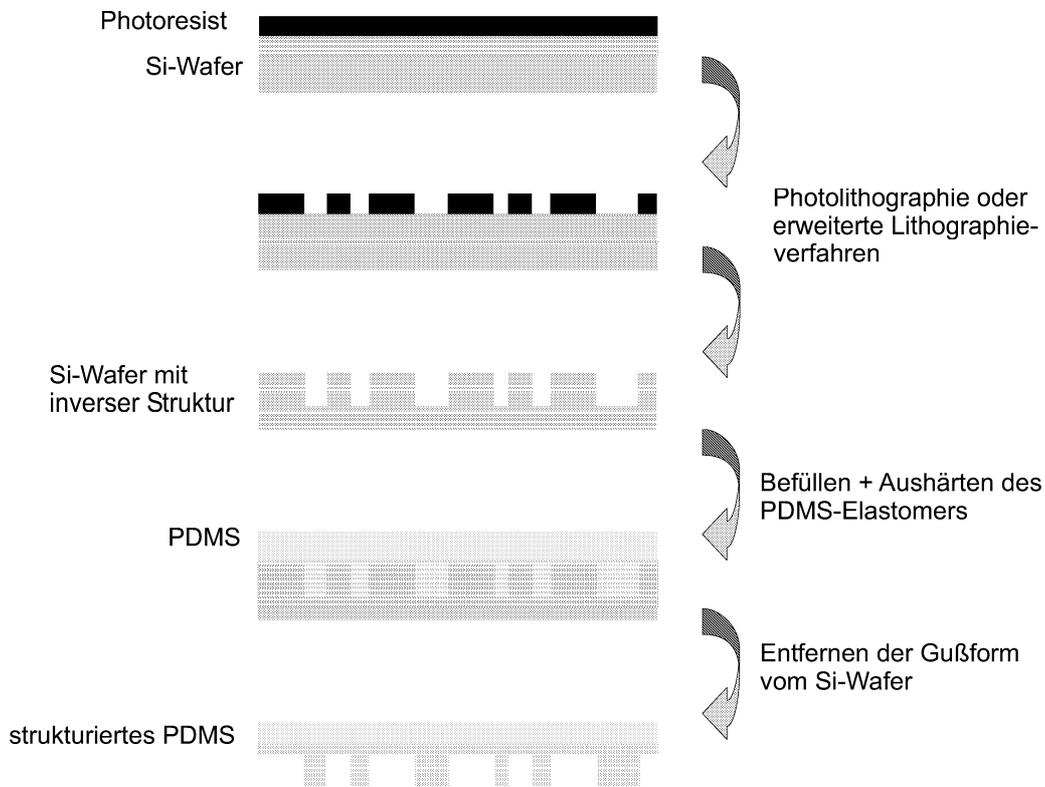


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Erzeugung einer Gussform aus elastomerem Material von einem strukturierten Silicium-Wafer.

Wafers gegossen, die die inverse Masterstruktur trägt. Durch einmalige Beschichtung des Silicium-Wafers mit einem dünnen Film von 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyldimethylchlorosilan wird eine hydrophobe Oberfläche erzeugt, von der das Elastomer leicht abgelöst werden kann, nachdem es für 6 h bei 60° C bzw., um den Einschluss von Luftblasen in dem Replikat zu vermeiden, 48 h bei Raumtemperatur ausgehärtet wurde. Alternativ kann die Luftblasenbildung durch vorheriges Entgasen unterdrückt werden, indem für wenige Minuten im Vakuumschrank ein geringer Unterdruck auf das flüssige Präpolymer angewendet wird.

4.2.3 Hydrophilisierung des PDMS

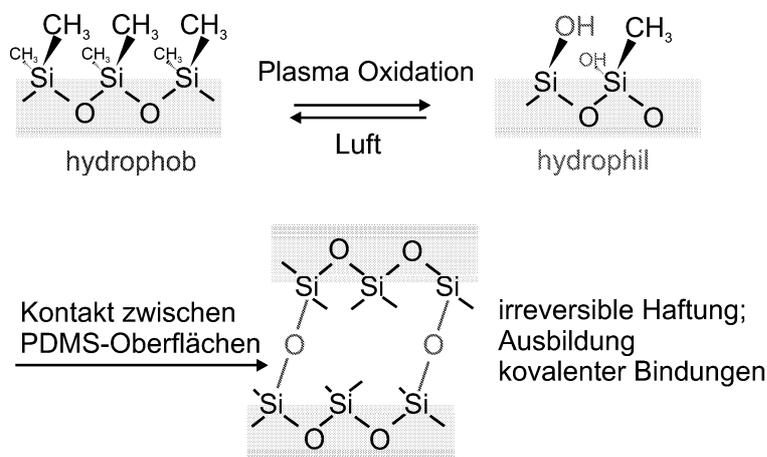


Abbildung 4.6: Hydroxilierung und Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen zwei PDMS-Oberflächen.

Mit der temporären Hydrophilisierung der PDMS-Gussformen durch eine Plasmabehandlung werden drei Ziele verfolgt. Erstens wird der Durchfluss der Suspension durch die Kanäle stark beeinflusst. Die oxidierten Kanäle aus PDMS zeigen eine weit höhere Oberflächenspannung als die hydrophoben Kanäle und werden von Flüssigkeiten mit hoher Oberflächenspannung (z.B. Wasser) erheblich leichter befüllt. Dieser Zusammenhang wird detailliert in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Zweitens kann durch die Hydroxilierung der PDMS-Oberfläche, die in Abbildung 4.6 dargestellt ist, eine irreversible Haftung durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen der PDMS-Oberfläche und dem jeweiligen Substrat erreicht werden [114,115]. Abbildung 4.6 bezieht sich auf die Kontaktierung von zwei hydrophilierten PDMS-Oberflächen. Es wird angenommen, dass durch die Plasmabehandlung des PDMS $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ Gruppen in $-\text{O}_n\text{Si}(\text{OH})_{4-n}$ konvertiert werden und dass die irreversible Haftung auf die Ausbildung von kovalenten (Si-O-Si)-Bindungen zwischen den beiden PDMS-Substraten zurückzuführen ist [112, 115]. Die irreversible Haftung kann auch zwischen PDMS und

z.B. Glas, Si, SiO₂ oder Si₃N₄ erreicht werden.

Je nach Wahl der Parameter der Plasmabehandlung und nach Vorbehandlung des Substrates kann auch eine reversible Haftung erzeugt werden, da die Hydrophilie des PDMS an Luft nicht stabil ist und die Oberfläche nach ca. 15-60 *min* wieder in den hydrophoben Zustand übergeht, wofür das Umgestalten der PDMS-Oberfläche durch Diffusion aus dem bulk-Material und Adsorptionen und Kontaminationen aus der Luft verantwortlich sind. Der PDMS-Stempel kann, um den hydrophilen Zustand aufrecht zu erhalten, in Wasser aufbewahrt werden [118]. Die temporäre Haftung ist zur Präparation der mikrostrukturierten Lipiddoppelschichten in der vorliegenden Arbeit erwünscht. Duffy *et al.* [115] beschreiben, dass die Kontaktierung der Oberflächen innerhalb einer Minute nach der Oxidation erfolgen muss, um eine irreversible Haftung zu erreichen. Um einen reversiblen Halt zu erzielen, kann man sich diesen Effekt zunutze machen und nach der Oxidation ca. 60–120 *s* warten, bevor die Oberflächen kontaktiert werden. Auch die Oxidationszeit, die in der Literatur mit 30–60 *s* angegeben ist, wird in der eigenen Präparation auf 5–20 *s* herabgesetzt. Trotzdem wird häufig eine, in der vorliegenden Arbeit unerwünschte, irreversible Bindung zwischen PDMS und dem Glas-Substrat erreicht. In der Literatur gibt es verschiedene Ansätze, eine (ir)reversible Haftung von PDMS auf verschiedenen Substraten zu erreichen. So beschreiben z.B. Linder *et al.* [114] die Möglichkeit, nur durch Hydrophilisierung des Glas-Substrates nicht aber des PDMS-Stempels eine reversible Haftung zu erreichen, während die meisten Veröffentlichungen von der Hydroxilierung des Stempels und des Substrates ausgehen [95, 118, 119].

Der Vollständigkeit halber sei das dritte Ziel der Plasmabehandlung erwähnt. Es betrifft Forschungsgruppen, die mit elektroosmotischem Fluss durch die Mikrokapillaren arbeiten. Durch die Sauerstoff-Plasmaoxidation werden Silanol-Gruppen (SiOH) an der PDMS-Oberfläche erzeugt, die in neutralen und basischen wässrigen Lösungen ionisieren (SiO⁻) und damit den elektroosmotischen Fluss in Richtung der Kathode unterstützen [115].

4.3 Präparation einzeln adressierbarer Lipidkompartimente

Im Folgenden wird erläutert, wie mikrostrukturierte Lipiddoppelschichtsegmente durch die Kombination aus der Vesikelspreittechnik und dem MIMIC-Verfahren der Softlithographie hergestellt werden.

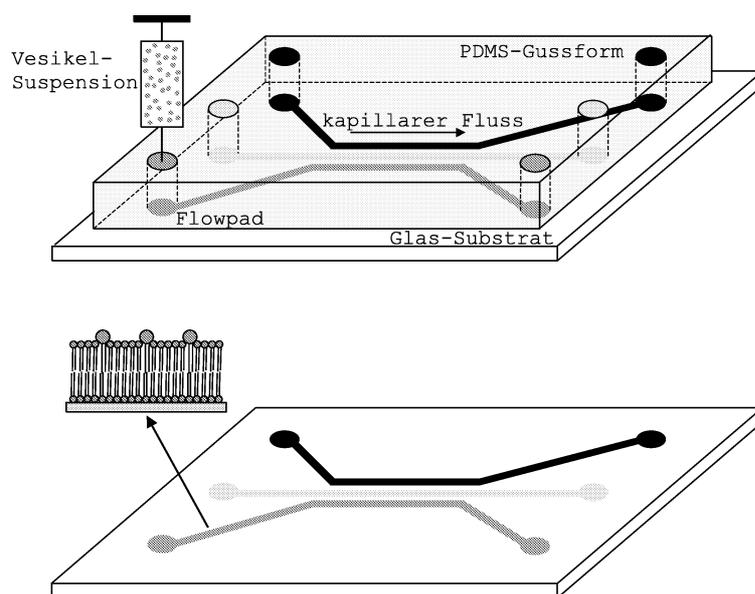


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der Mikrostrukturierung von festkörperunterstützten Membransegmenten unterschiedlicher Komposition.

Abbildung 4.7 veranschaulicht die einzelnen Präparationsschritte. Zunächst wird die durch Replikatformen (s. 4.2.2) gewonnene PDMS-Gussform im O_2 -Plasma hydrophilisiert (s. 4.2.3) und in reversiblen Kontakt mit einer gereinigten Glasoberfläche gebracht, wodurch ein Netzwerk leerer Kanäle entsteht. Jeder Kanal endet an beiden Seiten in Flowpads, die über Zuflussvorrichtungen auf der Oberseite des PDMS-Stempels zugänglich sind. Die getrennten Flowpads erlauben dabei eine einzelne Adressierbarkeit der Kanäle. Um diese Befüllungsvorrichtung zu erhalten, wurden Raumhalter aus Edelstahl während des Aushärtungsvor-

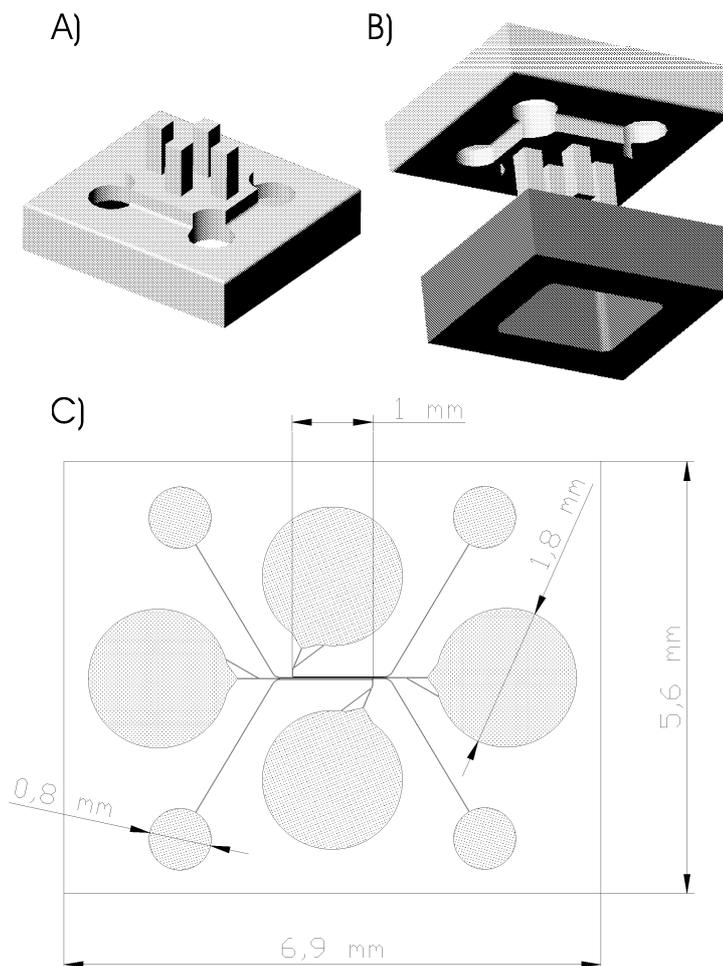


Abbildung 4.8: A: Blick auf einen umgekehrt liegenden Raumhalter, mit dem die Befüllungsvorrichtung im PDMS-Stempel erzeugt wird; B: Seitenansicht des Raumhalters mit dazugehörigem Edelstahlrahmen; C: Schemazeichnung der Struktur 3.

gangs auf den Flowpads des Silicium-Wafers aufgesetzt. Dieser Raumhalter wird in Abbildung 4.8 A skizziert, die den Blick auf den umgekehrt liegenden Raumhalter zeigt. Abbildung 4.8 B stellt den Raumhalter aus Abb. 4.8 A mit dem dazugehörigen Edelstahlrahmen in der Seitenansicht dar. Der Raumhalter wird zusammen mit dem Edelstahlrahmen auf den strukturierten Silicium-Wafer gesetzt und so positioniert, dass die vier abgebildeten Säulen des Raumhalters auf

den vier Flowpads der Struktur aufliegen, die für die Befüllung bestimmt sind. Die Flowpads sind schematisch als große Kreise in Abbildung 4.8 C, die die Struktur 3 darstellt, eingetragen.

Nach dem Aushärten des PDMS können der Edelstahlrahmen und der Raumhalter entfernt werden. Sie hinterlassen entsprechende Aussparungen im PDMS-Stempel. Danach können unterschiedliche Vesikelsuspensionen in die einzelnen Flowpads injiziert werden. Die pro Kanal injizierte Flüssigkeitsmenge beträgt 100 *nl* bis 300 *nl*, die Konzentration der Vesikelsuspensionen variiert je nach Lipidzusammensetzung zwischen 0,1 $\frac{mg}{ml}$ und 1 $\frac{mg}{ml}$. Die obere Darstellung in Abbildung 4.7 zeigt den Vorgang der Befüllung der einzelnen Kanäle. Die verschiedenen Graustufen der Kanäle kennzeichnen die Befüllung der Mikrokavitäten mit unterschiedlichen, selektiv funktionalisierten Vesikelsuspensionen. Durch kapillare Kräfte, die in Kapitel 4.3.1 eingehend beschrieben werden, befüllen die Vesikellösungen die Kanäle, in denen die Vesikel an den Kapillaroberflächen adhären, spreiten und zu planaren Lipiddoppelschichten fusionieren (s.4.1.1). Nachdem der PDMS-Stempel entfernt wurde und die Probe intensiv mit dem entsprechenden Puffer gespült wurde, verbleiben die getrennten Lipiddoppelschichtstreifen aus unterschiedlichen Lipidkompositionen, dargestellt in dem unteren Bild in Abbildung 4.7, auf dem Substrat und sind in wässriger Umgebung über mehrere Tage bis Wochen stabil. Die in dieser Arbeit verwendeten und konzipierten Master-Strukturen werden im Anhang A aufgeführt. Die Abmessungen der am häufigsten verwendeten Kapillarstruktur, Struktur 1, betragen 15 μm Breite, 3 μm Höhe und 2 *mm* Länge; die fünf parallelen Kapillaren sind 5 μm voneinander entfernt und enden an beiden Seiten jeweils in einem Flowpad der Größe 2,13 *mm* \times 2,13 *mm*.

4.3.1 Hydrodynamische Betrachtung

Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben wurde, bildet die Reliefstruktur in der PDMS-Gussform durch das Aufsetzen auf ein festes Substrat ein Netzwerk leerer Kanäle aus. Die Zugabe von Vesikelsuspensionen in die jeweilige, mit einer Mikrokavität hydraulisch verbundene Befüllungsvorrichtung führt zur spontanen Füllung des damit verbundenen Mikrokanals durch die wirkenden Kapillarkräfte. Der Fluss einer Flüssigkeit durch eine Kapillare resultiert aus dem Bestreben eines Systems, eine bestehende Druckdifferenz zwischen zwei hydrodynamisch gekoppelten Bereichen der Flüssigkeit zu minimieren. Die Druckdifferenz ist eine Folge der in unterschiedlichen Phasengrenzbereichen des Systems auftretenden Krümmungsunterschiede und der Existenz einer effektiven mechanischen Spannung in der Grenzschicht, der Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung [120]. Der Einfluss der Gravitation wird in der folgenden Betrachtung, sofern nicht explizit erwähnt, vernachlässigt, da er in vornehmlich horizontal ausgerichteten Systemen, wie es hier vorliegt, klein gegenüber dem Beitrag des kapillaren Drucks ist. Thermodynamisch kann die Befüllung eines Kanals infolge von Kapillarkräften durch die Minimierung der freien Enthalpie ΔG gemäß Gleichung 4.1 verstanden werden [87, 117, 120]. Betrachtet werde eine rechteckige Kapillare, dargestellt in Abbildung 4.9 (aus [117]), mit der Breite b und der Höhe c , die mit der Flüssigkeit aus einem Flüssigkeitstropfen mit dem Radius r befüllt wird ($c, b \ll r$). $\gamma_{LV}, \gamma_{SV}, \gamma_{S'V}, \gamma_{SL}$ und $\gamma_{S'L}$ bezeichnen die Grenzflächenspannungen $\gamma = (\frac{\partial G_A}{\partial A})_{p, T, n_i}$, wobei L für die Flüssigkeit, V für die Dampfphase, S für PDMS und S' für das Substrat stehen. ΔA^{Kugel} und ΔA^{Kanal} geben die Änderungen der Oberfläche des Flüssigkeitstropfens und der Kapillare an, die durch die Befüllung des Kanals mit Flüssigkeit auftritt. Dieses Modell stellt nur eine grobe Näherung dar, da es anstelle der quaderförmigen Flowpads, die als Flüssigkeitsreservoir dienen, mit den Grenzflächen Flüssigkeit-Substrat und Flüssigkeit-PDMS einen Tropfen mit der Grenzfläche Flüssigkeit-Luft annimmt. Es veranschaulicht

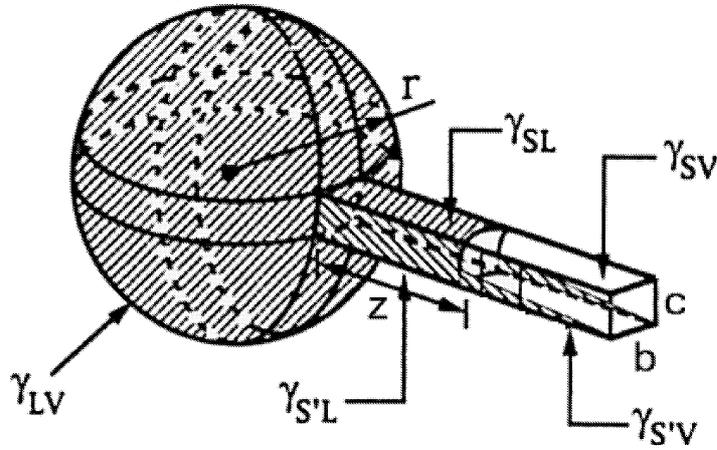


Abbildung 4.9: Modell für die Befüllung einer rechteckigen Kapillare mit einer Flüssigkeit aus einem Flüssigkeitstropfen mit dem Radius r (aus [117]).

aber in geeigneter Weise die Abhängigkeit der Kapillarkraft von den auftretenden Grenzflächenspannungen.

$$\Delta G = \gamma_{LV} \Delta A^{Kugel} - f(\gamma_{SL}, \gamma_{S'L}) \Delta A^{Kanal} \quad (4.1)$$

$$= \frac{2cb\Delta z\gamma_{LV}}{r} - [(b\Delta z + 2c\Delta z)(\gamma_{SV} - \gamma_{SL}) + b\Delta z(\gamma_{S'V} - \gamma_{S'L})] \quad (4.2)$$

Unter der Annahme, dass $c, b \ll r$, wird der erste Summand in 4.1 vernachlässigbar und dieser Ausdruck vereinfacht sich zu:

$$\Delta G = -[(b\Delta z + 2c\Delta z)(\gamma_{SV} - \gamma_{SL}) + b\Delta z(\gamma_{S'V} - \gamma_{S'L})]. \quad (4.3)$$

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta \quad (4.4)$$

Nimmt ΔG einen negativen Wert an, wird die Kapillare spontan gefüllt, ist ΔG positiv, tritt keine Befüllung der Kapillare mit der Flüssigkeit auf. Unter Verwendung der Young'schen Gleichung 4.4, die den Kontaktwinkel θ in Relation

zu den Grenzflächenspannungen γ_i [120] setzt, sowie unter der Annahme $b \approx c$, vereinfacht sich Gl. 4.3 zu:

$$\Delta G = -[b\Delta z\gamma_{LV}(3\cos\theta + \cos\theta')]. \quad (4.5)$$

Im benetzenden Fall, also für Werte von θ und θ' zwischen 0 und 90°, wird die Flüssigkeit die Kapillare befüllen. Flüssigkeiten mit hohen Grenzflächenspannungen und großen Werten für γ_{SL} und $\gamma_{S'L}$ ($\theta, \theta' > 90^\circ$) fließen nicht in die Kapillare. Durch einen Zusatz von z.B. Tensiden oder organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Methanol mit niedrigen Oberflächenspannungen zur Flüssigkeit kann die Grenzflächenspannung herabgesetzt werden und die Kapillare wird befüllt. Kim *et al.* [117] geben an, dass die Zugabe von 5% Ethanol ($\gamma_{LV} = 22,39 \frac{mN}{m}$ bei $T = 20^\circ C$ [121]) zu Wasser ($\gamma_{LV} = 72,88 \frac{mN}{m}$ bei $T = 20^\circ C$ [121]) ausreichend ist, um in eine mit reinem Wasser nicht befüllbare Kapillare aus PDMS und einem teilweise hydrophilen Substrat (SAM, $-\text{COOCH}_3$ Endgruppe auf Gold) ($\theta = 105^\circ, \theta' = 60^\circ$) zu fließen. Da die Grenzflächenspannung der Gussform aus PDMS $\gamma_{SV} = 21,6 \frac{mN}{m}$ erheblich kleiner ist als die Grenzflächenspannung des verwendeten Glassubstrats $\gamma_{SV} \approx 73 \frac{mN}{m}$, wird das zu strukturierende Material bevorzugt das Substrat benetzen [117]. Äquivalent zu der Betrachtung der Grenzflächenspannungen kann das Be- und Entnetzungsverhalten der Flüssigkeit in der rechteckigen Kapillaren durch die Druckdifferenz Δp ausgedrückt werden, die für die Versuchsdurchführung anschaulichere Ergebnisse liefert. Die Druckdifferenz Δp in Gleichung 4.6, die auf die Flüssigkeit in einem an beiden Enden geöffneten Kanal ausgeübt wird, setzt sich aus der Kapillarkraft p_{cap} und dem hydrostatischen Druck p_g durch das Schwerfeld der Erde zusammen. In den Schweredruck gehen die Dichte ρ der Flüssigkeit, die Gravitationsbeschleunigung $g = 9,81 \frac{m}{s^2}$ an der Erdoberfläche und die Höhe der Flüssigkeitssäule h ein.

$$\Delta p = p_{cap} + p_g = p_{cap} + \rho \cdot g \cdot h \quad (4.6)$$

Angenommen, die Kapillare würde mit Wasser ($\rho = 10^3 \frac{kg}{m^3}$) gefüllt, beträgt der Schweredruck p_g ca. $10 Pa$ pro mm Differenz der Flüssigkeitssäulen in den Zulauf- und Ablauf-Flowpads.

Der Kapillardruck p_{cap} für eine rechteckige Kapillare mit Breite b und Höhe c kann näherungsweise durch Gleichung 4.7 ausgedrückt werden, wobei der Term, der die Änderung der Grenzflächenspannung im Flüssigkeitsreservoir beschreibt, wie auch in Gleichung 4.3 vernachlässigt wird [117, 118, 120].

$$p_{cap} = -\frac{1}{A_{Kanal}} \frac{dG}{dz} \approx \gamma_{LV} \left(\frac{\cos\theta + \cos\theta'}{c} + \frac{2\cos\theta}{b} \right) \quad (4.7)$$

Aus Gleichung 4.7 wird ersichtlich, dass der Kapillardruck stark abhängig ist von der Geometrie der gewählten Kapillare und besonders von den Kontaktwinkeln θ und θ' der verwendeten Flüssigkeit mit den Kapillaroberflächen aus PDMS und Substrat. Optimal für das verwendete Probensystem wäre ein hydrophilisiertes PDMS-Replikat mit $\theta \approx 0^\circ$ [112] und ein Substrat mit $\theta' = 0^\circ$. Auch bei der Verwendung des hydrophoben PDMS mit $\theta \approx 110^\circ$ [83] kann der Kanal je nach Wahl der Kapillargeometrie und des Kontaktwinkels des Substrats θ' befüllt werden. Die Abschätzung des Kapillardrucks p_{cap} nach Gleichung 4.7 für die häufig verwendete Struktur 1, siehe Anhang A.1, mit einer Breite von $b = 15 \mu m$ und einer Höhe von $c = 3 \mu m$ ergibt für die beiden Grenzfälle $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 110^\circ$ Werte von $p_{cap}(\theta = 0^\circ) = 57,6 kPa$ für hydrophiles PDMS und $p_{cap}(\theta = 110^\circ) = 12,5 kPa$ für unbehandeltes, hydrophobes PDMS. Dabei wurde angenommen, dass der Kanal mit Wasser befüllt wird ($\gamma_{LV} \approx 73 \frac{mN}{m}$ [121]) und das Glas-Substrat ideal benetzbar ist ($\theta' = 0^\circ$). Der Schweredruck p_g , der in den betrachteten Systemen in der Größenordnung von $10 Pa$ liegt, kann hier gegenüber dem Kapillardruck p_{cap} vernachlässigt werden, dessen Werte in der Größenordnung von $10 kPa$ liegen. Daraus folgt, dass $\Delta p \cong p_{cap}$, wobei das Vorzeichen über die Be- bzw. Entnetzung der Oberflächen entscheidet. Nur bei einem

positiven Wert von Δp wird die Kapillare befüllt. Die Abhängigkeit des Kapillardrucks von den auftretenden Kontaktwinkeln und von der gewählten Geometrie wird in Abbildung 4.10 veranschaulicht.

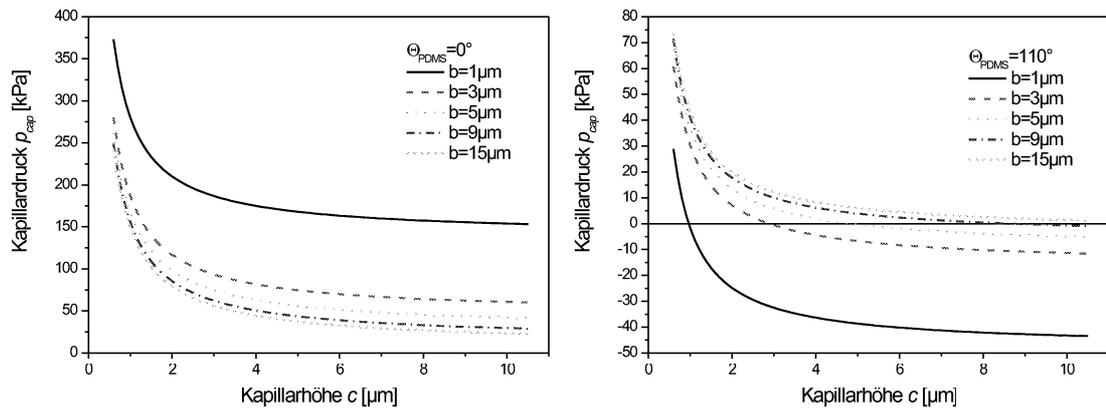


Abbildung 4.10: Abhängigkeit des Kapillardrucks von der Geometrie des Mikrokanals für hydrophile PDMS-Oberflächen (links) und für hydrophobe PDMS-Oberflächen (rechts) nach Gleichung 4.7.

Aufgetragen ist der nach Gleichung 4.7 berechnete Kapillardruck p_{cap} von Wasser mit $\gamma = 73 \frac{mN}{m}$ als Funktion der Kapillarahöhe für verschiedene Werte der Kapillarbreite b . Die linke Abbildung zeigt den Grenzfall des ideal hydrophilisierten PDMS-Replikats mit $\theta = 0^\circ$ und das rechte Diagramm bezieht sich auf nicht behandelte, hydrophobe PDMS-Oberflächen mit $\theta = 110^\circ$. Das Glas-Substrat sei ideal benetzbar ($\theta' = 0^\circ$). Die Berechnung zeigt, dass der Kapillardruck bei vollständig hydrophiler Kapillaroberfläche (linke Abbildung) bei konstanter Kapillarahöhe abnimmt, je breiter die Kapillare gewählt wird. Umgekehrt steigt der Kapillardruck mit zunehmender Kapillarbreite bei einer konstanten Kapillarahöhe, wenn hydrophobe PDMS-Oberflächen verwendet werden (rechte Abbildung). Diese Grafik zeigt deutlich, dass bei ungünstiger Wahl der Breite b und Höhe c die Kapillare nicht mehr befüllt wird, da der Kapillardruck

in diesem Fall negative Werte annimmt. Die dargestellte Abbildung bezieht sich lediglich auf die Grenzfälle des vollständig hydrophilen und hydrophoben PDMS–Replikats. In Kapitel 4.2.3 wurde beschrieben, dass die einmal hydrophilisierte PDMS–Oberfläche auf einer Zeitskala von Minuten bis zu einer Stunde wieder in den hydrophoben Zustand übergeht. Daher ist der Kontaktwinkel θ zeitabhängig ($\theta = \theta(t)$). Auch die Substratoberfläche kann z.B. durch unzureichende Reinigung des Glas–Trägers oder durch Verwendung hydrophober Substrate nur teilweise oder gar nicht benetzend sein, wodurch der Kapillardruck erneut vermindert wird und sogar die Befüllung verhindern kann. Die Abhängigkeit des Kapillardrucks von den Kontaktwinkeln θ und θ' wird in Abbildung 4.11 deutlich. Diese Grafik zeigt den Verlauf des Kapillardrucks p_{cap} von Wasser als Funktion des PDMS–Kontaktwinkels θ für verschiedene Werte des Substrat–Kontaktwinkels θ' . Die Rechnung bezieht sich auf die geometrischen Größen der Struktur 1 mit $b = 15 \mu m$ und $c = 3 \mu m$. Für diese konkrete Struktur lässt sich aus Abbildung

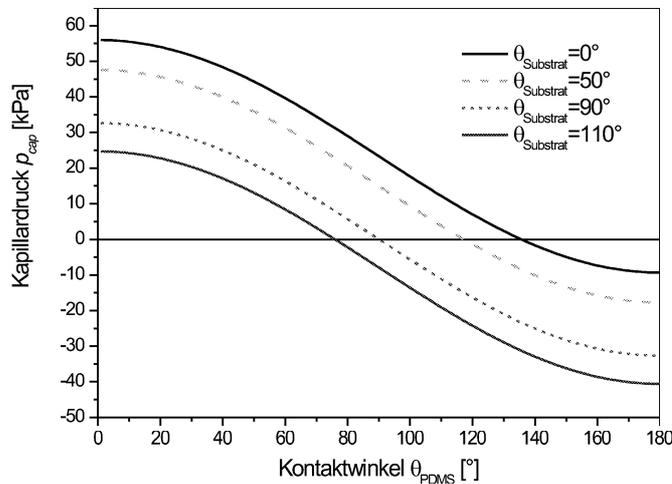


Abbildung 4.11: Abhängigkeit des Kapillardrucks von dem PDMS–Kontaktwinkel θ für verschiedene Substrat–Kontaktwinkel θ' nach Gleichung 4.7.

