

**PHOTOFIXIERUNG VON LIPIDMEMBRANEN AUS
GLYKOLIPOPOLYMEREN AUF GOLDOBERFLÄCHEN**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Annette Reisinger-Friebis
geboren in Germersheim

Mainz, 2006

Dekan: Prof. Dr. P. L.

1.Berichterstatter: Prof. Dr. U.P.

2.Berichterstatter: Prof. Dr. W.K.

Tag der mündlichen Prüfung:

" Quand nous prendrons conscience de notre rôle, même le plus effacé, alors seulement nous serons heureux. Alors seulement nous pourrons vivre en paix et mourir en paix, car ce qui donne un sens à la vie donne un sens à la mort."

Antoine de Saint-Exupéry, Terre des hommes

1 Allgemeiner Teil

1.1 Biologische Lipidmembranen

Biologische Zellen sind von Lipidmembranen umgeben. Diese Zellmembranen sind für die Funktion der Zelle von entscheidender Bedeutung. Zum einen umhüllen sie die einzelnen Zellen und bilden eine hochselektive Permeabilitätsschranke, zum anderen unterteilen sie das Zellinnere in Reaktionsräume, die sogenannten Kompartimente. Die biologische Membran ist ein flächiges Aggregat bestehend aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Wie bereits erwähnt erfolgt durch die Membranen eine Abgrenzung der Zellen gegen ihre Umgebung. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine starre undurchdringliche Barriere sondern um eine selektive Abgrenzung, in die spezifische Proteine eingebettet vorliegen. Diese erfüllen je nach Zelltyp unterschiedliche Aufgaben. Durch Transportsysteme, wie hochspezifische Pumpen und Kanäle, wird die Molekül- und Ionenzusammensetzung des Intrazellularraumes reguliert. Die eukaryontischen Zellen zeichnen sich außerdem durch die oben genannten Kompartimente aus; es handelt sich hierbei um Zellorganellen, die alle unterschiedliche Aufgaben erfüllen. In ihrem Inneren laufen die unterschiedlichsten biochemischen Stoffwechselreaktionen auf engstem Raum und doch getrennt voneinander ab.

Die Zellmembran erfüllt Funktionen wie den Stofftransport, die Bindung von Rezeptoren, enzymatische Prozesse und Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zellen. Die Membranlipide bilden in wässrigen Medien spontan geschlossene bimolekulare Schichten. Membranen sind asymmetrische flüssige Strukturen. Das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson [Singer 1972] beschreibt die Ausbildung einer fluiden Doppelschicht aus zwei monomolekularen Lipidschichten, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Integrale Membranproteine durchspannen die Membran und ermöglichen einen Stoffaustausch mit anderen Zellen. Die integralen Membranproteine sind lateral beweglich und bilden carrier, Kanäle und aktive Transporter. Im Gegensatz dazu liegen periphere

Membranproteine an der Oberfläche der Membran. Sie können beispielsweise durch elektrostatische Wechselwirkungen festgehalten werden.

Die Lipiddoppelschicht bildet eine nahezu impermeable Barriere für geladene und größere Moleküle. Sie verhält sich wie eine zweidimensionale Matrix. Die Lipide bilden das Grundgerüst der Membran. Sie bestehen aus einer hydrophoben Kette und einer hydrophilen Kopfgruppe. Diese amphiphile Eigenschaft und ihr Dipolcharakter führen dazu, dass die Lipide in wässrigem Milieu spontan Doppelschichten ausbilden. Die hydrophoben Ketten lagern sich zusammen, während die hydrophilen Kopfgruppen dem Wasser zugewandt sind. Dadurch bilden sich, je nach Art der Lipide und den äußeren Bedingungen Lipiddoppel- oder Multischichten. Die Doppelschicht bildet eine Struktur von etwa 5nm Stärke. Sie stellt die Grundstruktur der Biomembran dar.

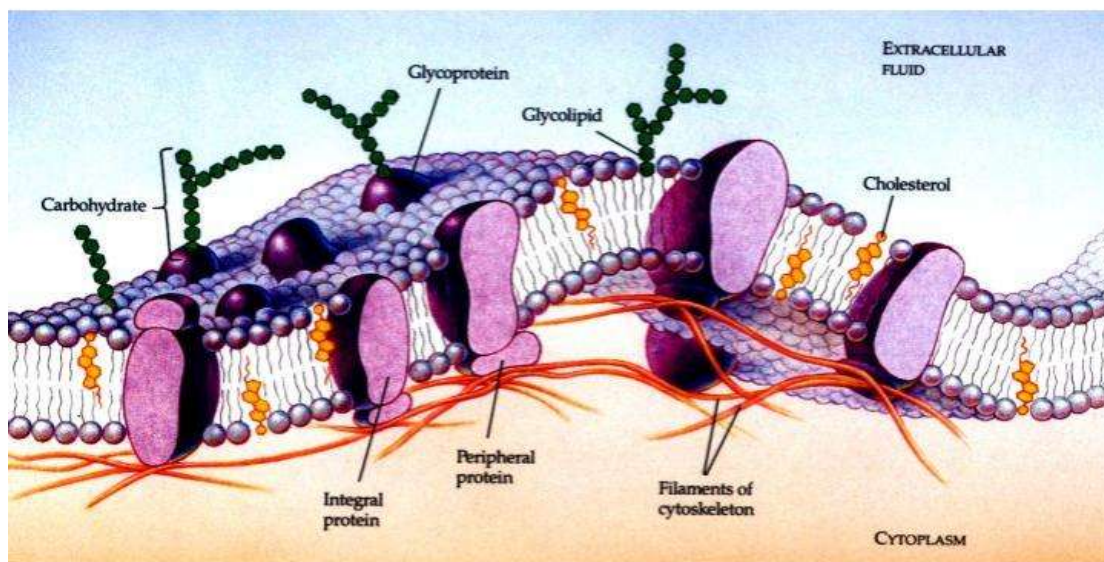


Abbildung 1-1: Schematisches Modell einer Zellmembran [Schiller 2002].

1.2 Biomimetik der Lipidmembranen

Ziel der Entwicklung von Modellsystemen ist die Nachahmung der biologischen Membran. Allerdings wurde aufgrund der Komplexität der Membranen zur Erforschung der Membraneigenschaften auf künstliche Membranen aus nur wenigen Komponenten zurückgegriffen. Vereinfachte Membranmodelle waren und sind Ziel intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen. Die wichtigsten Komponenten der

Modellmembranen sind amphiphile Moleküle, vorrangig Phospholipide, die sich aus Lösungsmitteln in thermodynamisch kontrollierte Aggregate zusammenfinden.

Ziel der Forschung ist die Anwendung der Membranen zur Untersuchung der in ihr enthaltenen Rezeptoren, Enzyme und Kanalproteine. Ein Anwendungsgebiet stellt die Biotechnologie dar. Nachfolgend soll kurz auf die wichtigsten Modellsysteme eingegangen werden.

1.3 Modellsysteme

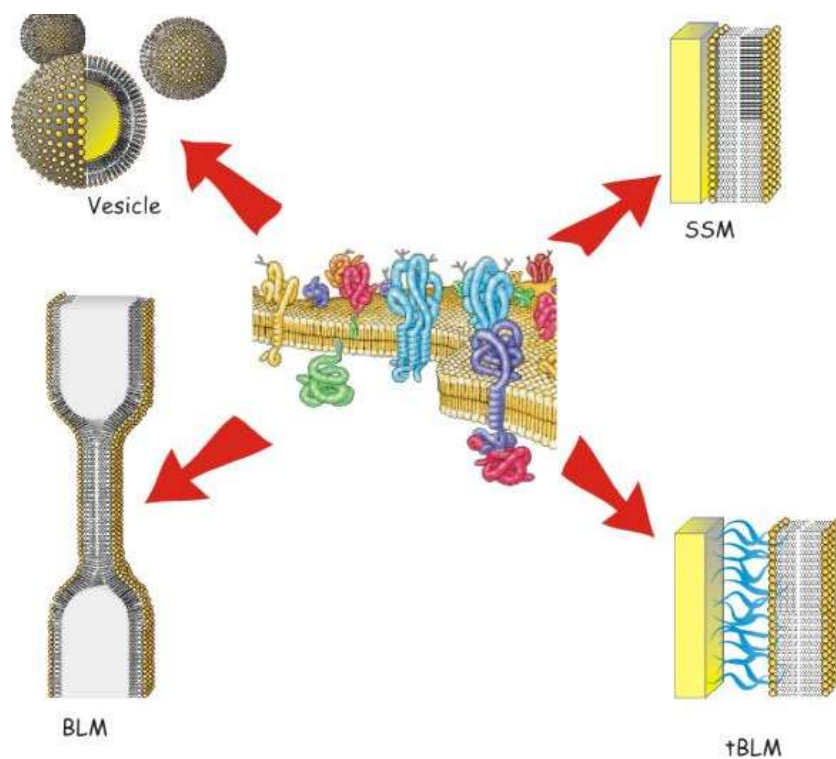


Abbildung 1-2 Modellsysteme, die ausgehend von den Gegebenheiten der natürlichen Biomembran (Mitte) entwickelt wurden: Vesicle= Liposom; SSM= solid supported membrane= Festkörperunterstützte Membran; BLM= black lipid membrane= Schwarzfilmmembran; tBLM= tethered bilayer membrane= festkörperunterstützte Membran mit Abstandhalter (tether)[Naumann 2003].

1.3.1 Liposomen

Phospholipide bilden in wässrigem Medium spontan konzentrische Vesikel, die Liposomen. Die Liposomenhülle besteht aus einer (unilamellar) oder mehreren

(multilamellar) wasserunlöslichen Phospholipid-Doppelschichten, die einen wässrigen Kern umschließen. Liposomen dienen als Membranmodelle für kalorimetrische und optische Untersuchungen.

In der Pharmazie sind sogenannte drug delivery Systeme seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschungen. Der Begriff definiert die Idee der direkten „Abgabe“ des entsprechenden Arzneistoffes an seinem gewünschten Wirkort ohne gleichzeitigen Kontakt mit anderen Zellen und dem damit verbundenen Risiko von unerwünschten Nebeneffekten. Negative systemische Effekte treten vor allem bei Langzeitanwendung (chronische Erkrankungen) und hohen Dosen (Chemotherapie bei Krebserkrankungen) von Arzneistoffen auf. Liposomen-enthaltende Arzneimittel sind seit einigen Jahren auf dem Markt. Es zählen dazu Liposomen aus Rindersurfactant¹ zur intratrachealen Instillation, die zur Behandlung des Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen und Säuglingen eingesetzt werden. Das Zytostatikum Doxorubicin zur i.v.² Injektion ist ein weiteres Liposomen-Präparat. In der liposomalen Darreichungsform ist die Zirkulationszeit in der Blutbahn deutlich verlängert. Tumorzellen besitzen aufgrund ihres schnellen Wachstums eine hohe Neubildungsrate zur Versorgung dienender Blutgefäße. Diese kommen beständig mit dem Arzneistoff in Kontakt. Die tumorversorgenden Blutgefäße haben außerdem im Gegensatz zu Gefäßen in normalem Gewebe Lücken, so genannte Gaps. Die intakten Liposomen dringen durch die Gaps ins Gewebekompartiment ein und bleiben im Interstitium des Tumors in der Nähe des Gefäßes. So steht am Wirkort eine hohe Konzentration des Zytostatikums zur Verfügung [Pharmazeutische Zeitung 2001].

Auch in kosmetischen Zubereitungen sind Liposomen enthalten. Ihnen wird unter anderem eine positive Beeinflussung des Hydratationszustandes der Haut zugeschrieben. Die Einbettung verschiedener Substanzen wie beispielsweise Vitamine sollen diesen Effekt noch verstärken.

¹ surfactant: der die Oberfläche der Lungenbläschen bedeckende Flüssigkeitsfilm enthält Substanzen, die die Oberflächenspannung herabsetzen. Diese werden allgemein als Surfactant bezeichnet (Mutschler 1996)

² i.v. intravenös

1.3.2 Black lipid membranes (Schwarzfilmmembranen)

Zur Herstellung der Schwarzfilmmembranen oder black lipid membranes wird ein geeignetes Lipid oder Lipidgemisch in organischem Lösungsmittel gelöst und die Lösung anschließend über ein 1-2mm großes Loch in einer Teflonplatte gestreift. Durch Verdampfen des Lösungsmittels und self-assembly der Lipidmoleküle entsteht spontan eine Lipiddoppelschicht. Die Schicht erscheint aufgrund ihrer Dicke ($<$ Wellenlänge des sichtbaren Lichtes) schwarz. An black lipid membranes lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Membranen und Membranproteinen studieren. Sie eignen sich zur Untersuchung von Stoff- und Ladungstransportphänomenen, wie sie bei der Permeation durch Lipidschichten auftreten. Die hervorragenden elektrischen Eigenschaften sowie die Möglichkeit zur Einzelkanaluntersuchung werden durch die geringe mechanische Stabilität beeinträchtigt.

1.3.3 Festkörperunterstützte Membranen

Die genannten Nachteile der verschiedenen Modellsysteme führten zur Entwicklung der festkörperunterstützten Membranen.

Die funktionelle Kombination von Lipiddoppelschichten mit festen Trägern wurde in den letzten Jahren zu einem aktuellen Forschungsthema [Sackmann 1996]. Der einfachste Ansatz einer festkörperunterstützten Membran ist eine Phospholipiddoppelschicht auf einer Oberfläche. Durch die Angliederung an planare Oberflächen zeigen diese Membransysteme verglichen mit den zuvor genannten Modellsystemen ein hohes Maß an Stabilität. Durch die planare Anordnung wird der Einsatz einer ganzen Reihe oberflächensensitiver Untersuchungsmethoden möglich. Es finden sich darunter spektroskopische wie Oberflächenplasmonenspektroskopie, Oberflächenfluoreszenzspektroskopie sowie elektrische wie Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS), Cyclovoltammetrie (CV), Neutronenstreuung und einige andere mehr. Eine Erläuterung der genannten Methoden findet sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit sowie bei Skoog und Leary [Skoog 1996].

Festkörperunterstützte Membranen werden verwendet um Einbau und Funktion von Kanal- und Carrierproteinen zu untersuchen; die Lipidmembran dient hierbei als Matrix für die zu untersuchenden Proteine [Cornell 1997].

Frühe Untersuchungen gehen von einer Lipiddoppelschicht aus, die lediglich physisorbiert auf einem hydrophilen Substrat vorliegt. Die Membran ist durch eine ultradünne Wasserschicht vom Substrat getrennt [McCornell 1986]. Dieses Konzept zeigt jedoch Nachteile. Die rein physikalische Kopplung kann zur Ablösung der Membran und damit zu einer sehr geringen Lebensdauer führen. Diese Tatsache erschwert die Anwendung der genannten Untersuchungsmethoden. Auch die sehr geringe Dicke der Wasserschicht unter der Lipidmembran (meist 1-2 nm) schafft nicht ausreichend Raum für die Einlagerung von integralen Proteinen, da für deren periphere Domänen ein entsprechender Raum benötigt wird. Die Möglichkeit des Einsatzes künstlicher Membranen zur Untersuchung natürlicher Membranproteine wurde von unterschiedlichen Gruppen genutzt, jedoch ist es schwierig Untersuchungen an Lipiddoppelschichten und in ihnen enthaltenen Transmembranproteine durchzuführen, wenn die Membran direkt auf dem Substrat aufgebaut wird. Der dünne Wasserfilm auf dem Substrat (1-2 nm) trennt zwar die Biomembran von der Oberfläche und scheint ausreichend um eine laterale Mobilität der Lipide zu ermöglichen aber ist nicht ausreichend um einen Kontakt zwischen Protein und Substrat zu verhindern. Dies kann zum einen zum Verlust der Protein-Mobilität führen zum anderen ist auch eine Denaturierung der Proteine wahrscheinlich [Salafsky 1996]. Die Verwendung von Abstandhaltern zwischen Substrat und Lipidmembran kann diese Probleme vermeiden.

1.3.4 Membransysteme mit Abstandhaltermolekülen

Die genannten Einschränkungen bei den rein festkörperunterstützten Membranen führten zur Entwicklung neuer Systeme, bei denen Abstandhaltermoleküle zwischen Substrat und Lipidschicht eingeführt wurden. Solche Systeme werden auch verankerte bimolekulare Lipidmembranen engl. tethered bimolecular lipid membranes, tBLM, genannt. Die Membran kann durch kovalente Anbindung auf der modifizierten Oberfläche verankert werden. Von der reinen Physisorption gelangt man so zur chemischen Anbindung, die deutlich stabilere Schichten erzeugt. Es

kommt zur Entkopplung der Membran vom Substrat. Diese Entkopplung ist sowohl strukturell als auch funktionell zu sehen. Der Einfluß der Oberfläche auf die Membraneigenschaften wird minimiert. Diese Tatsache erleichtert die Biomimesis der natürlichen Membran und ihrer komplexen Eigenschaften.

Man kann die festkörperunterstützten Membranen in verschiedene Kategorien einteilen. Einmal die rein physisorbierten Modelle, dann die rein chemisorbierten oder eine Kombination aus beiden. Hier ist die sind die Moleküle chemisch an das Substrat gebunden, entstandene Lücken werden mit freien Lipiden aufgefüllt [Cornell 1997], [Raguse 1998], [Lingler1998].

Eine Untergruppe der Membransysteme mit Abstandhaltermolekülen stellen die polymerunterstützten Membranen dar. Systeme aus dieser Untergruppe werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht und im folgenden genauer erläutert.

1.4 Polymerunterstützte Membranen

Wichtige Eigenschaften der biologischen Membranen sind die laterale Fluidität und eine hydrophile Umgebung auf beiden Seiten der Membran. Diese Anforderungen müssen auch in einer festkörperunterstützten Membran erfüllt sein, wenn diese für die Untersuchung von Membranproteinen verwendet werden soll. Reaktionen in Membranen hängen von lateraler Bewegung und den fluiden Eigenschaften aller Membrankomponenten ab [Wagner 2000]. Die Konformation und somit die Funktion der Membranproteine geht mit einer hydrophilen Umgebung einher [Leik 1993], [Skar 1996]. In Wasser quellbare Hydrogele als „Kissen“ unter der Membran erfüllen diese Forderungen in besonderem Maße: sie ermöglichen eine Entkopplung der Lipidmembran vom Substrat und stellen eine hydrophile, Wasser-enthaltende Schicht für die Einbettung der voluminösen Membranproteine zur Verfügung [Sackmann 1996].