4.11 leicht ablesen, ob für ein Wertepaar θ, θ' die Kapillare mit Wasser befüllt

wird. Nimmt p_{cap} für eine Kontaktwinkelkombination θ, θ' einen positiven Wert an, wird die Kapillare befüllt, ist p_{cap} negativ, tritt keine Befüllung ein. Für hydrophilisiertes PDMS ergibt sich in den angeführten Beispielen auch bei der Verwendung hydrophober Substrate ein positiver Wert des Kapillardrucks. Liegt das PDMS jedoch in dem hydrophoben Zustand vor, hängt es von dem Kontaktwinkel des verwendeten Substrates ab, ob eine Befüllung der Mikrokapillare möglich ist bzw. ob der Kapillardruck ausreichend groß ist, um eine Befüllung der Kapillare innerhalb weniger Minuten zu gewährleisten. Um hohe Kapillardrücke zu erreichen, müssen folglich die Produkte aus $\gamma_{LV} \cdot \cos\theta$ und $\gamma_{LV} \cdot \cos\theta'$ möglichst hohe Werte annehmen und es muss eine geeignete Geometrie für das jeweilige System gewählt werden.

Im Folgenden wird das Geschwindigkeitsprofil und die mittlere Geschwindigkeit einer Flüssigkeit in einer Mikrokavität sowie die Befüllungsdauer des Kanals betrachtet, um abschätzen zu können, welchen Einfluss die Geometrie der Kapillare, die absoluten geometrischen Maße und der Kapillardruck auf diese Größen nimmt. Mathematisch wird die Bewegung von Flüssigkeiten durch ein definiertes Volumen beschrieben durch die vollständigen Navier–Stokes–Gleichungen 4.8, die sich aus den Newtonschen Bewegungsgleichungen (Massen–, Impuls– und Energieerhaltung) ableiten [122].

$$\rho \frac{du_i}{dt} = \rho k_i + \frac{\partial}{\partial x_k} \left\{ -p + \lambda^* \frac{\partial u_k}{\partial x_k} \right\} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left\{ \eta \left[\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right] \right\} \quad (4.8)$$

Hierbei bezeichnet u_i eine Komponente des Geschwindigkeitsfeldes \vec{u} eines Flüssigkeitsteilchens, ρ die Dichteverteilung, η die Scherviskosität (dynamische Viskosität), p das Druckfeld, k_i sind die Komponenten der Massenkraft $\vec{k} = \lim_{\Delta m} \frac{\Delta \vec{F}}{\Delta m}$. Die Größen λ^* und η sind materialtypische skalare Funktionen des thermodynamischen Zustandes, die nach dem Cauchy–Poisson–Gesetz der Materialtheorie einen linearen Zusammenhang (Gleichung 4.9) mit den Komponenten

des Spannungstensors τ_{ij} einer viskosen Flüssigkeit und denen des Deformationsgeschwindigkeitstensors e_{ij} bilden, wodurch die explizite Berechnung der Dissipationsfunktion ermöglicht wird [122].

$$\tau_{ij} = -p\delta_{ij} + \lambda^* e_{kk}\delta_{ij} + 2\eta e_{ij} \quad (4.9)$$

Um einen Ausdruck für das Geschwindigkeitsprofil der Flüssigkeit in den vorgegebenen Mikrokanälen zu nähern, werde die laminare, stationäre Schichtenströmung in einem unendlich langen, geraden Rohr mit rechteckigem Querschnitt der Breite b und der Höhe c nach J.H. Spurk [122] betrachtet. Der Koordinatenursprung befindet sich in der Mitte der Kapillare. Die Rohrachse verlaufe parallel zur z -Achse und die Flüssigkeit sei inkompressibel ($\operatorname{div} \vec{u} = 0$). Als weitere Voraussetzung wird angenommen, dass keine freien Oberflächen im betrachteten Volumenelement vorliegen.

Die einzige nicht verschwindende Geschwindigkeitskomponente verläuft in Rohrachsenrichtung (positive z -Richtung) und ist von der z -Koordinate unabhängig, so dass die nichtlinearen konvektiven Glieder in den Bewegungsgleichungen wie bei allen Schichtenströmungen verschwinden. Mit diesen kinematisch einfachen Voraussetzungen reduzieren sich die Navier–Stokes–Gleichungen in kartesischen Koordinaten 4.8 auf die Poisson–Gleichung 4.10 mit $K = -\frac{\partial p}{\partial z} = \text{const.}$

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} = -\frac{K}{\eta} \quad (4.10)$$

mit den Randbedingungen

$$\begin{aligned} u\left(\frac{b}{2}, y\right) &= 0 \\ u\left(x, \frac{c}{2}\right) &= 0 \end{aligned} \quad (4.11)$$

Eine mögliche Lösung der linearen Gleichung 4.10 ist in Gleichung 4.12 angegeben.

$$u(x, y) = \frac{K}{2\eta} \left[\frac{c^2}{4} - y^2 + \frac{8}{c} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n \cosh(mx)}{m^3} \frac{1}{m \frac{b}{2}} \cos(my) \right] \quad (4.12)$$

mit $m = \frac{\pi}{c}(2n - 1)$.

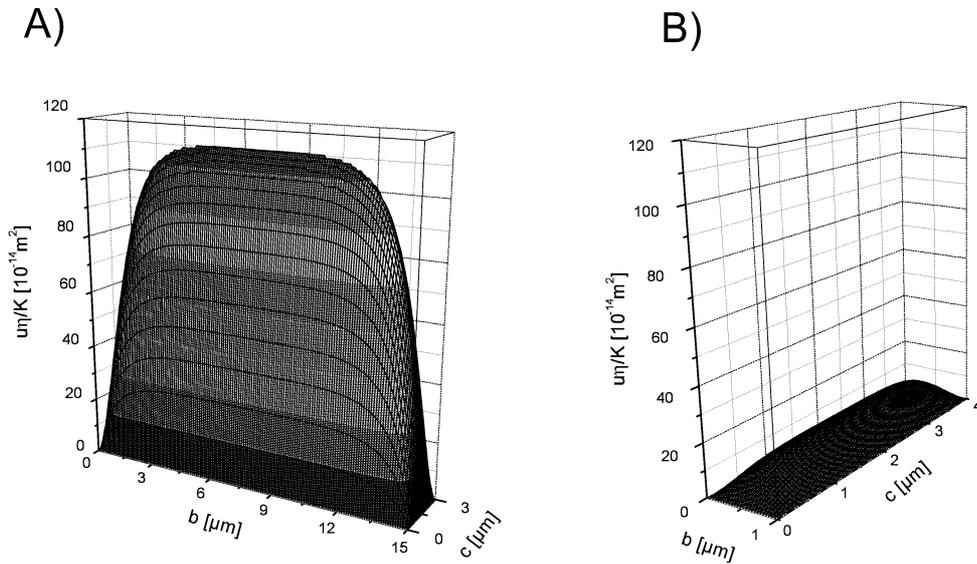


Abbildung 4.12: Nach Gleichung 4.12 berechnetes Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit dem Seitenverhältnis 5:1 ($b = 15 \mu\text{m}$, $c = 3 \mu\text{m}$) (A) und dem Seitenverhältnis 1:4 ($b = 1 \mu\text{m}$, $c = 4 \mu\text{m}$) (B).

Abbildung 4.12 A zeigt das aus Gleichung 4.12 berechnete, quasi-paraboloide Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal. Aufgetragen ist $\frac{u\eta}{K}$ gegen die räumlichen Koordinaten x, y . Zur anschaulichen Darstellung wurden die Koordinaten um $\frac{b}{2}$ bzw. $\frac{c}{2}$ transformiert. Für die Breite b und die Höhe c des Kanals wurden die Werte $b = 15 \mu\text{m}$ und $c = 3 \mu\text{m}$ eingesetzt, die der verwendeten Struktur 1, siehe Anhang A.1, entsprechen. Der Einfluss der Geometrie und der Absolutwerte der Abmessungen auf das Geschwindigkeitsprofil wird in Abbildung 4.12 B ver-

deutlich. Diese Graphik zeigt das für die Struktur 4A, siehe Anhang A.4, nach Gleichung 4.12 berechnete Geschwindigkeitsprofil für einen Mikrokanal mit einer Breite von $b = 1 \mu m$ und einer Höhe von $c = 4 \mu m$. Die gleiche Ordinatenkalibrierung wie in Abbildung 4.12 A verdeutlicht die Abnahme der Maximalgeschwindigkeit um 90%. Die Form bleibt quasi-paraboloid, wie Abbildung 4.13 zeigt, die die Vergrößerung von Abbildung 4.12 B darstellt.

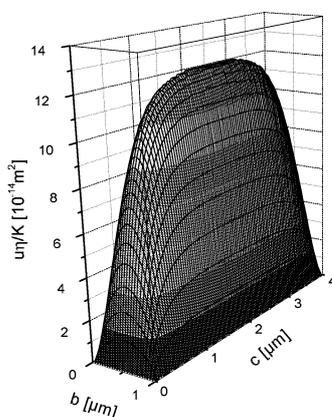


Abbildung 4.13: Vergrößerung von Abbildung 4.12 B, die das berechnete Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit dem Seitenverhältnis 1:4 ($b = 1 \mu m$, $c = 4 \mu m$) zeigt.

Der Einfluss der chemischen Heterogenität der vier Wände, die zu einer Verzerrung des quasi-paraboloiden Geschwindigkeitsprofils führen wird, geht in diese Berechnung nicht ein, da die Oberflächenspannungen der vier Oberflächen als gleich angenommen wurden. Außerdem wurde bei der Berechnung nicht berücksichtigt, dass Δp in Gleichung 4.7 auch von den geometrischen Größen b und c abhängt. Wie bereits beschrieben wurde, hängt der Verlauf des Kapillardrucks als Funktion der Breite, bzw. Höhe davon ab, ob hydrophobe oder hydrophile

PDMS-Oberflächen vorliegen. Tendenziell steigt der Kapillardruck bei hydrophilen PDMS-Oberflächen mit abnehmender Breite und abnehmender Höhe und nimmt bei hydrophoben Oberflächen mit abnehmender Breite bei konstanter Höhe ab. Dagegen reduziert sich die mittlere Geschwindigkeit in jedem Fall mit abnehmender Breite und Höhe. Diese gegenläufigen Effekte erschweren es, einen generellen Trend für das Fließverhalten in Abhängigkeit der geometrischen Faktoren anzugeben. An einem Beispiel wird verdeutlicht, dass ein Kompromiss zwischen Zeitbedarf und Befüllungsgarantie gefunden werden muss. Verglichen wird die mittlere Geschwindigkeit U aus Gleichung 4.13, die das Verhältnis aus Volumenstrom zu Kapillarquerschnittsfläche $b \cdot c$ bei einer Flüssigkeitssäule der Länge $l = 5 \text{ mm}$ angibt und die Zeit t aus Gleichung 4.15, die die Flüssigkeit benötigt, um eine Länge $l = 5 \text{ mm}$ der Kapillare zu füllen (für Struktur 1 mit $b = 15 \text{ }\mu\text{m}$, $c = 3 \text{ }\mu\text{m}$ und für Struktur 4A mit $b = 1 \text{ }\mu\text{m}$, $c = 4 \text{ }\mu\text{m}$).

$$U = \frac{dz}{dt} = \frac{C_g \Delta p}{\eta l} \quad (4.13)$$

mit

$$C_g = \frac{c^2}{4} \left[\frac{1}{3} - \frac{c}{b} \frac{64}{\pi^5} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\tanh\left(\frac{\pi(2n-1)b}{2c}\right)}{(2n-1)^5} \right] \quad (4.14)$$

Die Zeit t , angegeben in Gleichung 4.15 erhält man aus Integration von Gleichung 4.13.

$$t = \frac{\eta}{2 \cdot \Delta p \cdot C_g} \cdot l^2 \quad (4.15)$$

Zum anschaulichen Vergleich werden die Ergebnisse in tabellarischer Form aufgeführt. Die Werte in Tabelle 4.1 beziehen sich auf ideal hydrophilisiertes PDMS mit $\theta = 0^\circ$, Tabelle 4.2 wurde mit $\theta = 110^\circ$ für hydrophobes PDMS berechnet. Für das als ideal hydrophil angenommene Glassubstrat wurde $\theta' = 0^\circ$ eingesetzt und für die Viskosität η wurde der Wert für Wasser mit $\eta = 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ zur Berechnung verwendet. Die Füllgeschwindigkeit U ist umgekehrt proportional zur

Struktur	Breite b (μm)	Höhe c (μm)	C_g (μm^2)	Δp (kPa)	U ($\frac{mm}{s}$)	t (s)
1	15	3	0,66	56	7,39	0,34
4A	1	4	0,07	175	2,45	1,02

Tabelle 4.1: Berechnung für hydrophiles PDMS ($\theta = 0^\circ$); $l = 5$ mm.

Struktur	Breite b (μm)	Höhe c (μm)	C_g (μm^2)	Δp (kPa)	U ($\frac{mm}{s}$)	t (s)
1	15	3	0,66	12,6	1,61	1,56
4A	1	4	0,07	(-36,37)	(-0,51)	(-4,91)

Tabelle 4.2: Berechnung für hydrophobes PDMS ($\theta = 110^\circ$); $l = 5$ mm.

Viskosität η und zur Länge l der Flüssigkeitssäule. Sie nimmt also ab, je viskoser die Flüssigkeit ist und je mehr die Kapillare gefüllt wird. U ist proportional zu dem geometrischen Faktor C_g , der zusammen mit der Viskosität η ein dissipativer Faktor ist, und ist proportional zu dem Kapillardruck, der in Gleichung 4.7 angegeben ist. Vergleicht man die Werte für die mittlere Geschwindigkeit U in Tabelle 4.1 für die Kapillare mit vollständig hydrophilen Oberflächen, wird deutlich, dass die Größe der Kapillare nicht nur Einfluss auf den Kapillardruck nimmt, sondern auch die Füllgeschwindigkeit dadurch bestimmt, dass die Kapillargröße in den geometrischen Faktor C_g eingeht. Beispielsweise nimmt der Kapillardruck $p_{cap} = 175$ kPa für Struktur 4A mit einem geometrischen Faktor von $C_g = 0,07$ μm^2 den ca. dreifachen Wert des Kapillardrucks $p_{cap} = 56$ kPa der Struktur 1 an, wobei der geometrische Faktor der Struktur 4A nur ca. ein Neuntel des geometrischen Faktors der Struktur 1 mit $C_g = 0,66$ μm^2 annimmt. Umgekehrt beträgt bei der partiell hydrophoben Kapillare der Kapillardruck des größeren Kanals (Struktur 1) $p_{cap} = 12,6$ kPa, wogegen sich für den kleineren Kanal (Struktur 4A) rechnerisch ein deutlich kleinerer Wert von $p_{cap} = -36,37$ kPa ergibt, was physikalisch bedeutet, dass sich diese Kapillare nicht mit dieser Flüssigkeit füllen wird. Analog zeigt sich dieses Verhalten bei der Betrachtung der Befüllungszeiten t , die rechnerisch für Kapillaren von wenigen mm Länge in der Größenordnung von Sekunden liegen. Diese Ergebnisse wurden experimentell von Delamarche *et al.* [118] und Kim *et al.* [117] für wässrige Lösungen bestätigt. Um eine kurze

Abschätzung für die mittlere Geschwindigkeit U und die Befüllungszeit t durchzuführen, kann man den Faktor C_g aus Gleichung 4.14 zu Ausdruck 4.16 nähern. Zur Berechnung der mittleren Geschwindigkeit U und der Befüllungsdauer wurde in den Gleichungen 4.13 und 4.15 $C_g \approx \tilde{C}_g$ eingesetzt. Bei dieser Näherung wird der dissipative Term C_g , der den Einfluss der Geometrie beschreibt, näherungsweise durch den hydraulischen Radius $R_H = \frac{2bc}{b+c}$ ausgedrückt, der das Verhältnis der vierfachen Querschnittsfläche zu der benetzten Umfanglänge des Querschnitts der Kapillare angibt [122].

$$\tilde{C}_g = \frac{1}{32} \cdot R_H^2 = \frac{1}{32} \cdot \left(\frac{2 \cdot b \cdot c}{b+c}\right)^2 \quad (4.16)$$

Für die hier betrachteten Systeme ist der Fehler bei der Berechnung der mittleren Geschwindigkeit und der Befüllungsdauer kleiner als 16 %.

Ein Maß für den Einfluss der dynamischen Viskosität η auf die Strömungsform wird durch die dimensionslose Reynoldssche Zahl Re gegeben, die als Verhältnis des Trägheitsterms zu dem Zähigkeitsterm der Navier–Stokes–Gleichungen 4.8 ausgedrückt werden kann. Der Wert der Reynoldsschen Zahl Re wird nach Gleichung 4.17 berechnet, wobei in diesem Fall für die systemcharakteristische Länge L der hydraulische Radius R_H der Kapillare eingesetzt wird [122, 123].

$$Re = \frac{U \cdot L \cdot \rho}{\eta} = \frac{U \cdot R_H \cdot \rho}{\eta} \quad (4.17)$$

Unterhalb eines problemspezifischen Schwellwertes, der kritischen Reynoldsschen Zahl Re_{krit} , beobachtet man geradlinige, zur Rohrwand parallele Teilchenbahnen mit einem schichtenförmigen oder laminaren Strömungsverlauf. Wird der Wert der kritischen Reynoldsschen Zahl überschritten, wird die Strömung turbulent. Diese Strömungsform ist gekennzeichnet durch eine stark erhöhte Diffusion, Instationarität der wirbelbehafteten Strömungen und durch stochastisches Verhalten der Strömungsgrößen. Als Richtwert von Re_{krit} unter technischen Bedingungen

wird in [122] ein Wert von $Re_{krit} = 2300$ angegeben. Berechnet man z.B. aus den Werten der Tabelle 4.2 die Reynoldssche Zahl für die Befüllung der Kapillarstruktur 1 mit Wasser, ergibt sich ein Wert von $Re = 8 \cdot 10^{-3}$ für $l = 5 \text{ mm}$. Da die mittlere Geschwindigkeit U reziprok von der Länge der Flüssigkeitssäule l in der Kapillare abhängt, nimmt auch die Reynoldssche Zahl Re mit zunehmender Länge l ab. Da die Reynoldssche Zahl der betrachteten mikrofluiden Systeme um Größenordnungen kleiner ist als die kritische Reynoldssche Zahl, ist die Strömungsform in der Kapillare laminar und somit diese Voraussetzung für die Berechnung der angeführten Strömungsgrößen erfüllt.

Die Bereiche des Systems, die keine freien Oberflächen beinhalten, sollten trotz der vernachlässigten Einflüsse wie z.B. Oberflächenrauigkeiten oder Krümmungen in der Kapillarstruktur näherungsweise gut durch die angeführte Berechnung beschrieben werden können. Für den Bereich der Flüssigkeitsfront, die sich durch die Kapillare bewegt, verliert die oben angeführte Lösung ihre Gültigkeit, da in Anwesenheit freier Oberflächen, die das Phänomen der Oberflächen- bzw. Kapillarspannung zeigen, der Einfluss der Massenkraft in der Berechnung nicht eliminiert werden kann.

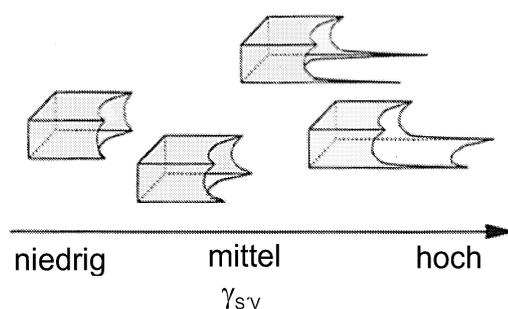


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der Laufmittelfronten in einer rechteckigen Kapillaren als Funktion der Grenzflächenspannung des Substrats γ_{SV} (aus [124]).

Nach der Betrachtung des Fließverhaltens der Flüssigkeitssäule in der Mikro-

kapillaren, soll nun die Form der Flüssigkeitsfront untersucht werden, die von den Grenzflächenspannungen γ_i abhängt [85]. Der Zusammenhang wurde qualitativ von Kim *et al.* [124] charakterisiert, die Alkanthiolat-SAMs mit verschiedenen terminalen Kopfgruppen auf Au/Ti/SiO₂/Si-Substraten verwendeten, um die Grenzflächenspannung $\gamma_{S'V}$ zu variieren, und die Kanäle mit einem flüssigen Präpolymer von Polyurethan füllten, um die Form der Laufmittelfront zu untersuchen. Der Kontaktwinkel des verwendeten flüssigen Präpolymers von Polyurethan auf PDMS beträgt $\theta_{advancing} = 58^\circ$ [124].

Abbildung 4.14 zeigt in schematischer Darstellung die Formen der Lauffronten des Präpolymers für verschiedene Grenzflächenspannungen des Substrats. Mit zunehmender Grenzflächenspannung $\gamma_{S'V}$, also nach Gleichung 4.4 mit abnehmendem Kontaktwinkel θ' zwischen Präpolymer und Substrat, ist der vorauslaufende Fluss in den Ecken stärker ausgeprägt und zeigt schließlich einen gleitenden Film auf dem Substrat, wobei die konkave Krümmung der Flüssigkeitsfront beibehalten wird. Dieses Benetzungsverhalten wurde durch die eigenen Unter-

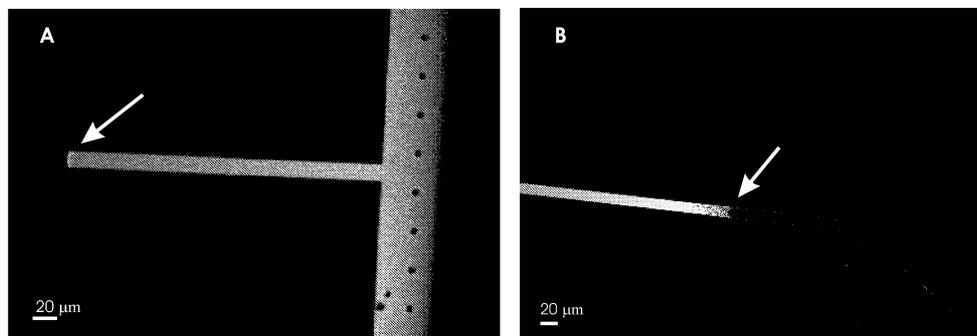


Abbildung 4.15: Profile der Flüssigkeitslaufprofile einer 5-(6)-FAM-Lösung bei der Verwendung von hydrophoben (A) und hydrophilen (B) PDMS-Oberflächen.

suchungen bestätigt, die mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop aufgenommen wurden. Bei der Befüllung einer Kapillare, die aus einer unbehandelten, also hydrophoben PDMS-Gussform und einem Glassubstrat besteht, mit einer

wässrigen 5-(6)-FAM-Lösung ($0,12 \frac{mg}{ml}$) zeigte sich, wie in Abbildung 4.15 A dargestellt wird, eine konvexe Lauffront. Wird die PDMS-Gussform zuvor im O_2 -Plasma hydroxiliert (s. Kapitel 4.2.3) und durch die Hydrophilisierung der Wert der Grenzflächenspannung γ_{SV} erhöht, tritt die anfängliche Befüllung der Kapillare in den Ecken ein, gefolgt von der kompletten Flüssigkeitssäule. Das konkave Profil der Lauffront ist in Abbildung 4.15 B zu erkennen. Die Glassubstrate wurden in beiden Fällen auf gleiche Weise vorbehandelt (s. 4.1.1) und hatten demnach theoretisch die gleiche Grenzflächenspannung.

Neben dem beschriebenen Einfluss, der sich aus der Instationarität der Grenzflächenspannung des hydrophilisierten PDMS ergibt, sind weitere Abweichungen von dem aufgezeigten, idealen Fließverhalten einer Flüssigkeit in einer Mikrokapillare zu erwarten. Diese sollen im Folgenden aufgeführt werden.

Beispielsweise bewirken Grenzflächenspannungsgradienten einen Fluss, der nicht auf die Kapillarwirkung zurückzuführen ist. Er wird üblicherweise als Marangoni-Fluss bezeichnet und bewirkt eine spontane Fließbewegung der Flüssigkeit von Regionen mit niedriger zu höherer Grenzflächenspannung [120]. Auch Inhomogenitäten der chemischen Komposition der Oberflächen und Variationen der Geometrie der Festkörperoberflächen führen dazu, dass insgesamt Abweichungen von der vereinfachten Betrachtung zu erwarten sind.

Eine weitere Abweichung von dem durch die Navier-Stokes-Gleichungen 4.8 beschriebenen Fließverhalten in einer Mikrokapillare wurde von Chun Yang *et al.* [125] beschrieben, die den Einfluss elektrokinetischer Effekte auf den Fluss einer Flüssigkeit in Mikrokanälen untersuchten. Der Einfluss des Feldes der elektrischen Doppelschicht (EDL), der Kanalgröße und der statischen elektrischen Ladungen auf die Flüssigkeitgeschwindigkeitsverteilung, das Strömungspotential, den Volumenstrom und die Reibungskoeffizienten wird durch einen zusätzlichen Kraftterm beschrieben, der den Navier-Stokes-Gleichungen 4.8 hinzugefügt wird und direkt proportional zum Strömungspotential und der Nettoladungsdichte auf den Wänden ist. Die Autoren beschreiben, dass unter Berücksichtigung des

EDL-Einflusses signifikante Effekte auf das Flüssigkeitsprofil zu erwarten sind. So sei die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit in der Nähe der Kapillarwände annähernd Null aufgrund der durch die Wirkung des EDL-Feldes und des induzierten Strömungspotentials erhöhten Reibung. Außerdem sind erhebliche Abweichungen des klassischen Geschwindigkeitsprofils 4.12 in den Ecken des Kanals zu erwarten. Für das Fallbeispiel mit einem elektrokinetischen Durchmesser $D_E = \frac{2 \cdot R_H}{d_L}$ von 24,7, der den Quotienten aus dem zweifachen, hydraulischen Radius R_H der Kapillare und der Dicke der Debye-Hückel-Schicht d_L angibt, wird eine Abnahme der maximalen Geschwindigkeit bei Berücksichtigung der elektrokinetischen Effekte von 25% angegeben. Es wird angenommen, dass es ein kritischer Wert für den elektrokinetischen Durchmesser D_E existiert, bei dem der zusätzlich auftretende Strömungswiderstand maximal ist.

Der hydraulische Radius R_H der in der vorliegenden Arbeit am häufigsten verwendeten Kapillarstruktur 1 (s. Anhang A.1) beträgt $R_H = \frac{2bc}{b+c} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$.

Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben wird, nimmt die Debye-Länge d_L nach Gleichung 5.7 beispielsweise für den verwendeten Puffer von 10 mM NaCl einen Wert von $d_L = 3 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ an. Somit beträgt der elektrokinetische Durchmesser $D_E = \frac{2 \cdot R_H}{d_L} = 3300$ für Struktur 1 und der beschriebene Einfluss des EDL-Feldes auf das Fließverhalten kann bei der verwendeten Struktur vernachlässigt werden. Sollten allerdings im Zuge des Miniaturisierungsbestrebens kleinere Strukturen eingesetzt werden, die einen niedrigeren hydraulischen Radius R_H aufweisen, oder Puffer mit geringerer Ionenkonzentration verwendet werden, die eine größere diffuse elektrische Doppelschicht aufweisen, so verringert sich der elektrokinetische Durchmesser D_E entsprechend. In diesem Fall sollten die von Chun Yang *et al.* beschriebenen Effekte bei der Betrachtung des Fließverhaltens einer Flüssigkeit in einer rechteckigen Mikrokapillare berücksichtigt werden.

Mit einer elektroosmotischen Durchflusskontrolle könnte der Durchfluss geladener Vesikel in der Kapillare beschleunigt werden oder eine Auftrennung von geladenen und neutralen Vesikeln in dem Kanal erreicht werden. Der druckgetriebene

Durchfluss ist zwar leicht und flexibel einsetzbar und weitgehend unabhängig von Ionenstärke, pH -Wert und Oberflächenkontaminationen, aber häufig aufgrund seines paraboloiden Geschwindigkeitsprofils besonders in rechteckigen Kapillaren unzureichend kontrollierbar. Im Vergleich dazu ist der elektroosmotische Fluss extrem abhängig von möglichen Veränderungen der Oberflächenladungen durch Kontamination oder Adhäsion des Analyten, bietet aber ein stumpfes Geschwindigkeitsprofil, das weitgehend unabhängig von der Geometrie der Kapillare ist [126]. Da beide Möglichkeiten der Durchflusskontrolle unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen, muss im Einzelfall der entsprechenden Anwendung abgewogen werden, welcher Durchflussantrieb günstig eingesetzt werden kann. Auch ein auf kontrollierter Diffusion basierender Gradientenmischer, wie er von Jeon *et al.* [127] beschrieben wird, ist für die Mikrostrukturierung künstlicher Membranen von Interesse, da so definierte Konzentrationsgradienten in der Komposition der Lipide oder der Rezeptorkonzentration einfach erzeugt werden können.

4.3.2 Die Wahl der geeigneten Replikatstruktur

Bei der Konzipierung neuer Master-Strukturen müssen zusätzlich zu der hydrodynamischen Betrachtung auch einige Stabilitätskriterien beachtet werden. Es gibt eine minimale Größe, bis zu der die Strukturen gut abgeformt werden können. Mit PDMS lassen sich Strukturen bis zu einer minimalen Größe von 500 nm herstellen. Kleinere Strukturen können durch die Verwendung härterer, siloxanbasierter Materialien erzeugt werden [88, 128]. Delamarche *et al.* replizierten so Strukturen bis 50 nm [113] und Xia *et al.* berichten von Strukturen bis zu 30 nm [7, 85]. Die minimale Breite der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Masterstrukturen, die in Anhang A abgebildet sind, beträgt 1 μm (Struktur 4A). Abbildung 4.16 A zeigt die stabilitätsbestimmenden Abmessungen h , d und l des PDMS-Stempels. Der repräsentative Wertebereich der Längen h , d und l beträgt nach Xia *et al.* [7] $h = 0,2 - 20 \mu m$, $d = 0,5 - 200 \mu m$ und $l = 0,5 - 200 \mu m$.

	Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3	Struktur 4A	Struktur 4B	Struktur 4
h	3	3	4	4	4	4
d	15	10	8	1	2	5
l	5	4	2,5	2	2,2	3
R_H	5	4,62	5,33	1,6	2,67	4,44
$\frac{h}{l}$	0,6	0,75	1,64	2	1,82	1,33
$\frac{d}{h}$	5	3,3	2	0,25	0,5	1,25

Tabelle 4.3: Tabellarische Aufführung der stabilitätsbestimmenden Parameter für die verwendeten Strukturen. Alle Angaben in μm .

Die Seitenverhältnisse $\frac{h}{l}$ und $\frac{d}{h}$ bestimmen die Stabilität der Struktur. Ist das Aspektverhältnis von $\frac{h}{l}$ zu groß, wird der Stempel unter seinem eigenen Gewicht zusammenfallen, wie Abbildung 4.16 B veranschaulicht. Ist das Verhältnis von $\frac{d}{h}$ zu groß, wie Abbildung 4.16 C zeigt, hängt der Stempel in der Kavität durch [129]. Ein günstiger Wertebereich für die Seitenverhältnisse ist $0,2 \leq \frac{h}{l} \leq 2$ und $\frac{d}{h} \leq 20$ [7]. Unter Berücksichtigung dieser Stabilitätskriterien wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Strukturen konzipiert, deren wichtige Längen und Seitenverhältnisse in Tabelle 4.3 aufgeführt werden. Die Strukturbreite wurde verkleinert und die Abstände zwischen den Kanälen verringert, um letztendlich die zu untersuchenden Membransegmente dem Rasterkraftmikroskop als Analysemethode zugänglicher zu machen, da so simultan mehrere Probensegmente untersucht werden können. Ein Vorteil der neuen Masterstrukturen 3 (s. Anhang A.3) und 4, 4A und 4B (s. Anhang A.4) gegenüber den Masterstrukturen 1 (s.

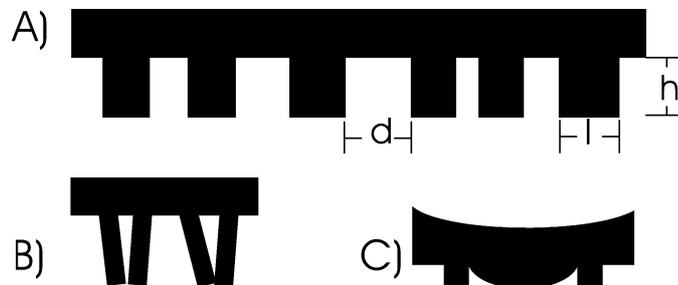


Abbildung 4.16: Stabilitätsbestimmende Abmessungen des PDMS-Stempels.

Anhang A.1) und 2 (s. Anhang A.2) ist der kürzere Zuleitungsweg, wodurch eine wesentlich geringere Befüllungsdauer entsteht (s. 4.3.1). Weitere Vorteile sind die Verkleinerung des Strömungswiderstands durch die Konzipierung von trichterförmigen Zuleitungswegen und die Verwendung mehrerer Zuleitungen für jeden einzelnen Kanal, die eine verlässliche Befüllung des Kanals gewährleisten, auch wenn einzelne Zuleitungswege verzerrt abgeformt wurden, was in Krümmungsbereichen gelegentlich auftritt. Dadurch wird häufig der Durchfluss gehemmt oder vollständig verhindert. Die absolute Verzerrung der Replikatstruktur von ihrer gewünschten Geometrie und die relativen Abweichungen der PDMS–Stempel untereinander, die während der Herstellung der Stempel oder durch elastische Verformung bei der Kontaktierung des Substrates entstehen, sind nach Rogers *et al.* [130] quantifizierbar, spielen bei den Untersuchungen in dieser Arbeit aber eine untergeordnete Rolle. Um die Durchflusszeit möglichst gering zu halten, kann zusätzlich zu der Verkürzung der Zuleitungswege der Kanal durch Anwendung eines äußeren Drucks gespült werden. Bei dem sog. vakuumunterstützten Mikroformen in Kapillaren [131] wird ein Unterdruck in dem Kanal erzeugt, der die Durchflussrate entsprechend den Betrachtungen in Kapitel 4.3.1 beschleunigt. Bei den eigenen Untersuchungen führte die Verwendung einer Peristaltikpumpe häufig zum Verlust der Haftung zwischen Substrat und PDMS–Stempel oder zur Luftblasenbildung im Mikrokanal. Daher wurde auf die Spülung der Kapillaren durch die Anwendung eines äußeren Drucks verzichtet und der Durchfluss über die Oberflächenspannungen von Substrat und Stempel gemäß den Erklärungen aus Kapitel 4.3.1 kontrolliert. Abgesehen von der Anwendung eines äußeren Drucks durch die Verwendung einer Pumpe und die Einstellung der Oberflächenspannungen von Substrat und PDMS–Stempel durch Plasma–Oxidation kann die Kontrolle des Durchflusses durch das Anlegen eines elektrischen Potentials oder lediglich über die Gravitation erfolgen [132]. Um einen Durchfluss durch die Kapillare zu gewährleisten, ist es nicht zwingend notwendig, beide Kapillarenden zu öffnen [117]. Da das Abformen der PDMS–Stempel von der Masterstruktur

einfacher wird, je weniger Aussparungen sich in dem Stempel befinden und die einzelnen Kanalstrukturen platzsparender mit kürzeren Zuleitungswegen angeordnet werden konnten, wurde bei der Konzipierung der Stempel 3, 4, 4A und 4B weitgehend auf ein zweites Flowpad pro Kanal verzichtet. Die verdrängte Luft entweicht durch das Polydimethylsiloxan. Allerdings muss eine erhöhte Durchflusszeit in Kauf genommen werden. Delamarche *et al.* [118] beschreiben, dass die Befüllung einer Kapillare mit einer Querschnittsfläche von $1 \mu\text{m}^2$ und einem geschlossenen Ende um 40 % langsamer erfolgt als die entsprechende beidseitig geöffnete Kapillare.

Über das Strömungsverhalten der Vesikel in der in die Mikrofluidik injizierte Suspension können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Die verwendeten, mit einer Polycarbonatmembran von 50 nm extrudierten und beschallten Vesikel aggregieren teilweise wieder, so dass sich auch größere Partikel in der Suspension befinden. Wahrscheinlich erfolgt eine Fraktionierung der Vesikel mit abnehmender Teilchengröße wie bei der Kapillaren Hydrodynamischen Fraktionierung (engl.: *Capillary Hydrodynamic Fractionation* (CHDF)) [133–135], die zur Größenselektion nicht geladener Teilchen mit Durchmessern in der Größenordnung von 10 nm bis zu einem Mikrometer eingesetzt wird. Kleine Teilchen bewegen sich im Lösungsmittelstrom langsamer, da sie sich statistisch betrachtet häufiger in Bereichen des Flüssigkeitsstroms bewegen, die sich weiter von der Kapillarachse entfernt befinden und in denen die Geschwindigkeit aufgrund des paraboloiden Strömungsprofils geringer ist. Größere Vesikel können sich wegen ihres größeren Durchmessers nicht so nah an den Rand bewegen [136].

Günstig ist, dass eine geringe Vesikeldichte im Lösungsmittel ausreicht, um über den Spreitprozess eine geschlossene planare Membran auf dem Substrat zu erzeugen und so einer möglichen Verstopfung der Kapillare durch eine Ansammlung überschüssiger und nicht adhärerter Vesikel vorzubeugen, wie die eigene Untersuchung ergab. Die Teilchendichte wurde so gewählt, dass beispielsweise bei einer Lipidkonzentration von $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ eine in das Flowpad einer mittleren Kapillare von

Struktur 1 injizierte Menge von 300 *nl* an Vesikelsuspension einer ≈ 14 fachen vollständigen Flächenbedeckung entspricht, wenn die Vesikel sowohl in beiden Flowpads als auch auf allen vier Wänden, also auf Glas und PDMS¹, spreiten.

In Anbetracht der angestrebten Miniaturisierung der Mikrofluidik sollte der Einfluss der Verkleinerung der Kanalbreite auf das Strömungsverhalten beachtet werden. Die Beeinflussung des Spreitverhaltens der Vesikel in der Kavität konnte bisher lediglich vermutet (vgl. Abschnitt 4.4), jedoch nicht geklärt werden. Da aber aufgrund des hydrodynamischen Fließverhaltens die Befüllung der Kanäle mit abnehmender Breite und Höhe in jedem Fall verzögert wird (s. 4.3.1), sollte bei den Untersuchungen jeweils abgewogen werden, ob die Miniaturisierung der Strukturen, wie bei der Untersuchung mit dem Rasterkraftmikroskop, Vorteile bringt, oder ob die schnelle und verlässliche Membransegment-Präparation im Vordergrund steht, da es bei den erhöhten Befüllungszeiten der kleineren Strukturen schnell zum Versiegen bzw. zum Eintrocknen des Flüssigkeitsstroms kommen kann. Wird die Probe lediglich mit optischen Untersuchungsmethoden charakterisiert, kann zugunsten kürzerer Befüllungszeiten durchaus auf die Miniaturisierung verzichtet werden.

¹Das Spreiten von Phospholipidvesikeln auf PDMS wurde z.B von Boxer *et al.* gezeigt [106].

4.4 Entwicklung und Validierung des Bindungsassays auf Basis von segmentierten Membranen

Ausgehend von der Fragestellung, ob das vorgestellte Konzept zur Generierung strukturierter Lipidmembranen auch praktisch realisierbar ist, werden zunächst die Möglichkeiten, Problematiken und Grenzen der Präparation und der optischen bzw. rasterkraftmikroskopischen Detektion besprochen. Anschließend werden in Abschnitt 4.4.1 die an dem konzipierten Bindungsassay durchgeführten Protein–Rezeptor–Bindungsstudien vorgestellt. Die in Abbildung 4.17 gezeigte

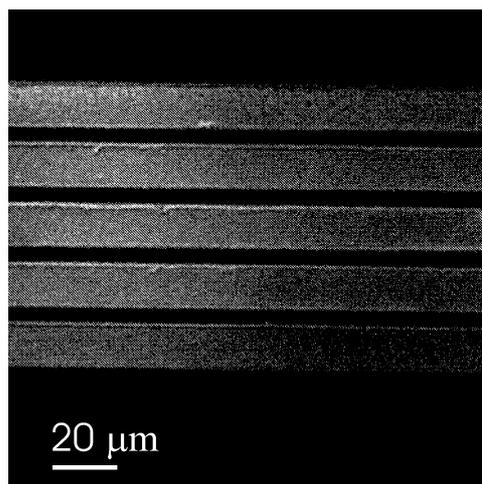


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Texas Red–DHPE dotierten DMPC–Lipidsegmenten in 10 *mM* NaCl, die mit der Struktur 1 generiert wurden.

fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von strukturierten Texas Red–x–DMPC–Membranen in 10 *mM* NaCl, die mit der Struktur 1 (s. A.1) generiert wurden, belegt, dass die Strukturierung und räumliche Trennung von Membrankompartimenten mit der beschriebenen Methode generell durchführbar ist. Die abgebil-

deten Strukturen sind, wie durch die Masterstruktur vorgegeben, $15\ \mu\text{m}$ breit und $5\ \mu\text{m}$ voneinander getrennt. Die räumliche Separation blieb auch nach der Abnahme des PDMS–Stempels über einige Wochen erhalten, wie eine Langzeitbeobachtung ergab. Die Untersuchung der Lipiddoppelschichten erfolgte jedoch immer innerhalb weniger Tage nach der Präparation der Lipidsegmente, um einen möglichen Einfluss durch Alterungserscheinungen der Probe, wie z.B. Adsorption, Kontamination oder Ablösen der Membran, auf die Messergebnisse auszuschließen. Die räumliche Stabilität der Lipidsegmente wurde sowohl bei Lipiden im Gelzustand als auch bei Lipiden in der fluiden Phase, wie z.B. POPC bei Raumtemperatur, beobachtet. Wahrscheinlich verbleibt beim Ablösen des PDMS–Stempels von dem Substrat eine Monoschicht an PDMS auf dem Glas, die die laterale Diffusion der strukturierten Lipide in diese Bereiche unterdrückt, wodurch die Streifenform der Lipiddoppelschicht erhalten bleibt.

Um beispielsweise Randeigenschaften der gespreiteten Lipidsegmente oder das hydrodynamische Verhalten der verwendeten Suspensionen zu untersuchen, wurde die vereinfachte Struktur 2 (s. Anhang A.2) verwendet, die im Folgenden charakterisiert wird. In Abbildung 4.18 sind fluoreszenzmikroskopische Momentaufnahmen von Texas Red–DHPE dotierten DMPC–Vesikeln in $10\ \text{mM}$ NaCl mit einer Konzentration von $c = 2\ \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, die sich entlang den Kapillaren der Struktur 2 bewegen, dargestellt. In der Kapillarstruktur 2 sind 300 Kanäle, die jeweils $10\ \mu\text{m}$ breit, $3\ \mu\text{m}$ hoch und $3\ \text{mm}$ lang sind, parallel in Abständen von je $4\ \mu\text{m}$ angeordnet. Alle Kapillaren enden an beiden Seiten jeweils in dem gleichen Flowpad, so dass die selektive Adressierbarkeit bei dieser Struktur nicht gegeben ist und alle Kanäle mit der gleichen Flüssigkeit befüllt werden. Ein ausgedehntes Flowpad, das als Flüssigkeitsreservoir dient, ist deutlich in Abbildung 4.18 B und in der vergrößerten Ansicht 4.18 C zu erkennen. Aus diesem Reservoir wird die Vesikellösung infolge von kapillaren Kräften durch die aus dem Flowpad abzweigenden Kanäle gezogen.

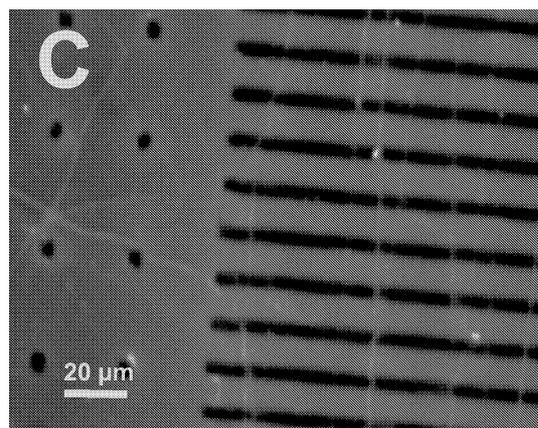
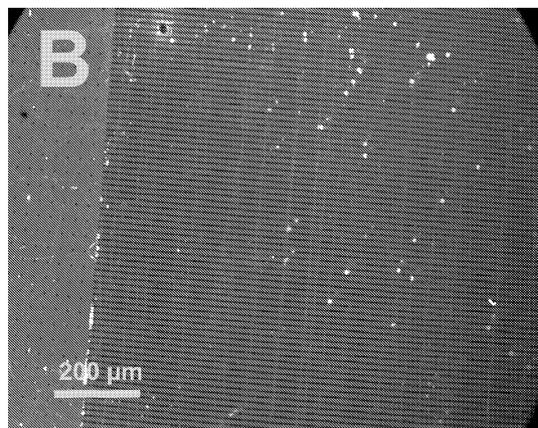
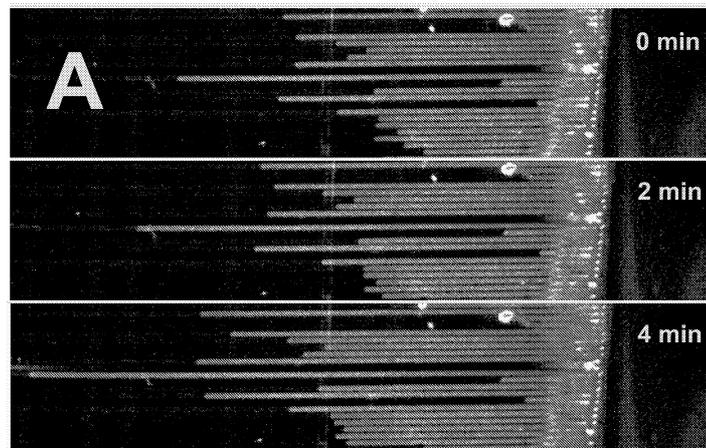


Abbildung 4.18: A: Fluoreszenzmikroskopische Momentaufnahmen von Texas Red-DHPE dotierten DMPC-Vesikeln, die sich entlang den Kapillaren der Struktur 2 bewegen; B: nach wenigen Minuten sind die Kanäle vollständig mit der Vesikelsuspension gefüllt; C: Vergrößerung von B.

Die Stabilität des Flowpads wird durch $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ große Säulen gewährleistet, die in regelmäßigen Abständen von $30 \mu\text{m}$ angeordnet sind, und in Abbildung 4.18 C deutlich als schwarze Aussparungen in dem wegen der Füllung mit fluoreszierender Vesikelsuspension farbig dargestellten Flowpad erscheinen. Außerdem ist Abbildung 4.18 C zu entnehmen, dass es bei stellenweise unzureichender Haftung zwischen PDMS–Stempel und Glassubstrat zur unerwünschten Mischung der Vesikellösungen in benachbarten Kapillaren kommen kann, wie die feinen, fluoreszierenden Verästelungen belegen. Abbildung 4.18 A zeigt Momentaufnahmen der Befüllungssequenz nach 0 min , 2 min und 4 min . Deutlich wird, dass die Befüllung der Kapillaren in einigen Kanälen kontinuierlich voranschreitet, während der Fluss in anderen Kapillaren häufig durch Verunreinigungen gehemmt wird und diese Kanäle nicht befüllt werden können. Abbildung 4.19 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der eben beschriebenen strukturierten Lipiddoppelschichten auf dem Glassubstrat nach dem Entfernen des PDMS–Stempels. Die Kanäle in Abbildung 4.19 A wurden in diesem Bereich des Stempels vollständig befüllt, so dass sich klar strukturierte Lipiddoppelschichtsegmente gebildet haben. Die Abbildungen 4.19 B und C verdeutlichen die Situation, in der es zur unvollständigen Befüllung der Kanäle in benachbarten Bereichen des Stempels und somit nur zur partiellen Ausbildung einer geschlossenen Lipiddoppelschicht gekommen ist, die auf die Verhinderung des Vesikelflusses durch die Hydrophobie des PDMS–Stempels (s. Abschnitt 4.3.1), auf die Verstopfung einzelner Kapillaren durch Vesikelanhäufungen oder auf die Verarmung der Vesikel innerhalb des winzigen Volumens ($\approx 50 \text{ Picoliter}$) zurückzuführen ist.

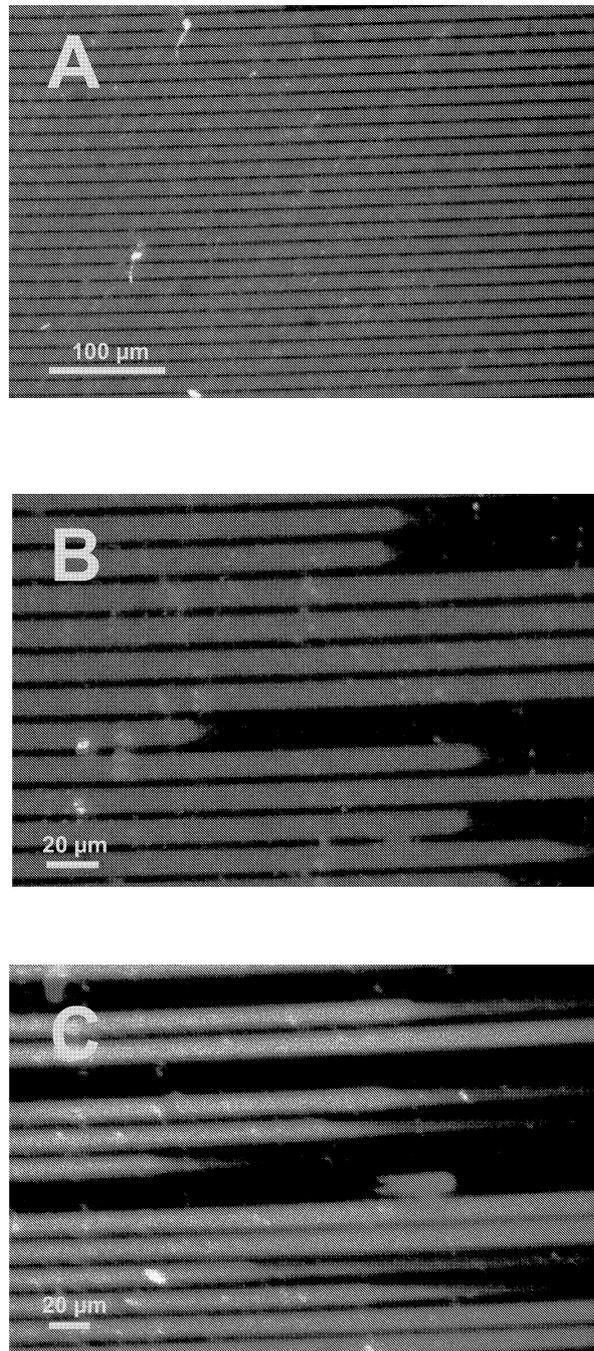


Abbildung 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der in Abbildung 4.18 beschriebenen, strukturierten Lipiddoppelschichten auf dem Glassubstrat nach dem Entfernen des PDMS-Stempels (Struktur 2).

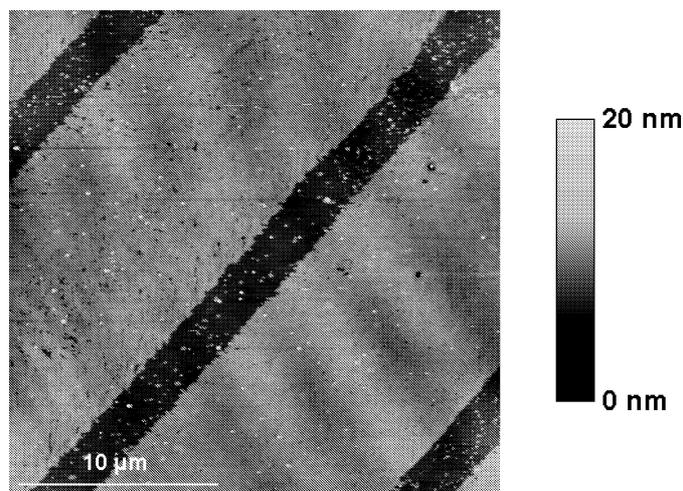


Abbildung 4.20: Rasterkraftmikroskopische Topographiefotografien (*Contact-Mode*, Höhengkala 20 nm) von strukturierten DMPC-Lipiddoppelschichten (Struktur 2).

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung wurden die Lipidsegmente rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die im *Contact-Mode* aufgenommenen Topographiefotografien in den Abbildungen 4.20 A und 4.21 A, C zeigen strukturierte Lipiddoppelschichten aus DMPC in 10 mM NaCl, die mit der in Anhang A gezeigten Struktur 2 generiert wurden. Die in Abbildung 4.21 B dargestellte Höhenanalyse, die entlang der in Abbildung 4.21 A eingezeichneten Linie gewonnen wurde, und die in Abbildung 4.21 D wiedergegebene Korrelationsanalyse, deren Daten sich auf das in Abbildung 4.21 C eingetragene Rechteck beziehen, ergeben einen mittleren Höhenunterschied von $4,2 \pm 0,5$ nm, der sehr gut mit dem theoretischen Wert für festkörperunterstützte DMPC-Doppelschichten übereinstimmt. Diese Höhenanalyse zeigt deutlich, dass sich planare Lipiddoppelschichten auf dem Glassubstrat gebildet haben.

Bei der Präparation der strukturierten Lipiddoppelschichten wurden einige Probleme beobachtet, die im Folgenden beschrieben werden. Der Abstand zwischen den Lipidstreifen sollte bei der verwendeten Struktur 2 $d = 4$ µm betragen. Da

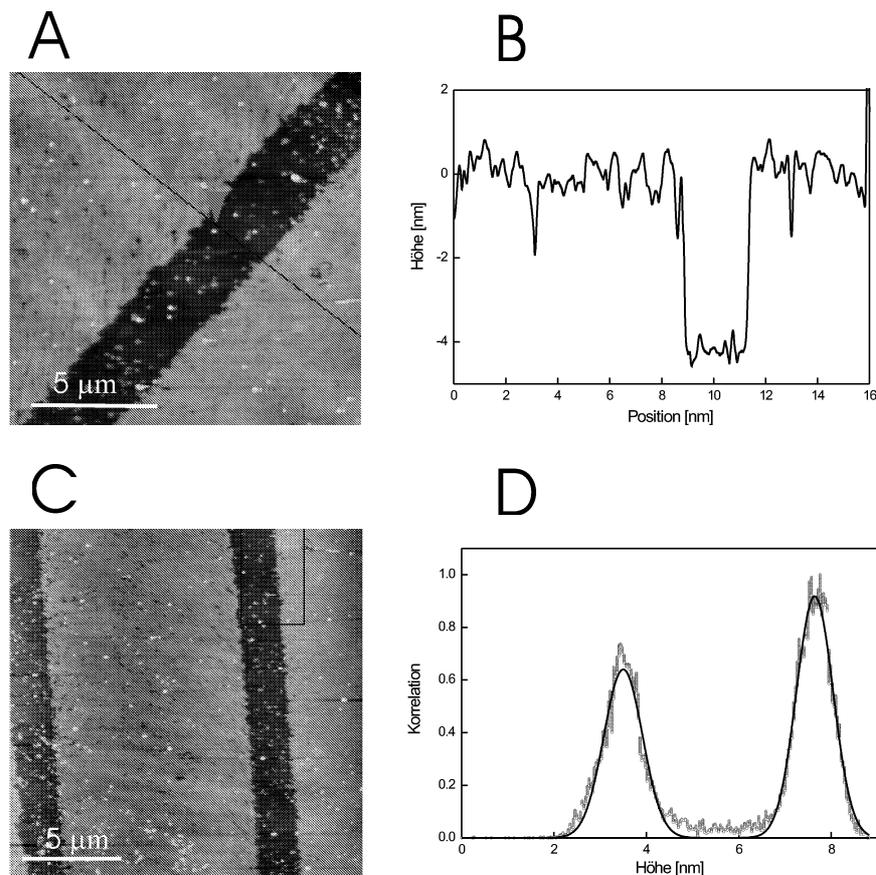


Abbildung 4.21: Topographiebilder (*Contact-Mode*, Höhenskala 20 nm) und Höhenanalyse von strukturierten Lipiddoppelschichten aus DMPC in 10 mM NaCl (Struktur 2).

der Abstand in den Experimenten, die in den Abbildungen 4.20 und 4.21 gezeigt werden, lediglich $d \approx 2\text{--}3 \mu\text{m}$ beträgt, lässt sich daraus schließen, dass entweder dieser PDMS-Stempel beim Replikatformen nicht korrekt abgeformt wurde, oder dass die Haftung zwischen dem Stempel und dem Substrat an den Rändern der aufliegenden Struktur unzureichend war und hier Vesikellösung unter den PDMS-Stempel gelangen konnte. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass überschüssige Vesikel nach dem Entfernen des PDMS-Stempels an diesen Stellen adhärten und spreiteten. Die geradlinige Berandung der Lipidstreifen spricht

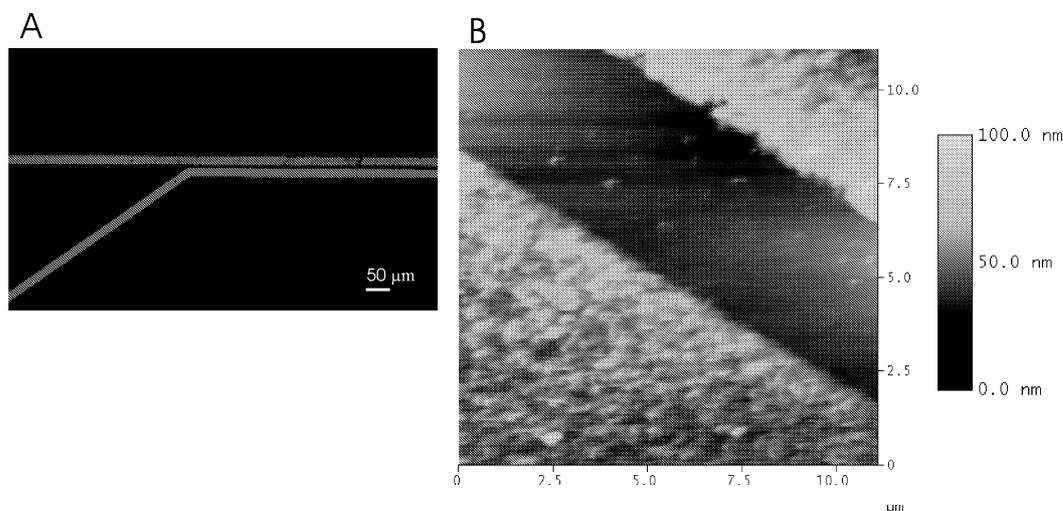


Abbildung 4.22: Fluoreszenzmikroskopische (A) und rasterkraftmikroskopische (B) Aufnahmen derselben Probe aus Bodipy-500/510- $C_{12}HPC$ dotierten DMPC-Vesikeln.

jedoch nicht für diese Annahme. Diese Situation kann aber grundsätzlich auftreten, wenn die Probe nach dem Entfernen des PDMS-Stempels nicht ausreichend gespült wird. Derartige Probleme bei der Präparation der Lipidstreifen werden anhand der Abbildungen 4.22, 4.23 und 4.24 diskutiert.

Gelegentlich lässt sich der PDMS-Stempel nicht mehr von dem Glassubstrat lösen; in diesem Fall ist die Probe für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung unbrauchbar und kann lediglich optisch charakterisiert werden. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung allein gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, ob sich planare Lipiddoppelschichten auf dem Substrat gebildet haben oder ob die Vesikel lediglich adhäriert aber nicht gespreitet sind. Diese Situation wird in Abbildung 4.22 verdeutlicht. In Abbildung 4.22 A sind zwei fluoreszierende Streifen aus Bodipy-500/510- $C_{12}HPC$ dotierten DMPC-Vesikeln in 10 mM NaCl dargestellt. Erst die rasterkraftmikroskopische Untersuchung (Abb. 4.22 B) dieser Probe ergibt, dass es sich keineswegs um eine planare Doppelschicht, sondern lediglich um eine unerwünschte Anhäufung von Vesikeln handelt (man beach-

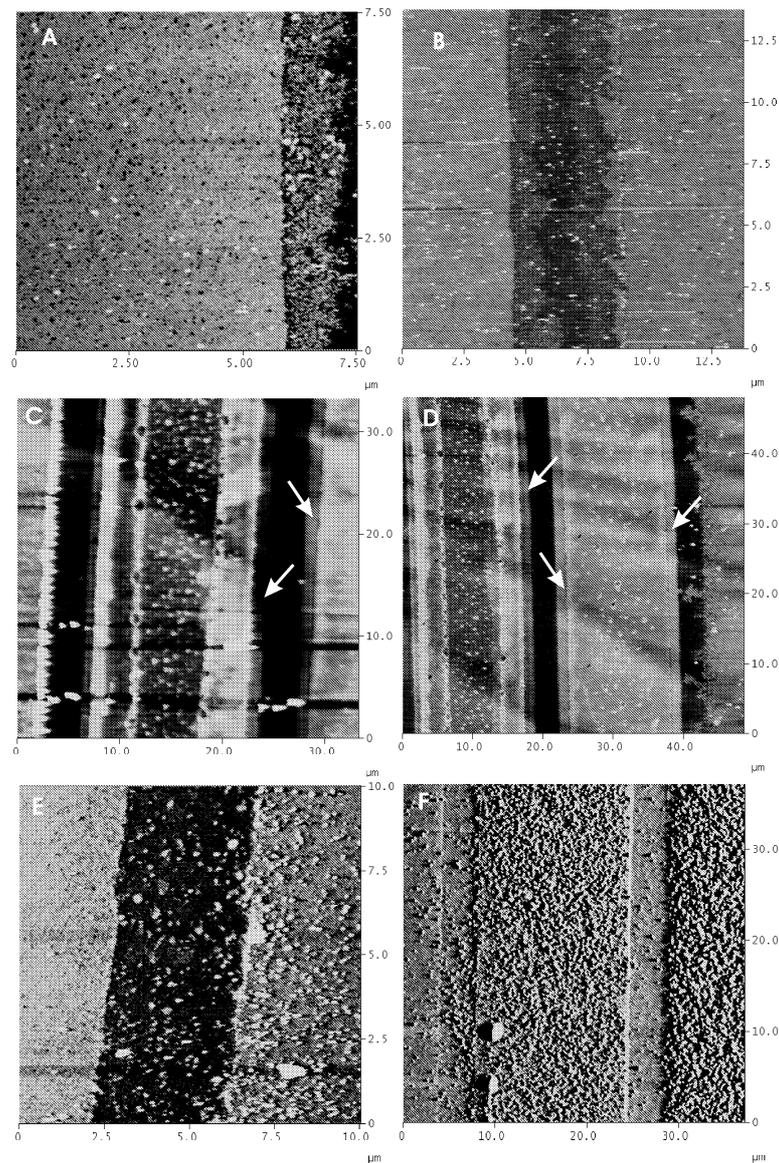


Abbildung 4.23: Rasterkraftmikroskopische Topographiefnahmen (A-E) (*Contact-Mode*; Höhengkala 20 nm) und Fehlersignal-Bild (F) von strukturierten DMPC-Lipidsegmenten.

te die Höhengkala von 100 nm). Die Abbildungen 4.23 A-E sind rasterkraftmikroskopische Topographiefnahmen (*Contact-Mode*) und Abbildung 4.23 F das AFM-Fehlersignal von DMPC-Lipidstreifen. Aus den Abbildungen 4.23 A und B

geht hervor, dass eine scharfe Berandung nicht bei jeder Präparation gelingt. Überschüssige Vesikel gelangen unter den Stempel, sofern dieser nicht vollständig auf dem Substrat aufliegt, oder werden nach der Abnahme des Stempels an diese benachbarten Stellen gespült, wo sie adhäreren und spreiten. Für die meisten Untersuchungen ist diese unscharfe Berandung nicht hinderlich, solange die Lipidstreifen aus unterschiedlichen Lipidkompositionen nicht zusammenlaufen und sich vermischen. Allerdings wird aus den Abbildungen auch deutlich, dass eine durchschnittliche, zufriedenstellende Oberflächenbelegung mit Lipid von ca. 90 % erreicht wird. Die Abbildungen 4.23 C und D verdeutlichen, dass die Mikroka-
vität Einfluss auf den Spreitvorgang nehmen kann und sich dadurch eine parallel zur Berandung durch den Stempel verlaufende Struktur (vgl. weiße Pfeile) in der Topographie der fusionierten Lipiddoppelschicht gebildet hat. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf unkorrekt von der Masterstruktur abgeformte PDMS-Stempel zurückzuführen, wurde aber glücklicherweise sehr selten beobachtet. Abbildungen 4.23 E und F stellen erneut heraus, dass es zu der Anhäufung von nicht gespreiteten Vesikeln auf der Probe kommen kann, was häufig durch unzureichendes Spülen der Probe mit dem entsprechenden Puffer nach der Abnahme des Stempels verursacht wird. Außerdem ist es wichtig, die Konzentration der Vesikel in der Suspension angemessen niedrig zu wählen, so dass die Anzahl an überschüssigen Vesikeln möglichst gering gehalten wird. Abbildung 4.24 zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder von Bodipy-x-DMPC-Lipidsegmenten (A-C) und von Bodipy-x-DPDPC-Lipidsegmenten (D) in 10 mM NaCl nach der Abnahme der Stempel. Abbildung 4.24 A verdeutlicht auftretende Abnutzungser-scheinungen des PDMS-Stempels nach häufigem Gebrauch. Durch ungleichmäßi-ge, unvollständige Haftung des PDMS-Stempels auf dem Glassubstrat kommt es zum Zusammenlaufen der verschiedenen Vesikelsuspensionen (Abbildung 4.24 B). Die Abbildungen 4.24 C und D belegen, dass das für den Spreitprozess von hoch-schmelzenden Lipiden unerlässliche Heizen der Proben problematisch sein kann, da es zur Bildung inhomogener Lipiddoppelschichten (C) oder zum Zusammen-

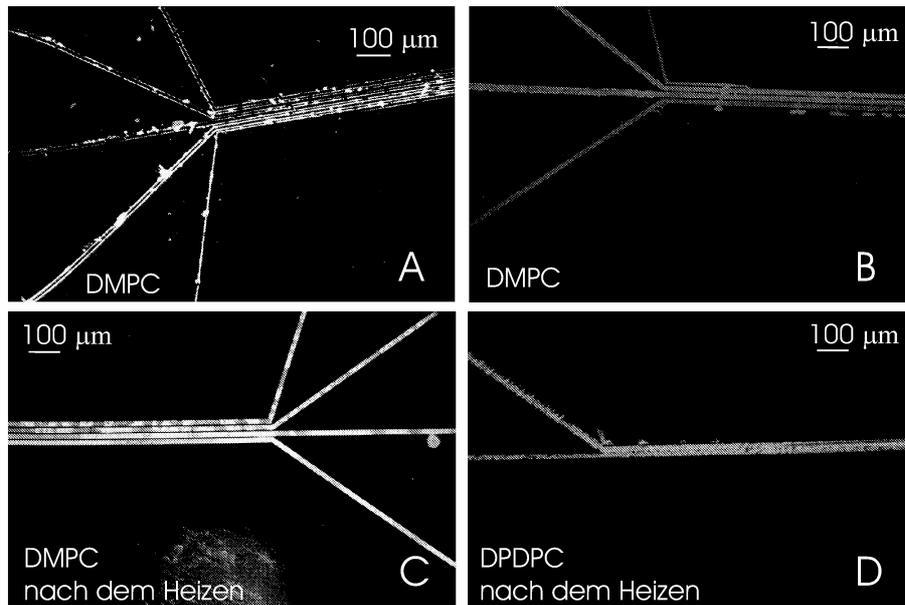


Abbildung 4.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Bodipy- x -DMPC-Lipidsegmenten (A–C) und von Bodipy- x -DPDPC-Lipidsegmenten (D) nach der Abnahme der PDMS-Stempel; (A) Abnutzungserscheinung nach häufigem Gebrauch; (B) Zusammenlaufen verschiedener Segmente; (C,D) Bildung inhomogener Doppelschichten und Zusammenlaufen der Segmente nach dem Heizen.

laufen der Lipidsegmente (D) kommen kann. Die in 4.24 C dargestellte DMPC-Probe wurde mit aufgesetztem Stempel für 5 *min* bei 60° C geheizt, während der PDMS-Stempel der in (D) abgebildeten DPDPC-Probe vor dem Heizen für 5 *min* bei 60° C entfernt wurde. Da das Heizen ohne Stempel entgegen den Beobachtungen, dass die Segmente ihre Grenzen bei Raumtemperatur beibehalten, schnell zum Zusammenlaufen der vorher räumlich getrennten Lipidsegmente führt, ist es sinnvoller die Proben mit aufgesetztem Stempel zu heizen. Da die erhöhte Temperatur die Bildung einer irreversiblen Haftung zwischen dem PDMS-Stempel und dem Substrat unterstützt, können nur kurze Heizzeiten von einigen Minuten gewählt werden, was die Präparation hochschmelzender Lipidkompositionen deutlich erschwert. Meist wird es jedoch wünschenswert sein, fluide Membra-

nen in Anlehnung an das Vorbild der biologischen Membran zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden FRAP-Messungen (engl.: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) der lateralen Beweglichkeit von Lipiden an strukturierten und unstrukturierten festkörperunterstützten Doppelschichten durchgeführt. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten D betragen $D = 0,4 \pm 0,02 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Die Strukturierung führte also nicht zu einer Immobilisierung der Lipide [137].