Der Ansatz, Polymere als Abstandhalter für eine biokompatible Membran zu verwenden, ist nicht neu. Die Oberflächenmodifikation mit Polymeren fand in den letzten Jahren zunehmend Beachtung. Dabei spielt die zukünftige Anwendung in der Biosensorik die entscheidende Rolle für die Entwicklung der unterschiedlichsten Systeme. Man hofft, durch die Verwendung von Polymeren als Abstandhalter

zwischen Substrat und Phospholipiddoppelschicht eine Denaturierung der zu untersuchenden Proteine verhindern zu können. Die Lipid-Protein-Doppelschicht soll durch das biokompatible Hydrogel des Polymers von der Substratoberfläche entkoppelt werden. Ein weiterer Faktor ist die stabile Kopplung des Polymersystems an den Untergrund. Dies wird auf Goldoberflächen bevorzugt durch die Verwendung von Sulfidgruppen für die kovalente Anbindung der zu untersuchenden Moleküle auf der Oberfläche erreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine polymerunterstützte Lipiddoppelschicht auf Goldoberflächen folgende Forderungen erfüllt sein müssen: zum einen muß das Polymer mittels Sulfidgruppen kovalent an der Goldoberfläche angebunden werden. Des weiteren sollen wasserlösliche Gruppen für eine Quellung des Kissens enthalten sein, das damit die Lipid-Protein-Doppelschicht vom Substrat entkoppelt. Das Polymermolekül soll außerdem ein gebundenes natürliches Lipid enthalten, das die anschließende Vesikelfusion induziert und damit die Doppelschicht zu komplettieren vermag.

Die unterschiedlichsten Polymere wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Abstandhalter untersucht. Spinke et al. beschäftigten sich mit dem Aufbau eines hydrophilen Methacrylat-Coblock-Polymers mit aliphatischen Seitenketten auf Goldoberflächen. Die anschließende Vesikelfusion wurde mit Oberflächenplasmonenspektroskopie verfolgt; die resultierenden Doppelschichten jedoch nicht weiter untersucht [Spinke 1992]. Kühner et al. arbeiteten mit 30-40µm dicken Polyacrylamidgelen und anschließendem Membranaufbau mittels Langmuir-Blodgett Techniken auf Glasoberflächen. Die Doppelschichten wurden mit Epifluoreszenzmikroskopie untersucht und hierbei Domänenbildung beobachtet [Kühner 1994]. Eine Erweiterung zur genannten Kühner Arbeit stellten die Arbeiten von Dietrich und Tampé dar. Sie untersuchten die elektrophoretische Mobilität von geladenen Lipiden in Monoschichten auf Agarosegelen. Auf diesen Substraten wurden jedoch keine Doppelschichten gebildet [Dietrich 1995]. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit Polyvinylsubstraten mit funktionalisierten Diethylenaminogruppen zur Anbindung von Lipidkopfgruppen. Es konnte die Bildung von homogenen Doppelschichten mit hohen Diffusionskoeffizienten für die Lipide gezeigt werden; allerdings waren die hydrophilen Abstandhalter zu kurz um

Membranproteine in dieses System einzubauen. Ebenfalls kann es durch nicht abreagierte positiv geladene Ammoniumgruppen zu Problemen kommen [Beyer 1996]. Dasselbe Ladungsproblem gibt es auch für Doppelschichten, die von Majewski et al. auf Polyethyleniminschichten untersucht wurden. Auch bei diesen stellte sich heraus, dass nicht abreagierte positiv geladene Ammoniumgruppen ein Problem für die Membranproteine darstellten [Majewski 1998]. Wong et al. charakterisierten Lipiddoppelschichten auf Polyethyleniminschichten. Die Dicke, Oberflächenrauigkeit und der Bedeckungsgrad wurden untersucht und festgestellt, dass die genannten Parameter entscheidend von der Präparationstechnik abhingen [Wong 1999]. Elender et al. konnten zeigen, dass sich homogene Doppelschichten von Dimyristoylphosphatidylcholin mit 20% Cholesterin auf Dextrankissen ausbilden ließen. Die laterale Beweglichkeit der Lipide in der Schicht war hoch, in Abwesenheit von Cholesterin war das ganze System jedoch sehr instabil [Elender 1996].

Allen Arbeiten gemeinsam ist das Ziel, eine kovalente Anbindung der Polymerschicht auf der jeweiligen Oberfläche zu erreichen. Man findet Versuche, die Stabilität der Schichten durch elektrostatische Wechselwirkungen zu erhöhen [Wong 1999], ebenso wie den Versuch einer kovalenten Anbindung. Die kovalente Anbindung bietet den Vorteil, von pH und Salzkonzentration unabhängig zu sein, dies ist besonders im Hinblick auf die zu inkorporierenden Membranproteine ein nicht zu unterschätzender Vorteil, da jedes Protein spezielle Anforderungen an seine Umgebung stellt.

1.4.1 Polyethylenglycol

1.4.1.1 Anwendungsgebiete für Polyethylenglycol

Das Polyethylenglycol-Molekül (PEG) wird in den unterschiedlichsten Bereichen eingesetzt. Man findet Einsatzgebiete im Rahmen von PEG-enthaltenden Liposomen, bei der Oberflächenbehandlung von Biomaterialien sowie zur Herstellung von Modellmembransystemen auf Polymerbasis.

Liposomen auf PEG-Basis finden Anwendung sowohl in Bereichen der Kosmetik als auch im Rahmen der Mikro-Verkapselung von Arzneistoffen. Die

Kosmetikindustrie wirbt für den Einsatz liposomenhaltiger Cremes, die hautsympathische Lipide in tiefere Hautschichten bringen sollen.

Arzneistoffe, die in PEG-enthaltenden Liposomen galenisch verarbeitet wurden, können parenteral appliziert zu längeren Verweilzeiten in der Blutbahn und damit zu einer längeren Wirkung der entsprechenden Arzneistoffe führen. Ebenso ist gerade im Einsatzbereich der Zytostatika von einer weniger systemischen als vielmehr lokalen Wirkung der Arzneistoffe auszugehen. Man bezeichnet die Technologie der PEG- Liposomen als „stealth“ Technologie (stealth, engl. List).

Einer der erfolgreichsten Ansätze für die Oberflächenbehandlung von biokompatiblen Oberflächen mit Polyethylenglycol ist dessen Verwendung als Oberflächenschutz. Die Verankerung von PEG-Molekülen auf Oberflächen reduziert die Adsorption von Proteinen ebenso wie von ganzen Zellen. Die Entwicklung solcher Biomaterialien ist von großem Interesse, da ein Einbringen derselben in den menschlichen Körper immer mit Problemen verbunden ist. Das Immunsystem erkennt jedwedes fremde Material und es kommt zu Störungen im Organismus. Diese reichen von Blutthrombenbildung über cytotoxische Effekte, Gewebsverletzungen und anderes mehr. So ist es von großer Bedeutung, die Biomaterialien so verträglich wie möglich zu machen. Die Oberflächenmodifizierung mit PEG-Schichten kann hierbei als Oberflächenschutz dienen. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte nachgewiesen werden, dass PEG Beschichtungen, sogenannte coatings, eine Blutplättchenanlagerung verhindern und damit das Risiko einer Thrombusbildung vermindern. Gölander und Mitarbeiter stellten fest, dass PEG-modifizierte Oberflächen keine Antigenaktivität³ zeigen [Gölander 1992]. PEG ist nicht toxisch und behindert weder Proteine noch Zellen in deren Funktionalität, es lässt sich an Oberflächen anbinden ohne deren Eigenschaften zu verändern. PEG ist in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln löslich. Der inerte Charakter von PEG basiert auf seiner molekularen Konformation in wässriger Lösung, wo die PEG Moleküle ungeladene hydrophile Gruppen nach außen tragen und eine hohe Oberflächenmobilität aufweisen [Andrade 1996] [Gölander 1992]. Die Löslichkeit

³ Antigen: Substanz, die von einem Organismus als „fremd“ erkannt wird und eine spezifische Immunantwort auslöst

von PEG in Wasser und anderen polaren Flüssigkeiten beruht auf der Tatsache, dass es eine wasserähnliche Struktur aufweist und so an Wasserstoffbrückenbindungen im Wasser teilnehmen kann. Die Eigenschaft einer PEG beschichteten Oberfläche, die Adsorption von Proteinen und anderen Biomolekülen zu verhindern, wird wahrscheinlich noch vergrößert durch eine sterische Stabilisation. Nähert sich ein Protein einer PEG-beschichteten Oberfläche wird das für jedes einzelne Polymersegment zur Verfügung stehende Volumen verringert. Daraus resultiert eine abstoßende Kraft der Polymerketten durch den Verlust eines Teils der ihnen zur Verfügung stehenden Fläche.

1.4.1.2 Polyethylenglycol als Basis für Modellmembransysteme

Die Literatur zeigt unterschiedliche Ansätze für die Anbindung von PEG auf Oberflächen. Die meisten erfordern zwei oder mehr Reaktionsschritte und erfolgen auf Oberflächen wie Silizium oder Glas.

Ein erfolgreicher Versuch auf Silizium wurde von Alcantar und Mitarbeitern durchgeführt [Alcantar 2000]. Es erfolgte eine direkte Kondensation der Alkohol-Endgruppe des PEG mit den Silanol-Gruppen der Silizium-Oberfläche. Frühere Versuche der Verankerung von PEG-Molekülen auf Oberflächen erforderten mehrere Reaktionsschritte. Alcantar gelang es, eine Oberflächenbeschichtungsmethode zu entwickeln, die zum einen nur eines einzigen Reaktionsschrittes bedarf und zum anderen mit einer großen Anzahl verschiedener Oberflächen durchgeführt werden kann. Alcantar arbeitete hauptsächlich auf Silizium-Oberflächen; die erzeugten Schichten wurden mit Ellipsometrie, Atomic Force Microscopy (AFM), Attenuated-Total-Reflection-Fourier-Transform-Infrared Spektroskopie (ATR-FT-IR) sowie Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

1.4.2 Lipopolymere

Lipopolymere sind aus zwei unterschiedlichen Komponenten aufgebaut. Der hydrophobe Lipidteil ist terminal an einen hydrophilen Polymerteil gebunden. Lipopolymere zeichnen sich aufgrund ihres Aufbaus sowohl durch hydrophile wie auch durch lipidische Eigenschaften aus; sie sind amphiphil.

Der Einsatz von Lipopolymeren in den unterschiedlichsten Bereichen setzt die genaue Kenntnis der Eigenschaften der jeweiligen Moleküle voraus. Lipopolymere sind bekannt für die Bildung zweidimensionaler physikalischer polymerartiger Netzwerke, sogenannter physikalischer Gele, an der Wasser-Luft Grenzfläche. Die Polymereinheit der Lipopolymere scheint für das Gelbildungsphänomen ausschlaggebend zu sein, da reine Phospholipide ohne verknüpfte Polymerketten keine Netzwerke bilden [Naumann 1999]. Diese Netzwerke werden durch zwei unterschiedliche Arten von assoziativen Interaktionen stabilisiert. Man unterscheidet die Mikrokondensation der Alkylketten der Lipopolymere, die kleine Cluster bilden und die physikalische Verknüpfung benachbarter Polymerketten durch Wasserstoffbrücken-Bindungen der adsorbierten Wassermoleküle. Die genannten Aspekte führen zur Bildung stabiler Netzwerke von Lipopolymeren an der Wasser-Luft Grenzfläche und erlauben eine Beeinflussung der Polymerkonformation durch Kompression bzw. Expansion des monolayers [Baekmark 1999]. Baekmark et al beschrieben die Eigenschaft von Lipopolymermonolayern, an der Wasser-Luft-Grenzfläche zwei charakteristische Übergangsregionen aufzuweisen. Die Druck-Flächen- Isothermen zeigen zwei charakteristische Bereiche. Man findet einmal bei niedrigen Filmdrücken einen Übergang, bei dem die Polymerketten mit amphiphilem Charakter in die wässrige subphase des Langmuir-Blodgett Troges gedrückt werden. Einen weiteren Übergang findet man bei hohen Filmdrücken, der durch die Kondensation der Alkylketten des Lipidteils hervorgerufen wird [Wiesenthal 1999]. Bisher ist nicht bekannt, ob die Polymeranteile der Lipopolymere an den Übergängen als langgestreckte Strukturen oder als Polymerknäule vorliegen. Um diese Frage zu beantworten, müssen die Druck-Flächen Isothermen genau ausgewertet werden. Sie geben Aufschluß über die Fläche die jedem einzelnen Lipopolymer-Molekül zur Verfügung steht. In Kombination mit molecular modeling Daten lassen sich so Rückschlüsse auf die Anordnung der Moleküle auf dem Trog bei bestimmten Kompressionsdrücken ziehen.

Bereits zu Beginn der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden unterschiedliche Lipopolymere hinsichtlich ihrer Eigenschaften und ihres Einsatzes in unterschiedlichen Bereichen untersucht.

1.4.2.1 Einsatz von Lipopolymeren als Liposomen

Aus kurzen, hydrophilen Polymeren kombiniert mit Lipidmolekülen wurden Liposomen generiert und im Rahmen der verzögerten Arzneistofffreisetzung untersucht [Blume 1990] [Lasic 1991] [Lasic 1996]. Die Lipopolymere wurden dazu benutzt, die Arzneistofffreisetzung aus den Liposomen zu verlangsamen und so eine längere Verweildauer der Arzneistoffe im Blutkreislauf zu gewährleisten.

Lipopolymere aus Polyethylenglycol (PEG) gekoppelt mit einem Lipid wurden als PEG-Lipid Vesikel für Untersuchungen zur retardierten Freisetzung von Arzneistoffen im menschlichen Körper verwendet. Die verwendeten Liposomen werden durch den Einsatz des Polyethylenglykols sterisch stabilisiert, man erreicht dadurch eine längere Verweildauer im Körper. Die Zeit lässt sich dabei von einigen Stunden auf Tage ausdehnen [Klibanov 1990] [Allen 1991]. Die Länge der Polymerkette spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da sie die biophysikalischen und chemischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls bestimmt [Kuhl 1998] [Kuhl 1994].

1.4.2.2 Nachahmung der Glykocalix durch Lipopolymere

Lipopolymere eignen sich auch zur Nachahmung der Glykocalix, einer kohlenhydratreichen Schicht auf der Außenseite der Plasmamembran eukaryotischer Zellen. Die Glycocalix kontrolliert die Annäherung von Liganden an die membranständigen Rezeptoren. Die Nachbildung der Glycocalix ist ein Einsatzgebiet, durch das die Sensitivität von Biosensoren erhöht bzw. erweitert werden kann. Neben den Lipiden und Proteinen bilden die Kohlenhydrate den dritten wichtigen Bestandteil der Membranen. Man findet sie in Form von Glykolipiden⁴, beispielsweise als Glycerolglykolipide und Glykosphingolipide und als Glykoproteine stets auf der dem Cytoplasma abgewandten Seite von Membranen. Die Membranen eukaryotischer Zellen besitzen einen Kohlenhydratanteil von etwa 2-10%, der von den Zuckerresten der Glykolipide und Glykoproteine bestimmt wird. In vivo verleihen Kohlenhydrate der Zelloberfläche durch ihre spezifische Struktur

⁴ Verbindungen aus einem Lipid verknüpft mit einem Kohlenhydrat

Individualität. Sie spielen als Oberflächenantigene eine wichtige Rolle, bei den Erythrocyten bestimmen sie deren Eigenschaften in Form der „Blutgruppen“. Viele Phänomene der Zellerkennung werden auf die Erkennung von Zuckern an Membranoberflächen zurückgeführt; beispielsweise bei der Infektion mit Viren und bei zahlreichen immunologischen Prozessen [Stryer 1996].

1.4.2.3 Biofunktionalisierung von Oberflächen- Modellmembransysteme mit Lipopolymeren

Polymer-modifizierte Lipide können sowohl als Abstandhaltermoleküle zwischen Substratoberfläche und Lipiddoppelschicht als auch als Lipidbausteine innerhalb der Lipiddoppelschicht dienen. Das Polymer-Ende des Moleküls wird dazu entweder kovalent oder durch Physisorption auf der Substratoberfläche verankert, wobei die Ankerdichte der Polymerketten variiert werden kann [deGennes 1980]. Die Eigenschaften des polymeren Molekülteils ermöglichen je nach Molekül einen mehr oder weniger großen Abstand zwischen Substratoberfläche und den Lipiddoppelschichten. Das Lipidende des Lipopolymermoleküls ragt in bestimmtem Winkel von der Oberfläche in den Raum und dient später zum Aufbau der Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion oder durch Langmuir-Schäfer Transfer. Durch die Kombination von unterschiedlichen Polymeren mit unterschiedlichen Lipiden wird die Untersuchung einer Vielzahl von unterschiedlich aufgebauten Molekülen möglich.

Bei Verwendung von Lipopolymeren auf Oberflächen soll der Polymeranteil als Abstandhalter zwischen Substrat und Membran dienen. Der Einsatz der Abstandhalter bietet die Möglichkeit, eine vertikale Stabilisierung durch kovalente Anbindung sowohl an der Lipopolymer-Substrat als auch an der Lipopolymer-Lipiddoppelschicht-Grenzfläche zu ermöglichen. Die Polymer-Substrat Stabilisierung basiert auf einer kovalenten Anbindungsreaktion auf einer modifizierten Substratoberfläche. Hierdurch kann eine vertikale Stabilisierung erreicht werden. Die sogar noch wichtigere Stabilisierung an der Polymer-Doppelschicht-Grenzfläche kann durch eine Vororientierung des entsprechenden Lipopolymers oder alternativ Lipopolymer-Phospholipid Gemisches an der Wasser-

Luft-Grenzfläche und nachfolgendem Transfer auf das präparierte Substrat durch Langmuir-Blodgett-Technik erfolgen. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der Lipopolymere ist eine Vororientierung sinnvoll und wünschenswert, da eine kovalente Anbindung des Polymeranteils des Moleküls möglichst an dessen terminalen Ende erfolgen soll, um einen möglichst großen Abstand zwischen Substratoberfläche und Lipiddoppelschicht zu erreichen.

Da die Anwendung von Lipopolymer-Abstandhaltern im Rahmen von kovalenten Anbindungen nicht auf zusätzlichen elektrostatischen Interaktionen basiert, haben diese den Vorteil, von Parametern wie pH und Salzkonzentration unabhängig zu sein. Dieser Vorteil macht sich vor allem dann bemerkbar, wenn Membranproteine eingebaut werden sollen, die alle etwas unterschiedliche Anforderungen an ihre Umgebung haben.

Die kovalente Anbindung zeigt sicherlich Auswirkungen auf das Gesamtsystem. Hier muß ein Kompromiss zwischen Stabilität des Systems und lateraler Mobilität innerhalb der Doppelschicht gefunden werden. Zur Untersuchung der Auswirkungen auf das Gesamtsystem können FRAP-Messungen (Fluorescence recovery after photobleaching; Fluoreszenzerholung nach Photobleichung) durchgeführt werden. Diese zeigen die laterale Mobilität innerhalb der Doppelschicht bei unterschiedlichen Zusammensetzungen der Monoschicht.