Zusammenfassend betrachtet können die meisten Probleme, die bei dieser Strukturierungsmethode auftreten, vermieden werden, indem die Probe mit hinreichender Menge an Flüssigkeit gespült wird und die präparativen, kompositionsabhängigen Parameter wie z.B. Vesikelkonzentration und Inkubationsdauer der Vesikel bis zum Entfernen des PDMS-Stempels für jedes Probensystem einzeln festgelegt werden, bevor es routinemäßig verwendet wird. Der PDMS-Stempel sollte gelegentlich optisch auf Abnutzungs- oder Alterungserscheinungen untersucht werden, um sicherzugehen, dass die Strukturgrenzen noch unbeschädigt sind. Abschließend lässt sich feststellen, dass die rasterkraftmikroskopische Untersuchung den Vorteil in sich birgt, dass der einwandfreie Zustand des Assays zuverlässig gewährleistet ist, wenn es beispielsweise für Protein-Rezeptor-Bindungsstudien eingesetzt wird.

4.4.1 Protein–Rezeptor–Bindungsstudien

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten, spezifischen Protein–Rezeptorbindungsstudien beschrieben. Zunächst wurde die Bindung des Lektins PNA an asialo- G_{M1} -haltige Membranen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abbildung 4.25 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnah-

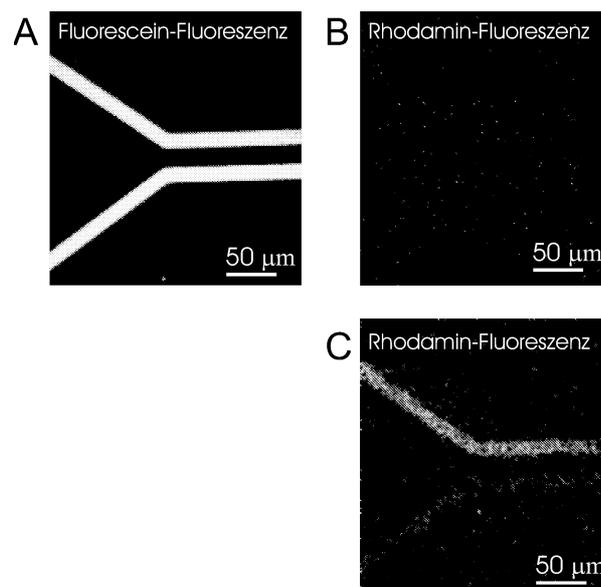


Abbildung 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier Lipidmembransegmente aus DMPC/asialo- G_{M1} /Bodipy (oberes Segment) sowie DMPC/Bodipy (unteres Segment) in der Fluorescein-Fluoreszenz (A) und in der Rhodamin-Fluoreszenz vor (B) und nach (C) der Zugabe des TRITC-x-PNA-Proteins.

men zweier Lipidmembransegmente aus DMPC mit 4 *mol%* des Rezeptors asialo- G_{M1} und 1 *mol%* des Fluorophors Bodipy-500/510- C_{12} HPC (oberes Segment) sowie DMPC mit 1 *mol%* Bodipy (unteres Segment) in der Fluorescein-Fluoreszenz (FITC-Fluoreszenz) (Abb. 4.25 A) und in der Rhodamin-Fluoreszenz (TRITC-Fluoreszenz) (Abb. 4.25 B) vor Zugabe des PNA-Proteins. Die spektrale Trennung der FITC- bzw. TRITC-Fluoreszenz wurde durch die Verwendung entsprechender Filtersätze erreicht. Nach einer 10-minütigen Inkubation von 0,3 μ M

TRITC-x-PNA ist die spezifische Bindung des Lektins an die rezeptortragende Membran durch die starke Intensitätszunahme der Rhodamin-Fluoreszenz des oberen Lipidsegmentes (Abb. 4.25 C) deutlich zu erkennen.

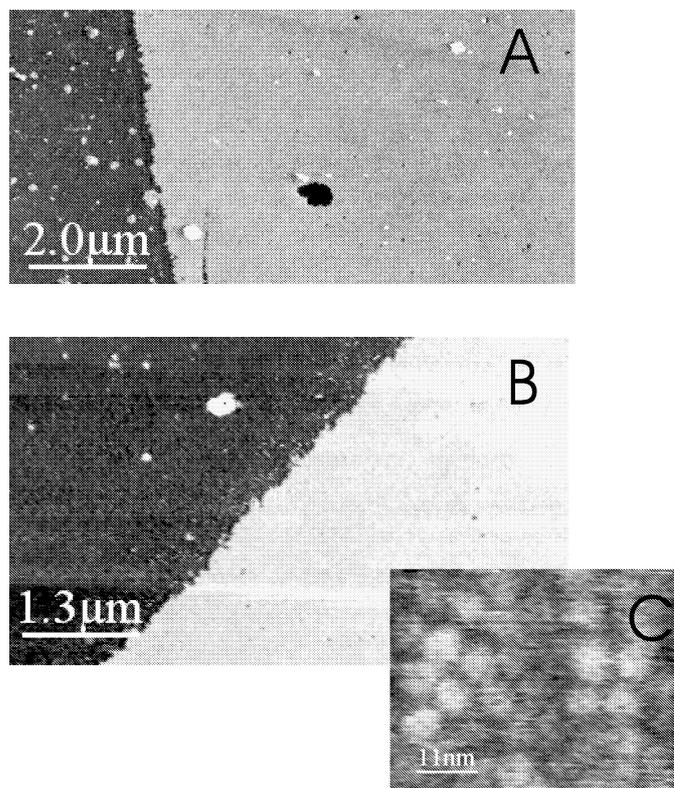


Abbildung 4.26: Rasterkraftmikroskopische Topographiefotografien (*Intermittent-Contact-Mode*, Höhenskala 14 nm) von Ausschnitten eines DMPC/ G_{M1} -Lipidmembransegmentes auf einem Glassubstrat (A) vor und (B,C) nach Zugabe von 3 nM Cholera Toxin (B-Oligomer). Die Abbildung der einzelnen B-Oligomere (C) im AFM-Fehlersignal belegt die spezifische Bindung des Toxins.

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Lipid-Protein-Wechselwirkung besitzt gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie und anderen optischen Methoden den Vorteil, mit molekularer Auflösung nicht nur die Detektion der Proteine anhand der Höhenänderung sondern auch deren zweifelsfreie Identifizierung durch

Einzelmolekülnachweis anhand der Konformation der Proteine zu ermöglichen. Als weiteres System wurde die spezifische Bindung der B-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) an G_{M1} -haltige Membranen untersucht.

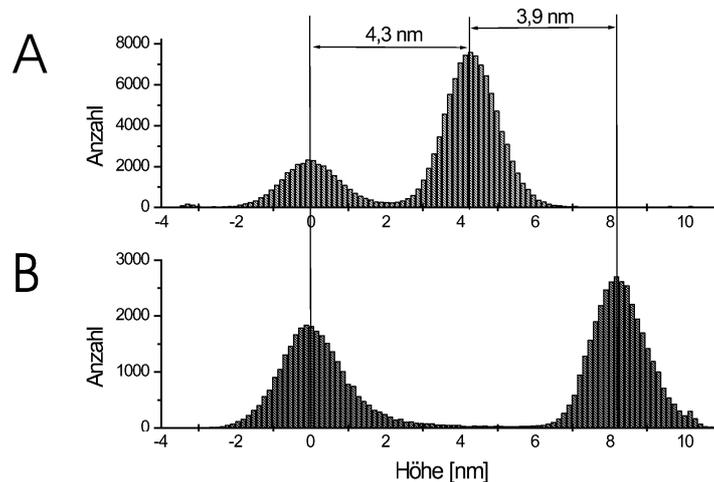


Abbildung 4.27: Histogramme der in Abbildung 4.26 gezeigten Topographieaufnahmen (A) vor Proteinzugabe und (B) nach der Proteinadsorption.

Abbildung 4.26 zeigt rasterkraftmikroskopische Topographieuntersuchungen von Lipidsegmenten aus DMPC mit 2 mol% G_{M1} auf einem Glas-Substrat vor (Abb. 4.26 A) und nach (Abb. 4.26 B,C) der Zugabe von 3 nM CTB. Zur Höhenanalyse (Abb. 4.27) wurden die mittleren Höhen von Substrat und Membran vor (Abb. 4.26 A) und nach (Abb. 4.26 B) der Proteinzugabe durch Anpassen von Gaußfunktionen an die Daten ermittelt. Die Differenz ergab für die DMPC/ G_{M1} -Membran ohne Protein eine mittlere Höhe von 4,3 nm und nach Inkubation des CTBs einen Wert von 8,2 nm. Die mittlere Höhenzunahme von 3,9 nm stimmt gut mit den röntgendiffraktometrisch bestimmten Daten [22] für die Proteinhöhe von 3,5 nm (vgl. Kapitel 2.4) überein. Die gemessene Abweichung kann durch den Einfluss der Hydrathülle oder durch einen Bedeckungsgrad der Probe von mehr als einer Monolage entstehen. Die spezifische Bindung des Proteins wird durch die

integrale Bestimmung der Membranhöhe ausgedrückt und durch die Abbildung der Einzelproteine (Abb. 4.26 C (AFM-Fehlersignal)) anhand der Form und des Radius der Moleküle (ca. 6 nm) bestätigt. Das Membransegment aus DMPC ohne inkorporierten Rezeptor, das sich nicht in der Abbildung befindet, zeigt keine Höhenzunahme bzw. Proteinstrukturen, was die prinzipielle Anwendbarkeit des vorgestellten Arrays für Untersuchungen der Bindungsspezifität von Biomaterialien bestätigt.

Der Bedeckungsgrad der Probe und die Packungsdichte des Proteins lassen sich mit dem AFM aus der direkten Abbildung der Einzelproteine und der Höhenzunahme des Lipidsegmentes ableiten. Geeignet ist dazu auch die Kombination der rasterkraftmikroskopischen Ergebnisse mit den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, wie es anhand eines Rechenbeispiels aufgezeigt wird. Abbildung 4.28 zeigt rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen (A,C) (*Intermittent-Contact-Mode*, Höhenskala 14 nm) von Ausschnitten zweier Lipidmembransegmente auf einem Glassubstrat (A) vor und (C) nach Zugabe von 114 nM Cholera Toxin (B-Oligomer)-x-FITC. Der linke Lipidstreifen in Abbildung 4.28 A und C besteht aus DMPC mit 2 mol% G_{M1} und 1 mol% Bodipy und ist nach der Zugabe des Cholera Toxins homogen mit CTB belegt, während der rechte Streifen aus DMPC mit 1 mol% Bodipy kein Rezeptorlipid enthält und keine Proteinadsorption aufweist. Die korrespondierenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden in (B, vor Proteinzugabe) und (D, mit Protein) gezeigt und die Histogramme der Intensitäten aus 4.28 B und 4.28 D werden in Abbildung 4.29 dargestellt. Abbildung 4.29 A zeigt die Intensitätsverhältnisse der Lipidstreifen aus DMPC mit 1 mol% Bodipy (der linke Streifen in Abb. 4.28 B, D enthält 2 mol% des Rezeptors G_{M1} und 1 mol% Bodipy, der mittlere und der rechte Streifen enthalten kein Rezeptorlipid, aber auch 1 mol% Bodipy) zum Hintergrund und bezieht sich auf Abb. 4.28 B; Abb. 4.29 B bezieht sich auf die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Abb. 4.28 D und zeigt drei Intensitäts-Peaks. Der linke ergibt sich aus dem Hintergrund, der mittlere gehört zu der Fluoreszenzin-

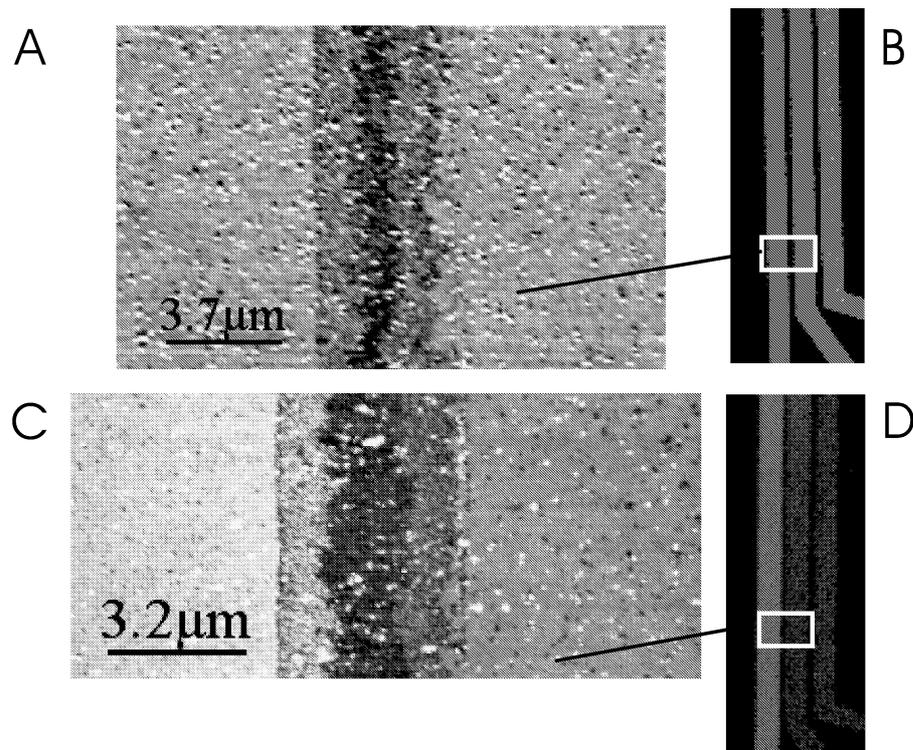


Abbildung 4.28: Rasterkraftmikroskopische Topographiefnahmen (A,C) (*Intermittent-Contact-Mode*, Höenskala 14 nm) von Ausschnitten verschiedener Lipidmembransegmente auf einem Glassubstrat (A) vor und (C) nach Zugabe von 114 nM FITC-x-Cholera Toxin (B-Oligomer) und korrespondierende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B,D).

tensität der Lipidsegmente ohne Rezeptorlipid, wobei die Intensität im Vergleich zu der Analyse vor Proteinzugabe durch das Bleichen der Fluorophore abgenommen hat. Der rechte Peak mit der höchsten Intensität ist auf das rezeptortragende Segment zurückzuführen; hier entsteht die Intensitätsdifferenz zum mittleren Peak durch die spezifische Bindung des Proteins FITC-x-CTB an die rezeptortragende Membran. Aus dem Verhältnis der Maxima der Intensitätspeaks, das in diesem konkreten Fall $\mu = 1,86$ beträgt, lässt sich der Bedeckungsgrad B der Probe mit dem Protein wie folgt berechnen:

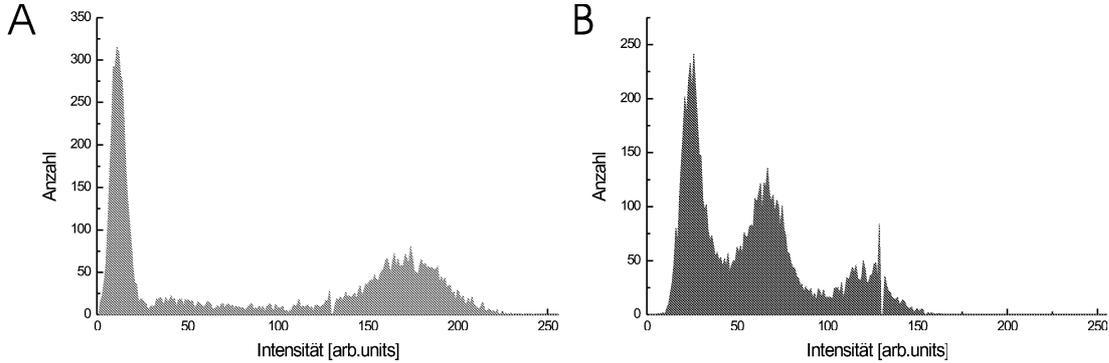


Abbildung 4.29: Histogramme der Intensitäten, die in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen 4.28 B und 4.28 D dargestellt werden und sich auf die spezifische Bindung des Proteins CTB an die rezeptortragende Membran aus DMPC/Bodipy/ G_{M1} beziehen.

Die genaue Packungsdichte der CTB-Moleküle ist in diesem Fall nicht bekannt. Es wird für die Abschätzung aber angenommen, dass sie dicht gepackt aneinanderliegen. Nimmt man für ein CTB-Oligomer den in Kapitel 2.4 angegebenen Durchmesser von $6,2 \text{ nm}$ [22] an, ergibt sich eine Flächenkonzentration an CTB-Molekülen von $\Gamma_{CTB} = 4,32 \cdot 10^{-20} \frac{\text{mol}}{\mu\text{m}^2}$. Setzt man für die DMPC-Kopfgruppen und die Bodipy-x-DMPC-Kopfgruppen jeweils eine Fläche von $0,47 \text{ nm}^2$ und für die Kopfgruppe des G_{M1} eine Fläche von $0,7 \text{ nm}^2$ voraus, erhält man unter Berücksichtigung der Molverhältnisse von 97:2:1 (DMPC: G_{M1} :Bodipy) eine Flächenkonzentration der Bodipy-Farbstoffe von $\Gamma_{Bodipy} = 3,499 \cdot 10^{-20} \frac{\text{mol}}{\mu\text{m}^2}$. Der Bedeckungsgrad B errechnet sich aus $B = \frac{\mu \cdot \Gamma_{Bodipy}}{1,3 \cdot \Gamma_{CTB}}$ und ergibt $B = 1,16$ Monolagen an FITC-x-CTB.² Der Wert dieser Abschätzung wird durch das rasterkraftmikroskopische, in Abbildung 4.28 C dargestellte, Ergebnis bestätigt. Bei dieser Abschätzung wurden die konkrete Packungsdichte des Proteins auf der Membran,

²Der Faktor 1,3 stammt aus der Dotierung der CTB-Moleküle mit den FITC-Molekülen, die nach Herstellerangaben $1,3 \text{ mol}$ Farbstoff pro mol Protein beträgt.

die Fluoreszenz–Quenching–Effekte [14] und die Differenz der Quantenausbeuten durch die Dotierung der Proteine und Lipide mit unterschiedlichen Farbstoffen vernachlässigt. In einer präzisen Berechnung des Bedeckungsgrades müssen diese Einflüsse mit einbezogen werden. Deshalb sollte bei der Durchführung der Experimente der gleiche Farbstoff für das Protein wie für die Dotierung der Lipide gewählt werden.

Kapitel 5

Kontaktmechanik an Modellmembranen

Während sich das vorhergehende Kapitel mit der Bindung von Proteinen an eine Lipidmatrix beschäftigt, stellt dieses Kapitel eine detaillierte rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Kontakt- und Stabilitätseigenschaften der Lipidmatrix selbst dar. Einleitend wird ein kurzer Überblick über die Verwendung der Kraftspektroskopie zur Untersuchung biologischer Systeme gegeben.

Die Kraftspektroskopie findet sehr häufig Anwendung in der Bestimmung der elastischen, elektrostatischen und adhäsiven Probeneigenschaften von Biomaterialien [35–37, 44]. Eindringtiefen der Messspitzen in native und artifizielle Biomembranen, die sich aus der Differenz der gemessenen Kontaktkurve zu dem Kurvenverlauf auf sehr harten Materialien ergeben, wurden ausgiebig untersucht [41, 138, 139].

Die Elastizität [139] und Viskoelastizität [38, 140] von Biomaterialien kann aus dem Verlauf der Kontaktkurve kurz nach dem Kontaktpunkt berechnet werden. Weisenhorn *et al.* quantifizierten erstmalig das Elastizitätsverhalten lebender Zellen und bestimmten den Young Modulus zu $E = 13 - 150 \text{ kPa}$ [138]. Radmacher *et al.* untersuchten eine Vielzahl an Zellen und Organellen und erhielten Werte

für den Young Modulus der untersuchten Zellen von $E = 1 - 100 \text{ kPa}$ [141]. Zudem wurden in dieser Arbeitsgruppe die Adhäsion und Elastizität von auf Glimmer adhären Enzymen analysiert und Adhäsionsbilder erstellt [142]. Die enge Korrelation zwischen Adhäsion- und Reibungskontrast wurde z.B. von Dufrene *et al.* [53] an LB-Filmen untersucht. Carpick *et al.* [143] geben eine eingehende Übersicht über die Adhäsions- und Reibungskontrastentstehung. Kraftspektroskopische Messungen der elektrostatischen Wechselwirkung, der repulsiven Hydratationskraft oder der sterischen Wechselwirkung wurden von zahlreichen Forschungsgruppen durchgeführt [63, 144–149] und bestätigten die theoretischen Vorhersagen.

5.1 Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen der Spitze–Probe–Wechselwirkung im Hinblick auf die Untersuchung mechanischer, adhäsiver und elektrostatischer Interaktionen einer AFM–Messspitze mit einer biologischen Probe kurz zusammengefasst. Die allgemeine Wechselwirkung von Körpern im nanoskaligen Bereich ist im Vergleich zu der Wechselwirkung makroskopischer Körper zum einen geprägt durch die drastische Vergrößerung des Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen der in Wechselwirkung stehenden Objekte, und zum anderen geprägt durch das Hervortreten der molekularen oder atomaren Natur der Strukturen. Insbesondere bedeutet dies, dass die chemischen Eigenschaften der Oberflächen sowie kurzreichweitige Volumenkräfte gegenüber langreichweitigen Kräften erheblich an Bedeutung gewinnen. Konsequenterweise kann die Erdschwerkraft meist vollständig vernachlässigt werden, während Wechselwirkungen, die z.B. durch die elektrische Doppelschicht (EDL) (engl.: Electrical Double Layer) hervorgerufen werden und die van–der–Waals Kraft in den Vordergrund treten. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die wichtigsten Kontinu-

umstheorien der Spitze–Probe–Wechselwirkung gegeben.

Die totale potentielle Wechselwirkungsenergie W_T zwischen der sphärischen Spitze mit Radius R und der als planar angenommenen Probe, die sich im Abstand z befindet, setzt sich näherungsweise additiv zusammen aus Beiträgen der van der Waals–Wechselwirkung W_{vdW} und der elektrostatischen Doppelschicht W_{EDL} , die üblicherweise zu der DLVO¹–Wechselwirkung zusammengefasst werden, und den nicht–DLVO–Struktur–Termen W_{St} , die z.B. kurzreichweitige Hydratations– oder sterische Wechselwirkungen [150–152] beinhalten.

$$W_T = W_{DLVO} + W_{St} = W_{vdW} + W_{EDL} + W_{St}. \quad (5.1)$$

Die verwendeten AFM–Spitzen und die biologischen Membranen tragen in wässriger Umgebung Netto–Oberflächenladungen, deren Betrag und Vorzeichen von der Temperatur, Adsorbaten und dem pH –Wert des Systems abhängen, da die funktionellen Gruppen an den Oberflächen entsprechend ihrem pK –Wert dissoziieren. Befindet sich das System in einem Elektrolyten, konzentrieren sich die jeweiligen Gegenionen an der Oberfläche.

Die entsprechenden Ausdrücke für die Kraft F zwischen Spitze und Probe wurden unter Verwendung der Derjaguin–Näherung 5.2 hergeleitet. Nach dieser Approximation ist die Kraft–Abstands–Abhängigkeit $F(z)$ zwischen zwei festen, inkompressiblen Kugeln im Abstand z mit den Radien R_1 und R_2 ($R_1, R_2 \gg z$) gegeben durch [152]

$$F(z) \approx \int_z^\infty 2\pi \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) f(x_s) dx_s = 2\pi \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) W(z). \quad (5.2)$$

Hierbei bezeichnet $W(z)$ das Potential zwischen einer Einheitsfläche und einer Ebene im Abstand z oder äquivalent die Energie $W(z)$ pro Einheitsfläche zweier Ebenen mit der Distanz z ; x_s bezeichnet den Abstand zwischen zwei Ober-

¹nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek

flächenelementen der beiden Körper. $f(x_s)$ ist die Normalkraft pro Einheitsfläche zwischen zwei Ebenen.

Lässt man eine Kugel sehr groß werden ($R_2 \gg R_1$), erhält man Gleichung 5.3, die die Kraft zwischen einer Kugel mit dem Radius $R = R_1$ im Abstand z über einer Ebene beschreibt.

$$F^{Kugel}(z) = 2\pi R W^{Ebene}(z). \quad (5.3)$$

Durch Einsetzen der nicht-retardierten van der Waals-Wechselwirkung zwischen zwei unendlichen Ebenen (Gleichung 5.4) in die Derjaguin-Näherung (Gleichung 5.3), erhält man die Kraft (Gleichung 5.5), die auf eine starre Kugel ausgeübt wird, die sich im Abstand z über einer Ebene befindet.

$$W_{vdW}^{Ebene}(z) = -\frac{H}{12\pi z^2}. \quad (5.4)$$

$$F_{vdW}^{Kugel}(z) = 2\pi R W_{vdW}^{Ebene}(z) = -\frac{HR}{6z^2}. \quad (5.5)$$

H bezeichnet die nicht-retardierte Hamaker-Konstante, die von den dielektrischen Eigenschaften der wechselwirkenden Materialien und dem Medium dazwischen abhängt und typische Werte von $0,2 \cdot 10^{-20}$ – $1 \cdot 10^{-20}$ J [146] annimmt.

Die auf eine Kugel mit Radius R wirkende elektrostatische Kraft F_{EDL} kann durch den in Gleichung 5.6 angegebenen Ausdruck genähert werden, der auf einer von Parsegian *et al.* [153] beschriebenen Gleichung basiert und für Oberflächenpotentiale < 50 mV gültig ist [144, 146, 154–156].

$$F_{EDL}(z) = \frac{2\pi d_l R}{\epsilon_0 \epsilon_r} [(\sigma_s^2 + \sigma_t^2) \cdot e^{-\frac{2z}{d_l}} + 2\sigma_s \sigma_t \cdot e^{-\frac{z}{d_l}}] \sim \sigma_s \sigma_t d_l \cdot e^{-\frac{z}{d_l}} \quad (5.6)$$

Dieser Ausdruck für F_{EDL} wurde aus dem osmotischen Druck und dem Maxwell'schen Spannungstensor abgeleitet. Für die Debye-Länge d_L , die in der Debye-

Hückel–Näherung der Entfernung entspricht, in der das Oberflächenpotential ψ auf $\frac{1}{e}$ des Anfangswertes ψ_0 abgefallen ist, gilt:

$$d_L = \sqrt{\frac{\sum \rho_i e^2}{\epsilon \epsilon_0 k T}}. \quad (5.7)$$

Es bezeichnen σ_s, σ_t die Oberflächenladungsdichten der Probe (engl.: *sample*) und der Spitze (engl.: *tip*), ϵ_0 die Influenzkonstante, ϵ_r die Dielektrische Funktion des Materials, e die Elementarladung, k die Boltzmann–Konstante, T die Temperatur und ρ_i die Ionenkonzentration der Komponente i . Gleichung 5.6 gilt für eine sphärische Spitzengeometrie. Der Einfluss abweichender Spitzengeometrien wird z.B. in dem Übersichtsartikel von Cappella [151] beschrieben.