1.4.2.4 Beispiele bisher untersuchter Lipopolymere als Abstandhaltersysteme

Die Verknüpfung von hydrophilen Polymeren mit Lipiden wurde bereits Anfang der 90er Jahre im Rahmen der Biofunktionalisierung von Oberflächen genutzt [Kühner 1994] [Schmitt 1994]. Ziel war der Aufbau von Lipiddoppelschichten mit hohem Widerstand auf leitenden Oberflächen, um dadurch Biosensoren auf elektrooptischen devices herzustellen [Stelzle 1993]. Im Rahmen früher Studien stellte sich jedoch heraus, dass die untersuchten Lipiddoppelschichten nur ungenügende Dichtigkeit aufwiesen. Diese ist jedoch ein entscheidender Faktor für den weiteren Einsatz als künstliche Biomembranmodelle.

Koppelt man PEG kovalent an Lipidmoleküle so erhält man die als PEG-Lipopolymere bezeichnete Verbindungsklasse. Es gibt eine Vielzahl Arbeiten zum Einsatz von Poly(ethylenoxid) als Polymerkomponente bei Lipopolymeren

[Sackmann 1996] [Wagner 2000] [Sinner 1998]. Poly(ethylenoxid) ist als Polymerkomponente sehr hydrophil. Verschiedene PEG-Lipopolymere wurden von einigen Gruppen untersucht, da sie sehr spezielle physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen, die sie für eine breite Verwendung in der Biotechnologie interessant macht. Während PEG-Verbindungen zur Verringerung der Protein Adsorption und der Unterdrückung der Blutgerinnung genau untersucht wurden, beschäftigten sich nur wenige Gruppen mit den quantitativen Studien der thermodynamischen und elastischen Eigenschaften der PEG-Lipide als einer Funktion der Kettenlänge [Hristova 1995] [Rex 1998].

Um die statischen und dynamischen Eigenschaften von adsorbierten oder auf der Oberfläche fest verankerten Polymeren zu beschreiben, wurden bereits 1976/1977 einfache Gesetze von De Gennes und Alexander entwickelt [de Gennes 1976] [Alexander 1977]. Abhängig von der Dichte der Ankerpunkte auf der Oberfläche können verschiedene Zustände unterschieden werden. Man findet geknäulte (mushroom-like) Anordnungen, bei denen es zu keiner lateralen Wechselwirkung zwischen den Ketten kommt, und bürstenähnliche (brush-like) Anordnungen [Biesalski 1999]. Die Anordnung auf der Oberfläche ist auch vom verwendeten Lösungsmittel abhängig. Für wässrige PEG Lösungen müssen die hydrophilen Eigenschaften des Polymers berücksichtigt werden. Wassermoleküle dringen in Mikrometer dicke PEG-Schichten auf Oberflächen ein. Untersuchungen über den Status des Wassers in den Schichten und an der Oberfläche wurden mit FT-IR von an Polyethylenglycol-Dimethylether Filmen gemacht [Die 1999]. Die Gruppe untersuchte auch die Mengen von adsorbiertem und in die Schichten eindringendem Wasser bei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten. Es stellte sich heraus, dass die Adsorptions- und Penetrationsprozesse nicht schrittweise erfolgten. Bei höheren Luftfeuchtigkeiten scheinen sich Wassercluster zu bilden, die den bisherigen Untersuchungen über die Struktur der Wassermoleküle in PEG-Schichten widersprechen. Man geht davon aus, dass die maximale Zahl an Wassermolekülen, die pro Ethylenglycol Einheit aufgenommen werden zwischen 1,6 und 3,3 liegt; jeweils abhängig von der molekularen Masse des Polymers [Huang 2001] [Finklea 1996]. Die Sauerstoff Moleküle innerhalb der PEG Kette sind polar und wirken als

Wasserstoffbrückenakzeptoren. Jedes der Wasserstoff-Atome des Wassers wird partiell an ein Sauerstoff Molekül gebunden [Demaille 1999].

Elender et al untersuchten das Quellungsverhalten von PEG-Lipopolymer Monoschichten [Elender 1996].

Untersuchungen zu Eigenschaften terminal angebundener PEG-SAMs wurde von der Gruppe Grunze verfolgt. Die beschriebenen PEG-Lipopolymere bestehend aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoffteil, der über eine SH-Gruppe auf Gold- oder alternativ auf Silberoberflächen angebunden wird, sowie aus einer PEG-Einheit, die von der Substratoberfläche weg orientiert vorliegt [Pertsin 2000]. Die PEG-Komponente wird von Oligoethyleneinheiten unterschiedlicher Länge gebildet, die mit einer Methoxygruppe abschließen. Im Gegensatz zu den reinen PEG-Oberflächen, die eine hohe Konformationsfreiheit aufweisen [Jeon 1991] [Taunto 1988] [Sleifzer 1996] [Halperin 1999] sind die oligoethylenterminierten SAMs dicht gepackte Monolayer mit eingeschränkter Konformationsfreiheit. Auf Goldoberflächen findet man $7/2$ Helices, d.h. jeweils 7 Ethylenglycoleinheiten bilden zwei Drehungen innerhalb der Helix; auf Silberoberflächen dagegen planare all-trans Konformation der Moleküle [Pertsin 2000]. Die Anzahl der Kohlenstoffatome der Alkankette scheint nicht entscheidend für das Verhalten der Ethylenglycol-Einheiten zu sein. Grunze und Mitarbeiter untersuchten das Verhalten der auf Goldoberflächen angebundenen Moleküle und stellten eine drastische Konformationsänderung beim Kontakt mit Wasser fest. Wassermoleküle drangen in die gebundenen Schichten ein und verursachten Konformationsänderungen innerhalb der Schicht [Pertsin 2000]. Die helikalen Ketten bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen. An einer Bindung sind jeweils zwei Sauerstoffatome der Kette beteiligt [Wang 1997]. Während in Luft geordnete Strukturen innerhalb der Schicht vorliegen, kommt es beim Eindringen von Wasser zu drastischen Veränderungen [Zolk 2000]. Grunze und Mitarbeiter kamen daher zu dem Schluß, dass ein Modell zur Erklärung der SAM Eigenschaften flexibel auf die genannten Faktoren eingehen muß. SFG (sum frequency generation) Spektren zeigten, dass die untersuchten Filme auf Gold nicht ausschließlich helikal vorliegen sondern dass unterschiedliche Konformationen innerhalb des Filmes koexistieren [Zolk 2000].

Der Einsatz von PEG-Lipopolymeren wurde ebenfalls von Wagner und Tamm untersucht [Wagner 2000]. In der zitierten Arbeit wurde Poly(ethylenoxid) (PEG 2000) mit 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DMPE) verknüpft und über eine Triethoxysilangruppe kovalent auf oberflächenmodifizierten Silikatsubstraten angebunden. Wagner und Tamm untersuchten sowohl Fluoreszenzdaten als auch den Einbau von Cytochrom b₅, einem relativ einfachen Protein, das in die Schichten eingebaut wurde. Cytochrom b₅ weist ein einziges hydrophobes helikales Protein auf, das tief in die Lipiddoppelschichten eindringt. Anschließend wurde die laterale Diffusion des Proteins durch Fluoreszenzmessungen untersucht, das Protein war hierbei fluoreszenzmarkiert. Als Beispiel für ein multihelikales Protein wurde Annexin V untersucht. Die erhaltenen Schichten bzw. der Einbau der Proteine wurde jedoch in keinem Fall elektrochemisch untersucht, so dass keinerlei Aussage zu den elektrischen Eigenschaften der Lipiddoppelschichten auf dem Polymerkissen gemacht werden konnten.

Auch andere Polymerkomponenten wurden untersucht. Munro und Frank arbeiteten auf Polyacrylamid-Lipid modifizierten Gold- und Silberoberflächen [Munro 2003]. Die Anbindung der synthetisierten Moleküle erfolgte über Sulfidgruppen auf einer Goldoberfläche. Die erhaltenen Filmdicken wurden mit QCM (quartz crystal microbalance) und XPS untersucht, es wurde jedoch keinerlei Aussage über die Möglichkeit eines Proteineinbaus in die erhaltenen Schichten gemacht.

Shen et al. beschäftigten sich mit dem Einsatz von Polyethylenoxid-Lipid Komponenten auf Benzophenon-modifizierten Silikon-Substraten [Shen 2001]. Die Eigenschaften der erhaltenen Schicht wurden mit AFM (atomic force microscopy) untersucht, nach Vesikelfusion und Komplettierung der Schicht zur Doppelschicht wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt.

Die Arbeiten von Naumann untersuchen den Einsatz von Polyethyloxazolinen auf oxidischen Oberflächen. Die mittels Langmuir-Blodgett Technik vororientierte Polymerschicht wurde auf einer mit Benzophenon als photoreaktive Substanz modifizierten Glas- bzw. Quarzoberfläche photochemisch angebunden. Ein Langmuir-Schäfer Transfer einer Phospholipidmonoschicht komplettierte die Lipiddoppelschicht. Je nach Ankerdichte stellte Naumann unterschiedliche laterale

Beweglichkeit fest. Die Schichten konnten durch den speziellen Schichtaufbau, der eine Entkopplung von der Oberfläche ermöglichte, ebenfalls mit FRAP untersucht werden, was wertvolle Hinweise zum Verhalten der reinen und auch gemischten Lipopolymerschichten ergab. [Naumann 2002]. Weitere Arbeiten von Naumann untersuchen das Verhalten von Lipopolymeren direkt auf dem Langmuir-Blodgett Trog; es handelt sich hierbei um 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[poly(ethylen glycol) 2000] (DSPE-EO₄₅), deren Verhalten in unterschiedlichen Mischungen durch FRAP Messungen untersucht wurden. [Naumann 2001]. Neueste Untersuchungen von Naumann und Mitarbeitern untersuchen die laterale Mobilität innerhalb von Biomembranmodellen bei Vorhandensein von „Hindernissen“ in Form von Dioctadecylamin [Poly(ethyloxazolin)] auf dem Niveau einzelner Moleküle [Deverall 2005].

1.4.2.5 Glykolipopolymere

Synthetische Glykolipopolymere werden als Modellsystem für das Verständnis der Erkennungsprozesse an Membranoberflächen herangezogen. Um diese Vorgänge besser untersuchen zu können sind definiert aufgebaute synthetische Glykolipopolymere notwendig. Der hohe Funktionalisierungsgrad und die reaktiven Eigenschaften der Zucker-Bausteine entlang des Polymer-Grundgerüsts erschweren die Synthese von Glykolipopolymeren mit traditionellen Polymerisierungstechniken. Daher wird die Technik der kontrollierten radikalischen Polymerisation in Lösung verwendet, die mit funktionellen Gruppen kompatibel ist und die Synthese von funktionalisierten Initiatoren erleichtert. Auf diesem Weg wurde die Synthese definierter amphiphiler Glykolipopolymere möglich, bei denen der amphiphile Charakter durch Auswahl geeigneter Monomere und Initiatorgruppen kontrolliert und variiert werden kann.

Für den Aufbau von Biomembranen aus Glykolipiden spielen deren Eigenschaften eine wichtige Rolle. Sie zeichnen sich durch ihren amphiphilen Charakter aus. Dieser bietet, eingebettet in eine Biomembran zum einen die Möglichkeit der Bildung eines Wasserreservoirs auf der Substratseite, zum anderen ist die lange Kette aus Zuckereinheiten zur Entkopplung des Systems von der Substratoberfläche sehr gut geeignet.

Der amphiphile Charakter der Glykolipopolymeren macht eine Anordnung an der Wasser-Luft-Grenzfläche möglich, so dass die entstehende monomolekulare Schicht im Anschluß auf feste Substrate übertragen und angebunden werden kann.

1.5 Photoreaktionen

1.5.1 Photoaffinitätsmarkierung

Schon 1962 berichten Westheimer et.al von ihrer Idee, nicht-kovalente Wechselwirkungen durch photolytische Aktivierung von Diazoverbindungen zu fixieren und somit nachzuweisen [Singh 1962]. Seitdem hat sich die Photoaffinitätsmarkierung im biochemischen Repertoire etabliert und ständig weiterentwickelt, das Grundprinzip ist jedoch erhalten geblieben [Bayley 1983][Dormán 1994][Kotzyba-Hibert 1995].

Zur Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung benötigt man einen lichtaktivierbaren Liganden, oder ein entsprechendes Analogon, das durch die Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge eine hochreaktive Molekülspezies bildet, die irreversibel an die Bindungsstelle eines Rezeptors bindet. Mit Hilfe einer zweiten Markierung kann der vernetzte Ligand-Rezeptor-Komplex detektiert werden. Als Markierung dienen häufig radioaktive Isotope wie ^3H , ^{33}S oder ^{125}I .

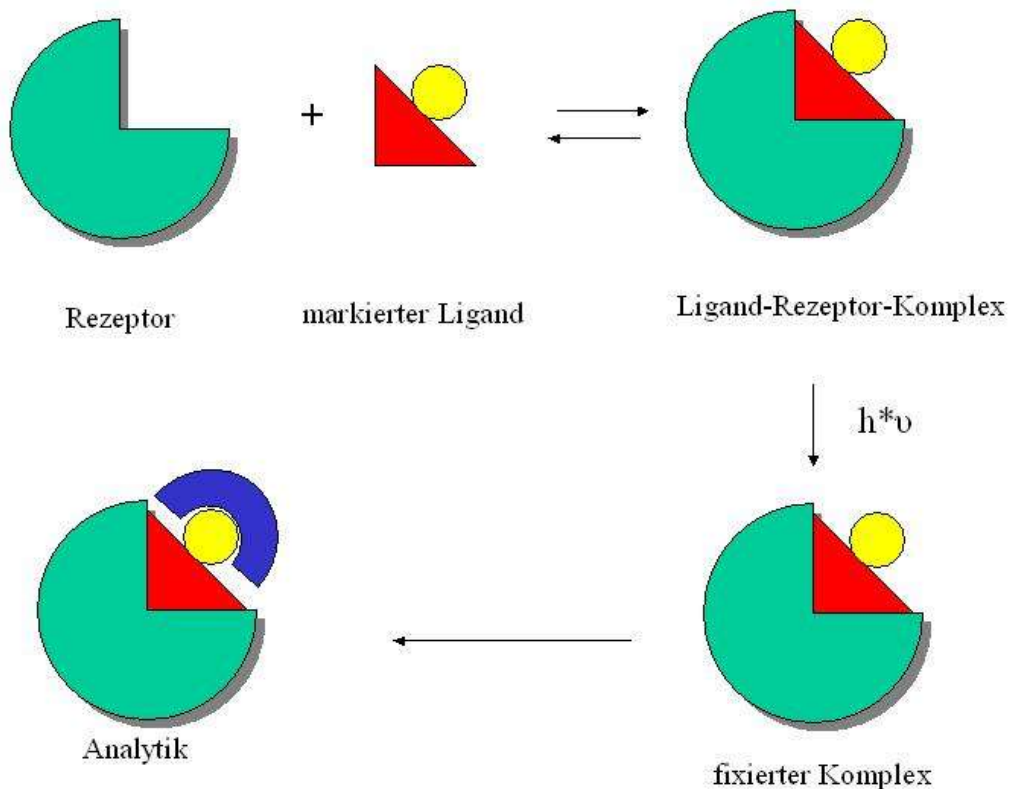


Abbildung 1-3: Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung

Die in den letzten 40 Jahren entwickelte Photomarkierung sowie die photochemische Quervernetzung, das sogenannte cross linking, zeigen eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten, um sowohl strukturelle Eigenschaften als auch Funktionen der Signaltransduktion innerhalb von biologischen Systemen zu untersuchen.

Die Untersuchung der Wechselwirkung von Liganden mit ihren jeweiligen biologischen Rezeptoren stellt eine große Herausforderung für Chemiker und Biologen dar. Die Strukturaufklärung biologischer Rezeptoren ermöglicht ein besseres Verständnis ihrer Funktion und ist daher wichtig für die Entwicklung von Substanzen, die spezifisch mit Rezeptoren wechselwirken können.

Die Methode der Photoaffinitätsmarkierung ist ein chemischer Ansatz, Rezeptoren zu charakterisieren; sie ist geeignet, die Rolle biologischer Rezeptoren bei der Signaltransduktion zu untersuchen. Ein „historisches Beispiel“ [Kotzyba-Hibert 1995] stellt die ortsspezifische Markierung von α -Chymotrypsin mit Diazoacetylchymotrypsin dar, bei der die photoreaktive Substanz im aktiven

Zentrum des Enzyms gebildet und das modifizierte Enzym stöchiometrisch identifiziert werden kann [Hexter 1971].

Die Identifizierung von Aminosäureresten, die mit Photoaffinitätssonden markiert vorliegen, stellt eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Photomarkierung dar. Diese Untersuchungen ermöglichen die Bestimmung der Position der Ligandenbindungsstelle innerhalb der Proteinsequenz und eine Ableitung von Informationen über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung. Die identifizierten Aminosäuren können außerdem Ziele für die ortsspezifische Mutagenese sein. Mit der Zahl der identifizierten Aminosäuren steigt letztlich die Zahl der Informationen, die man über Rezeptorstrukturen erhält. Für Details zur erfolgreichen Photoaffinitätsmarkierung definierter Aminosäurereste sowie der verwendeten Sonden und Zielrezeptoren kann der Artikel von Kotzyba-Hibert herangezogen werden [Kotzyba-Hibert 1995].

Photochemische Reaktionen sind sehr komplex und viele Details sind noch unbekannt. Idealerweise sollte eine photoaktivierbare Verbindung sehr reaktiv sein, wobei die Möglichkeit einer Insertion in eine große Anzahl von Bindungen für eine Anbindung weiterer Moleküle ebenso wie eine Anbindung der photoreaktiven Verbindung selbst von Vorteil ist. Daneben sollte sie im Dunkeln stabil sein und eine hohe Selektivität für Licht eines genau definierten Wellenlängenbereiches aufweisen, der im Idealfall keine Veränderungen bei biologischen Zielstrukturen bewirken darf.

Dies führt zwangsläufig zu einer starken Eingrenzung des Forschungsfeldes. Photochemische Fragmentierungen, die unter Stickstoff-Freisetzung stattfinden, sind unter den beschriebenen Verbindungen am häufigsten vertreten, da Stickstoff als inertes Gas nachfolgende Reaktionen wenig beeinflusst. So finden als Vorstufen häufig die folgenden Verbindungen Verwendung

- Aryl-Azide
- Diazoverbindungen
- Aryl-Diazirine

Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie photolabile Vorstufen von Carbenen bzw. Nitrenen sind. Carbene und Nitrene sind isoelektrische Spezies und reagieren daher chemisch ähnlich. Aufgrund ihres Elektronenmangels sind sie alle starke Elektrophile und Reaktionen mit Doppelbindungen oder Heteroatomen wie S, O oder

N, die nichtbindende Elektronenpaare besitzen, verlaufen sehr rasch. Das besondere Interesse an Carbenen und Nitrenen begründet sich auf ihrer Eigenschaft, sogar aliphatische C-H Bindungen angreifen zu können.

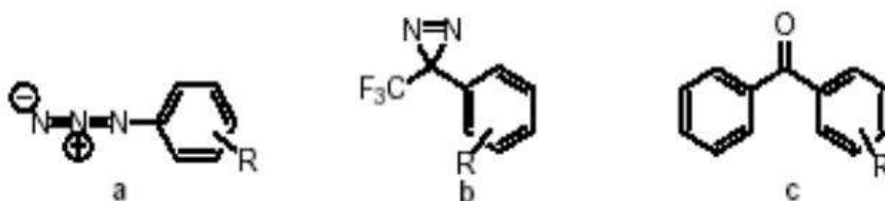


Abbildung 1-4: a) Arylazid- b) Aryl-Diazirin- c) Arylketon-Derivat [Schiller 2002]

Eine ausführliche Beschreibung der unterschiedlichen Forschungsansätze beinhaltet der Artikel von Kotzyba-Hibert [Kotzyba-Hibert 1995] sowie der Artikel von Brunner [Brunner 1993].

1.5.2 Verwendung von Benzophenon in der Photochemie

Photoaktivierbare Arylketonderivate (Abbildung 1-4 c) wurden als biochemische Sonden seit Beginn der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts verwendet. Das Benzophenon als photoaktivierbare Verbindung hat hierbei bereits seit Beginn der 70er Jahre Einzug in die Biochemie gefunden. Die Carbonyl-Photochemie sowie begleitende Wasserstoff-Transfer Aktionen werden häufig genutzt. Das Benzophenon stellt ein Beispiel für ein photoaktivierbares Aryl-Keton dar. Seine häufige Verwendung als photoreaktive Verbindung kann auf folgende chemische Vorteile zurückgeführt werden: Benzophenone sind stabiler als Diazo-Ester, Arylazide und Diazirine; das Molekül kann bei Wellenlängen von 350-360nm aktiviert werden, was proteinzerstörende Wellenbereiche vermeidet. Benzophenone reagieren bevorzugt mit unreaktiven C-H Bindungen, auch in Anwesenheit von Wasser und Nucleophilen. Die genannten Eigenschaften zeichnen die Verbindung für den Einsatz bei der Untersuchung von Makromolekülen aus.

Die erste Applikation eines photochemisch erzeugten Triplett-Zustandes des Benzophenons in einem biologischen System wurde 1974 von Galardy beschrieben [Galardy 1974]. Benzophenon wurde in den Jahren danach als photoaktivierbare Verbindung zur Funktionalisierung von C-H Bindungen in Steroiden und zur

Erforschung von Konformationen flexibler Ketten in Lösungen, Micellen und Membranen verwendet [Breslow 1980,1986]. Die lichtinduzierte kovalente Modifikation von hydrophoben Membranen diente der Untersuchung von Membranstrukturen ohne oder mit darin enthaltenen Makromolekülen wie beispielsweise Proteinen.

Erste Untersuchungen erfolgten an Fettsäuren, die in Micellen organisiert vorlagen. Das Benzophenon-Molekül wurde an Alkylketten mit polaren Endfunktionalitäten gebunden und bildete so amphiphile Testsubstanzen. Markovich und Mitarbeiter untersuchten die Reaktionen zwischen Benzophenon enthaltenden langkettigen Fettsäuren und mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb von Micellen. Diese Untersuchungen lieferten wertvolle Hinweise zur Position der von Benzophenon vermittelten Wasserstoff-Abstraktion [Markovich 1990]. Andere Gruppen arbeiteten mit Benzophenon-enthaltenden Phosphatidyl-Analogen um genauere Aussagen über den Aufbau der Micellen machen zu können [Lala 1993]. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Studium der ATP und GTP-Bindungsstellen. Das verwendete 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) wurde dabei sowohl als photoaktiver irreversibler Inhibitor am reaktiven Zentrum des Enzyms als auch als Label eingesetzt [Williams 1986].

Es erfolgten Untersuchungen am Lactose-Permease Protein von E.coli [Page 1986] und an der ATPase [Montecucco 1986].

Eine wichtige Erkenntnis dieser frühen Untersuchungen war der effektive „Reaktionsradius“ des aktivierten Benzophenon-Moleküls. Bereits Yamamoto et al. [Yamamoto 1993] konnten zeigen, dass eine sehr effektive und regioselektive Anbindung durch Benzophenon im Radius von 3 Å um das aktivierte Benzophenon Molekül stattfand. Einen Überblick über weitere Untersuchungen bietet der Artikel von Dormán & Prestwich [Dormán 1994] sowie der Artikel von Brunner [Brunner 1993].

1.5.2.1 Photochemie des Benzophenons

Betrachtet man das Benzophenon Photophore, das bei einer Wellenlänge von etwa 350 nm ein Photon absorbiert, führt dies zu einer Übertragung eines Elektrons von einem n-Orbital des Sauerstoffs in ein antibindendes π^* -Orbital der Carbonylgruppe.

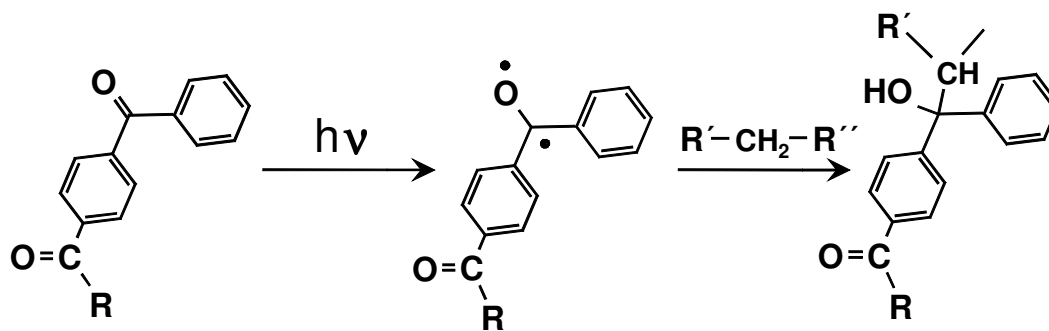


Abbildung 1-5: Reaktion von Benzophenon mit aliphatischer Verbindung nach UV-Bestrahlung (350nm)[Schiller 2003]

Im diradikalischen Triplett-Zustand ist das nur halb besetzte und damit elektronenarme n-Orbital des Sauerstoffs elektrophil und reagiert mit schwachen C-H σ -Bindungen, was zu einer Wasserstoff Abstrahierung führt, um das halb gefüllte n-Orbital zu komplettieren. Die gebildeten Ketyl- und Alkylradikale reagieren unter Bildung von C-C Bindungen, es bilden sich Benzopinacol-ähnliche Verbindungen. Diradikalische Spezies können nur mit geometrisch zugänglichen C-H Bindungen reagieren. Der Reaktand und das Substrat müssen für einen ausreichenden Zeitraum in einer bestimmten Distanz vorliegen (etwa 3 Å). Diese Selektivität lässt sich durch stereoelektronische Faktoren erklären. Bestimmte Winkel und Ebenen werden für den „Angriff“ favorisiert.

1.5.2.2 Lebensdauer des angeregten Zustandes des Benzophenons

Die Lebensdauer des angeregten Triplett-Zustandes des Benzophenons mit zwei ungepaarten Elektronen ist sehr viel länger als die des Singulett Zustandes. Die Lebensdauer des angeregten Triplett-Zustandes kann in Abwesenheit geeigneter Reaktionspartner, meist abstrahierbarer H-Atome, 80-120 μ s betragen. In Anwesenheit von für die Reaktion vorteilhaft orientierten C-H Gruppen ist er wesentlich kürzer. Höhere Konzentrationen an H-Donoren senken die Lebensdauer gemäß der Stern-Vollmer Gleichung

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_2[RH]$$

Dabei sind:

τ_0 : Lebensdauer des angeregten Zustandes ohne geeignete Reaktionspartner

τ : Lebensdauer des angeregten Zustandes in Anwesenheit von H-Donatoren
k: Reaktionskoeffizient für Reaktion 2.Ordnung

Der Triplett-Zustand relaxiert zum Grundzustand, wenn kein H-Donator mit geeigneter Geometrie vorhanden ist. Dieser Relaxationsprozess benötigt keinen Radikalfänger. Das Benzophenon-Molekül kann elektronisch relaxieren während seine bindungs- und photoaktivierbaren Eigenschaften erhalten bleiben. Das Molekül kann so viele Anregungs- und Relaxationszyklen durchlaufen bis eine geeignete Gruppe als Reaktionspartner zur Verfügung steht; der Anregungszustand ist also reversibel. Die Radikale, die dann durch die H-Abstrahierung gebildet werden, bleiben im Übergangszustand nahe beieinander, so dass nur eine minimale Bewegung erforderlich ist, um die stereo-elektronischen Bedingungen für die Bindungsbildung zu erreichen.

1.5.2.3 Molekülanbindung auf Oberflächen mittels Benzophenon

Die Anbindung von Molekülen auf Oberflächen mit Hilfe von photoreaktiven Verbindungen fand bereits Mitte der Neunziger Jahre Verwendung. Die verwendeten Verbindungen waren meist aromatischer Natur und dienten der Anbindung weiterer Moleküle auf den modifizierten Oberflächen u.a. zur Detektion bestimmter Substanzen. Ein weiteres Untersuchungsfeld war die Modifikation von in der medizinischen Versorgung eingesetzten Kunststoffen wie Silikon. Silikone finden beispielsweise als Katheter- oder Ernährungssondenmaterial Verwendung. Ein Verschluss ist beim Einsatz von Kathetern bzw. Ernährungssonden sehr problematisch. Diese findet insbesondere durch Proteinadsorption im menschlichen Organismus statt. Ein Verhindern dieser Proteinadsorption durch entsprechende Oberflächenbehandlung des verwendeten Kunststoffmaterials wäre wünschenswert, um die biomedizinische Langzeitanwendung zu erleichtern. Die Proteinadsorption kann durch einen Polymerüberzug, der photochemisch kovalent gebunden wird deutlich verringert werden [DeFife 1999].

Die photochemische Anbindung von Polymerfilmen auf Siliziumoberflächen wurde von Prucker und Mitarbeitern erstmals vorgestellt [Frank 1999]. Auf Siliziumträgern wurden Polystyren- bzw. Polyethyloxazolin-Filme mit Hilfe von Benzophenon angebonden. Die Polymere wurden hierbei durch spin-coating auf die

präparierten Oberflächen übertragen. Die gebildeten, mehrere Nanometer dicken, Schichten erwiesen sich als sehr stabil. Angebundene Moleküle widerstanden sogar Extraktionen im Soxhlet-Apparat während 10h.

Prucker und Mitarbeiter untersuchten den Einfluß der Bestrahlungsdauer auf die Schichtdicken angebundener Polymere nach anschließender Extraktion. Für Polystyrol stellten sich hierbei Bestrahlungszeiten von etwa 30min als sinnvoll heraus [Frank 1999].

Weitere Untersuchungen folgten; Shen et al untersuchte den Übertrag und nachfolgende Anbindung von mittels LB-Technik vororientierten Lipopolymeren und Lipopolymer-Mischungen auf die mit Benzophenon modifizierten Substrate [Shen 2001]. Es wurden Techniken wie Langmuir-Blodgett, Ellipsometrie, Oberflächenplasmonenspektroskopie, Kontaktwinkel- sowie Fluoreszenzmessungen verwendet, um die erhaltenen Schichten bzw. die Zwischenstufen zu untersuchen. Alle genannten Untersuchungen erfolgten auf Silizium-Oberflächen, was den Einsatz von elektrochemischen Methoden zur Charakterisierung der erhaltenen Schichten unmöglich machte.

1.5.3 Verwendung von Arylaziden in der Photochemie

Die Untersuchung der chemischen Eigenschaften der Arylazide (Abbildung 1-4) hat eine lange Tradition, die bis ins 19. Jahrhundert zurückgeht und bereits mehrfach beschrieben wurde [Armaovitch 1964] [Schuster 1992] [Gritsan 2001]. Phenylazid wurde 1864 erstmals von Greiss synthetisiert. Seit dieser Zeit wurden eine Vielzahl von Derivaten auf ihre möglichen biologischen und industriellen Einsatzgebiete untersucht. Die Anwendungen umfassen die Photoaffinitätsmarkierung, Quervernetzung in photoresistenten Verbindungen, die Herstellung von leitenden Polymeren sowie die lichtinduzierte Aktivierung von Polymeroberflächen.

Die Photochemie der Arylazide wurde erstmals 1969 von Knowles et al beschrieben [Knowles 1969]. Bereits 1988 wurde von Li und Mitarbeitern gezeigt, dass der Substituent am Aren die photochemische Reaktivität beeinflusst und damit die chemische Reaktivität des gebildeten Intermediates prägt. Arylazide fanden sich in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts unter den am häufigsten verwendeten Reagenzien zur Photomarkierung [Bayley 1984]. Diese waren bereits 1972 von

Banks und Mitarbeitern untersucht worden [Banks 1972]. Später wurde der Vorteil der fehlenden Ringerweiterungsreaktion bei den Pentafluorverbindungen erkannt [Dunkin 1982]. Die Autoren Keana und Cai wiesen 1990 auf mögliche zukünftige Einsätze von Perfluorophenylaziden hin [Keana 1990]. Sie synthetisierten diverse Perfluorverbindungen mit unterschiedlichen Substituenten und untersuchten deren Eigenschaften.

1.5.3.1 Photochemie des Phenylazids

Bei der Photolyse des Phenylazids werden mehrere reaktive Zwischenprodukte gebildet, das Schlüsselprodukt bildet das Phenylnitren, das im Singulett-Zustand vorliegt. Die Existenz desselben wurde 1997 durch Laser flash photolysis (LFP)⁵ nachgewiesen; seine Lebensdauer liegt bei etwa 1 ns [Gritsan 1997]. Der Substituent am Aren beeinflusst die photochemische Reaktion und prägt die chemische Reaktivität des gebildeten Intermediates. Beispielsweise konnten Abramovitch und Mitarbeiter nachweisen, dass polyfluorierte Singulett-Nitrene für die Chemie nützliche Eigenschaften aufweisen [Abramovich 1972]. Die Untersuchungen wurden von der Keana-Gruppe weiter fortgeführt [Keana 1990]. Phenyl- und stickstoffsubstituierte Phenylazide spielen eine große Rolle in vielen Bereichen der photochemischen Markierung und sind immer noch weit verbreitet.

Die charakteristischste Photoreaktion von Diazoverbindungen und Aziden ist die Elimination eines Stickstoff Moleküls gefolgt von der Reaktion des resultierenden Carbens bzw. Nitrens. Carbene und Nitrene sind isoelektrische Verbindungen mit jeweils 6 Valenzelektronen, somit sind ihre chemischen Reaktionen qualitativ vergleichbar.

Die Bestrahlung der Azide führt zu einem Azid im angeregten Singulettzustand, das entweder unter N_2 -Verlust in ein Singulett- Nitren übergeht oder durch intersystem crossing ein Triplett-Azid bildet, das sich seinerseits ebenfalls unter N_2 -Abspaltung in ein Triplett-Nitren umwandelt. Das Singulett-Nitren kann entweder in C-H oder alternativ C-OH Bindungen insertieren, zum entsprechenden

⁵ Laser flash photolysis: Laserinduzierte Photolyse/ Photoabbau. Messung von Änderungen im Absorptionsspektrum von Molekülen nach Bestrahlung mit Laserlicht.

Didehydrazepin umlagern oder unter intersystem crossing in das Triplett-Nitren übergehen. Die Literatur beschreibt immer wieder die Anwendung von Aryl-Aziden im Bereich der Photoaffinitätsmarkierung. Hierbei werden unter anderem natürlich vorkommende Hormone markiert, um ihre Reaktion auf molekularer Ebene mit ihrem natürlichen Rezeptor besser zu verstehen. Ein Beispiel ist die Markierung des Progesterons und seine Interaktion mit dem Progesteron Rezeptor (PgR). [Kym 1992].

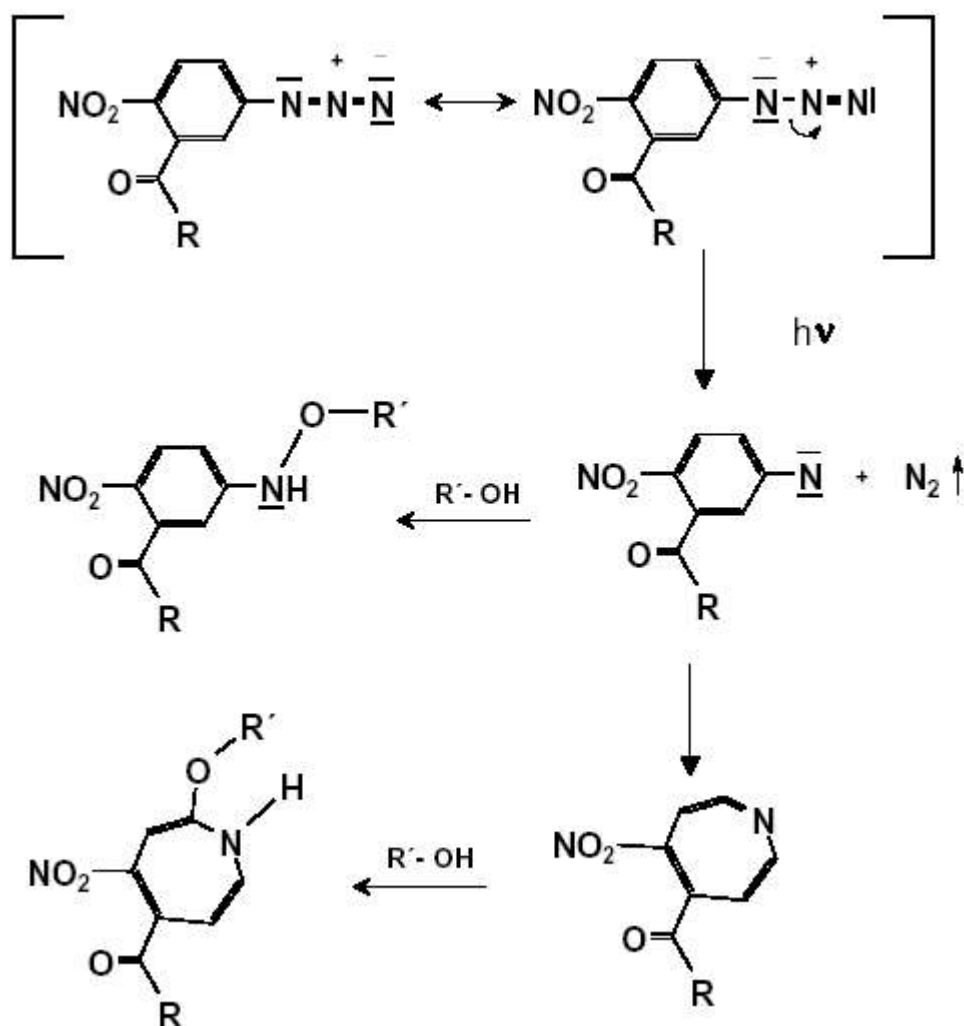


Abbildung 1-6 Schema des durch UV-Bestrahlung angeregten Azids und nachfolgende Reaktionen (R = beliebiger Substituent, gegebenenfalls gebunden an ein festes Substrat)[Schiller 2003].