Neben der elektrostatischen Wechselwirkung treten z.B. die elastische Deformation und die Adhäsion der beiden betrachteten Körper auf. Die gängige Beschreibung dieser Größen beruht ebenfalls auf Kontinuumsmodellen, bei denen die mikroskopische Natur unberücksichtigt bleibt. Häufig verwendet werden die Hertz–Theorie, das JKR²– und das DMT³–Modell, sowie das Modell von Maugis und die MYD⁴–Theorie. In der Theorie von Hertz [161], die sehr häufig für die Abschätzung der elastischen Parameter verwendet wird, jedoch die Adhäsion nicht berücksichtigt, ist der Kontaktradius R_K für ein Material mit einem Young Modulus E gegeben durch Gleichung 5.8, in der ν das Poisson–Verhältnis bezeichnet. Hierbei wird die Spitze als unendlich hart betrachtet ($E_{\text{Spitze}} \rightarrow \infty$).

$$R_k^3 = \frac{3 R F (1 - \nu^2)}{4 E} \quad (5.8)$$

Die Eindringtiefe z , die nach der hier verwendeten Konvention negativ ist, wird gegeben durch:

²nach Johnson, Kendall und Roberts [157]

³nach Derjaguin, Muller und Toporov [158]

⁴nach Muller, Yushchenko und Derjaguin [159, 160]

$$z^3 = \frac{\left(\frac{3(1-\nu^2)}{4E}\right)^2 F^2}{R} \quad (5.9)$$

Die Hertz Theorie berechnet den elastischen Kontakt streng genommen nicht für einen sphärischen Körper sondern für einen Paraboloiden. Sneddon [162] ist es gelungen, die Hertz–Theorie auf andere Spitzengeometrien zu erweitern, wobei die allgemeine Form des Kraftverlaufs als Funktion des Kontaktradius R_K und der Eindringtiefe z von einem geometrieabhängigen Parameter m bestimmt wird:

$$F(z) = \frac{2R_k E}{(1-\nu^2)^m} \cdot z \quad (5.10)$$

Dabei ist z.B. $m = 1$ für einen stumpfen Zylinder, $m = 2$ für eine konische Spitzenform oder $m = 1,5$ für einen Paraboloiden, für den Gleichung 5.10 direkt in die Hertz–Lösung überführt wird. Die einfachste Annahme von unveränderlichen Kontaktradien ($m = 1$) vereinfacht die Abschätzung einer Probenelastizität erheblich, da die Proben– oder Kontaktsteifigkeit $k_s = \frac{dF}{dz}$ ihre Abhängigkeit von z verliert:

$$k_s = \frac{2R_k E}{(1-\nu^2)} \quad (5.11)$$

In der von Johnson, Kendall und Roberts (JKR) [157] eingeführten Theorie werden auch Adhäsionskräfte berücksichtigt, die sich aber lediglich auf die Kontaktfläche beschränken. Dieser unstetige Verlauf der Wechselwirkung führt in diesem Modell dazu, dass am Rande des Kontaktkreises unendlich hohe Spannungen auftreten. Die Derjaguin Muller–Toporov–Theorie (DMT) [158] ist eng mit dem Hertz’schen Kontakt verwandt, berücksichtigt aber die Adhäsion. Es wird davon ausgegangen, dass sich die attraktiven Wechselwirkungen nicht auf die Verformung der Grenzflächen auswirken. Während die JKR–Theorie eine gute Näherung für den Grenzfall starker Adhäsion, großer Spitzenradien und weicher Proben darstellt und die DMT–Theorie den komplementären Grenzfall kleiner

Adhäsion, kleiner Spitzenradien und harter Proben gut charakterisiert, beschreibt die Theorie von Maugis [163] den Übergang zwischen diesen beiden Grenzfällen. Dies wird auch von dem die Derjaguin–Näherung 5.2 ausnutzenden MYD–Modell nach Muller, Yushchenko und Derjaguin [159,160] geleistet, welches zudem in der Lage ist, den Übergang von Nichtkontakt zu Kontakt konsistent zu berechnen. Ein Nachteil ist jedoch der sich aus der Lösung der elliptischen Integralgleichung ergebende erhebliche numerische Rechenaufwand.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MYD–Rechnungen durchgeführt, in denen die van der Waals–Wechselwirkung um den elektrostatischen Einfluss der elektrischen Doppelschicht erweitert wurde, um biologische Systeme, in denen die Wechselwirkung zwischen Oberflächenladungen und den Ionen der Elektrolytlösung eine große Rolle spielen, besser beschreiben zu können. Die Bedeutung dieser Ergänzung wurde bereits für den Fall konstanter *Oberflächenpotentiale* von Hughes *et al.* [164] abgeschätzt und soll hier für den Fall konstanter *Oberflächenladungsdichten* explizit berechnet werden. Dafür wurde die dem Modell zugrunde liegende van der Waals–Kraft pro Flächeneinheit um einen EDL–Druckterm nach Parsegian *et al.* [153] erweitert. Dieser Term kann in genäherter Form ($\frac{x_s}{d_l} > 1$) für die Gesamtkraft zwischen einer sphärischen Spitze und einer Probe in Gleichung 5.6 überführt werden. Gleichung 5.12 gibt den modifizierten, in der Rechnung verwendeten Druck an, der zwischen zwei Flächenelementen von planaren Halbräumen wirkt.

$$p(x_s) = \frac{H}{6\pi r_0^3} \left[\left(\frac{r_0}{x_s} \right)^9 - \left(\frac{r_0}{x_s} \right)^3 \right] + \frac{2}{\epsilon_0 \epsilon_r} \cdot \left(\frac{\sigma_s^2 + \sigma_t^2 + \sigma_s \sigma_t (e^{\frac{x_s}{d_l}} + e^{-\frac{x_s}{d_l}})}{(e^{\frac{x_s}{d_l}} - e^{-\frac{x_s}{d_l}})^2} \right) \quad (5.12)$$

Dabei steht r_0 für den Ausschlussradius durch die Pauli Repulsion. Abbildung 5.1 zeigt MYD–Rechnungen mit für Lipidmembranen typischen Parametern. Die eingesetzten Oberflächenladungsdichten betragen $\sigma_t = -0,032 \frac{C}{m^2}$ für die Si_3N_4 –Spitze [144] und $\sigma_s = \pm 0,05 \frac{C}{m^2}$ für eine hochgeladene Membranoberfläche, so-

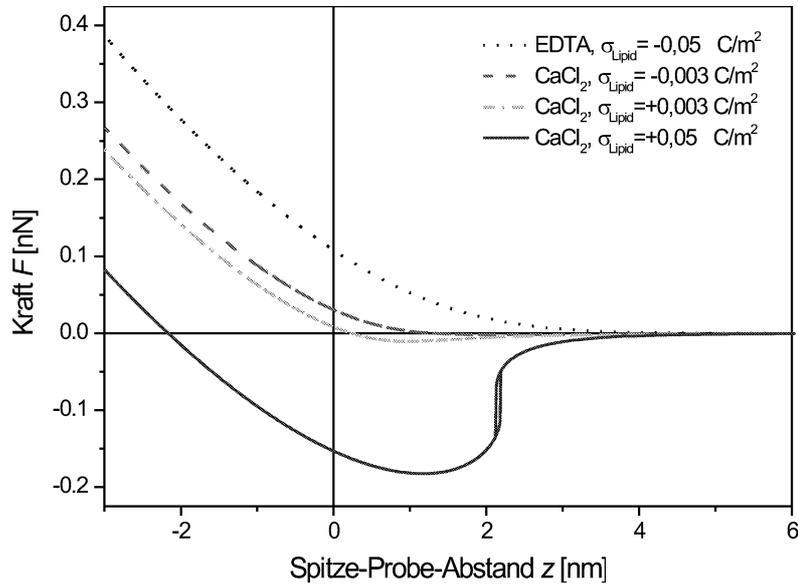


Abbildung 5.1: Berechnung der Kraft als Funktion des Spitze–Probe–Abstands nach dem Kontaktmodell von Muller, Yushchenko und Derjaguin für typische Oberflächenladungsdichten von Lipidmembranen.

wie $\sigma_s = \pm 0,003 \frac{C}{m^2}$ für eine schwachgeladene Membranoberfläche [156, 165]. Für die Probe wurde ein Young Modulus von $E_s = 5 \text{ MPa}$ und für die Spitze ein Young Modulus von $E_t = 192 \text{ GPa}$ mit einem Poisson–Verhältnis von $\nu = 0,33$ angenommen. Der Spitzenradius beträgt 20 nm . Die Rechnung wurde für eine Elektrolytkonzentration von $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$, $c(\text{Tris}) = 10 \text{ mM}$ und $c(\text{CaCl}_2 \text{ bzw. EDTA}) = 2 \text{ mM}$ durchgeführt. Für die Hamakerkonstante wurde $H = 7 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ und für den Gleichgewichtsabstand $r_0 = 0,3 \text{ nm}$ eingesetzt. Die Abbildung der Kraftverläufe zeigt signifikante Unterschiede aufgrund der Oberflächenladungsdichten. Während die stark negativ geladene Membranoberfläche (z.B. POPS in EDTA) attraktive Kräfte im betrachteten Bereich vollständig unterdrückt (das Wechselwirkungspotential wird in diesem Bereich aufgrund des

fehlenden Vorzeichenwechsels kein Minimum besitzen), ist für die schwachen absoluten Oberflächenladungsdichten eine extrem geringe Attraktion zu beobachten. Bei sehr starken positiven Oberflächenladungen (z.B. POPS in hohen CaCl_2 -Konzentrationen) ist die attraktive Kraft deutlich ausgeprägter und stark genug, um eine mechanische Instabilität bei der Deformation des weichen Probenmaterials zu bewirken. Diese äußert sich in dem unstetigen Kraftverlauf bei der Annäherung an die Probe und der beim Zurückziehen auftretenden Hysterese. Es sei angemerkt, dass die dem MYD-Modell zugrunde liegende Annahme eines elastischen Halbraums bei den typischerweise auftretenden Schichtdicken von der Doppelschicht von $\approx 5 \text{ nm}$ offensichtlich verletzt wird, wodurch ein direkter Vergleich der hier berechneten Kurven mit den experimentellen Daten erschwert wird.

5.2 Methodik zur Analyse von Spitze–Probe–Wechselwirkungen

Die folgenden Unterkapitel beschreiben einige von der Rasterkraftmikroskopie gebotenen Möglichkeiten, die in Abschnitt 5.1 angeführten Wechselwirkungen zwischen einer Messspitze und einer Probe zu untersuchen. Auf die Beschreibung der theoretischen Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie in Kapitel 3.1 aufbauend, wird zunächst das Messprinzip der Kraftspektroskopie vorgestellt und anschließend die Analyse der Kraftkurven hinsichtlich der mechanischen und elektrostatischen Eigenschaften anhand von Anwendungsbeispielen besprochen. Es werden sowohl Kraftkurven behandelt, die mit einem konventionellen AFM–Aufbau gemessen werden als auch die, die über den *Pulsed Force Mode* zugänglich sind. Die eigenen Untersuchungen fokussieren sich auf die Betrachtung der Steifigkeit und des Durchbruchverhaltens von Lipidmembranen, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem PFM gemessen wurden. Es werden Simulationen der PFM–Kraftkurven diskutiert und ein automatisches Analyseverfahren vorgestellt, mit dem die Stabilitätsparameter der untersuchten Membranen quantifiziert wurden.

5.2.1 Konventionelle Kraftspektroskopie

In der Kraftspektroskopie [44, 151] wird ein Cantilever an eine Probe heran und wieder zurückgefahren, nachdem die Spitze des Cantilevers mit der Probe in Wechselwirkung stand. Die Auslenkung des Cantilevers aus seiner Ruhelage z_d gibt Aufschluss über den jeweiligen Wechselwirkungsmechanismus zwischen Spitze und Probe als Funktion der Piezoposition z_p (s. Abb. 5.2). Sind die Sensitivität C der Photodiode und die Federkonstante k_c des Cantilevers bekannt, kann über das Hook'sche Gesetz $F = -k_c \cdot C \cdot D = -k_c \cdot z_d$ die Kraft F aus dem Photodiodensignal D bestimmt werden, die die Probe auf die Spitze ausübt. Die Kraftauflösung liegt in der Größenordnung von wenigen Piconewton. Der Spitze–

Probe–Abstand z ist der Messung nicht direkt zugänglich. Die direkt messbaren

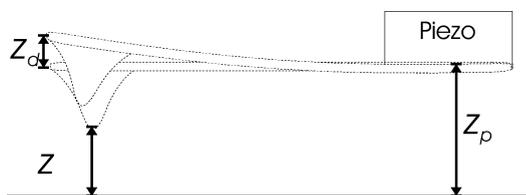


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der relevanten Abstandsparameter des modulierten Cantilevers über einer Probe.

Größen der Cantileverauslenkung z_d ($z_d < 0$ bei attraktiven Kräften) und die momentane Piezoposition z_p , die über $z_p + z_d = z$ mit dem Spitze–Probe–Abstand z korreliert sind, können nach Gleichung 5.13 umgerechnet werden, so dass sich $F(z)$ ergibt.

$$\left(\frac{k_c}{F'} - 1\right) \cdot z_d = z_p \quad (5.13)$$

Die Auslenkung des Cantilevers in Flüssigkeit beim Heranführen an eine Probe und beim Zurückziehen wird schematisch in Abbildung 5.3 dargestellt. Die linke Abbildung bezieht sich auf den Hinweg, die rechte Abbildung stellt den Rückweg dar. Die Bewegung des Cantilevers erfolgt über den Piezo mit der Amplitude A . Der Hinweg startet in der waagerechten Position (I) des Cantilevers, der infolge der hydrodynamischen Dämpfung repulsive Kräfte erfährt und nach oben ausgelenkt wird (II). Überwiegen die attraktiven Spitze–Probe–Wechselwirkungen die Repulsion, durchläuft der Cantilever die waagerechte Stellung (III) und wird zur Probe hingebogen. Ausgehend von dem elastischen Kontakt (IV) mit der Probe wird der Cantilever durch die Piezobewegung zurückgezogen und durchläuft wieder die waagerechte Stellung (V) und die zur Probe hin gerichtete Auslenkung (VI) durch die hydrodynamische Dämpfung, bis die waagerechte Stellung des Cantilevers am oberen Umkehrpunkt der Schwingung erreicht ist.

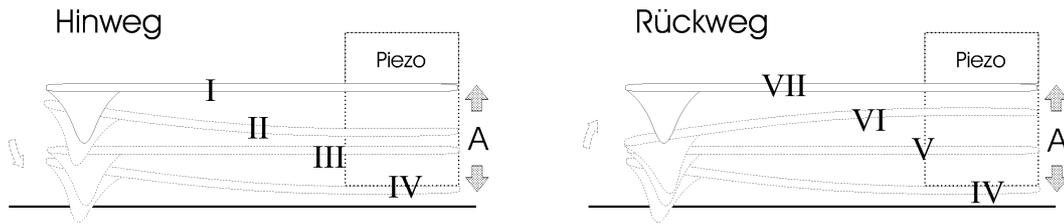


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Cantileverbewegung bei der Annäherung an eine Probe (links) und auf dem Rückweg (rechts) in Flüssigkeiten.

Der typische Verlauf des Wechselwirkungspotentials und der daraus resultierenden Kraft F als Funktion des Spitze–Probe–Abstands z wurde bereits in Kapitel 3.1 anhand von Abbildung 3.1 erläutert. Während eines Oszillationszyklus durchläuft ein Cantilever mit der Federkonstante k_c dieses Potential auf dem Hin- und Rückweg. Wird aber der Kraftgradient des Systems $k = \frac{\partial F(z)}{\partial z}$ größer als die Federkonstante des Cantilevers, werden Bereiche des Wechselwirkungspotentials übersprungen und können nicht abgebildet werden.

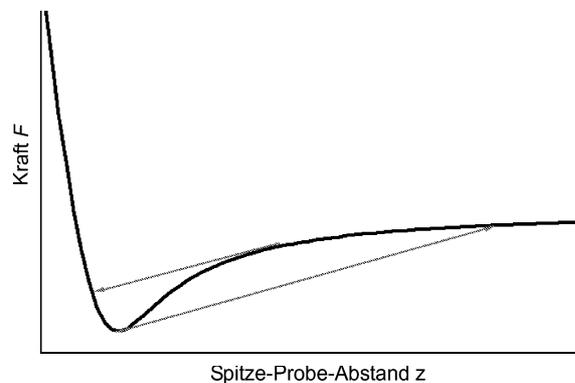


Abbildung 5.4: Instabilität bei der Kraftspektroskopie.

Abbildung 5.4 veranschaulicht das Auftreten von Instabilitäten auf dem Hin- und Rückweg der Kraftkurve. Die eingezeichneten Pfeile verdeutlichen, dass vollständige Kurven der Spitze–Probe–Wechselwirkung nicht generell aufgenom-

men werden können. Die Verwendung von Cantilevern mit hoher Federkonstante im Experiment bedeutet zwar, dass der instabile Bereich verringert wird, aber dass gleichzeitig auch die Kraftsensitivität abnimmt. Der typische Verlauf von

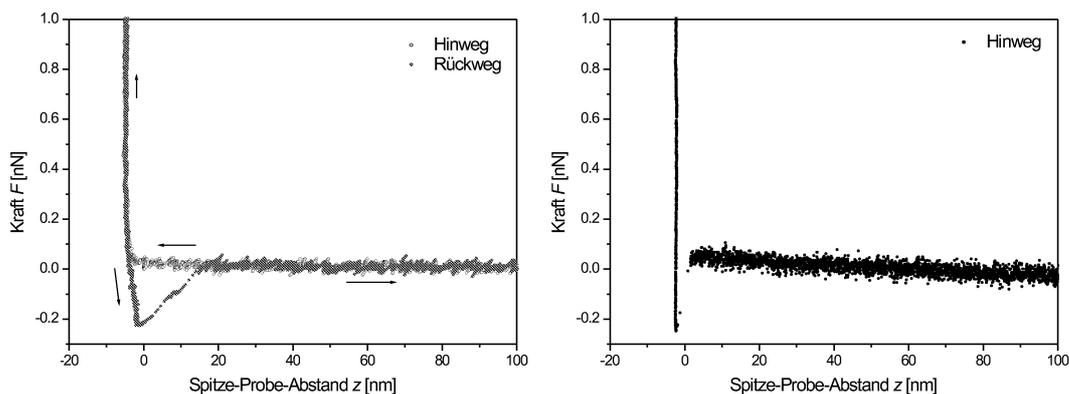


Abbildung 5.5: Typischer Verlauf von Kraft-Abstands-Kurven in Wasser.

Kraftkurven, die in Flüssigkeiten gemessen wurden, ist Abbildung 5.5 zu entnehmen. Die linke Abbildung zeigt einen Oszillationszyklus eines Cantilevers über einer Probe, die im Annäherungsbereich netto-repulsive DLVO-Kräfte (s. 5.1) auf den Cantilever ausübt und somit keine Instabilität in diesem Kurvenbereich auftritt. Der ebenfalls in der linken Abbildung gezeigte Rückweg zeigt deutlich den Instabilitätsbereich, der häufig als „*Snap-Off*“ bezeichnet wird. Die Differenz zwischen der maximalen, attraktiven Kraft und der Nulllinie gibt die Adhäsionskraft an. Die rechte Abbildung, in der zur übersichtlichen Darstellung lediglich der Hinweg der Kraftkurve gezeigt wird, wurde auf einer Probe gemessen, die kurz vor dem Probenkontakt attraktive Kräfte auf die Spitze ausübte. Die dadurch erzeugte Instabilität wird häufig als „*Snap-On*“ bezeichnet. Die durch die Instabilitäten erzeugten Hysteresen führen zu einer Energiedissipation, da an dem Abrisspunkt die potentielle Energie der effektiven Feder, die das System verkörpert, in kinetische Energie umgewandelt wird [166]. Gelegentlich weisen die

gemessenen Kraftkurven Hysteresen auf, die im Kontaktbereich auf Reibungseinflüsse zurückzuführen sind. Durch die hydrodynamische Dämpfung des Cantilevers in hochviskosen Flüssigkeiten kann es auch im Bereich der freien Schwingung zu einer Hysterese zwischen Hin- und Rückweg des Cantilevers kommen [167]. Außerdem treten Hysteresen auf, die durch den Piezo verursacht werden.

5.2.2 *Pulsed Force Mode*–Kraftkurven

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der *Pulsed Force Mode* (vgl. 3.2) zur quantitativen Analyse und Korrelation von Durchbruchkräften, Durchbruchlängen, Steifigkeiten und der Adhäsion von Lipiden verwendet. Dabei war die simultane Abbildung der Topographie möglich. Bei den Untersuchungen wurden die Lipidkopfgruppen, Kettenlängen der Lipide und die Lamellarität systematisch variiert, um Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Membrankomponenten aus ihren mechanischen Eigenschaften ziehen zu können. Das Messprinzip zur Aufnahme von Kraftkurven mit der konventionellen, quasistatischen Kraftmikroskopie und mit dem *Pulsed Force Mode* unterscheidet sich zunächst lediglich durch das Modulationssignal und die Modulationsfrequenz. Während im Kraft–Abstands–Modus des konventionellen AFM–Betriebs eine Dreiecksspannung und Frequenzen in der Größenordnung von 1 *Hz* angewendet werden, führt der Piezo im *Pulsed Force Mode* eine Sinusschwingung mit 0,1 *kHz* bis 2 *kHz* aus. Die schnelle Akquisition konventioneller Kraftkurven ist wesentlich schwieriger, da im Dreieckssignal enthaltene, höherfrequente Terme zu schwer interpretierbaren Resonanzerscheinungen des Cantilevers oder des Piezos führen können. Da die Messung mit dem konventionellen Aufbau aufgrund der niedrigen Geschwindigkeit im Vergleich zur Verwendung des PFM's sehr zeitaufwendig ist und zudem durch die erhöhte Dauer einer Messung größere Gerätedriften zu erwarten sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit der *Pulsed Force Mode* zur Messung der mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen gewählt.

Ein gutes Verständnis der im *Pulsed Force Mode* auftretenden Effekte und eine zuverlässige automatisierte Auswertung der großen Datenmengen sind die Grundvoraussetzungen für die quantitative Analyse mechanischer Eigenschaften der festkörperunterstützten Doppelschichten mit dieser Methodik. Die hohe Akquisitionsrate ist besonders von Interesse, da die statistische Natur der Kontaktereignisse nicht vernachlässigt werden kann [168]. Aus den durchgeführten Simu-

lationen der PFM–Kraftkurven, in denen u.a. der Einfluss der Hydrodynamik berücksichtigt wurde, konnten zunächst die für diesen Zweck optimalen Betriebsparameter für die Messung mit der Pulsed Force Box bestimmt werden und so eine mögliche Fehleinstellung und –interpretation verhindert werden. Zur Auswertung wurde eine neue automatisierte Multiparameter–Cluster–Methode angewendet, die weniger der subjektiven Beeinflussung unterliegt als die manuelle Auswertung der Daten und gleichzeitig die schnelle Analyse der großen Datenmengen, die durch die Verwendung des *Pulsed Force Mode* auftreten, unterstützt.

5.2.2.1 Simulation der PFM–Kraftkurven und Vergleich zum Experiment

Während die Durchführung von Kraft–Abstands–Messungen an Luft vergleichsweise unkompliziert ist, erfordert die Messung in Flüssigkeiten die Berücksichtigung der Wechselwirkungsmechanismen zwischen dem Medium und dem Cantilever. Durch die stark erhöhte hydrodynamische Dämpfung der Cantileverbewegung in der Flüssigkeit, die auf die 50fach höhere dynamische Viskosität von Wasser im Vergleich zu trockener Luft [122] zurückzuführen ist, kommt es zu einer signifikanten Phasenverschiebung zwischen der Anregungskraft und dem Detektionssignal. Diese kann z.B. zu einer möglichen Fehlinterpretation der Adhäsion führen, wie sie von X. Chen *et al.* [169] beschrieben wird. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationen der PFM–Kraftkurven, basieren auf dem Modell des extern angeregten und gedämpften harmonischen Oszillators. Die Methodik zur Durchführung dieser Simulationen beruht auf einem numerischen Ansatz, der bereits erfolgreich für die Simulation des AFM–*Tapping–Mode* eingesetzt wurde [170]. Das Modellsystem kann durch folgende Bewegungsgleichung beschrieben werden:

$$m_{eff}\ddot{z} + \alpha\dot{z} + k_c z + F_{ts}(z) = F_p(t). \quad (5.14)$$

Dabei steht m_{eff} für die effektive Masse des Systems, k_c für die Federkonstante des Cantilevers, k_s für die Federkonstante der Probe und α für die Dämpfungskonstante des Mediums. $F_p(t) = k_c A \sin(2\pi ft)$ bezeichnet die sinusförmige Anregungskraft und $F_{ts}(z)$ die in der Simulation als linear und harmonisch angenommene Modellkraft der Spitze–Probe–Wechselwirkung bei einem gegebenen Spitze–Probe–Abstand z . Damit ist $F_{ts}(z)$ gegeben durch: $F_{ts}(z) = -k_s \cdot z$ für $z \leq 0$ und $F_{ts}(z) = 0$ für $z > 0$. Es sei nochmal darauf hingewiesen, dass die Spitze–Probe–Kraft $F_{ts}(z)$ auch im *Pulsed Force Mode* wegen der Piezobewegung nicht direkt gemessen wird (vgl. 5.2.1), sondern die Kraft $F_d(t)$, die zur Auslenkung des Cantilevers führt, als Funktion der Zeit.

$$F_d(t) = k_c \cdot z(t) - F_p = k_c \cdot z(t) - k_c \cdot A \cdot \sin(2\pi ft) \quad (5.15)$$

Für die Integration der Gleichung 5.14 wird der Verlet–Algorithmus verwendet [171]. Um die numerische Stabilität zu gewährleisten, wurde eine Schrittweite von 2^{-16} der Oszillationsperiode gewählt. In der Simulation wird die Lösung $z(t)$ der Differentialgleichung 5.14 in den in Gleichung 5.15 angegebenen Ausdruck eingesetzt, damit der direkte Vergleich mit der Messung möglich wird. Die Federkonstante k_c lässt sich aus der Messung des thermischen Rauschspektrums an Luft berechnen [172], die Dämpfungskonstante α wurde aus dem maximalen Wert der Kraft in dem Teil des Oszillationszyklus bestimmt, der sich außerhalb des Kontaktbereichs befindet und durch die Hydrodynamik bestimmt wird und die effektive Masse m_{eff} des Systems kann aus der Messung der Resonanzkurve des Cantilevers in Flüssigkeiten berechnet werden. Um die Anregungsamplitude des Piezos zu kalibrieren, wurden während einer Messung auf einem harten Substrat die Betriebsparameter so gewählt, dass der Cantilever den Kontakt zur Probe in der Oszillationsperiode nicht verliert. Aus dieser Messung wurden die am Gerät in Prozent angegebenen Werte der PFM–Anregungsamplitude in nm umgerechnet.

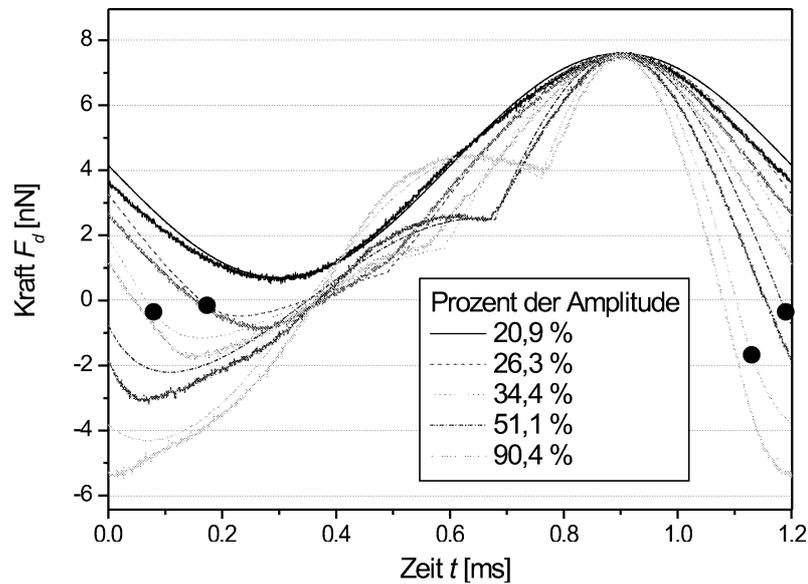


Abbildung 5.6: Vergleich von auf DPPC/Glimmer gemessenen und simulierten (glatte Kurven) PFM-Kraftkurven mit Variation der Anregungsamplitude.

Der Einfluss der Anregungsamplitude auf die PFM-Kraftkurven wird in Abbildung 5.6 verdeutlicht. Die Abbildung zeigt simulierte (glatte Kurven) und gemessene Kraftkurven, die bei verschiedenen Anregungsamplituden auf einer DPPC-Doppelschicht auf Glimmer gemessen wurden. Die Anregungsamplitude wurde von $A = 44 \text{ nm}$ (20,9 %) bis $A = 190 \text{ nm}$ (90,4 %) variiert. Je größer die Anregungsamplitude gewählt wird, desto ausgeprägter ist die linksseitige Schulter des Kraftmaximums, die auf die hydrodynamische Dämpfung des freien Cantilevers im Bereich der größten Anregungsgeschwindigkeit zurückzuführen ist (vgl. Abb. 5.3). Dieses Maximum kann bei der Messung mit niedrigen Arbeitspunkten (engl.: *Setpoint*, maximale Kraft am Regelpunkt) einen größeren Absolutwert annehmen als das Maximum der Kraft im Kontaktbereich. Ein ausgeprägtes Nebenmaximum erschwert aber die Bestimmung der korrekten Triggerposition auf der

Basislinie, die den Bereich angibt, in dem Spitze–Probe–Wechselwirkungen vernachlässigt werden können. Dagegen bleibt der Kontaktpunkt, an dem die Spitze auf die Probe stößt, weiterhin gut identifizierbar. Die hydrodynamische Dämpfung des Cantilevers führt auf dem Rückweg der Schwingungsperiode ebenso zu einer Phasenverschiebung zwischen Anregungs– und Detektionssignal. Dadurch befinden sich die in der Abbildung als schwarze Kreise dargestellten Punkte, an denen die Spitze in der Simulation den Kontakt zur Probe verliert, nicht am Kraftminimum der Oszillation. Daher kann die Adhäsion nicht generell zuverlässig aus der PFM–Kraftkurve bestimmt werden. Um diese Artefakte bei den eigenen Messungen möglichst gering zu halten, wurden niedrige Anregungsamplituden von 7 % (15 nm) bis 12 % (25 nm) bei Anregungsfrequenzen von $f = 100 \text{ Hz}$ bis $f = 300 \text{ Hz}$ verwendet. Es zeigte sich, dass dadurch die störenden hydrodynamischen Einflüsse weitgehend vermieden werden und die Adhäsion verlässlich gemessen werden konnte, und außerdem immer noch eine ausreichend schnelle Aufnahme von PFM–Kraftkurven möglich war.

Im Hinblick auf die qualitativen Steifigkeitsmessungen an Lipidsystemen wurden Simulationen durchgeführt, in denen die Probensteifigkeit bei konstanter Anregungsfrequenz und Amplitude systematisch verändert wurde. Der *Pulsed Force Mode* bietet die Möglichkeit durch Platzieren von zwei Triggerwerten bei t_1 und t_2 die PFM–Steifigkeit S_{PFM} aufzunehmen. Die PFM–Elektronik verarbeitet die Kraftdifferenz $\Delta F = F_2 - F_1$ und die Zeitdifferenz $\Delta t = t_2 - t_1$ gemäß Gleichung 5.16 (aus [67]) zu der PFM–Probensteifigkeit S_{PFM} (vgl. Abbildung 3.3) und erstellt aus diesen Werten ein Steifigkeitsbild.

$$S_{PFM} = k_{eff} = \frac{k_s k_c}{k_s + k_c} = \frac{\Delta F}{A(1 - \cos(2\pi f \Delta t))} \quad (5.16)$$

Abbildung 5.7 zeigt die simulierten PFM–Kraftkurven (A,B) und die daraus nach Gleichung 5.16 errechneten PFM–Steifigkeiten (C,D) für verschiedene Frequenzen (A,C $f = 100 \text{ Hz}$ und B,D $f = 1000 \text{ Hz}$). Für die Simulationen wurden die

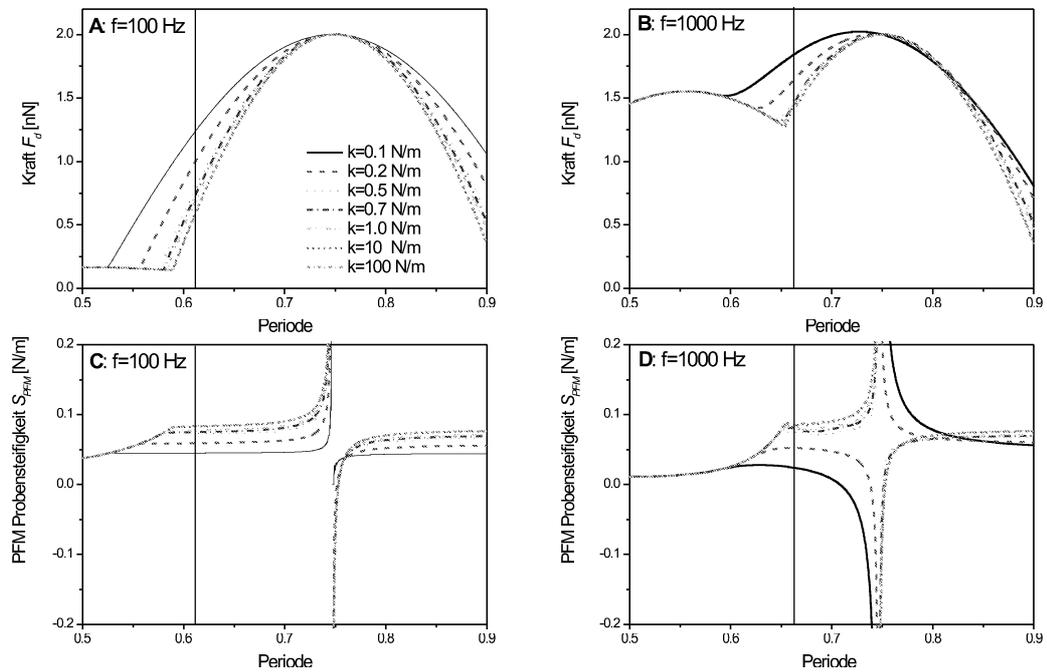


Abbildung 5.7: Simulierte PFM-Kraftkurven (A,B) und daraus errechnete PFM-Steifigkeiten (C,D) für verschiedene Frequenzen und Probensteifigkeiten.

Federkonstanten der als harmonische Feder betrachteten Probe von $k_s = 0,1 \frac{N}{m}$ bis $k_s = 100 \frac{N}{m}$ variiert. Die Federkonstanten lassen sich näherungsweise nach Gleichung 5.11 in den Young Modulus E der Probe umrechnen. Die in der Simulation verwendeten Federkonstanten von $k_s = 0,1 \frac{N}{m}$ bis $k_s = 100 \frac{N}{m}$ entsprechen Elastizitätsmodulen von $E = 4,46 \text{ MPa}$ bis $E = 4,46 \text{ GPa}$, wobei ein Poisson-Verhältnis von $\nu = 0,33$ und ein Kontaktradius von $R_K = 10 \text{ nm}$ angenommen wurde. Die Simulationen zeigen deutlich, dass der mit dem PFM bestimmte PFM-Steifigkeitskontrast von der gewählten Triggerposition und der Anregungsfrequenz abhängt und dass es zur Kontrastinversion der gemessenen Steifigkeiten kommen kann. Bei geringen Frequenzen (s. Abb. 5.7 A,C) und dadurch geringen Dämpfungskräften sind jedoch ausgedehnte Plateaubereiche auf beiden Seiten des

Kraftmaximum zu erkennen, in denen der PFM–Steifigkeitskontrast nahezu konstant, also unabhängig von der Triggerposition ist. Für hohe Dämpfungskräfte, wie sie bei höheren Anregungsfrequenzen auftreten (s. Abb. 5.7 B,D) ist vor dem Kraftmaximum ebenfalls ein solcher Plateaubereich zu erkennen, der jedoch weitaus schmaler als der bei geringen Dämpfungskräften auftretende Plateaubereich ist. Die in den Abbildungen eingetragenen, senkrechten Linien geben eine typische Wahl für die Triggerposition an. In den jeweiligen PFM–Steifigkeitskurven (C,D) zeigt sich ebenfalls der nichtlineare Zusammenhang zwischen dem gemessenen Steifigkeitskontrast und der durch die Simulation vorgegebenen Probensteifigkeit (vgl. Gl. 5.16). Die Modulationsamplitude wurde in diesen Simulationen konstant gehalten und beträgt $A = 50 \text{ nm}$. Für die Federkonstante des Cantilevers wurde der nominelle Wert des häufig verwendeten Olympus–Cantilevers ($k_c = 0,08 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, Olympus OMCL–TR400PSA) angenommen. Deutlich wird, dass die Messung der PFM–Steifigkeit von harten Proben lediglich die Federkonstante des Cantilevers wiedergeben wird. Die Kontrastinversion (s. Abb. 5.7 D) sowie

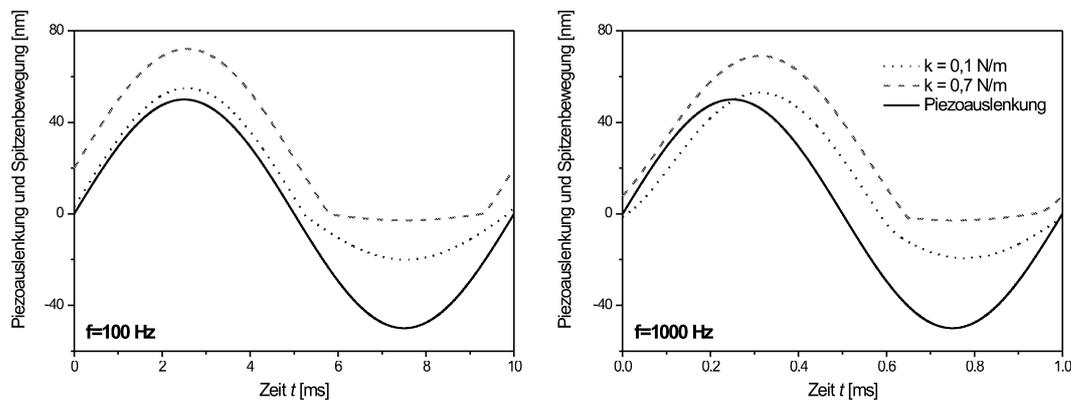


Abbildung 5.8: Piezoauslenkung und Spitze–Probe–Abstand für zwei ausgewählte Probensysteme der in Abbildung 5.7 A–D vorgestellten Rechnungen.

die Auflösung der Plateaubereiche in der Nähe des Auslenkungsmaximums des

Piezos lassen sich durch die relativ starke Phasenverschiebung (vgl. Abb. 5.8 A,B) erklären, welche in der Gleichung 5.16 nicht berücksichtigt wird. Die Phasenverschiebung setzt eine schnelle Bewegung der Spitze voraus, so dass sie bei dem Kontakt mit einer harten Probe relativ klein ist, während sie beim Kontakt mit einer sehr weichen Probe erhalten bleibt. Wie sich gut aus der Abbildung 5.8 B erkennen lässt, befindet sich bei starker Dämpfung das Eindringungsmaximum der Spitze in der weichen Probe deutlich hinter dem Auslenkungsmaximum des Piezos. Dies führt dazu (s. Abb. 5.7 B), dass die Cantileverauslenkung, die sich aus der Differenz von Piezoauslenkung und Spitze–Probe–Abstand ergibt, vor dem Maximum der Piezoauslenkung maximal wird. Daher kann die Kraftdifferenz aus Kraft am 1. Triggerpunkt und Kraft am 2. Triggerpunkt (Regelpunkt F_{max}), wie sie in Gleichung 5.16 verwendet wird, bei sehr weichen Proben und hohen Dämpfungskräften eine Vorzeicheninversion erfahren und kann zu der gezeigten Kontrastinversion führen. Generell wird der auf harten Materialien ($\sim GPa$) gemessene Elastizitätskontrast bei der Verwendung von weichen Cantilevern ($k = 0,01 \frac{N}{m}$ bis $k = 1 \frac{N}{m} \sim MPa$) gering sein, da sich die Federkonstanten der Probe k_s und des Cantilevers k_c nach Gleichung 5.17 reziprok zu der effektiven Federkonstante des Systems k_{eff} addieren (vgl. Gleichung 5.16).

$$\frac{1}{k_{eff}} = \frac{1}{k_s} + \frac{1}{k_c} \quad (5.17)$$

Das Auftreten von Kontrastinversionen des Steifigkeits- oder Adhäsions-signals beim PFM wird anhand von Abbildung 5.9 sichtbar. Die linke Spalte der Abbildung zeigt Topographieaufnahmen (Höhenskala 10 nm) von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin-Mischungen (2:2:1). In der mittleren Spalte ist das Steifigkeitssignal (Skala 0,06 V) dargestellt und in der rechten Spalte die zugehörigen Adhäsionsbilder (Skala 0,3 V). Diese repräsentative Lipidmischung ist zur Untersuchung der „Lipid–Raft“-Hypothese von aktuellem Forschungsinteresse. Es wird angenommen, dass eine Sphingolipid–Cholesterin–Interaktion

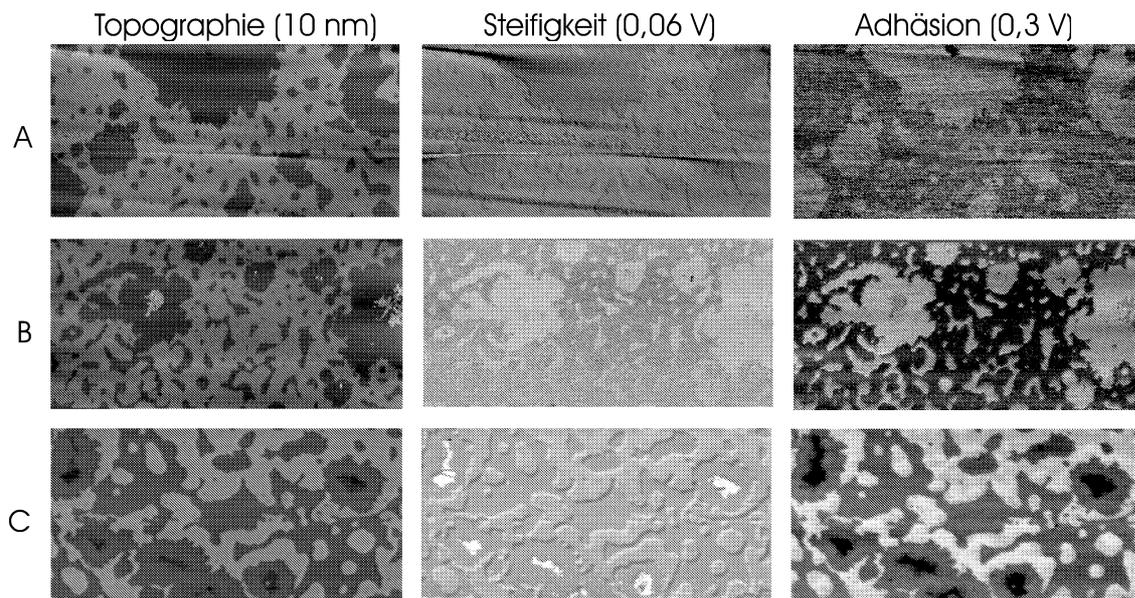


Abbildung 5.9: Topographie (linke Abbildungen; Skala: 10 nm), Steifigkeit (mittlere Abbildungen; Skala: 0,06 V) und Adhäsionsmessungen (rechte Abbildungen; Skala: 0,3 V) von *Lipid Raft* repräsentierenden DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin-Mischungen (2:2:1), die mit dem *Pulsed Force Mode* gemessen wurden.

zur Bildung einer lateralen Phasenseparation dieser Komponenten in fluiden Phosphoglyceriden führt und sich diese Sphingolipid-Cholesterin-reichen, festen Domänen wie Detergenzien-resistente-Membranen verhalten, die unlöslich in kalten, nichtionischen Detergenzien, wie z.B. Triton-X, sind [173–176]. Die Struktur und Funktion dieser Mikrodomänen ist noch weitgehend unverstanden. Man glaubt jedoch, dass sie eine essentielle Rolle bei exo- und endocytotischen Prozessen spielt. Die Abbildung 5.9 A zeigt, dass sich Domänen gebildet haben, die sich um ca. 1 nm in der Höhe unterscheiden. Die simultane Steifigkeits- und Adhäsionsuntersuchung ergab, dass sich die tiefere Phase weicher (dunkel=weich) und adhäsiver verhält als die höhere Phase und somit die tiefere Phase dem DOPC und die höhere Phase dem Sphingomyelin zugeordnet werden kann. Die Fragestel-

lung, in welcher Phase sich das Cholesterin vollständig oder anteilig löst, könnte über eine systematische Variation des Cholesteringehalts aus der Steifigkeits- und Adhäsionsmessung beantwortet werden. Dabei ist zu beachten, dass die PFM-Betriebsparameter konstant gehalten werden und dadurch ein direkter Vergleich möglich wird und dass die Parameter entsprechend den obigen Ausführungen sorgsam gewählt werden, um mögliche Artefakte durch Steifigkeits- und Adhäsionskontrastinversionen auszuschließen. Das Auftreten von Kontrastinversionen wird in den Abbildungen 5.9 B und C visualisiert, die beide bei relativ hohen Anregungsfrequenzen ($f \approx 1 \text{ kHz}$) aufgenommen wurden. Abbildung B zeigt eine Steifigkeitskontrastinversion und Abbildung C die Inversion des Adhäsionskontrasts.

Im Hinblick auf die Charakterisierung von Biomembranen sollte sich das PFM neben der Messung der Adhäsion, der Steifigkeit, der elektrostatischen Wechselwirkung und der elastischen Deformation von weichen Materialien auch hervorragend für die Untersuchung von Durchbrüchen der Messspitze durch Lipidmembranen eignen. Diese von einigen Forschungsgruppen [53–55, 64, 148, 168] im konventionellen AFM-Betrieb beobachteten Durchbruchereignisse sind von besonderem Interesse, da sie zur Beantwortung wichtiger Fragestellungen bezüglich der Stabilität von Lipidmembranen und Zusammenhänge zwischen adhäsiven und mechanischen Eigenschaften beitragen können. Leider liegen bisher fast ausschließlich qualitative Beobachtungen vor und eine konsequente, quantitative Analyse an verschiedenen Lipiden mit guter Statistik fehlt vollständig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Korrelation zwischen Durchbruchlänge, Durchbruchkraft, Adhäsion und Probensteifigkeit als Funktion der Lipidkopfgruppe, der Kettenlänge und der Lamellarität untersucht, wobei sich eine große Statistik zwanglos aus der erhöhten Geschwindigkeit des PFM ergibt. Die Messungen wurden mit einem automatisierten Multiparameteranalyseverfahren ausgewertet, das im Folgenden beschrieben wird.

5.2.2.2 Multiparameteranalyse der Doppelschichtdurchbrüche in PFM-Kraftkurven

Bei der Messung von Kraftkurven auf Lipidmembranen kommt es häufig zum Durchbruch der Messspitze durch die Membran. Dabei hängen die Durchbruchkräfte und die Durchbruchlängen von dem Lipid, der Geometrie der Spitze und der Ionenumgebung ab. Der Durchbruch tritt in der Kraftkurve im Kontaktbereich auf und äußert sich in einer Instabilität vergleichbar zum *Snap-On*. Abbildung 5.10 zeigt gemessene Durchbrüche von Cantilevern durch eine POPS-Doppelschicht, die mit der quasistatischen Kraftmikroskopie (links) und mit dem *Pulsed Force Mode* (rechts) gemessen wurden. Die Durchbruchkraft wird an dem Punkt bestimmt, an dem die Spitze den Kontakt zur Oberfläche verliert und auf das Substrat schnellt. Aus der Verschiebung der Kontaktkurve kann die Durchbruchlänge bestimmt werden. Die Differenz der Steigungen der Kontaktkurven gibt Aufschluss über die Steifigkeit des Lipids.

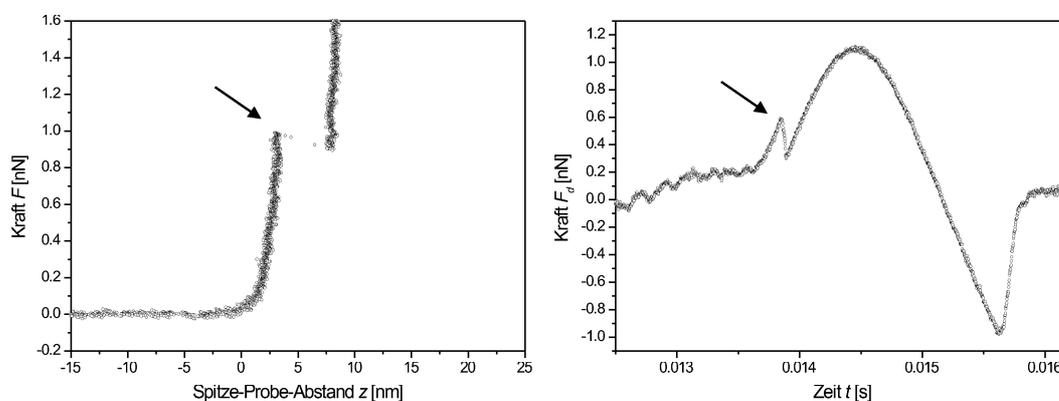


Abbildung 5.10: Kraftkurven gemessen im konventionellen Kraft-Abstands-Modus (links) und im *Pulsed Force Mode* (rechts) auf POPS-Doppelschichten.

Aufgrund der großen Datenraten (≈ 100 Kraftkurven/ s) ist eine automatisierte Auswertung sinnvoll, mit der die Parameter Adhäsion, Durchbruchkraft, Durch-

bruchlänge und Probensteifigkeit in jeder einzelnen Schwingungsperiode quantifiziert werden können. Aufgrund der statistischen Natur der Durchbrüche, die von Franz *et al.* [168] beschrieben wurde, treten nicht in jedem Oszillationszyklus Durchbrüche auf, wodurch die automatische Auswertung erschwert wird. Daher wurde der automatisierten Analyse eine manuelle Clusteranalyse angeschlossen, mit der die Durchbruchlängen und -kräfte, Adhäsionswerte und mit einiger Einschränkung auch der Young Modulus der Probe zuverlässig und schnell bestimmt werden konnten. Die automatische Vorauswertung geht von linearen Regressionen über die Zeit Δt_l (l =Linie) aus, die einen Bruchteil der Gesamtperiode ΔT darstellt. An jedem Punkt t ($t \in [\frac{\Delta t_l}{2}, \Delta T - \frac{\Delta t_l}{2}]$) wird eine Regression ausgeführt, so dass man für die eingeschränkte Periode eine Funktion für die Geradensteigungen $a(t)$, die Ordinatenabschnitte $b(t)$ und die Summe der quadratischen Abweichungen $\chi^2(t)$ erhält. Von einer vordefinierten Zeit t_0 an, von der man ausgeht, dass diese vor jedem möglichen Probenkontakt liegt, bis zur Zeit der maximalen Kraft $t(F_{max})$ wird in jeder Periode das Maximum der Funktion $f_b(t) = \chi^2(t) \frac{da(t)}{dt}$ gesucht, welches zur Detektion des Endes t_e eines möglichen Durchbruchs dient. In der Funktion $f_b(t)$ dienen sowohl der Absolutwert von $\frac{da(t)}{dt}$ als auch χ^2 als Kantendetektoren, während zugleich die lineare Regression zu einer effektiven Glättung der Kurve führt, ohne dabei Informationen über die Kantenposition zu verlieren. Der Beginn des Durchbruchs t_s wird aus dem Minimum von $f_b(t)$ mit $t \in [t_0, t_e]$ bestimmt. Die Durchbruchlänge d wird über $d = y_s(t_s) - y_e(t_s)$ aus den Regressionsgeraden $y_s(t)$ und $y_e(t)$ bestimmt. Dabei sind $y_s(t)$ und $y_e(t)$ die Geradengleichungen an dem ersten lokalen Minimum von $\chi^2(t)$ vor dem Durchbruch bzw. nach dem Durchbruch. In einem zweiten Schritt wird über eine Clusteranalyse die Trennung der Fehldetektionen von den tatsächlichen Durchbrüchen vorgenommen. Die Fehldetektionen sind auf die Perioden zurückzuführen, in denen keine Durchbrüche stattfanden.

Abbildung 5.11 zeigt eine dreidimensionale Clusterdarstellung der Parameter

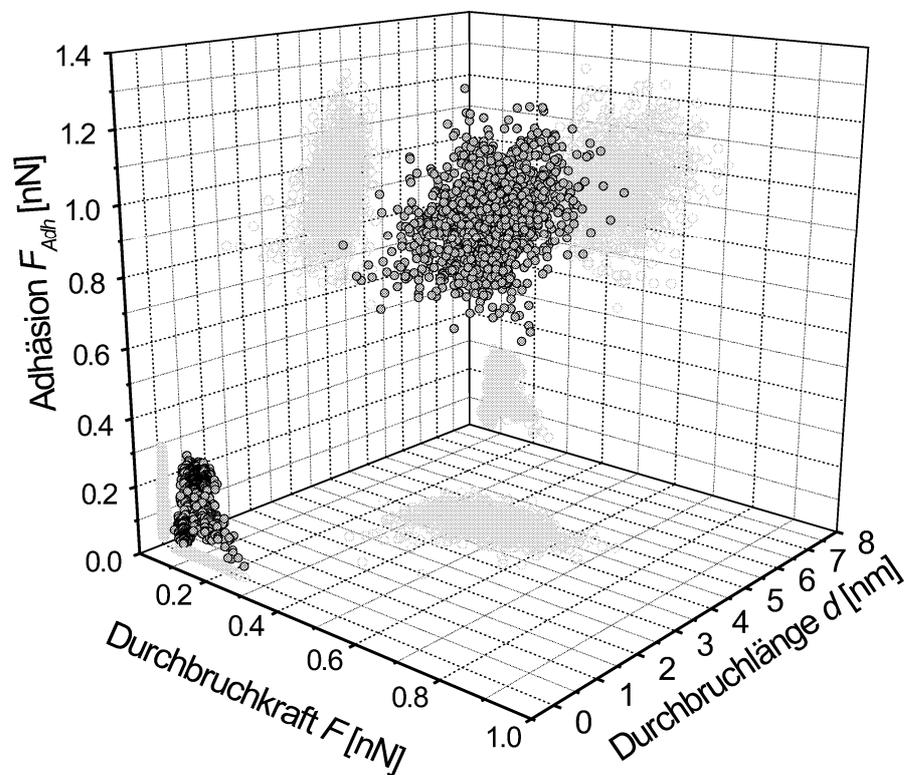


Abbildung 5.11: Adhäsion einer POPS-Doppelschicht als Funktion der Durchbruchlänge und der Durchbruchkraft in einer dreidimensionalen Projektionsdarstellung.

Durchbruchlänge, Durchbruchkraft und Adhäsion, gemessen auf einer POPS-Doppelschicht. Durch das Auftreten von negativen Durchbruchlängen und die deutliche Trennung der Datenhäufungspunkte lassen sich die Fehldetektionen gut von den echten Durchbrüchen unterscheiden.

Zusätzlich zur Durchbruchlänge kann aus der Analyse die Probensteifigkeit des Kontaktes k_{ss} vor dem Durchbruch bestimmt werden. Ausgangspunkt dazu ist die

Gleichung 5.17, die den Zusammenhang zwischen Piezobewegung, Spitzenbewegung und Cantileverauslenkung angibt. Die Geradensteigung a , die in Einheiten von V/s angegeben ist, lässt sich über ein konstantes c in die effektive Systemsteifigkeit k_{eff} umrechnen ($k_{eff} = a \cdot c$). Damit ergibt sich für a vor und nach dem Durchbruch:

$$a_s = \frac{1}{c} \cdot \left(\frac{k_{ss} \cdot k_c}{k_{ss} + k_c} \right) \quad (5.18)$$

$$a_e = \frac{1}{c} \cdot \left(\frac{k_{se} \cdot k_c}{k_{se} + k_c} \right) \quad (5.19)$$

wobei a_s und k_{ss} bzw. a_e und k_{se} jeweils die Steigung a und die Probensteifigkeit k_s vor und nach dem Durchbruch angeben. Dabei muss beachtet werden, dass die Voraussetzung für eine Konstante c eine Näherung erster Ordnung der sinusoidalen Bewegung des Piezos im Bereich des Durchbruchs beinhaltet. Löst man nun Gleichung 5.18 nach k_{ss} und Gleichung 5.19 nach c , erhält man für k_{ss} :

$$k_{ss} = \frac{a_s \cdot k_c \cdot k_{se}}{a_e \cdot (k_{se} + k_c) - a_s \cdot k_{se}} = \frac{a_s \cdot k_c}{a_e \cdot \left(1 + \frac{k_c}{k_{se}}\right) - a_s} \quad (5.20)$$

Unter der Annahme, dass nach dem Durchbruch die Substratsteifigkeit k_{se} viel größer als die Cantileversteifigkeit k_c ist, wie es der Fall ist, wenn die Spitze mit dem Substrat in Kontakt ist, vereinfacht sich Gleichung 5.20 zu:

$$k_{ss} = \frac{a_s \cdot k_c}{a_e - a_s} \quad (5.21)$$

Man beachte, dass Gleichung 5.21 keine separate Kalibrierung der Piezobewegung oder der Cantileversensitivität C benötigt. Aufgrund der Näherung erster Ordnung für die Piezobewegung ist sie für konventionelle Kraftkurven innerhalb der Annahme, dass $k_c \ll k_{ss}$, sogar exakt gültig, während für eine sinusoidale Piezobewegung zunächst abgeschätzt werden sollte, welcher Fehler durch die

Krümmung des Sinus auftritt. Diese Abschätzung ist möglich, indem die Steigung a_e mit einem Faktor zur Beschreibung der Steigungsänderung innerhalb der Regressionsgerade multipliziert wird. Damit ergibt sich:

$$a'_e = a_e \cdot \frac{\cos(2\pi f t_s)}{\cos(2\pi f t_e)} \quad (5.22)$$

Die Substitution von a_e in Gleichung 5.21 mit a'_e aus Gleichung 5.22 sollte dann für eine konkrete Analyse keine wesentlichen Änderungen für k_{ss} ergeben. Offensichtlich ist dies genau dann der Fall, wenn die Durchbrüche nicht in der Nähe der Maximalkraft der PFM Kurve auftreten und die Geradenregressionen über einen kurzen Bereich ausgeführt werden ($t_e - t_s \ll \frac{\Delta T}{4}$).

5.3 Experimentelle Untersuchung der Durchbruchkräfte von Lipiddoppelschichten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine systematische Studie durchgeführt, in wie weit die Lipidkopfguppen, Kettenlängen und die Lamellarität der Lipidschicht auf die Stabilität der Membran Einfluss nehmen. Diese mechanische Eigenschaft lässt sich gut anhand von Durchbruchereignissen der AFM-Spitze durch die Lipidschicht analysieren (vgl. Abschnitt 5.2.2.2). Einige Autoren berichteten über die Messung dieser Instabilität und deuteten sie dadurch, dass der Cantilever die Membran durchdringt und auf das Substrat schnellt [53–55, 64, 148, 168]. Bisher liegen nur sehr wenige Untersuchungen dieser Durchbruchereignisse vor. In der Arbeitsgruppe von U. Lee *et al.* [54] wurden die Durchbruchkräfte einer AFM-Spitze durch Monogalactosylethanolamin, Dioleyl-phosphatidylethanolamin und Distearyl-phosphatidylethanolamin aus je 260 Kraftkurven ausgewertet. Hierbei ergab sich, dass der Quotient aus Durchbruchkraft und Spitzenradius $\frac{F}{R}$ eine materialspezifische, reproduzierbare Größe ist. Allerdings wurden in dieser Untersuchung, die im Hinblick auf die Optimierung des Abbildungscontrasts beim AFM durchgeführt wurde, Langmuir-Blodgett-Proben (s. 4.1.1) verwendet, bei denen ungeklärt ist, inwieweit eine Kooperativität zwischen den beiden Monoschichten besteht. Geeigneter für diese Untersuchung sind Lipidschichten, die durch das Vesikelspreitverfahren präpariert wurden. Diese Präparationsmethode wurde von V. Franz *et al.* [168] verwendet, der die statistische Natur der Durchbrüche an Dioleyloxypropyl-trimethylammonium Chlorid und Dioleyl-phosphatidylserin aus 50–400 Kraftkurven auswertete und ein Modell entwickelt, wie die Durchbrüche mikroskopisch initiiert werden können. Er stellt heraus, dass die Durchbruchkraft logarithmisch von der Geschwindigkeit abhängt, mit der die Kraftkurven aufgenommen werden. Eine quantitative Analyse der Parameter Durchbruchlänge, Durchbruchkraft, Probensteifigkeit und Adhäsion, sowie die Untersu-

chung der Korrelation dieser Größen untereinander und deren Abhängigkeit von der Lipidkopfgruppe, der Kettenlänge und der Lamellarität wurde bisher nicht durchgeführt. Hinsichtlich dieser Lücken wurden in der vorliegenden Arbeit die Durchbrucheigenschaften von POPS-Doppelschichten und bilamellaren POPS-Multischichten untersucht und die Durchbrüche der Spitze durch Membranen aus POPS, DMPS und DPPS im Vergleich zu POPC und DMPC charakterisiert. Die Lipidschichten wurden nach dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Verfahren präpariert. Obwohl nur unilamellare Vesikel für den Spreitvorgang verwendet wurden, kommt es bei PS-Systemen häufig zur Ausbildung von Multischichten. Die entsprechende Lamellenzahl kann mit dem AFM anhand der Höhe identifiziert werden, solange das Substrat als Referenzhöhe erkennbar bleibt. Die PFM-Messungen wurden mit niedrigen Anregungsamplituden von 7 % (15 nm) bis 12 % (25 nm) bei Anregungsfrequenzen von $f = 100 \text{ Hz}$ bis $f = 300 \text{ Hz}$ durchgeführt, um den störenden Einfluss der hydrodynamischen Dämpfung (vgl. 5.2.2) möglichst gering zu halten. Die Messungen, die direkt verglichen werden, wurden mit der gleichen Anregungsfrequenz durchgeführt, um den von Franz *et al.* [168] beschriebenen Einfluss der Geschwindigkeit auf die Durchbruchkraft konstant zu halten. Außerdem wurden für diese Messungen jeweils die gleichen AFM-Spitzen verwendet, damit auf die konkrete Spitzengeometrie keine Rücksicht genommen werden musste. Federkonstanten wurden aus dem thermischen Rauschspektrum der verwendeten Cantilever nach der von Butt *et al.* beschriebenen Methode [172] berechnet. Die Federkonstanten für den bei den Steifigkeitsmessungen verwendeten Olympus-Cantilever (OMCL-TR400PSA) variierten von $0,7 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ bis $0,9 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Der Spitzenradius wurde mit einem Kalibriergitter TGT01 (Anfatec, Oelsnitz, Deutschland) bestimmt. Für die Aufnahme der kompletten Kraftkurven wurde das Kraftsignal mit Hilfe einer Oszillatorkarte (NI 5911, National Instruments, USA) aufgenommen. Die Auflösung dieser Karte bewegt sich zwischen 8 Bit bei 100 MS/s und 21 Bit bei 10 kS/s . Anschließend konnten die Daten mit dem in Abschnitt 5.2.2.2 beschriebenen, halbautomatischen Analyseverfahren ausgewertet

werden. Die Anzahl der pro System ausgewerteten Perioden beträgt 1000 bis 5000. Die hier vorgestellte Untersuchung der Durchbruchkräfte erfolgte ausschließlich in dem Puffer aus 150 *mM* NaCl, 10 *mM* Tris, 2 *mM* CaCl₂, *pH* = 7,4. Die Untersuchung fokussiert sich zunächst auf die Stabilitätseigenschaften eines Membransystems aus unilamellaren und bilamellaren POPS-Schichten.

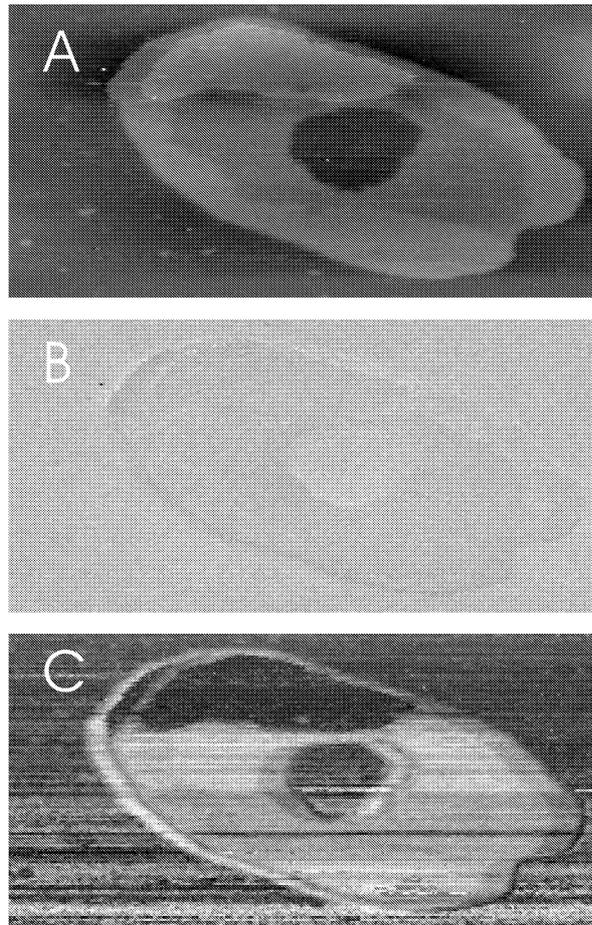


Abbildung 5.12: PFM-Aufnahmen ($300 \text{ nm} \times 600 \text{ nm}$) der Topographie (A; Höhenskala: 20 nm), Steifigkeit (B; Skala: $0,1 \text{ V}$) und Adhäsion (C; Skala: 2 V) einer POPS-Lipidschicht, die unilamellare und bilamellare Bereiche zeigt.

Abbildung 5.12 zeigt die PFM-Aufnahmen der Topographie (A), der PFM-Steifigkeit (B) und der Adhäsion (C) einer POPS-Domäne auf Glimmer, die aus

Doppelschicht- und Multischichtbereichen besteht. Während das Lipid im PFM-Stifigkeitsbild, das nach der Formel 5.16 ausgewertet wurde, weicher (dunkle Phase) ist als das Substrat, weisen die unilamellaren und bilamellaren Bereichen untereinander keinen Elastizitätskontrast auf. Das Adhäsionsbild zeigt jedoch deutlich, dass die Multischicht und das Substrat sehr geringe Adhäsion besitzen und der Bereich der POPS-Doppelschicht sehr adhäsiv ist. Die Erhöhung der Adhäsionswerte an den Rändern der Struktur ist wahrscheinlich auf den Einfluss der Topographie auf die Adhäsionsmessung durch die Erhöhung der Kontaktfläche zurückzuführen, die ausführlich von T. Stifter *et al.* [177] beschrieben wurde. Die Randbereiche werden in dieser Untersuchung daher nicht zur Analyse hinzugezogen.

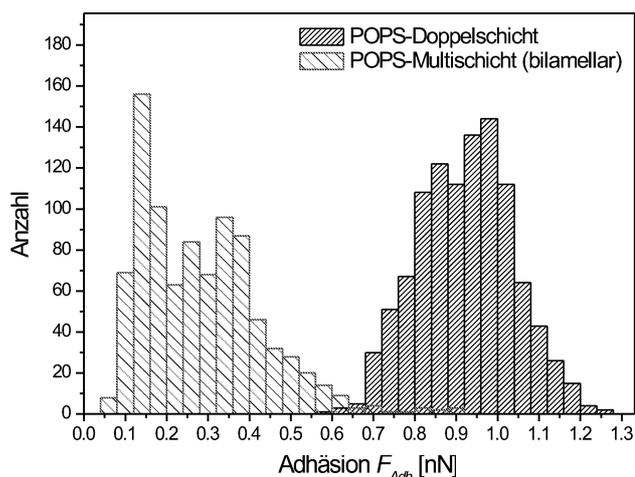


Abbildung 5.13: Histogramm der Adhäsionswerte, die mit der gleichen AFM-Spitze auf einer POPS-Doppelschicht (enge Schraffur) und einer bilamellaren POPS-Multischicht (weite Schraffur) gemessen wurden.

Die quantitative Auswertung der Adhäsionswerte auf dem unilamellaren Bereich und dem bilamellaren Bereich, ist in Abbildung 5.13 abgebildet und wurde mit der gleichen AFM-Spitze durchgeführt. Die Histogrammanalyse ergab, dass die bila-

mellare POPS–Multischicht eine sehr geringe Adhäsion ($F_{Adh} = 0,29 \pm 0,15 \text{ nN}$) aufweist, die deutlich von den erhöhten Werten der Doppelschicht ($F_{Adh} = 0,92 \pm 0,11 \text{ nN}$) getrennt ist. Dieses Ergebnis lässt sich aus der Betrachtung der Durchbruchereignisse auf den beiden Bereichen erklären. Während der Cantilever in annähernd jeder Periode, die auf dem Doppelschichtbereich gemessen wurde, durch die Lipidschicht dringt, wurde auf der bilamellaren POPS–Multischicht kein Durchbruch beobachtet.