Abbildung 1-6 verdeutlicht die durch UV-Bestrahlung hervorgerufenen Reaktionsschritte des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Phenylazids. In eckigen Klammern ist die Mesomerie der reaktiven Azido-Gruppe des verwendeten

5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorids gezeigt (R= kann gegebenenfalls an ein festes Substrat gebunden sein). Nach Bestrahlung mit UV-Licht kommt es zur Photoelimination eines Moleküls Stickstoff. Das gebildete Nitren kann auf zwei unterschiedliche Arten weiterreagieren. Einmal Weg a) direkte Abstrahierung eines Wasserstoff-Moleküls aus der OH-Gruppe eines Zuckerbausteins des in der Arbeit untersuchten entsprechenden Polymers (Homo- bzw. Copolymer) und anschließender Bindungsbildung mit dem Zuckerbaustein des Polymers. Weg b) stellt die Alternativreaktion dar und läuft über eine Ringerweiterungsreaktion des Azids zum Didehydroazepin und anschließender Insertion in die kovalente Bindung des Zuckerbausteins des verwendeten Homo- bzw. Copolymers. Beide Wege a) und b) führen letztendlich zur kovalenten Bindungsknüpfung mit der Zuckerkette des entsprechenden Polymers und für den Fall, dass der Substituent an ein festes Substrat gebunden vorliegt, zum Aufbau der jeweiligen Monoschicht.

1.5.3.2 Molekülanbindung auf Oberflächen mittels Azid

Zelladhäsive Peptide sind Gegenstand neuerer Untersuchungen im Bereich der Photoaffinitätsmarkierung. In Arbeiten von Chung et al. wurde das Peptid photochemisch an eine Chitosan-Oberfläche gebunden. Anschließend wurde die Adhäsion von menschlichen Endothelialzellen untersucht. Weitere Anwendungen im Bereich des tissue engineering⁶ sind denkbar [Chung 2002]. Andere Arbeiten wurden zur Erhöhung der Geschwindigkeit und der Sensitivität von ELISA Techniken (enzyme-linked immuno-sorbent assay) ausgerichtet. Eine Mikrotiter Platte wurde durch eine Photochemische Reaktion aktiviert. Anschließend untersuchte man die Immobilisierung von Antigenen auf diesen modifizierten Platten. Diese erfolgte mit größerer Geschwindigkeit und höherer Effizienz als bei konventionellen Platten. Auch dieser Bereich der diagnostischen Tests im Rahmen der ELISA Technik stellt potentielle Anwendungen für die Photoanbindung dar [Bora 2002]. Erdtmann et al beschäftigten sich mit der Immobilisierung von Heparin und Dextransulfat als anionische Polysaccharide mit Hilfe von 4-Azido-1-Fluoro-2-Nitrobenzen (AFNB)

⁶ tissue engineering: Herstellung funktionsfähiger künstlicher Zell- und Gewebeverbände auf der Basis kultivierter Zellen und verschiedener künstlicher Matritzen

auf Cellulosemembranen. Ziel war die Präparation antithrombotischer Polymeroberflächen bzw. die Herstellung biokompatibler Materialien [Erdtmann 1994]. Die Gruppe von Elender et al untersuchte aminosilanisierte Si/SiO₂ bzw. Glasoberflächen. Die anschließende kovalente Anbindung von Dextran wurde durch Kupplung mit photoreaktivem N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS) erreicht. Bartlett und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Anbindung von Polymerfilmen auf Poly(2-ethyl-2-oxazolin) PEOX und Polystyren PS Filmen mittels funktionalisierten Perfluorophenylaziden. Die Polymere wurden hierbei durch spin coating aufgebracht und anschließend photochemisch gebunden [Bartlett 2001].

Soweit der Autorin dieser Arbeit bekannt, arbeiteten die bisher beispielhaft genannten Ansätze der photochemischen Anbindung entweder in Lösung oder auf modifizierten Glas bzw. Siliziumoberflächen. Die Anbindung auf thermisch aufgedampften dünnen Goldfilmen soll in der vorgestellten Arbeit untersucht werden. Eine der hauptsächlichen Schwierigkeiten ist hierbei der Anbindungsschritt, bei dem die auf der Oberfläche kovalent gebundenen photoaktiven Moleküle mit UV-Licht der entsprechenden Anregungswellenlänge bestrahlt werden. Die Schwierigkeit bei diesem Schritt ist das Phänomen des Förster Transfers.

1.5.4 Förster Transfer

Das Phänomen des Förster Transfers beruht auf einer Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen einem Donor-Chromophor im Anregungszustand D* und einem eng benachbarten Akzeptor-Chromophor im Grundzustand A [Turro 1991]. Die Elektronen der beiden Chromophore beeinflussen sich gegenseitig; bei Vorliegen einer Resonanz können analog zu einer Sender-Empfänger Wechselwirkung gekoppelte Übergänge D*→D und A*→A stattfinden. Die Folge ist eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzintensität der Donormoleküle bei gleichzeitiger Zunahme der Akzeptorfluoreszenz. Der Umfang der Energieübertragung im Verhältnis zu anderen Desaktivierungsprozessen von D* ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes R zwischen beiden Molekülen. Der Absolutwert der Übertragungseffizienz ist darüber hinaus abhängig von der mittleren Orientierung der beiden Dipole zueinander, der spektralen Überlappung von Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Absorption, sowie der Zahl der

Akzeptormoleküle in unmittelbarer Umgebung des Donors. Der Einfluß der Spektrenüberlappung lässt sich durch einen kritischen Radius r_0 ausdrücken, der die Distanz für 50%ige Förster-Transfer-Effizienz angibt. Typischerweise liegt der Radius r_0 im Bereich von wenigen Nanometern.

Förster-Transfer ist auch zwischen Chromophoren der gleichen Art möglich. In diesem Fall wird von Energiewanderung gesprochen. Dieser Prozess kann den eigentlichen Energietransfer auf ein Akzeptormolekül beeinflussen, weil die Energiewanderung die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von angeregtem Zustand und Akzeptor erhöht. Für die Energiewanderung lassen sich ebenfalls r_0 – Werte bestimmen. Ist die Konzentration der Akzeptormoleküle grösser als die der Donormoleküle, so dominiert die Energieübertragung auf den Akzeptor das Geschehen [Webber1990].

Einen Konkurrenzprozeß zum Förster-Transfer stellt der Elektronen-Austausch zwischen D^* und A dar. Dieser Mechanismus ist auf eine Überlappung der beteiligten Molekülorbitale angewiesen und setzt deshalb einen physikalischen Kontakt zwischen den Chromophoren voraus. Er weist eine exponentielle Abstandsabhängigkeit auf und ist nur im Bereich der Moleküldimensionen (wenige Å) wirksam.

1.5.4.1 Bedeutung des Förster Transfers für die vorliegenden Untersuchungen

Der als Förster-Transfer bezeichnete Energietransfer kann auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Systeme beeinflussen. Es handelt sich in diesem Fall um einen Energietransfer zwischen den verwendeten photochemisch aktiven Komponenten 5-Azido-2-Nitrobenzoesäure (Azid) oder alternativ 4-Benzoylbenzoesäure (Benzophenon) und der Goldoberfläche. Dieser Energietransfer würde zur Deaktivierung der reaktiven Zentren der verwendeten Komponenten führen und die weiteren Anbindungsreaktion mit den entsprechenden Co- und Homopolymeren negativ beeinflussen. Eine Anbindungsreaktion der letztgenannten Moleküle würde dann nur noch in einem sehr geringen Umfang stattfinden. Der Einfluß dieser unvollständigen Anbindung der untersuchten Polymerfilme auf das Gesamtsystem liegt auf der Hand. Zum einen sind die so hergestellten Filme wesentlich dünner als die vollständig angebondenen. Lediglich die fest

angebundenen Polymere bleiben bei der Herstellung der Filme während der Spülvorgänge auf der Goldoberfläche haften. Diese bilden einen sehr lückenhaften Film; die angebundenen Moleküle sind nicht in der Lage sich gegenseitig zu stabilisieren und „kippen“; diese Vorgänge führt zu sehr dünnen Filmen, die die eigentlichen Dimensionen der verwendeten Polymere nur wenig widerspiegeln. Zum anderen stellen die lückenhaft angebundenen Polymere naturgemäß keine dichte Barriere dar, was sich auch in den elektrochemischen Untersuchungen widerspiegelt. Die Kapazitäten und Widerstände dieser unvollständig angebundenen Schichten liegen über bzw. unter den üblicherweise erreichten Werten.

Aufgrund der vorgenannten Tatsachen ist der Abstand der photochemischen Komponenten zur Goldoberfläche ein entscheidender Faktor für die weiteren Reaktionen, da ein Energietransfer zwischen Goldoberfläche und den photochemisch aktiven Molekülen Azid bzw. Benzophenon lediglich durch deren wechselseitigen Abstand unterbunden werden kann.

2 Methoden

2.1 Langmuir-Blodgett Monoschichten an der Wasser-Luft Grenzfläche

Als Langmuir-Blodgett-Schichten (LB-Schichten) bezeichnet man monomolekulare Schichten amphiphiler Moleküle, die sich mit Hilfe spezieller Techniken aufbauen lassen. Amphiphile Moleküle organisieren sich an der Wasser/ Luft-Grenzfläche spontan zu monomolekularen Filmen, den sogenannten Monoschichten. Als Triebkraft dieser Selbstorganisation gilt der hydrophobe Effekt [Tanford 1973] [Israelachvili 1991]. Er bewirkt eine Minimierung des Kontaktes hydrophober Molekülbereiche mit Wasser, während die hydrophilen Molekülbereiche maximal hydratisiert werden. Das Wissen über die Selbstorganisation von Amphiphilen an der Wasser-Luft-Grenzfläche ist phänomenologisch bereits seit der Antike bekannt. Monoschichten aus tierischen oder pflanzlichen Ölen wurden von den Babyloniern als Werkzeuge der Wahrsagung verwendet [Tabor 1980].

Wissenschaftliche Untersuchungen nach heutigem Stand begannen mit den Arbeiten von Benjamin Franklin Ende des 18. Jahrhunderts sowie Agnes Pockels und Lord Raleigh am Ende des 19. Jahrhunderts [Franklin 1774] [Raleigh 1899]. Obwohl Lord Raleigh bereits den monomolekularen Charakter der Monoschichten vermutete, dauerte es bis 1917 bis Irving Langmuir ein im Wesentlichen heute noch gültiges Modell der Struktur von Monoschichten veröffentlichte [Langmuir 1917].

Einige Jahre später zeigte Langmuir die Möglichkeit des Übertrags von Monoschichten auf feste Träger [Langmuir 1920]. In den dreißiger Jahren wurde sein Verfahren von Katherine Blodgett zum Aufbau von Multischichten durch wiederholtes Durchtauchen eines Trägers durch die Monoschicht weiterentwickelt. Diesen nach ihren Entdeckern benannten Langmuir-Blodgett Multischichten (LB) wurde zunächst wenig Aufmerksamkeit entgegengebracht. Erst in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts begann die Forschung sich erneut für die alten Erkenntnisse zu interessieren. Dieses Interesse ist in der Kombination der Struktureigenschaften, die die LB Schichten in sich vereinen, begründet. Die Schichten sind extrem dünn (Nanometerbereich) und weisen eine exakt definierte

und homogene Dicke auf. Darüber hinaus bleibt während des Übertragungsprozesses auf Substrate die zweidimensionale Orientierung weitgehend erhalten.

2.1.1 Herstellung von Monoschichten an der Wasser/Luft Grenzfläche

Werden in einem organischen Lösungsmittel gelöste amphiphile Moleküle mit Hilfe einer Mikroliterspritze tröpfchenweise auf eine polare Flüssigkeit (Subphase) aufgebracht (gespreitet), so orientieren sich die hydrophilen Molekülteile zur polaren Subphase, während sich die hydrophoben Molekülteile zur Luftseite hin orientieren. Die Bedingung für die völlige und spontane Ausbreitung der im Lösungsmitteltropfen gelösten Amphiphile auf der Wasseroberfläche wird durch den Spreitungskoeffizienten S von Harkins vorgegeben [Harkins 1952].

$$S = \gamma_{(W/L)} - (\gamma_{(LM/L)} + \gamma_{(LM/W)})$$

Dabei bezeichnet $\gamma_{(W/L)}$ die Grenzflächenspannung von Wasser gegen Luft, $\gamma_{(LM/L)}$ die Oberflächenspannung des Lösungsmitteltropfens (LM) und $\gamma_{(LM/W)}$ die Grenzflächenspannung zwischen Lösungsmittel und Wasser. Ist der Spreitungskoeffizient positiv, so resultiert an der Grenzfläche Wasser/Luft eine nach außen wirkende laterale Kraft, es findet Spreitung statt, während der dünne Lösungsmittelfilm rasch verdunstet und die Amphiphile entsprechend ihrer Eigenschaften ausgerichtet aber lateral ungeordnet auf der Wasseroberfläche vorliegen. Bei negativem Spreitungskoeffizienten ist eine Spreitung nicht möglich und der Lösungsmitteltropfen bleibt linsenförmig auf der Wasseroberfläche zurück.

Nach erfolgreicher Spreitung bildet sich eine Monolage der Substanz, deren einzelne Moleküle nicht miteinander in Kontakt stehen. Durch Kompression des Filmes mit beweglichen Barrieren können Phasenumwandlungen induziert werden, die durch unterschiedliche morphologische Anordnung der Moleküle bedingt sind.

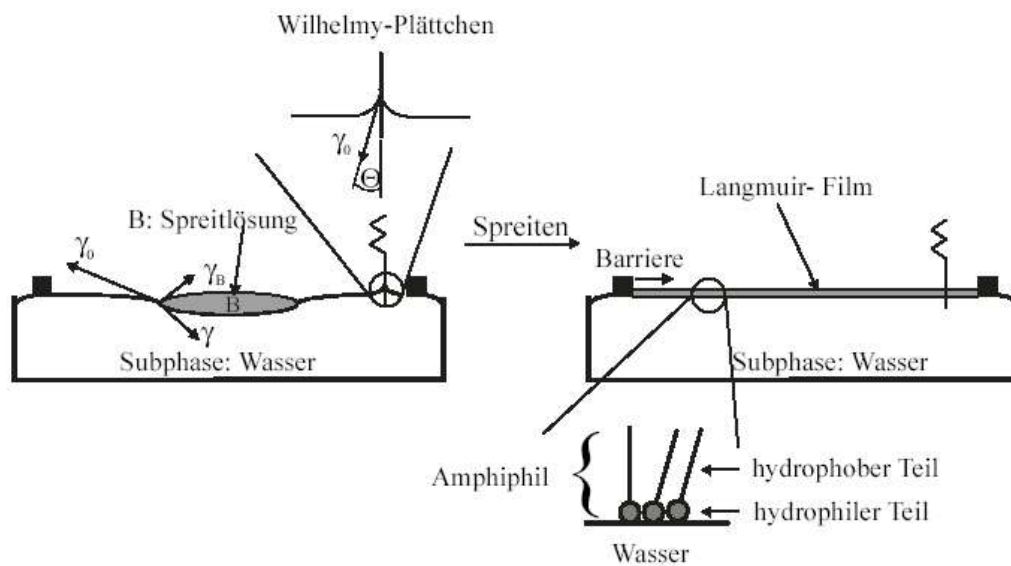


Abbildung 2-1 linke Seite: die Spreitlösung wird auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Das Lösungsmittel verbleibt zunächst als linsenförmiger Tropfen auf der Subphase Wasser. Das gezeigte Wilhelmy-Plättchen dient der Messung der Oberflächenspannung. Rechte Seite: nach Verdunstung des Lösungsmittels ist die Subphase (hier Wasser) mit einem monomolekularen Film des Amphiphils bedeckt. Die Ausrichtung des Amphiphils ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt. Der hydrophile Molekülteil orientiert sich zur wässrigen Subphase hin während der hydrophobe Molekülteil aus dem Wasser herausragt⁷

2.1.2 Kompression und Kompressionsverhalten von Monoschichten

Bei großem Abstand der gespreiteten amphiphilen Moleküle verhalten diese sich wie ein zweidimensionales Gas. Sie unterliegen damit einem modifizierten Gasgesetz, das durch folgende Gleichung beschrieben wird

$$\pi \cdot A = k \cdot T$$

π : Oberflächen- bzw. Filmdruck [mN/m]

A: Fläche/ Molekül

Durch die Kompression der Moleküle durch die Barrieren der Filmwaage kann die laterale Dichte der aufgebrachten Moleküle erhöht werden. Der sich dabei aufbauende Filmdruck π wird durch Messung der Oberflächenspannung ermittelt

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

⁷ ULR www.uni-paderborn F1-Praktikum Physik, 28.7.2002

γ_0 : Oberflächenspannung der reinen Subphase, meist Wasser⁸

γ : Oberflächenspannung der mit Amphiphilen bedeckten Subphase

Der Oberflächen- bzw. Filmdruck entspricht also der Absenkung der Oberflächenspannung. Der Expansionsdruck der Monoschicht wirkt der kontrahierenden Kraft der Oberflächenspannung entgegen.

Die Phasenumwandlungen in dünnen Langmuir-Filmen werden durch Betrachtung des Oberflächendruckes in Abhängigkeit von der Fläche bei konstanter Temperatur experimentell ermittelt. Man bezeichnet die erhaltenen Kurven als π/A -Isothermen. Der Oberflächendruck wird nach der Wilhelmy-Methode bestimmt. Hierbei wird die Kraft F gemessen, die auf ein ideal benetzbares Plättchen, das sogenannte Wilhelmy-Plättchen, wirkt, das in die mit Film bedeckte Subphase des Troges eintaucht.

Die Abszisse der π - A Isothermen wird zweckmäßigerweise als Fläche pro Molekül angegeben und nicht als tatsächlich vorliegende Filmfläche.

Während des bei konstanter Temperatur gemessenen Kurvenverlaufs zeigen die π - A Isothermen der Monoschichten charakteristische Bereiche, die mit gas- flüssig- und festanaloge Phasenzuständen übereinstimmen [Gaines 1966]. Bei fortschreitender Kompression wird der Eigenflächenbedarf der Amphiphile letztendlich unterschritten und es kommt zum Kollabieren der Schicht. Die Phasenübergänge sind als charakteristische Änderungen des Anstiegs der π - A Isotherme erkennbar.

⁸ Oberflächenspannung von reinem Wasser 72,8 mN/m

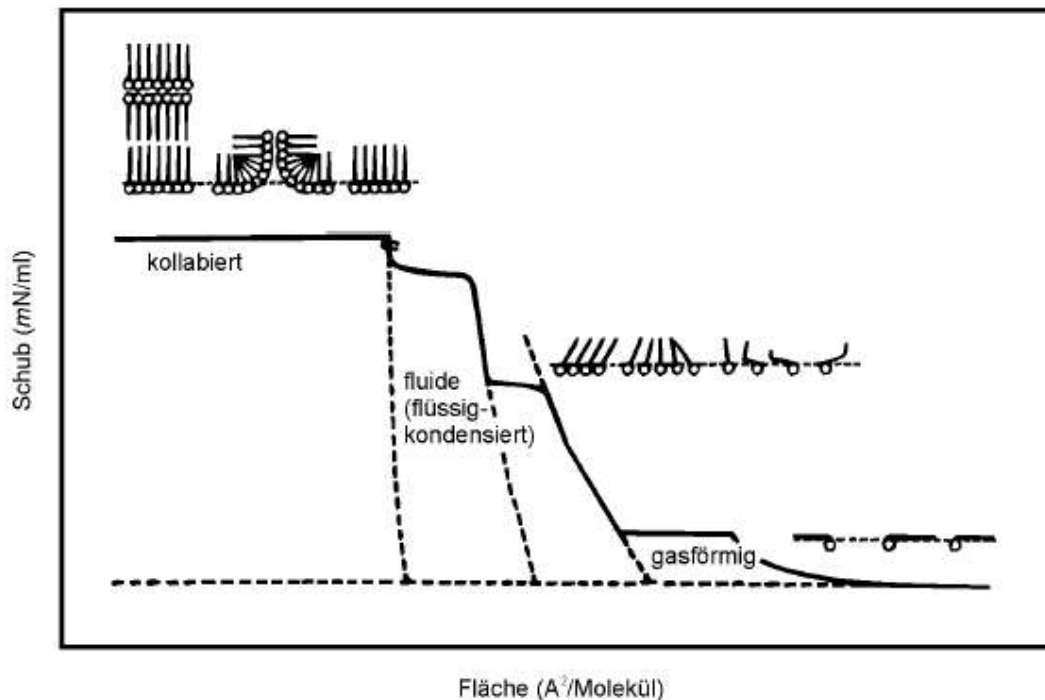


Abbildung 2-2 Anordnung der Moleküle während der Kompression. Von rechts nach links: zunächst haben die Moleküle keinen Kontakt zueinander, sie verhalten sich wie ein zweidimensionales Gas. Mit steigendem Druck ordnen sich die Moleküle büstenförmig an der Wasseroberfläche an (flüssig-kondensiert). Bei fortgesetzter Kompression des Filmes kommt es letztendlich zum Filmkollaps und damit zur Bildung von Multischichten [Draeger 2001]

2.1.2.1 Gasanaloger oder expandierter Bereich

Bei Vorhandensein großer Flächen und zunächst nur wenig Kontakt der Moleküle untereinander liegen diese in der sehr kompressiblen gasanalogen Phase vor. Die Moleküle des Filmes stehen nicht miteinander in Wechselwirkung und verhalten sich wie ein zweidimensionales ideales Gas.

2.1.2.2 Flüssiganaloger oder teilkomprimierter Bereich

Fortschreitende Kompression des Filmes führt zur Verminderung des lateralen Abstandes der Moleküle und damit zu intermolekularen Wechselwirkungen, die bei weiter fortschreitender Kompression die Phase L1 bilden. Die L1 Phase entspricht der einer Flüssigkeit und wird auch als LE Phase (liquid expanded) bezeichnet. Sie koexistiert bei höheren Kompressionsdrücken mit der gas-analogen Phase, wobei mit fortschreitender Kompression die Flächenanteile des Films in der flüssig

expandierten Phase L1 auf Kosten der Gasphase G zunehmen. Der Phasenübergangsdruck π bleibt im Idealfall während des Phasenüberganges konstant. In der L1 Phase sind die Moleküle zur Senkrechten geneigt, es kommt zur Aufrichtung der hydrophoben Reste; die Amphiphile besitzen nur kurzzeitig Positionsordnung.

2.1.2.3 Festanaloger Bereich

Der Langmuir-Film geht bei weiterer Kompression in ähnlicher Weise von der flüssig-expandierten Phase L1 in die flüssig-kondensierte Phase L2, auch LC Phase (liquid condensed phase) genannt, über. Auch hier koexistieren die Phasen L1 und L2 bei konstantem Phasenübergangsdruck π . Die π - A Isotherme zeichnet sich durch einen steilen, linearen Anstieg des Filmdrucks aus. Bei nahezu senkrechter Ausrichtung der hydrophoben Molekülteile zur Phasengrenzfläche liegen die Amphiphile dicht gepackt an der Wasseroberfläche vor.

Folgende Phasen liegen vor:

- LS, S und CS sind Phasen des Langmuir-Filmes, in denen die Moleküle keine Neigung zur Senkrechten mehr besitzen. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer in-plane Gitterstruktur und der Rotationsfähigkeit der Moleküle um die Längsachse:
- LS : „super liquid“, in-plane hexagonales Gitter, Moleküle können frei um ihre Achse rotieren
- S : „Solid“, in-plane (rechtwinkliges) orthorhombisches Gitter, Rotation um die Längsachse eingeschränkt
- CS : „crystallin solid“, in-plane (rechtwinkliges) orthorhombisches Gitter, keine Rotation um die Längsachse mehr möglich.

2.1.2.4 Kollapsbereich

Wird der Film über den minimalen Platzbedarf der amphiphilen Moleküle hinaus weiter komprimiert, so kommt es zu einem Prozess der als Schichtkollaps bezeichnet wird. Die π - A Isotherme zeigt einen plötzlichen Abbruch des steilen Filmdruckanstiegs sowie häufig ein anschließendes Absinken des Filmdrucks. Beim Prozess des Schichtkollapses werden einzelne Moleküle oder Moleküllagen aus der gebildeten Schicht herausgedrückt und der Film kollabiert. Der Druck, bei dem dieser Prozess stattfindet ist sowohl von den beteiligten Molekülen und ihren Eigenschaften als auch von der „Vorgeschichte“ der Monoschicht abhängig. Hierbei

spielen Temperatur , Kompressionsgeschwindigkeit, und Reinheit und Zusammensetzung der Spreitlösung eine Rolle.

2.1.3 Transfer des Films auf feste Substrate

Nach Bildung der Langmuir-Monoschicht auf der Filmwaage an der Wasser/Luft-Grenzfläche kann der Übertrag auf feste Substrate erfolgen. Durch senkrecht Ein- oder Austauchen des Substrates in die mit dem Film bedeckte Subphase wird dieser bei konstantem Oberflächendruck, dem sogenannten Transferdruck, auf das Substrat übertragen. Um den Transferdruck während der Beschichtung konstant halten zu können, müssen die Barrieren die Filmfläche verringern, da durch die Beschichtung Moleküle aus dem Langmuir-Film auf die Oberfläche übertragen werden. So werden isobare Verhältnisse während der Beschichtung gesichert. Das Transferverhältnis T ist definiert als Quotient aus der während des Transfers verringerten Filmfläche A_F und der beschichteten Substratoberfläche A_S

$$T = A_F / A_S$$

Im Idealfall beträgt das Transferverhältnis 1.

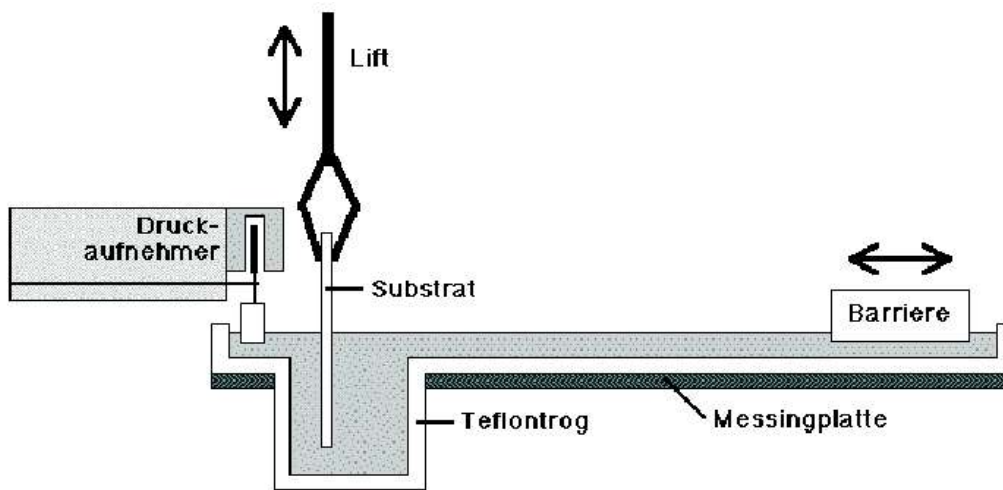


Abbildung 2-3 LB-Trog im Querschnitt. Der Übertrag des LB-Filmes auf feste Substrate erfolgt bei einem je nach Monoschicht unterschiedlichen Oberflächendruck. Er kann sowohl durch Eintauchen, wie auch durch Herausziehen des Substrates erfolgen. Der Druckaufnehmer kontrolliert die Einhaltung der spezifischen Versuchsbedingungen⁹

⁹ ULR www.uni-paderborn F1-Praktikum Physik, 28.7.2002

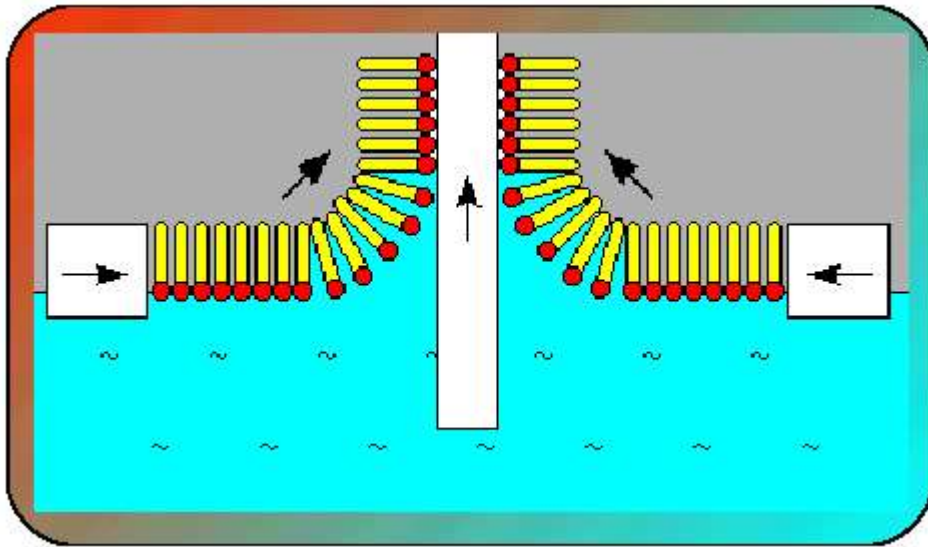


Abbildung 2-4 Übertrag auf ein festes Substrat durch Herausziehen [Schiller 2003]

2.2 Optik und Oberflächenplasmonenspektroskopie

In den letzten Jahren hat die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie oder surface plasmon resonance spectroscopy (SPS) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode lassen sich Aussagen über ultradünne dielektrische Schichten treffen [Knoll 1991] [Knoll 1998]. Im folgenden Kapitel soll auf die Grundlagen der Meßmethode und das Messprinzip eingegangen werden.

2.2.1 Polarisationszustände von Licht

Licht lässt sich als elektromagnetische transversale Welle beschreiben: der Vektor des elektrischen Feldes E und der Vektor des magnetischen Feldes H stehen senkrecht aufeinander und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle. Beide Felder schwingen in Phase. Zur Beschreibung der Schwingungsrichtung einer Lichtwelle betrachtet man den elektrischen Feldvektor \vec{E} . Mit seiner Hilfe kann Licht mit Hilfe der Wellengleichung wie folgt beschrieben werden

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = |E| \cos(\omega \cdot t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \delta)$$

wobei $|E|$ die Amplitude bezeichnet, $\omega = 2\pi\nu$ die Kreisfrequenz, $|k| = 2\pi/\lambda$ den Wellenvektor und δ die Phase. Die meisten Lichtquellen emittieren unpolarisiertes

Licht. Es sind alle Schwingungsrichtungen quer zur Ausbreitungsrichtung enthalten. Lineare Polarisation des Lichtes wird dann erreicht, wenn die Lichtwelle quer zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Man kann die linear polarisierte Welle in eine parallel polarisierte und eine senkrecht polarisierte Komponente aufteilen.

2.2.2 Totalreflexion

Läßt man einen Lichtstrahl von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium fallen (Bsp. Grenzfläche Wasser/Luft), so kommt es nach Snellius zwischen diesen zwei Medien mit den unterschiedlichen Brechungsindizes n_1 und n_2 zu einer Brechung des Lichtstrahls. Ein Teil wird gebrochen, ein anderer reflektiert. Es gilt das Reflexionsgesetz nach dem der Einfallswinkel Θ_{ein} gleich dem Reflexionswinkel Θ_{ref} ist. Oberhalb eines kritischen Winkels Θ_c kommt es zur Totalreflexion ($\Theta_t = \pi/2$) an der Grenzfläche.

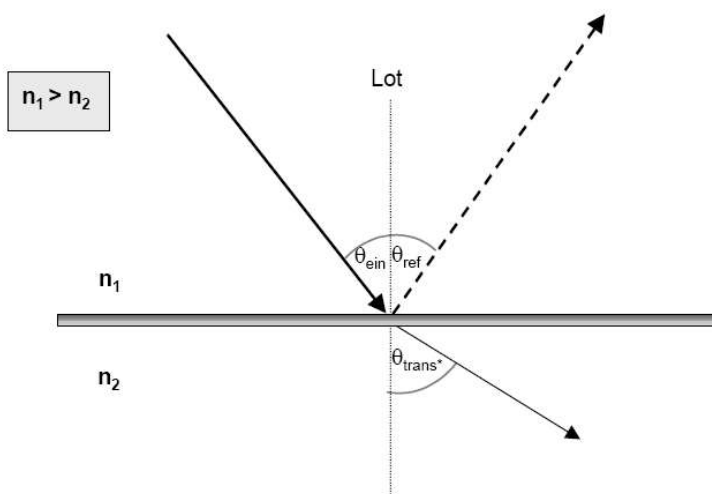


Abbildung 2-5 Reflexion an der Grenzfläche Glas/Dielektrikum. n_1 : Brechungsindex des Glases; n_2 Brechungsindex des Dielektrikums [Lauer 2001]

Den Zusammenhang zwischen Einfallswinkel Θ_{ein} und Brechungswinkel Θ_{trans^*} zeigt das Snellius'sche Brechungsgesetz

$$\frac{\sin \Theta_{\text{ein}}}{\sin \Theta_{\text{trans}^*}} = \frac{n_2}{n_1} = \text{kons tan } t$$

Mit zunehmendem Einfallswinkel Θ_{ein} steigt auch der Brechungswinkel Θ_{trans^*} an. Bei einem bestimmten Einfallswinkel wird der Brechungswinkel $\Theta_{\text{trans}^*} = 90^\circ$ erreicht.

Diesen Winkel Θ_c bezeichnet man als Grenzwinkel der Totalreflexion. Oberhalb dieses Winkels findet ausschließlich Reflexion des einfallenden Lichtstrahles statt.

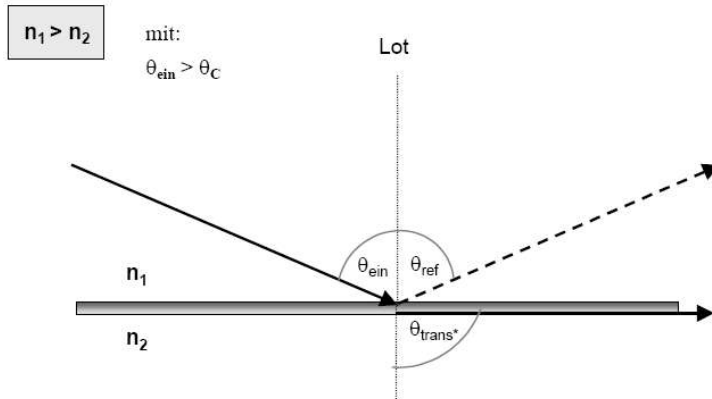


Abbildung 2-6 Totalreflexion an der Grenzfläche Glas(n_1)/Dielektrikum. Bei einem Einfallswinkel θ_c wird der Brechungswinkel θ_{trans} 90° . Diesen Winkel bezeichnet man als Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c . [Lauer 2001]

Der kritische Winkels Θ_c lässt sich mit Hilfe des Snellius'schen Brechungsgesetzes aus den Brechungsindizes der Medien n_1 und n_2 berechnen.

$$\sin \Theta_c = \frac{n_2}{n_1}$$

Wird monochromatisches Licht der Wellenlänge λ beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium total reflektiert, so fällt das elektromagnetische Feld im optisch dünneren Medium nicht sofort auf Null ab. Unter der Bedingung, dass die Normalkomponente des elektrischen Feldes \vec{E} und die Tangentialkomponente der dielektrischen Verschiebung an der Grenzfläche stetig sind ergibt sich aus den Maxwell-Gleichungen, dass bei der Totalreflexion eine Störung im optisch dünneren Medium auftritt. Die z-Komponente des elektrischen Feldes dringt in das optisch dünnere Medium ein und nimmt dabei senkrecht zur Grenzfläche exponentiell ab [Knoll 1991]. Die Eindringtiefe d_p lässt sich mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnen

$$E(z) = E = E_0 e^{-z/d_p}$$

$$d_p = \frac{\lambda / n_1}{2\pi (\sin^2 \Theta_{ein} - n_2^2 / n_1^2)^{1/2}}$$

Die Eindringtiefe d_p hängt von der Wellenlänge λ , den Brechungsindizes der beiden Medien n_1 und n_2 und dem Einfallswinkel Θ_{ein} ab. Sie liegt in der Größenordnung der Wellenlänge λ des einfallenden Lichts.