Die enge Korrelation zwischen der hohen Adhäsion auf der POPS–Doppelschicht und dem Auftreten eines Durchbruchs und umgekehrt zwischen der niedrigen Adhäsion auf der POPS–Multischicht, auf der kein Durchbruch beobachtet wurde (vgl. Abb. 5.11), kann durch die Ausbildung einer Cochleat–Phase zwischen den beiden Lamellen der bilamellaren Multischicht erklärt werden. Es ist bekannt, dass in multilamellaren Systemen PS–Moleküle in Anwesenheit von Ca^{2+} –Ionen PS/ Ca^{2+} –Komplexe bilden, die für die Dehydrierung und die Immobilisierung der Serinkopfgruppen verantwortlich sind und somit zu einer Verbrückung der Lamellen führen [178–182]. Vermutlich wirkt sich diese Stabilisierung durch die hohe Kooperativität der einzelnen Monoschichten auf die gesamte Multischicht aus und verhindert so den Durchbruch der AFM–Spitze durch die Membran bei den hier angewendeten Kräften.

Abbildung 5.14 verdeutlicht den typischen Verlauf der jeweiligen Kraftkurve. Die auf der POPS–Doppelschicht gemessene Kurve zeigt im Kontaktbereich einen Durchbruch bei einer Kraft von $F = 520 \text{ pN}$. Die Abbildung zeigt auch das Auftreten der hohen Adhäsion auf der Doppelschicht ($F_{Adh} = 0,97 \text{ nN}$) und die vergleichsweise geringe Adhäsion auf der Multischicht ($F_{Adh} = 0,35 \text{ nN}$). Die Durchbruchkraft als Funktion der Durchbruchlänge (vgl. Abb. 5.15) zeigt, dass keine signifikante Abhängigkeit der beiden Größen vorliegt. Der Erwartung nach sollte die Durchbruchlänge geringfügig abnehmen, wenn die Durchbruchkraft steigt, da in diesem Fall der Cantilever die Lipidmembran tiefer eindrücken

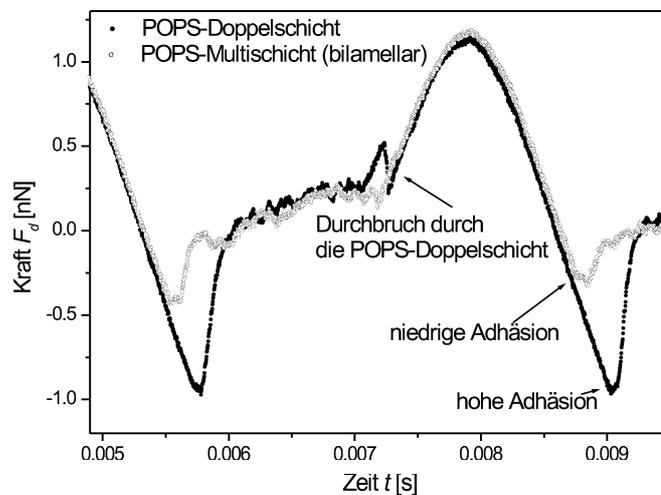


Abbildung 5.14: PFM-Kraftkurven einer POPS-Doppelschicht (gefüllte Kreise) und einer bilamellaren POPS-Multischicht (Kreise), die mit der gleichen AFM-Spitze gemessen wurde.

sollte. Es ist möglich, dass dieser Trend in der Streuung der Werte für die Durchbruchlängen untergeht und sich so der Detektion entzieht.

Die charakteristischen Größen Durchbruchlänge und Durchbruchkraft sind normalverteilt, wie die Abbildungen 5.15 B und 5.15 C belegen. Die mittlere Durchbruchlänge, die $d = 4,3 \pm 0,4 \text{ nm}$ beträgt, stimmt gut mit der Höhe einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht überein. Die absolute Höhe der Membranen variiert in den AFM-Messungen, da die Dicke der unterliegenden Wasserschicht der verschiedenen Proben unterschiedlich ist und die Eindringtiefe des Cantilevers von der Spitzengeometrie und der Probensteifigkeit abhängt.

Im Gegensatz zu der Durchbruchlänge, die von der Durchbruchkraft unabhängig erscheint, ist die Probensteifigkeit vor dem Durchbruch signifikant von der Durchbruchkraft abhängig, wie in Abbildung 5.16 verdeutlicht wird. An der Streuung der Probensteifigkeit in der logarithmischen Darstellung lässt sich gut erken-

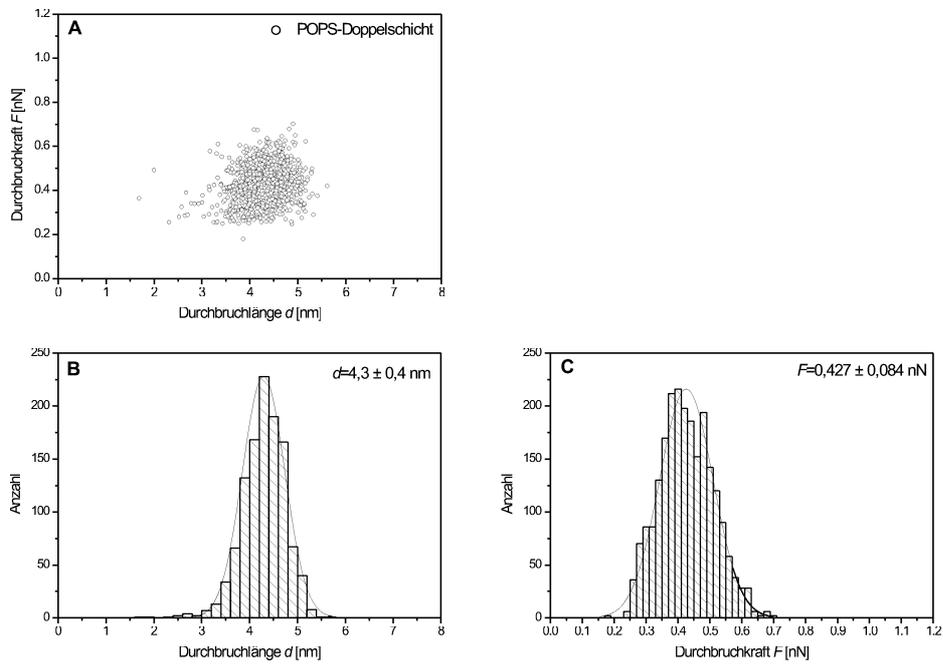


Abbildung 5.15: Durchbruchkraft einer POPS–Doppelschicht als Funktion der Durchbruchlänge (A) mit Histogrammanalyse (B,C).

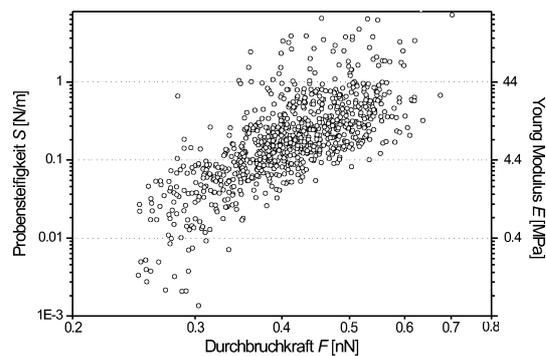


Abbildung 5.16: Probensteifigkeit einer POPS–Doppelschicht als Funktion der Durchbruchkraft in logarithmischer Auftragung nach Gleichung 5.21.

nen, dass das Kraftmikroskop über eine konstante *relative* Sensitivität bezüglich der Probensteifigkeit verfügt. Das Ansteigen der Probensteifigkeit mit höheren Kräften, ist jedoch innerhalb der gängigen Kontakttheorien (vgl. 5.1) nicht konsistent mit der sich nicht ändernden Durchbruchlänge. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei den hier auftretenden hohen Drücken die Beschreibung durch die lineare Elastizitätstheorie versagt. Eine grundsätzliche Problematik besteht darin, dass die Kontakttheorien sich auf den Kontakt elastischer Halbräume beschränken und die hier betrachteten Proben eine Probendicke in der Größenordnung des Kontaktradius aufweisen. Trotzdem bewegt sich der abgeschätzte Young Modulus E für die POPS–Doppelschicht in der Größenordnung von 20 MPa . Dieser Wert stimmt gut mit dem für Lipidfilme typischen Bereich [183] von $10\text{--}200 \text{ MPa}$ überein.

Während die Lipiddoppelschichten aus POPC und DMPC ebenfalls Durchbrüche zeigten, wurden auf den DMPS– und DPPS–Membranen keine Durchbrüche der verwendeten Spitzen bis zu einer maximal angewendeten Kraft von 24 nN beobachtet. Die Durchbrüche auf den POPC– und DMPC–Systemen weisen einen von den Durchbrüchen auf POPS abweichenden Verlauf auf. Typische PFM–Kraftkurven werden in Abbildung 5.17 dargestellt. Alle Abbildungen zeigen Durchbrüche der Messspitze durch die Lipidschicht. Abbildung D veranschaulicht durch die zwei hintereinander auftretenden Durchbrüche, dass die einzelnen Lamellen von POPC–Multischichten einzeln durchdrungen werden können. In A, B und C sind die Regressionsgeraden eingezeichnet, die zur Bestimmung der Probensteifigkeit verwendet wurden (vgl. Abschnitt 5.2.2.2). Die kurzen Geraden wurden jeweils an die letzten 40 Punkte vor dem Durchbruch und an die ersten 40 Messpunkte nach dem Durchbruch angefügt. Die lange eingezeichnete Gerade nach dem Durchbruch wurde an den in den Abbildungen sichtbaren Bereich angefügt, in denen der Sinus näherungsweise linear verläuft. Aus der Differenz der kurzen Geraden kann, wie in Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben wurde, die Steifigkeit der Probe bestimmt werden. Der Vergleich zwischen der kurzen und der langen

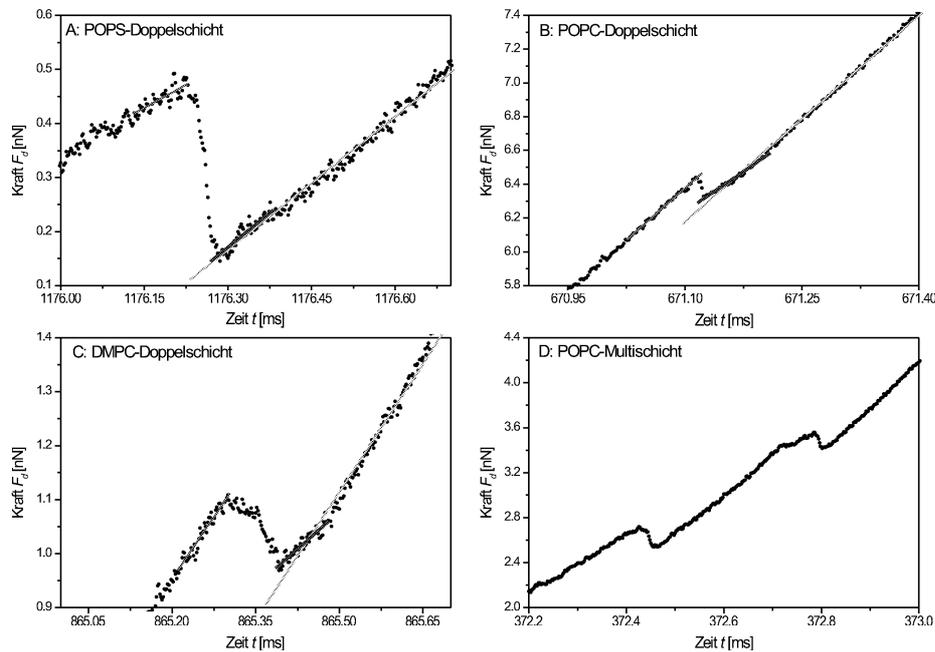


Abbildung 5.17: PFM-Kraftkurven mit typischem Verlauf gemessen auf Lipiddoppelschichten aus POPS (A), POPC (B), DMPC (C) und auf einer POPC-Multischicht (D).

Gerade nach dem Durchbruch zeigt, dass diese Auswertemethode nur sinnvoll bei POPS und eingeschränkt bei POPC angewendet werden kann, da lediglich hier die Steigung der kurzen Gerade mit der Steigung der langen Gerade übereinstimmt und somit die Steifigkeit des Substrats (Glimmer) wiedergibt. Die Steigungen der DMPC- und teilweise der POPC-Kraftkurven verlaufen nach dem Durchbruch zunächst flacher als die entsprechenden Geraden im Kontakt mit dem Substrat, was darauf hindeutet, dass die Messspitze nach dem Durchbruch zunächst ein weiches Material (Lipid) berührt, bevor sie auf das Substrat stößt.

Ein weiterer Durchbruch-Typ wurde bevorzugt auf DMPC-Doppelschichten beobachtet und ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Die Spitze scheint in diesem Fall

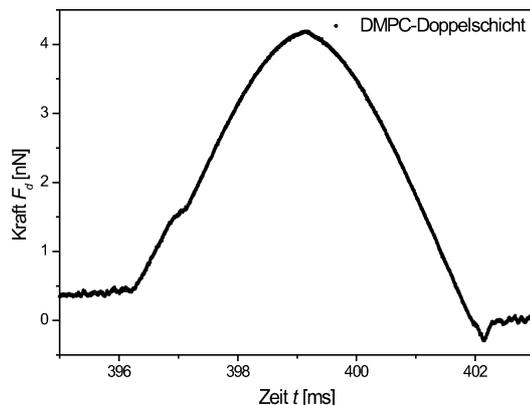


Abbildung 5.18: PFM-Kraftkurve mit typischem Verlauf gemessen auf einer DMPC-Lipiddoppelschicht.

träge durch das Material zu „gleiten“, ohne dass eine Instabilität auftritt oder die Lipiddoppelschicht abrupt kollabiert. Für eine grobe Abschätzung, wie viele Lipidmoleküle direkt von dem Durchbruch einer Spitze betroffen sind, wurde der Kontaktradius R_K einer Messspitze mit einem typischen Radius von $R = 20 \text{ nm}$ berechnet, der entsteht, wenn die Spitze 5 nm in den Lipidfilm eingetaucht ist. Diese Vorstellung entspricht ungefähr der Situation nach dem Durchbruch. Der Kontaktradius beträgt in diesem Fall $R_K = 13,2 \text{ nm}$, die Kontaktfläche demnach $\pi R^2 \approx 550 \text{ nm}^2$. Nimmt man an, dass ein Lipidmolekül eine Fläche von $0,5 \text{ nm}^2$ einnimmt, ergibt sich, dass 1100 Moleküle ihre Position infolge des Spitzendurchbruchs ändern müssen. Auffallend ist, dass im Gegensatz zu POPS sowohl auf den POPC- als auch auf den DMPC-Systemen nach dem Durchbruch keine signifikante Adhäsion beobachtet wurde. Die Betrachtung der Adhäsionsverhalten von POPC-Doppelschichten und POPC-Multischichten allein deutet darauf hin, dass die Adhäsion hauptsächlich durch den Kontakt zwischen der hydrophilen Spitze und den hydrophoben Ketten erklärt werden kann, da auf POPS keine signifikante Adhäsion beobachtet werden konnte, wenn kein Durchbruch auftrat und hohe

Adhäsion gemessen wurde, wenn die Spitze durch die Doppelschicht drang. Der Vergleich der Adhäsionsverhalten von POPS und POPC, die sich lediglich in der Kopfgruppe unterscheiden aber die gleichen Ketten besitzen, kollidiert zunächst mit der Vorstellung, dass die Adhäsion auf den Einfluss der Ketten zurückgeht, da auf POPC keine Korrelation zwischen Durchbruch und Adhäsion beobachtet wurde und die Adhäsion durchgängig klein bleibt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Durchbruchmechanismen (vgl. Abb. 5.17 und 5.18) lässt sich eine Erklärungsmöglichkeit formulieren, die davon ausgeht, dass bei einem Durchbruch auf den untersuchten fluiden PC-Systemen die Ketten aufgrund ihrer hohen Mobilität und dem geringen Ordnungsgrad ausweichen können und die AFM-Spitze während des gesamten Durchbruchs hauptsächlich in Kontakt mit den Lipidkopfgruppen steht. Im Vergleich dazu liegt das POPS in Ca^{2+} -haltigem Puffer in der geordneten Phase vor und ist damit wesentlich starrer, unbeweglicher und evtl. auch brüchiger, so dass die Spitze spontan die gesamte Schicht durchdringen kann und in direktem Kontakt zu den Ketten steht, der zu der hohen Adhäsion führt. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten Durchbrüche auf z.B. DOPS, POPS, DMPS und DPPS durch die Verwendung von Cantilevern mit höherer Federkonstante und damit größerer Auflagekraft und kleineren Spitzenradien erzeugt werden, um die genaue Abhängigkeit von den mechanischen und chemischen Eigenschaften des Lipids zu bestimmen. Es ist bekannt, dass die Adhäsion von Langmuir-Blodgett-Monoschichten aus Fettsäuren mit der gleichen Kopfgruppe variieren kann, wenn diese unterschiedliche Steifigkeiten aufweisen, die durch verschiedene Fettsäurekettenlängen verursacht werden [184, 185]. Dufrene *et al.* berichten ebenfalls von der Abhängigkeit des Adhäsionskontrasts von der Probensteifigkeit der untersuchten Monoschichten und führen dieses Verhalten auf die verschiedenen Kontaktradien zurück [53]. Bei diesen Untersuchungen stand der Cantilever aber in direktem Kontakt zu den Ketten.

Zusammenfassend betrachtet konnte mit dieser Untersuchung eine direkte Korre-

lation zwischen Adhäsion und Durchbruchkraft der verschiedenen Lipide nachgewiesen werden. Die Studien an PS- und PC-Schichten ergaben, dass vermutlich auf diesen Lipiden ein unterschiedlicher Durchbruchmechanismus stattfindet, der dafür verantwortlich ist, dass bei PC-Systemen eine vom Durchbruch unabhängige, geringe Adhäsion beobachtet werden konnte. Die Durchbruchlänge, die auf allen untersuchten Systemen zu ca. 4 *nm* bestimmt wurde, stimmt gut mit dem theoretischen Wert für Lipiddoppelschichten auf festen Substraten überein.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zielsetzungen verfolgt. Einerseits sollte ein Bindungsassay auf der Basis selektiv funktionalisierter und mikrostrukturierter Lipiddoppelschichtsegmente realisiert werden und dessen Anwendbarkeit in einem Multispotanalyseverfahren belegt werden. Andererseits sollten die mechanischen und adhäsiven Eigenschaften ausgewählter Lipidsysteme mit einer neuen Charakterisierungstechnik untersucht werden, die es auch in Zukunft erlauben wird, die individuell adressierbaren Membranen orts aufgelöst analysieren zu können.

Im ersten Teil gelang es erstmalig, eine Methode zur Mikrostrukturierung festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten in Flüssigkeiten zu entwickeln. Sie kombiniert die softlithographische Technik des Mikroformens in Kapillaren mit der Vesikelspreittechnik und bietet ein elegantes Verfahren, einzeln adressierbare Lipidsegmente im Mikrometer Regime zu erzeugen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das hydrodynamische Fließverhalten in Mikrokavitäten bei Variation der Parameter Kapillardruck, Oberflächenspannung, Kapillargeometrie und Probenviskosität analysiert. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der Stabilitätskriterien für PDMS-Elastomere wurden außerdem neue Strukturen entwickelt, die für den Einsatz am Rasterkraftmikroskop opti-

miert wurden.

Die Anwendbarkeit des *Lab-On-A-Chip-Devices* als Biosensor wird durch zwei prominente Bindungsstudien belegt. Die spezifische Bindung des Lektins Peanut Agglutinin an ein asialo- G_{M1} -dotiertes Membransegment wurde mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop nachgewiesen. Die hervorragende Einsatzmöglichkeit der Rasterkraftmikroskopie für die Protein-Rezeptor-Erkennungsstudie konnte anhand der spezifischen Bindung der B-Untereinheit des Cholera Toxins an ein G_{M1} -haltiges Membransegment gezeigt werden. Mit dem AFM kann die Bindung nicht nur über die Höhenzunahme, sondern auch über die Visualisierung der Einzelproteine bestätigt werden. Zudem bot das Rasterkraftmikroskop die Möglichkeit, strukturelle Änderungen der Lipidmatrix nachzuweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine neue Methodik zur Untersuchung der Kontaktmechanik von Rastersonden und Lipidmembranen auf Basis der Digitalisierung von Hochgeschwindigkeitskraftkurven und einer automatisierten Multi-parameteranalyse entwickelt. Dabei konnte die Korrelation zwischen der Adhäsion und den materialspezifischen Durchbruchlängen und Durchbruchkräften, die charakteristische Stabilitätsparameter der Lipidmembran darstellen, hergestellt werden. Zum Verständnis der Kraftkurven wurden Simulationen der Systemantwort durchgeführt, die auf dem Modell des harmonischen Oszillators beruhen und ein tieferes Verständnis der Kontrastentstehung ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass bei den untersuchten Systemen mit variierenden Kopfgruppen und Kettenlängen ein enger Zusammenhang zwischen Durchbruchmechanismus und Adhäsion besteht. Auf Lipiddoppelschichten mit Serinkopfgruppen wurde eine hohe Adhäsion nur bei gleichzeitigem Auftreten von Durchbrüchen beobachtet, während die Cholinsysteme eine vom Durchbruch unabhängige, geringe Adhäsion zeigten und ein deutlich differenziertes Durchbruchverhalten aufwiesen. Es wurde ferner ein Unterschied im Durchbruchverhalten von Doppelschichten und bilamellaren Doppelschichten beobachtet. Das Analyseverfahren erlaubte zudem die simultane Quantifizierung der elastischen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht-

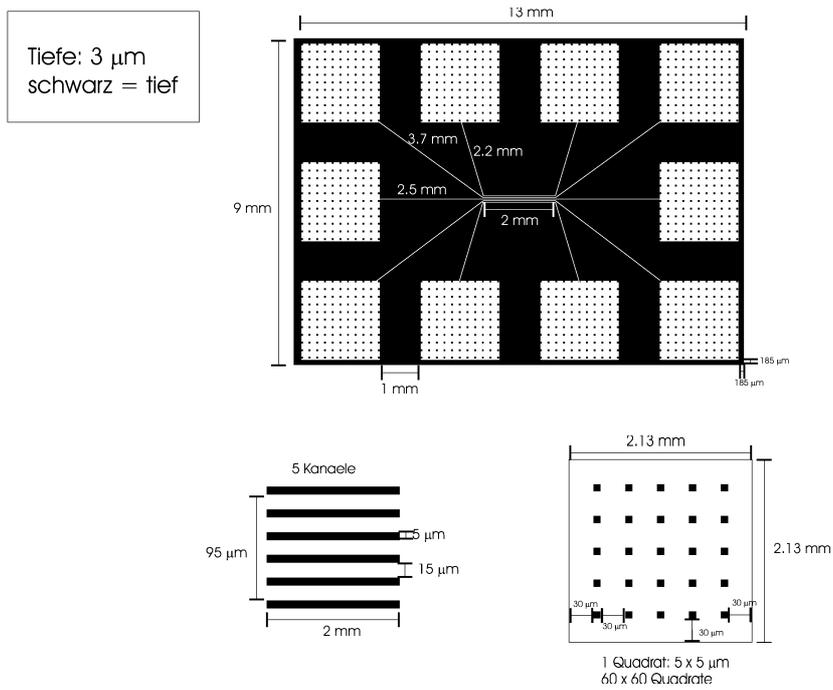
ten.

Insgesamt wurden zwei neuartige Verfahren vorgestellt, deren Schwerpunkte im Fall des Screening-Devices auf der Präparation des Arrays aus Lipidsegmenten lag und sich im Fall der Untersuchung der Kontaktmechanik auf die Multiparameteranalyse der Membranstabilität als Funktion von Kopfgruppe, Kettenlänge und Lamellarität konzentrierten. Diese beiden Techniken lassen sich gut in einem Multispotanalyseverfahren kombinieren, in der Lipid-Protein-Wechselwirkungen im Zusammenhang mit den mechanischen und adhäsiven Eigenschaften untersucht werden können.

Hier ergibt sich ein neuer Weg, nicht nur vergleichbare Ergebnisse bzgl. der mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen zu erhalten, sondern auch Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen auf der Ebene kleinster Molekülverbände zu untersuchen.

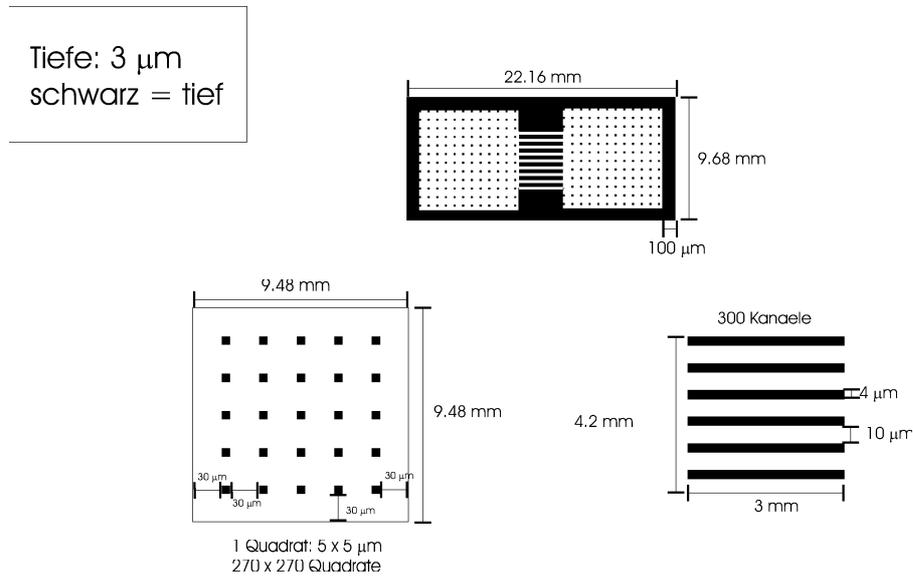
Anhang A

Strukturen im Silicium-Wafer



nicht alle quadratischen Loecher gezeigt

Abbildung A.1: Masterstruktur 1 im Silicium-Wafer.



nicht alle Quadrate abgebildet

Abbildung A.2: Masterstruktur 2 im Silicium-Wafer.

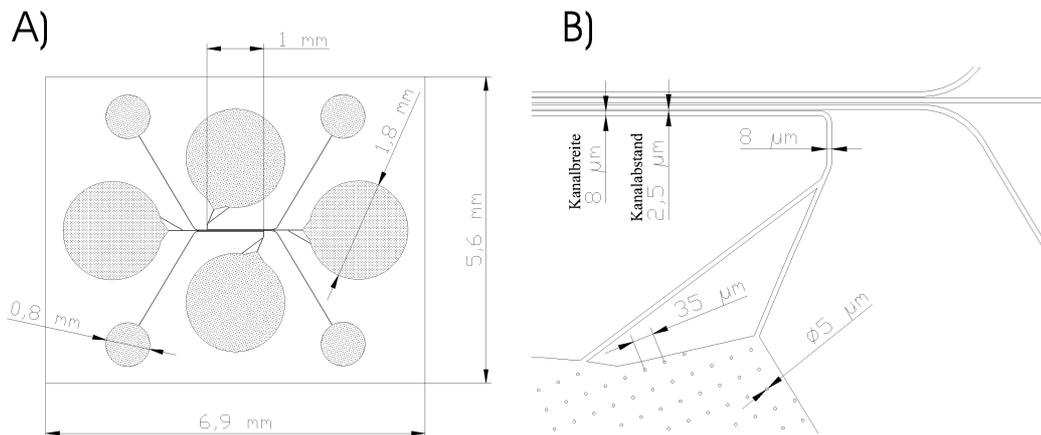


Abbildung A.3: Masterstruktur 3 im Silicium-Wafer; (A) Gesamtübersicht der Struktur; (B) Ausschnittsvergrößerung. Die Kapillarhöhe beträgt 4 μm .

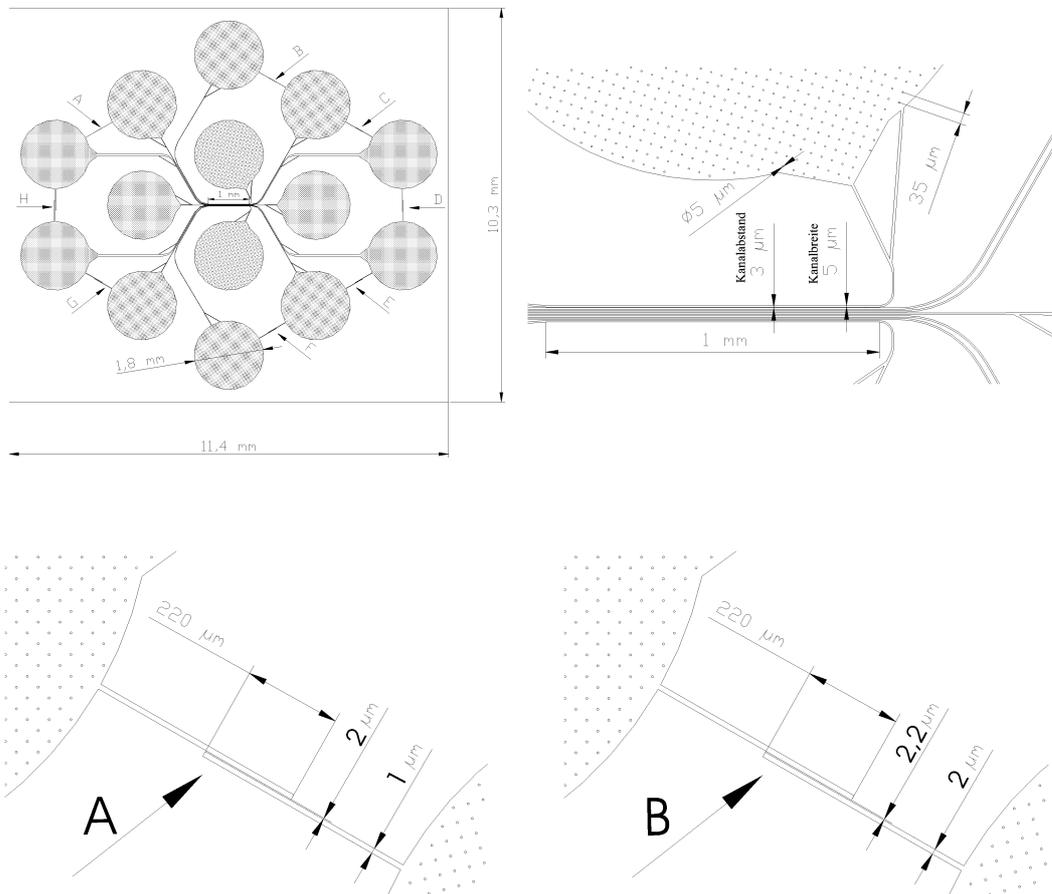


Abbildung A.4: Masterstruktur 4, 4A und 4B im Silicium-Wafer; (oben links) Gesamtübersicht der Struktur; (oben rechts) Ausschnittsvergrößerung der Hauptkapillaren (Struktur 4) in der Mitte der Masterstruktur. Die Ausschnittsvergrößerung der Kapillarsysteme 4A (unten links) und 4B (unten rechts) beziehen sich auf die Kapillaren, die sich im äußeren Bereich der Masterstruktur befinden (vgl. Gesamtübersicht). Die Kapillarhöhe beträgt $4 \mu m$.

Anhang B

Geräte

Rasterkraftmikroskopie:

Dimension 3100, Nanoscope IIIa+A/D Controller	Veeco, Santa Barbara, CA, USA
Bioscope, Nanoscope IIIa Controller	Veeco, Santa Barbara, CA, USA
Pulsed Force Box	WITec GmbH, Ulm, Deutschland
Kalibriergitter mit Spitzen TGT01	Anfatec, Oelsnitz, Deutschland
Cantilever:	
OMCL-TR400PSA	Olympus Optical Co., Japan
DNP-S-10	Veeco, Santa Barbara, CA, USA
Oszillatorkarte NI 5911	National Instruments, USA

Optische Mikroskopie:

Bio-Rad MRC 600	Bio-Rad, München, Deutschland
Leica DM IRE2	Leica Microsystems, Deutschland
Objektive HC PL Fluotar:	
10 × 0,3	Leica Microsystems, Deutschland
20 × 0,5	Leica Microsystems, Deutschland
50 × 0,8	Leica Microsystems, Deutschland

Probenpräparation:

Extruder LiposoFast	Avestin, Kanada
Tip Sonifier Labsonic U	Brandt, Deutschland
Plasmareiniger PDC-002	Harrick, New York, USA

Mikrostrukturierung:

Strukturierung der Silicium-Wafer	IMSAS, Bremen, Deutschland
	IMM, Mainz, Deutschland

Materialien

asialo- G_{M1}	Alexis Corporation, Schweiz
	Sigma, Deutschland
Bodipy-500/510- C_{12} HPC	Molecular Probes, USA
Calciumchlorid	VWR, Deutschland
Chloroform	Fluka, Deutschland
Cholesterin	Sigma, Deutschland
DMPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DMPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPDPC	Sigma, Deutschland
DPPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
EDTA	VWR, Deutschland
Ethanol	Fluka, Deutschland
5-(6)-FAM	Molecular Probes, USA
FITC-x-CTB	CALBIOCHEM, La Jolla, CA, USA
Gangliosid G_{M1}	Sigma, Deutschland
Glasdeckgläser	Plano, Deutschland
Glasobjektträger	Plano, Deutschland
Glimmer	Plano, Deutschland
Hellmanex	VWR, Deutschland
Methanol	Fluka, Deutschland
Mucosol	VWR, Deutschland
Natriumchlorid	VWR, Deutschland
PDMS	<i>SylgardTM</i> 184, Dow Corning, West Midland, USA
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Sphingomyelin brain	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Texas Red	Molecular Probes, USA
Tris	VWR, Deutschland
TRITC-x-PNA	Sigma, Deutschland

Literaturverzeichnis

- [1] Stephen P. A. Fodor, J. Leighton Read, Michael C. Pirrung, Lubert Strayer, Amy Tsai Lu und Dennis Solas. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*, 251:767–773, 1991.
- [2] E. Sackmann. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science*, 271:43–48, 1996.
- [3] Li A. Kung, Lance Kam, Jennifer S. Hovis und Steven G. Boxer. Patterning Hybrid Surfaces of Proteins and Supported Lipid Bilayers. *Langmuir*, 16(17):6773–6776, 2000.
- [4] Jennifer S. Hovis und Steven G. Boxer. Patterning Barriers to Lateral Diffusion in Supported Lipid Bilayer Membranes by Blotting and Stamping. *Langmuir*, 16(3):894–897, 2000.
- [5] Kenichi Morigaki, Tobias Baumgart, Andreas Offenhäusser und Wolfgang Knoll. Strukturierung festkörpergestützter Lipiddoppelschichten durch lithographische Polymerisation eines Diacetylen-Lipids. *Angew. Chem.*, 113(1):184–186, 2001.
- [6] A.A. Brian und H.M. McConnell. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81:6159–6165, 1984.