2.2.3 Oberflächenplasmonen

Oberflächenplasmonen sind elektromagnetische Wellen, die sich entlang einer Grenzfläche Metall/Dielektrikum ausbreiten und deren Felder von der Grenzfläche aus in beide Medien exponentiell abfallen.

Betrachtet man den Strahlengang von einem Dielektrikum in ein Metall, so beobachtet man bei Bestrahlung der Metalloberfläche einen Teil des Strahls, der reflektiert und einen Teil der transmittiert wird. Der transmittierte Strahl kommt zu einer Wechselwirkung eingestrahlt Lichts mit den Elektronen des Metalls. Diese halten sich aufgrund ihrer Ladung gegenseitig auf einen bestimmten Abstand, sind aber ansonsten frei beweglich, es bildet sich nahezu ein Kristallgitter aus. Die Elektronen können sich daher nur kollektiv durch das Gitter bewegen. Bei Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge kommt es zur Anregung eines Plasmons an der Metalloberfläche, wenn eine planare elektromagnetische Welle (Licht) in diese Grenzfläche einkoppelt. Die kollektiven Anregungszustände des freien Elektronengases werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Für eine Anregung müssen die Energie und der Impuls der Lichtwellen mit denen des Plasmons übereinstimmen.

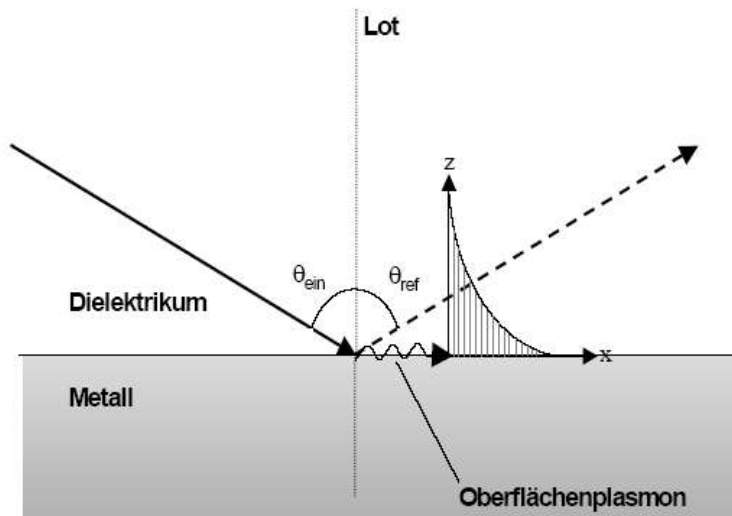


Abbildung 2-7 Reflexion an einer Grenzfläche Metall/Dielektrikum unter gleichzeitiger Anregung eines Oberflächenplasmons. Dieses zeigt ein elektrisches Feld innerhalb des Dielektrikums, welches sowohl in x - als auch in z -Richtung exponentiell abfällt [Lauer 2001].

2.2.4 Anregungsgeometrie

Folgende Überlegungen zur Geometrie zeigen die Bedingungen, die für die Anregung eines Plasmons gegeben sein müssen.

Das angeregte Oberflächenplasmon zeigt in Ausbreitungsrichtung, also parallel zur Oberfläche des Dielektrikums, ein elektrisches Feld \vec{E} . Bei Ausbreitung innerhalb des Dielektrikums nimmt dieses als evaneszentes Feld bezeichnete Feld ab. Das Oberflächenplasmon verhält sich wie eine Lichtwelle mit sinusförmigem Verlauf

$$\vec{E} = E_0 \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda_p} x\right)$$

Dabei wird $\left(\frac{2\pi}{\lambda_p}\right)$ als Wellenvektor \vec{k} bezeichnet. Abhängig vom Einfallswinkel sind

die Bedingungen für \vec{k} -Vektoren erfüllt und das eingestrahelte Laserlicht koppelt mit einem Plasmon. Hierbei kommt es zur Übertragung der Lichtenergie auf das Plasmon; es kommt zu einem Intensitätsminimum des reflektierten Lichtstrahls. Der

Winkel bei dem dieses Minimum auftritt ist abhängig vom \vec{k} -Vektor des Plasmons. Die Projektion des Wellenvektors des eingestrahnten Laserlichts (\vec{k}_0) muß sich mit der des Wellenvektors des Plasmons ($\vec{k}_{Plasmon}$) übereinstimmen. Erfolgt eine Änderung des Wellenvektors des Plasmons durch eine Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche (Bsp. Adsorption von Molekülen), so verschiebt sich auch das Minimum des reflektierten Lichts.

Es kann keine Anregung eines Plasmons an der Luft erfolgen: die Projektion des Wellenvektors (\vec{k}_0) des eingestrahnten Laserlichts ist zu kurz im Vergleich mit dem Wellenvektor des Plasmons ($\vec{k}_{Plasmon}$). Die Messungen erfolgen daher in einer speziellen Anordnung, der sogenannten Kretschmann Konfiguration [Kretschmann 1971].

2.2.5 Kretschmann Konfiguration

Das Licht wird bei dieser Anordnung durch ein Dielektrikum mit höherem Brechungsindex als Luft auf die Metalloberfläche gelenkt. So kommt es zu einer Vergrößerung des Wellenvektors des Lichts und damit zum Erreichen der Länge des Plasmonenwellenvektors. Ist die verwendete Metallschicht ausreichend dünn kann sich das elektromagnetische Feld des Plasmons durch das Metall hindurch auf der rückseitigen Grenzfläche fortsetzen [Kretschmann 1971]. Dort kann das Oberflächenplasmon zur Detektion von molekularen Schichten, die an der Metalloberfläche adsorbiert vorliegen und dadurch den Brechungsindex verändern, benutzt werden. Die Reflektivität eines Mehrschichtsystems kann unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen des elektrischen und des magnetischen Feldes aus den Fresnelgleichungen abgeleitet werden. Das Laserlicht wird an der Basis des Prismas nach den Fresnelgleichungen reflektiert und transmittiert. Ab einem kritischen Winkel tritt Totalreflexion ein. Im Bereich dieses Winkels kommt es zum exponentiellen Abfall des evaneszenten Feldes und zur Anregung eines Plasmons. Dies findet auch an der dem Prisma abgewandten Seite des Metalls statt, wenn die Projektion der Feldvektoren des Lichts mit denen des Plasmons übereinstimmen.

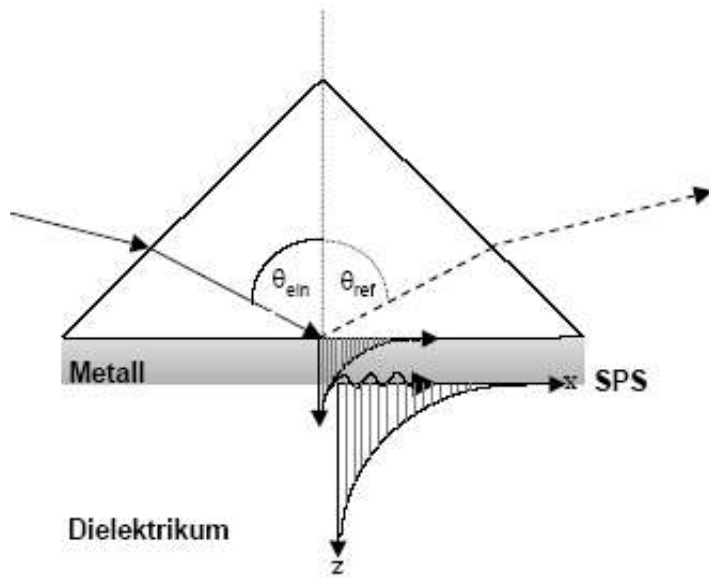


Abbildung 2-8 Schematische Darstellung der Prismenkopplung: Kretschmann-Konfiguration [Lauer 2001].

2.2.6 Messanordnung

Die Abbildung zeigt die verwendete Messanordnung für die Plasmonenspektroskopie, in der die Reflektivität eines Mehrschichtsystems für einen bestimmten Winkelbereich bestimmt wird. Der Laserstrahl des HeNe-Lasers ($\lambda=635\text{nm}$) wird durch den Frequenzmodulator (2) periodisch moduliert ($\nu=1193\text{ Hz}$). Diese Frequenz wird als Referenzsignal an einen Lock-in Verstärker weitergegeben, um Störsignale zu vermeiden.

Der Lichtstrahl durchläuft zwei Glan-Thompson Polarisatoren (3) aus Berliner Glas. Der erstgenannte dient zur Intensitätsregelung, der letztgenannte zur Festlegung der Polarisationsrichtung. Anschließend trifft der Laserstrahl auf ein 90° Prisma aus LaSFN9-Glas, das mit Immersionsöl an einen LaSFN9 Glasträger optisch gekoppelt ist. Die Rückseite des Glasträgers bedeckt eine thermisch aufgedampfte 50nm dicke Goldschicht, an deren Oberfläche Plasmonen angeregt werden können. Das Prisma/Glasträger/Messzellensystem ist auf einem Zweikreis-Goniometer montiert. Es wird über zwei Schrittmotoren mit einer Winkelauflösung von $1/1000^\circ$ angesteuert. Der reflektierte Laserstrahl wird durch eine Bikonvexlinse auf eine Si-Photodiode fokussiert, deren Ausgangsspannung der reflektierten Lichtintensität

proportional ist. Die temperierbare Messingküvette, die auf der Rückseite der Messzelle angebracht wird, vermeidet Temperaturschwankungen und damit Änderungen des Brechungsindex.

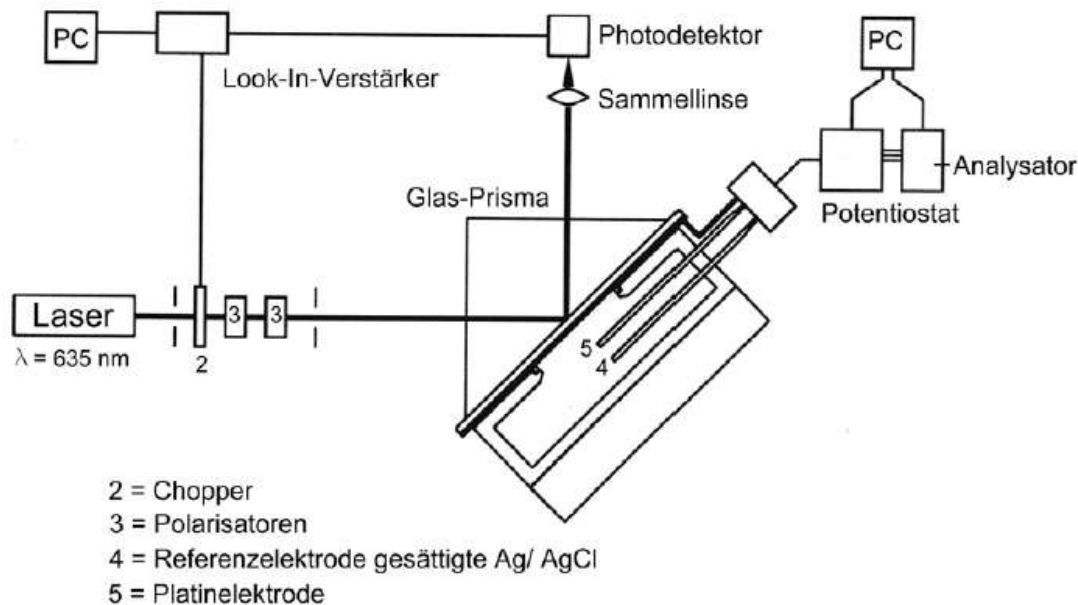


Abbildung 2-9 Schematische Darstellung des kombinierten Messaufbaus für Oberflächenplasmonen bzw. Impedanzmessungen [Naumann 2003].

2.2.7 Einfluß ultradünner Schichten auf die Dispersion von Plasmonen

Bei Verwendung einer Metalloberfläche zur Adsorption von Molekülen aus einer Lösung bewirken diese eine Verschiebung des resonanten Einfallswinkels des Laserstrahls. Ursache ist der Einfluß der Schicht adsorbierter Moleküle auf die Feldverteilung an der Metallgrenzfläche [Veith 1995]. Die adsorbierte Schicht erhöht den durchschnittlichen Brechungsindex des Dielektrikums, das im Wechselwirkungsbereich des Plasmons liegt. Gemessene Resonanzkurven können quantitativ mittels des Transfer-Matrix-Algorithmus ausgewertet werden [Veith 1995]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass weder der exakte Brechungsindex noch die Schichtdicke der adsorbierten Schicht bekannt sind, so dass der Wert für einen dieser Parameter nur unter Kenntnis des Wertes für den zweiten Parameter bestimmt werden kann. Für Lipid/Proteinschichten wird im Rahmen dieser Arbeit ein Brechungsindex von 1,5 angenommen [Ulman 1991]. Werden mehrere Schichten adsorbiert, so muß die Probe vor und nach jeder Veränderung gemessen werden, so

dass die Parameter der vorangegangenen Schichten vor der Messung der neuen Schicht bekannt sind. Tritt bei den Messungen eine Vergrößerung der Halbwertsbreite der Resonanzkurve auf, so deutet dies auf eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit hin. Die Verschiebung des Resonanzwinkels kann durch Variation der geometrischen Dicke und des Brechungsindex dieser Schicht in der Anpassungsrechnung beschrieben werden. Die entsprechenden Werte der vorher gemessenen Schichten müssen hierbei natürlich konstant gehalten werden.

2.2.8 Kinetik-Messungen

Ein großer Vorteil der Plasmonenspektroskopie ist die Möglichkeit von zeitabhängigen Untersuchungen. Neben den winkelabhängigen Reflektivitätsmessungen kann auch der zeitliche Verlauf von Adsorptionsprozessen beobachtet werden. Man wählt einen Winkelwert innerhalb des Minimums der Plasmonenkurve aus und beobachtet nach einer gewissen Vorlaufzeit die Verschiebung desselben durch Zugabe einer adsorbierenden Substanz. Anfänglich steigt die Reflektivität stark an. Nach einer Weile kommt es zu einer langsameren Änderung bis die Kurve schließlich in die Sättigung übergeht. Kinetikmessungen erlauben Aussagen über die Zeitdauer und den Verlauf von Adsorptionsprozessen.

2.3 Impedanz-Spektroskopie

Die Impedanz-Spektroskopie (IS) ist eine Methode, mit deren Hilfe die elektrischen Eigenschaften von Materialien und deren Grenzflächen mit elektrisch leitenden Elektroden untersucht werden können. Die IS liefert Informationen über die Verteilung von Ladungen in unmittelbarer Nachbarschaft der untersuchten Grenzflächen z. B. Elektrode/Elektrolyt. Im Folgenden sollen verschiedene Modelle zur Untersuchung und Beschreibung von Grenzflächenladungen beschrieben werden. Außerdem erfolgt eine kurze Vorstellung der physikalischen Grundlagen und Prinzipien der Impedanz-Meßtechnik.

2.3.1 Die elektrische Doppelschicht

Bringt man eine Elektrodenoberfläche mit einem Elektrolyten in Kontakt, so kommt es an der Grenzfläche zwischen beiden Medien zur Ausbildung einer geladenen Schicht. Diese Ladungen werden durch entsprechende Gegenladungen in der Lösung ausgeglichen. Abhängig vom elektrochemischen Potential des Metalles treten entweder Elektronen (e^-) aus dem Metall aus oder werden von ihm aufgenommen. Bei Austritt von Elektronen verbleibt ein positiver Ladungsüberschuß innerhalb des Metalles. Dieser wird durch eine Schicht negativ geladener Ladungen direkt an der Grenzfläche Metall/ Elektrolytlösung kompensiert. Es bilden sich zwei gegensätzliche parallele Ladungsschichten wie in Abbildung 2-10 schematisch dargestellt.

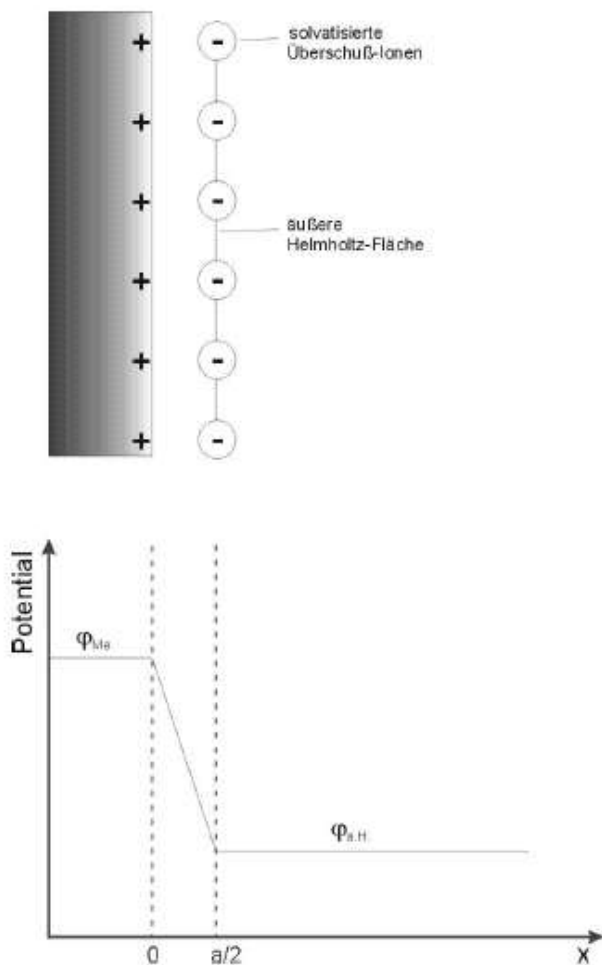


Abbildung 2-10: Helmholtz Modell der elektrischen Doppelschicht [Lauer 2001]

Hierbei handelt es sich um das einfachste Modell der elektrischen Doppelschicht. Diese wird entweder als „**starre Doppelschicht**“ oder als **Helmholtz-Modell** bezeichnet [Hamann 1985] [Schwuger 1996]. Die Eigenschaften der Helmholtz-Schicht können als die eines Kondensators beschrieben werden, da die Ladungsschwerpunkte der entgegengesetzten Ladungen jeweils auf einer Ebene liegen, analog den Platten eines Kondensators.