- [7] Younan Xia und George M. Whitesides. Soft Lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, Seiten 153–184, 1998.
- [8] G. Binnig, C.F. Quate und C. Gerber. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, 1986.
- [9] G. Löffler. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 3. vollst. überarbeitete Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [10] J.R. Silvius. *Lipid-Protein Interactions: Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*. John Wiley and Sons, New York, 1982.
- [11] www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu. Internetdatenbank, Januar 2003.
- [12] C.H. Huang und S. Li. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422:273–307, 1999.
- [13] Lubert Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 4. Auflage, Heidelberg, Berlin, 1996.
- [14] A.K. Singh, S.H. Harrison und J.S. Schoeniger. Gangliosides as Receptors for Biological Toxins: Development of Sensitive Fluoroimmunoassays Using Ganglioside-Bearing Liposomes. *Anal. Chem.*, 72:6019–6024, 2000.
- [15] H. Lis und N. Sharon. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.*, 98:637–674, 1998.
- [16] B. Ortiz, M. Bacilio, P. Gorocica, L.F. Montano, Y. Garfias und E. Zenteno. The Hydrophobic Character of Peanut (*Arachis hypogaea*) Isoagglutinins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:6267–6270, 2000.

- [17] R. Banerjee, K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia und M. Vijayan. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.*, 259:281–296, 1996.
- [18] K.J. Neurohr, D.R. Bundle, N.M. Young und H.H. Mantsch. Binding of disaccharides by peanut agglutinin as studied by ultraviolet difference spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 123:305–310, 1982.
- [19] M.J. Swamy, D. Gupta, S.K. Mahanta und A. Surolia. Further Characterization of the saccharide specificity of the peanut (*Arachis hypogae*) agglutinin. *Carbohydr. Res.*, 213:59–67, 1996.
- [20] C. Steinem, A. Janshoff, J. Wegener, W.P. Ulrich, W. Willenbrink, M. Sieber und H.J. Galla. Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 12:787–808, 1997.
- [21] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber und H.J. Galla. Specific binding of peanut agglutinin to G_{M1} -doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements. *Eur. Biophys. J.*, 25:105–113, 1996.
- [22] E.A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L’Hoir, J.A. Martial und W.G.J. Hol. Crystal Structure of Cholera Toxin B-pentamer Bound to Receptor *Protein Sci.*, 3:166–175, 1994.
- [23] D. Cabral-Lilly, G.E. Sosinsky, R.A. Reed, M.R. McDermott und G.Graham Shipley. Orientation of Cholera Toxin bound to Model Membranes. *Biophysical Journal*, 66:935–941, 1994.
- [24] J. Mou, J. Yang und Z. Shao. Atomic Force Microscopy of Cholera Toxin B-oligomers Bound to Bilayers of Biologically Relevant Lipids. *J. Mol. Biol.*, 248:507–512, 1995.

- [25] B. Goins, M. Masserini, B.G. Barisas und E. Freire. Lateral Diffusion of Ganglioside G_{M1} in Phospholipid Bilayer Membranes. *Biophysical Journal*, 49:849–856, 1986.
- [26] M.I. Fisher und T. Tjaernhage. Structure and activity of lipid membrane biosensor surfaces studied with atomic force microscopy and a resonant mirror. *Biosensors and Bioelectronics*, 15:463–471, 2000.
- [27] C.A. Rowe-Taitt, J.J. Cras, C.H. Patterson, J.P. Golden und F.S. Ligler. A Ganglioside-Based Assay for Cholera Toxin Using an Array Biosensor. *Analytical Biochemistry*, 281:123–133, 2000.
- [28] Alvaro San Paulo und Ricardo Garcia. High-Resolution Imaging of Antibodies by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy: Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes. *Biophysical Journal*, 78:1599–1605, 2000.
- [29] Bernd Gotsmann. Dynamische Kraftspektroskopie. *Dissertation*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000.
- [30] F.J. Giessibl. Atomic Resolution of the Silicon (111)-(7×7) Surface By Atomic-Force Microscopy. *Science*, 267:68–71, 1995.
- [31] Boris Anczykowski. Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur dynamischen Rasterkraftmikroskopie. *Dissertation*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1998.
- [32] B. Anczykowski, D. Krüger, K.L. Babcock und H. Fuchs. Basic properties of dynamic force spectroscopy with the scanning force microscope in experiment and simulation. *Ultramicroscopy*, 66:251–259, 1996.
- [33] D. Krüger, B. Anczykowski und H. Fuchs. Physical properties of dynamic force microscopies in contact and noncontact operation. *Annalen der Physik*, 6:341–363, 1997.

- [34] V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press, 57 Shelton Street, Covent Garden, London, 1999.
- [35] H. Takano, J.R. Kenseth, S. Wong, J.C. O'Brien und M.D. Porter. Chemical and Biochemical Analysis Using Scanning Force Microscopy. *Chem. Rev.*, 99:2845–2890, 1999.
- [36] A. Ikai. STM and AFM of bio/organic molecules and structures. *Surface Science Reports*, 26:261–332, 1996.
- [37] Y.F. Dufrene und G.U. Lee. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1509:14–41, 2000.
- [38] M. Radmacher, R.W. Tillmann, M. Fritz und H.E. Gaub. From Molecules to Cells: Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Science*, 257:1900–1905, 1992.
- [39] H.G. Hansma, K.J. Kim, D.E. Laney, R.A. Garcia, M. Argaman, M.J. Allen und S.M. Parsons. Properties of Biomolecules Measured from Atomic Force Microscope Images: A Review. *Journal of Structural Biology*, 119:99–108, 1997.
- [40] D.J. Müller, F.A. Schabert, G. Büldt und A. Engel. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 68:1681–1686, 1995.
- [41] H.-A. Kolb, O. Enders und R. Schauer. Morphology of native and reconstituted biological membranes and their components analysed with atomic force microscopy. *Applied Physics A*, 68:247–254, 1999.

- [42] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann und H. Gaub. Atomic Force Microscopy Imaging of Phospholipid Bilayer Degradation by Phospholipase A2. *Biophysical Journal*, 74:2398–2404, 1998.
- [43] O.H. Willemsen, M.M.E. Snel, K.O. van der Werf, B.G. de Groot, J. Greve, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, H. Schindler, Y. van Kooyk und C.G. Figdor. Simultaneous Height and Adhesion Imaging of Antibody-Antigen Interactions by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 75:2220–2228, 1998.
- [44] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer und H. Fuchs. Force Spectroscopy of Molecular Systems – Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:3212–3237, 2000.
- [45] Singh und D.J. Keller. Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers. *Biophysical Journal*, 60:1401–1410, 1991.
- [46] M. Beckmann, P. Nollert und H.-A. Kolb. Manipulation and Molecular Resolution of a Phosphatidylcholine-Supported Planar bilayer by Atomic Force Microscopy. *J. Membrane Bio.*, 161:227–233, 1998.
- [47] L.K. Tamm, C. Böhm, Jie Yang, Z. Shao, J. Hwang, M. Edidin und E. Betzig. Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy. *Thin Solid Films*, 284-285:813–816, 1996.
- [48] M.-C. Giocondi, L. Pacheco, P. E. Milhet und C. Le Grimallec. Temperature dependancy of the topology of supported dimyristoyl-distearoyl phosphatidylcholine bilayers. *Ultramicroscopy*, 86:151–157, 2001.
- [49] H.A. Rinia, R.A. Demel, J.P.J.M. van der Eerden und B. de Kruijff. Blistering of Langmuir-Blodgett Bilayers Containing Anionic Phospholipids as Observed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 77:1683–1693, 1999.

- [50] P.E. Milhiet, C. Domec, M.C. Biocondi, N. Van Mau, F. Heitz und C. Le Grimellec. Domain Formation in Models of the renal Brush Border Membrane Outer Leaflet. *Biophysical Journal*, 81:547–555, 2001.
- [51] C. Gliss, H. Clausen-Schaumann, R. Günther, S. Odenbach, O. Randl und T.M Bayerl. Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 74:2443–2450, 1998.
- [52] C.W. Hollars und R.C. Dunn. Submicron Structure in L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers and Bilayers Probed with Confocal, Atomic Force, and Near-Field Microscopy. *Biophysical Journal*, 75:342–353, 1998.
- [53] Y.F. Dufrene, W.R. Barger, J.-B. D. Green und G.U. Lee. Nanometer-Scale Surface Properties of Mixed Phospholipid Monolayers and Bilayers. *Langmuir*, 13:4779–4784, 1997.
- [54] J. Schneider, Y.F. Dufrene, W.R. Barger Jr. und G.U. Lee. Atomic Force Microscope Image Contrast Mechanisms on Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79:1107–1118, 2000.
- [55] Y.F. Dufrene, T. Boland, J.W. Schneider, W.R. Barger und G.U. Lee. Characterization of the physical properties of model biomembranes at the nanometer scale with the atomic force microscope. *Faraday Discussion*, 111:79–94, 1998.
- [56] M. Menke, S. Künneke und A. Janshoff. Lateral organization of G_{M1} in phase-separated monolayers visualized by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 31:317–322, 2002.

- [57] V. Vie, N. Van Mau, E. Lesniewska, J.P. Goudonnet, F. Heitz und C. Le Grimmellec. Distribution of Ganglioside G_{M1} between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, 14:4574–4583, 1998.
- [58] C. Yuan und L.J. Johnston. Distribution of Ganglioside G_{M1} in L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Monolayers: A Model for Lipid Rafts. *Biophysical Journal*, 79:2768–2781, 2000.
- [59] Z.V. Leonenko, A. Carnini und D. T. Cramb. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1509:131–147, 2000.
- [60] I. Reviakine und A. Brisson. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 16:1806–1815, 2000.
- [61] B. Pignataro, C. Steinem, H.J. Galla, H. Fuchs und A. Janshoff. Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 78:487–498, 2000.
- [62] T. Shibata-Seki, J. Masai, T. Tagawa, T. Sorin und S. Kondo. In-situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a substrate. *Thin Solid Films*, 273:297–303, 1996.
- [63] A.L. Weisenhorn, F.J. Schmitt, W. Knoll und P.K. Hansma. Streptavidin binding observed with an atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 42-44:1125–1132, 1992.
- [64] H. Mueller, H.J. Butt und E. Bamberg. Adsorption of Membrane-Associated Proteins to Lipid Bilayers Studied with the Atomic Force Microscope. *J. Phys. Chem. B*, 104:4552–4559, 2000.

- [65] T.J. McMaster, M.J. Miles, P.R. Shewry und A.S. Tatham. In Situ Surface Adsorption of the Protein C Hordein Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 16(4):1463–1468, 2000.
- [66] C. Moeller, M. Allen, V. Elings, A. Engel und D.J. Engel. Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces. *Biophysical Journal*, 77:1150–1158, 1999.
- [67] A. Rosa-Zeiser, E. Weilandt, S. Hild und O. Marti. The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Meas. Sci. Technol.*, 8:1333–1338, 1997.
- [68] T. Miyatani, M. Horii, A. Rosa, M. Fujihira und O. Marti. Mapping of electrical double-layer force between tip and sample surfaces in water with the pulsed-force-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 71(18):2632–2634, 1997.
- [69] T. Miyatani, S. Okamoto, A. Rosa, O. Marti und M. Fujihira. Surface charge mapping of solid surfaces in water by pulsed-force-mode atomic force microscopy. *Appl. Phys. A*, 66:S349–S352, 1998.
- [70] H.U. Krottil, T. Stifter, H. Waschipky, K. Weishaupt, S. Hild und O. Marti. Pulsed Force Mode: a New Method for the Investigation of Surface Properties. *Surface and Interface Analysis*, 27:336–340, 1999.
- [71] O. Marti. *Handbook of Modern Tribology: Measurement of adhesion and pull-off-forces*. CRC, 2000.
- [72] H.M. McConnell, T.H. Watts, R.M. Weis und A.A. Brian. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 864:95–106, 1986.

- [73] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao und L. Hu. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061:297–303, 1991.
- [74] B.J. Frisken, C. Asman und P.J. Patty. Studies of Vesicle Extrusion. *Langmuir*, 16:928–933, 2000.
- [75] J. Nissen, S. Gritsch, G. Wiegand und J.O. Raedler. Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - concepts towards self-healing membranes. *Eur. Phys. J. B*, 10:335–344, 1999.
- [76] C.A. Keller, K. Glasmaestar, V.P. Zhdanov und B. Kasemo. Formation of Supported membranes from Vesicles. *Physical Review Letters*, 84:5443–5446, 2000.
- [77] Noo Li Jeon, Junmin Hu, George M. Whitesides, Martin K. Erhardt und Ralph G. Nuzzo. Fabrication of Silicon MOSFETs Using Soft Lithography. *Adv. Mater.*, 10(17):1466–1469, 1998.
- [78] Frank F. Bier und Frank Kleinjung. Feature-size limitations of microarray technology - a critical review. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371:151–156, 2001.
- [79] Kazuo Hosokawa, Teruo Fujii und Isao Endo. Formation and Active Mixing of Metered Nano/Picoliter Liquid Droplets in a Microfluidic Device. *4th International Symposium on Micro Total Analysis Systems*, University of Twente, Enschede, NL, 2000.
- [80] Rebecca J. Jackman, David C. Duffy, Emanuele Ostuni, Nikolaos D. Willmore und George M. Whitesides. Fabricating Large Arrays of Microwells with Arbitrary Dimensions and Filling Them Using Discontinuous Dewetting. *Anal. Chem.*, 70(11):2280–2287, 1998.

- [81] Lance Kam und Steven G. Boxer. Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55:487–495, 2001.
- [82] Joydeep Lahiri, Emanuele Ostuni und George M. Whitesides. Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing. *Langmuir*, 15(6):2055–2060, 1999.
- [83] Kazuo Hosokawa, Teruo Fujii und Isao Endo. Droplet-Based Nano/Picoliter Mixer Using Hydrophobic Microcapillary Vent. *Proc. Micro Electro Mechanical Systems*, Seiten 388–393, 1999.
- [84] Marc A. Unger, Hou-Pu Chou, Todd Thorsen, Axel Scherer und Stephen R. Quake. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*, 288:113–116, 2000.
- [85] Younan Xia und George M. Whitesides. Softlithographie. *Angew. Chem.*, 110:569–594, 1998.
- [86] Younan Xia, John A. Rogers, Kateri E. Paul und George M. Whitesides. Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures. *Chem. Rev.*, 99(7):1823–1848, 1999.
- [87] Enoch Kim, Younan Xia und George Whitesides. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, 376:581–584, 1995.
- [88] B. Michel, A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Junker, H. Kind, J.P. Renault, H. Rothuizen, H. Schmid, P. Schmidt-Winkel, R. Stutz und H. Wolf. Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning. *IBM J. RES. and DEV.*, 45(5):697–719, 2001.
- [89] Andre Bernard, Dora Fitzli, Peter Sonderegger, Emmanuel Delamarche, Bruno Michel, Hans Rudof Bosshard und Hans Biebuyck. Affinity capture

- of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nature Biotechnology*, 19:866–869, 2001.
- [90] C.D. James, R.C. Davis, L. Kam, H.G. Craighead, M. Isaacson, J.N. Turner und W. Shain. Patterned Protein Layers on Solid Substrates by Thin Stamp Microcontact Printing. *Langmuir*, 14:741–744, 1998.
- [91] Huaiqiu Shi, Wei-Bor Tsai, Michael D. Garrison, Sandro Ferrari und Buddy D. Ratner. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, 398:593–597, 1999.
- [92] Michael D. Garrison, Todd C. McDevitt, Reto Luginbühl, Cecilia M. Giachelli, Pat Stayton und Buddy D. Ratner. Quantitative interrogation of micropatterned biomolecules by surface force microscopy. *Ultramicroscopy*, 82:193–202, 2000.
- [93] Matthias Geissler, Andre Bernard, Alexander Bietsch, Heinz Schmid, Bruno Michel und Emmanuel Delamarche. Microcontact-Printing Chemical Patterns with Flat Stamps. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(26):6303–6304, 2000.
- [94] Andre Bernard, Jean Philippe Renault, Bruno Michel, Hans Rudolf Bosshard und Emmanuel Delamarche. Microcontact Printing of Proteins. *Adv. Mater.*, 12(14):1067–1070, 2000.
- [95] Emmanuel Delamarche, Andre Bernard, Heinz Schmid, Bruno Michel und Hans Biebuyck. Patterned Delivery of Immunoglobulins to Surfaces Using Microfluidic Networks. *Science*, 276:779–781, 1997.
- [96] Andre Bernard, Bruno Michel und Emmanuel Delamarche. Micromosaic Immunoassays. *Anal. Chem.*, 73(1):8–12, 2001.
- [97] I. Caelen, A. Bernard, D. Juncker, B. Michel, H. Heinzelmann und E. Delamarche. Formation of Gradients of Proteins on Surfaces with Microfluidic Networks. *Langmuir*, 16:9125–9130, 2000.

- [98] Hanbin Mao, Tinglu Yang und Paul S. Cremer. Design and Characterization of Immobilized Enzymes in Microfluidic Systems. *Anal. Chem.*, 74(2):379–385, 2002.
- [99] Andreas Janshoff und Stephanie Künneke. Micropatterned Solid Supported Membranes Formed by Micromolding in Capillaries. *Eur. Biophys. J.*, 29:549–554, 2000.
- [100] Tinglu Yang, Seung-Yong Jung, Hanbin Mao und Paul S. Cremer. Fabrication of Phospholipid Bilayer-Coated Microchannels for On-Chip Immunoassays. *Anal. Chem.*, 73:165–169, 2001.
- [101] Jay T. Groves, Nick Ulman und Steven G. Boxer. Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Supports. *Science*, 275:651–653, 1997.
- [102] Jay T. Groves, Nick Ulman, Paul S. Cremer und Steven G. Boxer. Substrate-Membrane Interactions: Mechanisms for Imposing Patterns on a Fluid Bilayer Membrane. *Langmuir*, 14(12):3347–3350, 1998.
- [103] Paul S. Cremer, Jay T. Groves, Li A. Kung und Steven G. Boxer. Writing and Erasing Barriers to Lateral Mobility into Fluid Phospholipid Bilayers. *Langmuir*, 15(11):3893–3896, 1999.
- [104] Paul S. Cremer und Steven G. Boxer. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B*, 103(13):2554–2559, 1999.
- [105] Jay T. Groves, Steven G. Boxer und Harden M. McConnell. Electric Field Effects in Multicomponent Fluid Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B*, 104:119–124, 2000.
- [106] Steven G. Boxer. Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:704–709, 2000.

- [107] Li A. Kung, Jay T. Groves, Nick Ulman und Steven G. Boxer. Printing via Photolithography on Micropartitioned Fluid Lipid Membranes. *Adv. Mater.*, 12(10):731–734, 2000.
- [108] Lance Kam und Steven G. Boxer. Formation of Supported Lipid Bilayer Composition Arrays by Controlled Mixing and Surface Caption. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:12901–12902, 2000.
- [109] Jay T. Groves und Steven G. Boxer. Micropattern Formation in supported Lipid Membranes. *Acc. Chem. Res.*, 35:149–157, 2002.
- [110] Tinglu Yang, Eric E. Simanek und Paul Cremer. Creating Addressable Aqueous Microcompartments above Solid Supported Phospholipid Bilayers Using Lithographically Patterned Poly(dimethylsiloxane) Molds. *Anal. Chem.*, 72(11):2587–2589, 2000.
- [111] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, A. Paulus und M. Ehrat. Integrated Capillary Electrophoresis on Flexible Silicone Microdevices: Analysis of DNA Restriction Fragments and Detection of Single DNA Molecules on Microchips. *Anal. Chem.*, 69(17):3451–3457, 1997.
- [112] Manoj K. Chaudhury und George M. Whitesides. Direct Measurement of Interfacial Interactions between Semispherical Lenses and Flat Sheets of Poly(dimethylsiloxane) and Their Chemical Derivatives. *Langmuir*, 7:1013–1025, 1991.
- [113] E. Delamarche, B. Schmid, A. Bietsch, N.B. Larsen, H. Rothuizen, B. Michel und B. Biebuyck. Transport Mechanisms of Alkanethiols during Microcontact Printing on Gold. *J. Phys. Chem. B*, 102(18):3324–3334, 1998.
- [114] Vincent Linder, Elisabeth Verpoorte, Wolfgang Thormann, Nico F. de Rooij und Hans Sigrüst. Surface Biopassivation of Replicated Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels and Application to Heteroge-

- neous Immunoreaction with On-Chip Fluorescence Detection. *Anal. Chem.*, 73:4181–4189, 2001.
- [115] David C. Duffy, J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller und George M. Whitesides. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 70(23):4974–4984, 1998.
- [116] B.A. Grzybowski, R. Haag, N. Bowden und G.M. Whitesides. Generation of Micrometer-Sized Patterns for Microanalytical Applications Using a Laser Direct-Write Method and Microcontact Printing. *Anal. Chem.*, 70(22):4645–4652, 1998.
- [117] Enoch Kim, Younan Xia und George M. Whitesides. Micromolding in Capillaries: Applications in Material Science. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:5722–5731, 1996.
- [118] Emmanuel Delamarche, Andre Bernard, Heinz Schmid, Alexander Bietsch, Bruno Michel und Hans Biebuyck. Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates: Design and Application to Bioassays. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:500–508, 1998.
- [119] Janelle R. Anderson, Daniel T. Chiu, Rebecca J. Jackman, Oksana Cherniavskaya, J. Cooper McDonald, Hongkai Wu, Sue H. Whitesides und George M. Whitesides. Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping. *Anal. Chem.*, 72(14):3158–3164, 2000.
- [120] D. Myers. *Surfaces, Interfaces and Colloids: principles and applications*. VCH Publishers, Inc., 1991.
- [121] John A. Dean (Editor). *Langes Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill, Inc., 14. Edition, 1992.

- [122] J.H. Spurk. *Strömungslehre: Einführung in die Theorie der Strömungen*. Springer, 1996.
- [123] R.F. Ismagilov, D. Rosmarin, P.J.A Kenis, D.T. Chiu, W. Zhang, H.A. Stone und G.M. Whitesides. Pressure-Driven Laminar Flow in Tangential Microchannels: an Elastomeric Microfluidic Switch. *Anal. Chem.*, 73(19):4682–4687, 2001.
- [124] Enoch Kim und George M. Whitesides. Imbibition and Flow of Wetting Liquids in Noncircular Capillaries. *J. Phys. Chem. B*, 101:855–863, 1997.
- [125] Chun Yang und Dongqing Li. Analysis of electrokinetic effects on the liquid flow in rectangular microchannels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 143:339–353, 1998.
- [126] A. E. Kamholz und P. Yager. Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels. *Biophysical Journal*, 80:155–160, 2001.
- [127] Noo Li Jeon, Stephan K. W. Dertinger, Daniel T. Chiu, Insung S. Choi, Abraham D. Stroock und George M. Whitesides. Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems. *Langmuir*, 16(22):8311–8316, 2000.
- [128] H. Schmid und B. Michel. Siloxane Polymers for High-Resolution , High-Accuracy Soft Lithography. *Macromolecules*, 33(8):3042–3049, 2000.
- [129] Emmanuel Delamarche, Heinz Schmid, Bruno Michel und Hans Biebuyck. Stability of Molded Polydimethylsiloxane Microstructures. *Adv. Mater.*, 9(9):741–746, 1997.
- [130] John A. Rogers, Kateri E. Paul und George M. Whitesides. Quantifying distortions in soft lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 16(1):88–97, 1998.

- [131] Noo Li Jeon, Insung S. Choi, Bing Xu und George M. Whitesides. Large-Area Patterning by Vacuum-Assisted Micromolding. *Adv. Mater.*, 11(11):946–950, 1999.
- [132] Paul J.A. Kenis, Rustem F. Ismagilov und George M. Whitesides. Micro-fabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. *Science*, 285:83–85, 1999.
- [133] J.G. Dosramos und C.A. Silebi. An Analysis of the Separation of Submicron Particles by Capillary Hydrodynamic Fractionation (CHDF). *Journal of Colloid and Interface Science*, 133(2):302–320, 1989.
- [134] C.A. Silebi und J.G. Dosramos. Separation of Submicrometer Particles by Capillary Hydrodynamic Fractionation (CHDF). *Journal of Colloid and Interface Science*, 130(1):14–24, 1989.
- [135] J.G. Dosramos und C.A. Silebi. The Determination of Particle Size Distribution of Submicrometer Particles by Capillary Hydrodynamic Fractionation (CHDF). *Journal of Colloid and Interface Science*, 135(1):165–177, 1990.
- [136] Robert J. Hunter. *Foundations of Colloid Science*. Vol. 1, Oxford University Press Inc., New York, 1986.
- [137] Silke Weiland. Einfluss des Cholesteringehalts auf die laterale Beweglichkeit von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus 1-Palmityl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin. *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2002.
- [138] A.L. Weisenhorn, M. Khorsandi, S. Kasas, V. Gotzos und H.J. Butt. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*, 4:106–113, 1993.

- [139] A. Vinckier und G. Semenza. Minireview: Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 430:12–16, 1998.
- [140] M. Radmacher, R.W. Tillmann und H.E. Gaub. Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 64:735–742, 1993.
- [141] M. Radmacher. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 16:47–57, 1997.
- [142] M. Radmacher, M. Fritz, J.P. Cleveland, D.A. Walters und P.K. Hansma. Imaging Adhesion Forces and Elasticity of Lysozyme Adsorbed on Mica with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 10:3809–3814, 1994.
- [143] R.W. Carpick und M. Salmeron. Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with the Atomic Force Microscope. *Chem. Rev.*, 97:1163–1194, 1997.
- [144] H.J. Butt. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 60:1438–1444, 1991.
- [145] T.J. Senden, C.J. Drummond und P. Kekicheff. Atomic Force Microscopy: Imaging with Electrical Double Layer Interactions. *Langmuir*, 10:358–362, 1994.
- [146] H.J. Butt, M. Jaschke und W. Ducker. Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38:191–201, 1995.
- [147] C. Rotsch und M. Radmacher. Mapping Local Electrostatic Forces with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 13:2825–2832, 1997.

- [148] H. Mueller, H.J. Butt und E. Bamberg. Force Measurements on Myelin Basic Protein Adsorbed to Mica and Lipid Bilayer Surfaces Done with the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal*, 76:1072–1079, 1999.
- [149] H.J. Butt, M. Kappl, H. Mueller und R. Raiteri. Steric Forces Measured with the Atomic Force Microscope at Various Temperatures. *Langmuir*, 15:2559–2565, 1999.
- [150] R. Lipowsky und E. Sackmann (Editoren). *Handbook of Biological Physics: Structure and Dynamics of Membranes: Generic and Specific Interactions*. Volume 1B, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995.
- [151] B. Cappella und G. Dietler. Force–distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, 34:1–104, 1999.
- [152] Jacob Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. ACADEMIC PRESS INC., San Diego, CA 92101, 2. Edition, 1992.
- [153] V.A. Parsegian und D. Gingell. On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges. *Biophysical Journal*, 12:1192–1204, 1972.
- [154] H.J. Butt. Electrostatic interaction in atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 60:777–785, 1991.
- [155] H.J. Butt. Electrostatic interaction in scanning probe microscopy when imaging in electrolyte solutions. *Nanotechnology*, 3:60–68, 1992.
- [156] H.J. Butt. Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a scanning force microscope. *Biophysical Journal*, 63:578–582, 1992.
- [157] K.L. Johnson, K. Kendall und A.D. Roberts. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 324:301–313, 1971.

- [158] B.B. Derjaguin, B.M. Muller und Y.P. Toporov. Effect of Contact Deformation on the Adhesion of Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 53(2):314–326, 1975.
- [159] V.M. Muller, V.S. Yushchenko und B.V. Derjaguin. On the Influence of Molecular Forces on the Deformation of an Elastic Sphere and its Sticking to a Rigid Plane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 77(1):91–101, 1980.
- [160] V.M. Muller, V.S. Yushchenko und B.V. Derjaguin. General Theoretical Consideration of the Influence of Surface Forces on Contact Deformations and the Reciprocal Adhesion of Elastic Spherical Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 92(1):92–101, 1983.
- [161] H. Hertz. Über die Berührung fester elastischer Körper. *J. Reine Angew. Math.*, 92:156–171, 1881.
- [162] I.N. Sneddon. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, 3:47–57, 1965.
- [163] D. Maugis. Adhesion of Spheres: The JKR–DMT Transition Using a Dugdale Model. *Journal of Colloid and Interface Science*, 150(1):243–269, 1992.
- [164] B.D. Hughes und L.R. White. Implications of Elastic Deformation on the Direct Measurement of Surface Forces. *J.C.S. Faraday I*, 76:963–978, 1980.
- [165] D.J. Müller, D. Fotiadis, S. Scheuring, S.A. Müller und A. Engel. Electrostatically Balanced Subnanometer Imaging of Biological Specimens by Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal*, 76:1101–1111, 1999.
- [166] J. Colchero, A.M. Baro und O. Marti. Energy dissipation in scanning force microscopy – friction on an atomic scale. *Tribology Letters*, 2:327–343, 1996.

- [167] Jan H. Hoh und Andreas Engel. Friction Effects on Force Measurements with an Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 9:3310–3312, 1993.
- [168] V. Franz, S. Loi, H. Müller, E. Bamberg und H.J. Butt. Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23:191–200, 2002.
- [169] X. Chen, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler und P.M. Williams. Hydrodynamic damping of tip sample oscillation in pulsed-force atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 77(21):3462–3464, 2000.
- [170] B. Anczykowski, D. Krüger und H. Fuchs. Cantilever dynamics in quasiconcontact force microscopy: spectroscopic aspects. *Physical Review B-Condensed Matter*, 53(23):15485–15488, 1996.
- [171] L. Verlet. Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard–Jones–Molecules. *Phys. Rev.*, 159(1):98–103, 1967.
- [172] H.J. Butt und M. Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6:1–7, 1995.
- [173] E. London und D.A. Brown. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta*, 1508:182–195, 2000.
- [174] H.A. Rinia, M.M.E. Snel, J.P.J.M. van der Eerden und B. de Kruijff. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with Atomic Force Microscopy. *FEBS Letters*, 501:92–96, 2001.
- [175] D.A. Brown und E. London. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:17221–17224, 2000.

- [176] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson und E. Gratton. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophysical Journal*, 80:1417–1428, 2001.
- [177] T. Stifter, E. Weilandt, O. Marti und S. Hild. Influence of the topography on adhesion measured by SFM. *Appl. Phys. A*, 66:S597–S605, 1998.
- [178] G.W. Feigenson. On the Nature of Calcium Ion Binding between Phosphatidylserine Lamellae. *Biochemistry*, 25:5819–5825, 1986.
- [179] H.L. Casal, A. Martin, H.H. Mantsch, F. Paltauf und H. Hauser. Infrared Studies of Fully Hydrated Unsaturated Phosphatidylserine Bilayers. Effect of Li^+ and Ca^{2+} . *Biochemistry*, 26:7395–7401, 1987.
- [180] M. Roux und M. Bloom. Calcium binding by phosphatidylserine headgroups. *Biophysical Journal*, 60:38–44, 1991.
- [181] J. Mattai, H. Hauser, R.A. Demel und G.G. Shipley. Interactions of Metal Ions with Phosphatidylserine Bilayer Membranes: Effect of Hydrocarbon Chain Unsaturation. *Biochemistry*, 28:2322–2330, 1989.
- [182] G.W. Feigenson. Calcium Ion Binding between Lipid Bilayers: The Four-Component System of Phosphatidylserine, Phosphatidylcholine, Calcium Chloride, and Water. *Biochemistry*, 28:1270–1278, 1989.
- [183] C.A. Rutkowski, L.M. Williams, T.H. Haines und H.Z. Cummins. The Elasticity of Synthetic Phospholipid Vesicles Obtained by Photon Correlation Spectroscopy. *Biochemistry*, 30:5688–5692, 1991.
- [184] D.D. Koleske, W.R. Barger, G.U. Lee und R.J. Colton. Scanning Probe Microscope Study of Mixed Chain-Length Phase-Segregated Langmuir-Blodgett Monolayers. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 464:377–383, 1997.

- [185] W. Barger, D.D. Koleske, K. Feldman, D. Krüger und R.J. Colton. Small Change – Big Effect: SPM Studies of two-component Fatty-Acid Monolayers. *Polym. Prepr.*, 37:606, 1996.