Man unterscheidet zwischen spezifisch und unspezifisch adsorbierten Ionen. Unspezifisch adsorbierte Ionen befinden sich wegen ihrer Solvathülle in größerem Abstand zur Grenzfläche. Man unterscheidet die innere und die äußere Helmholtz-Schicht. Die innere Helmholtz-Schicht wird hierbei durch die Elektrodenoberfläche repräsentiert, zusammen mit einer starren Schicht nicht solvatisierter spezifisch adsorbierter Gegenionen. Die äußere Helmholtz-Schicht bildet sich aus einer weiteren starren und negativ geladenen Schicht solvatisiert vorliegender unspezifisch adsorbierter Gegenionen. Das Potential ϕ nimmt zwischen beiden Schichten linear ab und bleibt außerhalb der äußeren Helmholtz-Schicht im Elektrolyten konstant.

Das Helmholtzsche Modell dient der Beschreibung von auftretenden Raumladungen an Elektroden. Nachteil ist die Beschreibung der Schichten als starre Einheiten, die keinerlei Bewegung zulassen.

Eine Weiterentwicklung des Helmholtz-Modells stellt das **Gouy-Chapman-Modell** dar. Dieses berücksichtigt thermische Bewegungen der Ladungen. Durch die Wärmebewegung wird die starre Struktur der Ladungen aufgelöst. In zunehmendem Abstand von der Elektrodenoberfläche führt diese Bewegung zu einer diffusen Schicht, das Modell wird daher auch als das der „**diffusen Doppelschicht**“ bezeichnet. Allerdings zeigt auch das Gouy-Chapman-Modell bei seiner Beschreibung der Schichten Defizite. So werden ausschließlich Coulomb-Wechselwirkungen beschrieben und die Oberflächenladungen werden als kontinuierlich angenommen. In der Regel liegen aber an Grenzflächen insbesondere innerhalb nicht zu konzentrierter Elektrolytlösungen weder ausschließlich starre noch diffuse Doppelschichten vor. Erst die Kombination der beiden Modelle zum **Sternschen Modell** führt zu einer guten Beschreibung des Verhaltens elektrischer

Doppelschichten. Im Sternschen Modell fällt das Potential φ zwischen der äußeren und der inneren Helmholtz-Schicht aufgrund adsorbierter Ionen linear auf einen Wert ab. Das direkt an der Grenzfläche auftretende Potential wird als Oberflächenpotential $\Delta\varphi_{\text{starr}}$ bezeichnet. Über die sich anschließende diffuse Doppelschicht fällt das Potential φ exponentiell auf den Wert des Elektrolyten ab.

Das Galvanipotential $\Delta\varphi$ zwischen dem Elektrodenpotential φ_{Metall} und dem Elektrolyten φ_{LM} ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$\Delta\varphi = (\varphi_{\text{Metall}} - \varphi_{\text{ä.H.}}) + (\varphi_{\text{ä.H.}} - \varphi_{\text{LM}}) = \Delta\varphi_{\text{starr}} + \Delta\varphi_{\text{diffus}}$$

Die Potentialdifferenz zwischen der äußeren Helmholtz-Schicht und dem Elektrolyten wird als **Zeta-Potential** ξ bezeichnet. Beim Massentransport am Elektrolyten bleibt in der Nähe der Grenzfläche stets eine dünne Schicht von Lösungsmittelmolekülen in Ruhe. Zu den elektrokinetischen Effekten tragen jedoch ausschließlich die Potentiale an sogenannten Scherflächen bei. Unter Scherflächen versteht man die Grenzfläche zwischen der unbewegten Lösungsmittelgrenzschicht und des Elektrolyten. Das Zeta-Potential ist das Potential, das an dieser Scherfläche herrscht [Adam 1997].

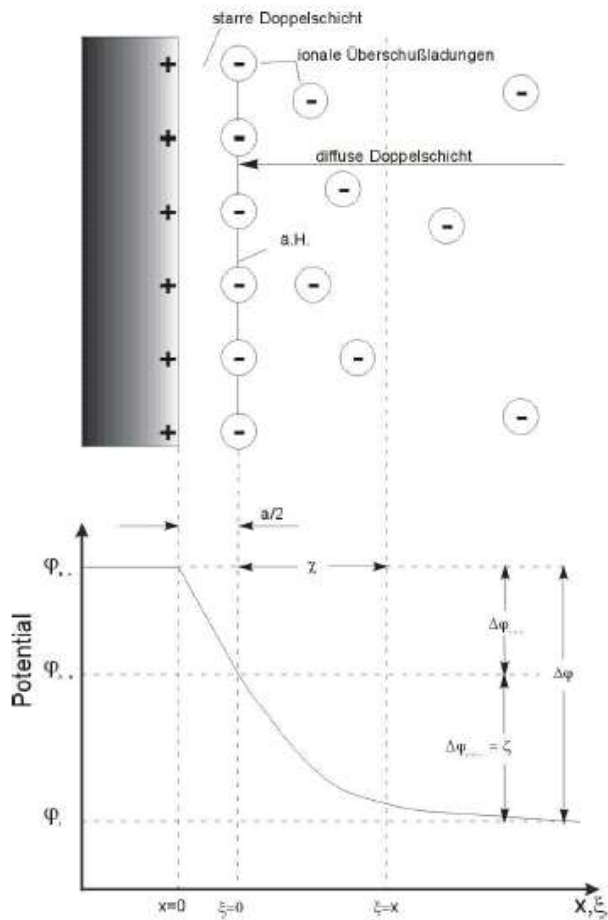


Abbildung 2-11: Graphische Darstellung des Helmholtz-Modells. Gezeigt wird der Potentialverlauf zwischen der Elektrode und der äusseren Helmholtz-Fläche [Lauer 2001].

2.3.2 Impedanzspektroskopie

Wie bereits erwähnt ist die Impedanzspektroskopie (IS) eine sehr empfindliche Methode zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Materialien und deren Grenzflächen an elektrisch leitenden Elektroden [Macdonald 1987]

2.3.3 Darstellung der Impedanzspektren

2.3.3.1 Bode-Plot

Hier wird der Betrag der Impedanz Z und der Phasenwinkel Φ als Funktion der logarithmierten Anregungsfrequenz aufgetragen. Für das einfachste Ersatzschaltbild eines Dielektrikums an der Grenzfläche Metall/Elektrolyt (siehe Zeichnung in

Abbildung 2-12; R_s Widerstand des Elektrolyten; R_m Widerstand des Dielektrikums; C_m Kapazität des Dielektrikums) ergibt sich z. B. das in Abbildung 2-12 gezeigte Spektrum:

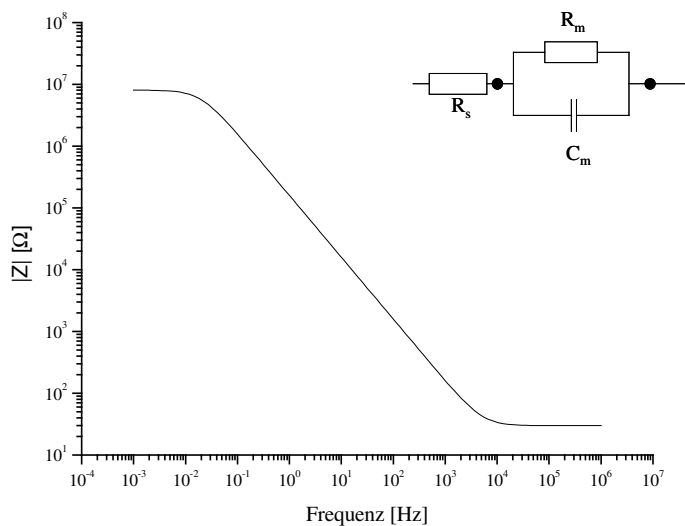


Abbildung 2-12 Bode Plot in $|Z|$

Die Schnittpunkte mit der Z Achse ergeben für hohe Frequenzen den Vorwiderstand, in diesem Fall den Widerstand des Elektrolyten R_E . Für niedrige Frequenzen erhält man den Widerstand des Dielektrikums R_m aus dem Schnittpunkt mit der y -Achse.

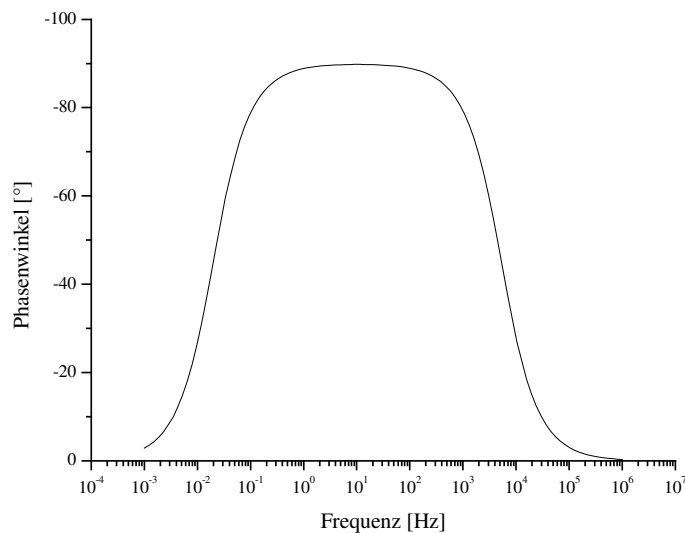


Abbildung 2-13: Bode-Plot der Phase

2.3.3.2 Frequenzreduzierte Admittanz

Zwischen der Admittanz Y und der Impedanz Z besteht der folgenden Zusammenhang

$$Y = \frac{1}{Z} = Y' + iY'' = G + G_a + i\omega C$$

mit G =Leitwert und G_a =Leitwert des Elektrolyten. Die Admittanz stellt eine komplexe Leitfähigkeit dar. Es gilt daher für den Real- bzw. Imaginärteil

$$Y'_\omega = \frac{Z'_\omega}{(Z'_\omega)^2 + (Z''_\omega)^2}$$

$$Y''_\omega = \frac{-Z''_\omega}{(Z'_\omega)^2 + (Z''_\omega)^2}$$

Die Division der Admittanz durch die Frequenz ω ergibt die frequenzreduzierte Admittanz Y/ω . Die Auftragung der Admittanz ergibt ein Diagramm, in dem der Schnittpunkt mit der imaginären Achse direkt die Kapazität C_s des Systems liefert.

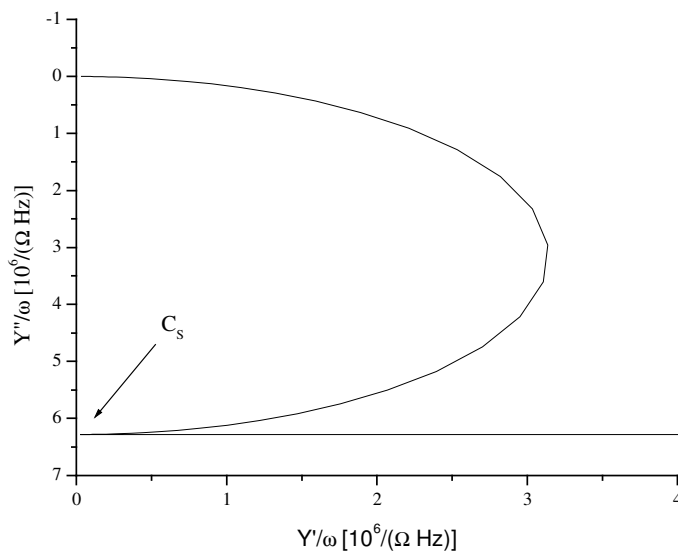


Abbildung 2-14: Admittanzplot

2.3.3.3 Ortskurve (Nyquist-Graph)

Die Auftragung der frequenzabhängigen Impedanzen in der komplexen Ebene ist die einfachste Auftragung. Es werden der Real- (Z') sowie der Imaginärteil (Z'') gegeneinander aufgetragen, dies ergibt ein Diagramm der Ortskurve.

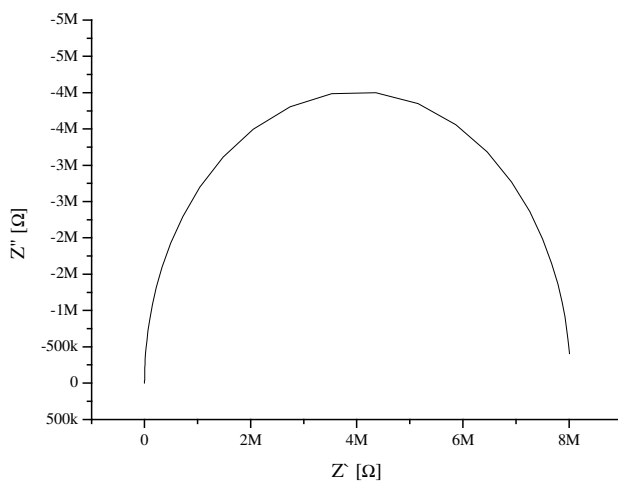


Abbildung 2-15: Ortsdarstellung

3 Themenstellung/Zielsetzung

Bereits in der Einleitung wurde das Ziel der Entwicklung von Biomembranmodellen, die Nachahmung der Membraneigenschaften der biologischen Lipidmembran, erläutert. Eine Nachbildung derselben ermöglicht, das Verständnis für die komplexe Struktur der Membran selbst, ebenso wie der in ihr enthaltenen Strukturen, zu vertiefen. Das komplexe Zusammenspiel von Struktur und Funktion der biologischen Lipidmembran ist immer noch nicht endgültig verstanden und bietet Raum für unterschiedliche Fragestellungen; diese mündeten in der Entwicklung unterschiedlicher Modellsysteme im Rahmen der Membranforschung.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit wurden unterschiedliche Membranmodellsysteme zur Nachahmung der biologischen Lipidmembran vorgestellt. Festkörperunterstützte Membranen bieten zum einen ein hohes Maß an Stabilität, zum anderen bieten sie die Möglichkeit des Einsatzes vieler oberflächensensitiver Untersuchungsmethoden. Innerhalb der Gruppe der festkörperunterstützten Systeme stellen wiederum die Membranmodelle mit Abstandhaltermolekülen die Reihe der Systeme dar, die dem Zusammenspiel aus Struktur, Dynamik und Funktion der natürlichen Membranen am nächsten kommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen fanden an Glykolipopolymer-Molekülen statt. Diese können nicht direkt auf dem goldbedampften Substrat immobilisiert werden. Wie in Abbildung 3-1 gezeigt sind eine Reihe von Funktionalisierungsschritten erforderlich. Zunächst wird eine sich selbst organisierende Monoschicht (self assembled monolayer, SAM) eines Thiolgemisches oder alternativ eines schwefelmodifizierten Polyethylenglykols auf der thermisch aufgedampften Goldschicht assembliert. Beide Schichten dienen als Abstandhalter, auch spacer bzw. tether genannt, die die im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigte photochemische Anbindung von Glykolipopolymer-Molekülen auf der Goldoberfläche ermöglichen. Der jeweils untersuchte SAM wird durch eine photoreaktive Verbindung funktionalisiert, die die nachfolgende Photoreaktion mit einer funktionellen Endgruppe am hydrophilen Ende der vororientierten

Glykolipopolymer-Monoschicht gestattet. Auf den so präparierten Schichten werden Liposomen eines Phospholipids gespreitet, die zur Ausbildung einer polymerunterstützten Lipiddoppelschicht führen.

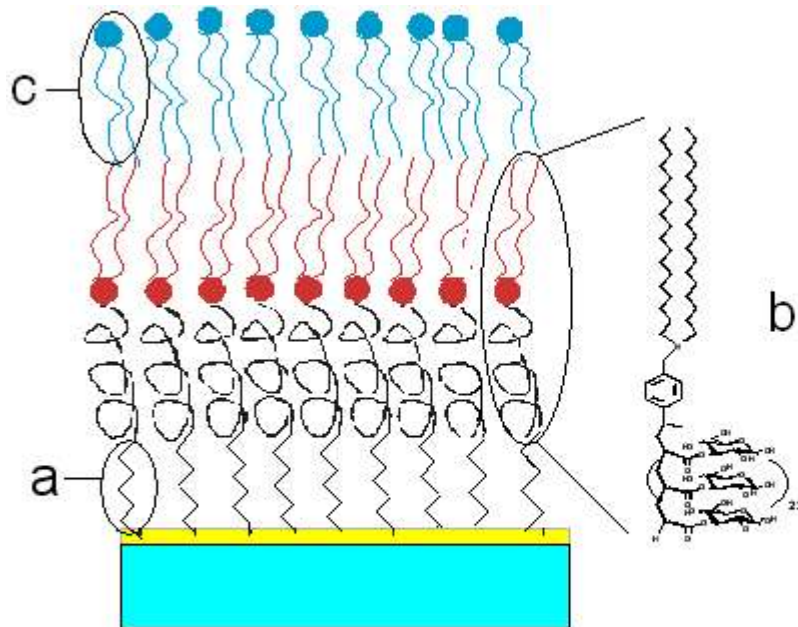


Abbildung 3-1 Allgemeine Darstellung der verankerten Lipopolymermembranen: a) Abstandhalter, der jeweils über Schwefel-Gold-Wechselwirkung auf der Goldoberfläche kovalent gebunden vorliegt b) Glykolipopolymer-Molekül, schwarz dargestellt der Kohlenhydrat-Anteil des Moleküls, rot dargestellt die Lipidkopfgruppe c) blau dargestellt: Phospholipidschicht aus ausgerollten Vesikeln

Bisherige Untersuchungen an Lipopolymermolekülen erfolgten auf oxidischen Oberflächen. Optimierungsversuche hinsichtlich Ankerdichte und Fluidität wurden vorgenommen. Es fehlen jedoch Untersuchungen zu den elektrischen Eigenschaften der hergestellten Membranen.

In der vorliegenden Arbeit sollen Glykolipopolymermoleküle als Lipopolymerkomponenten hinsichtlich ihrer Eignung als Modellmembranbestandteile untersucht werden. Die Moleküle sollen auf dem Langmuir-Blodgett Trog vororientiert und anschließend auf thermisch aufgedampften und entsprechend präparierten Goldoberflächen photochemisch kovalent angebunden werden. Die erhaltenen Schichten sollen anschließend

hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Eignung als Modellmembransysteme untersucht und optimiert werden. Die Vororientierung ermöglicht eine gezielte, möglichst endständige Anbindung der Moleküle. Die nachfolgende photochemisch kovalente Anbindung stellt eine besondere Herausforderung dar, da hierbei als Schwierigkeit das Phänomen des Förster-Energietransfers auftreten kann.

Ein wünschenswertes Merkmal von festkörperunterstützten Membranen sind die elektrischen Eigenschaften, da diese die spätere Verwendung als Modellsysteme für Membranproteine hauptsächlich bestimmen. Aus diesem Grund ist ein weiteres Ziel der hier vorgestellten Arbeit, die elektrischen Eigenschaften der Glykolipopolymer- basierenden Modellmembranen mit Hilfe von Impedanzmessungen zu untersuchen.

4 Übersicht über die untersuchten Systeme

4.1 Prinzip des Aufbaus der Schichten bis zur Vesikelfusion

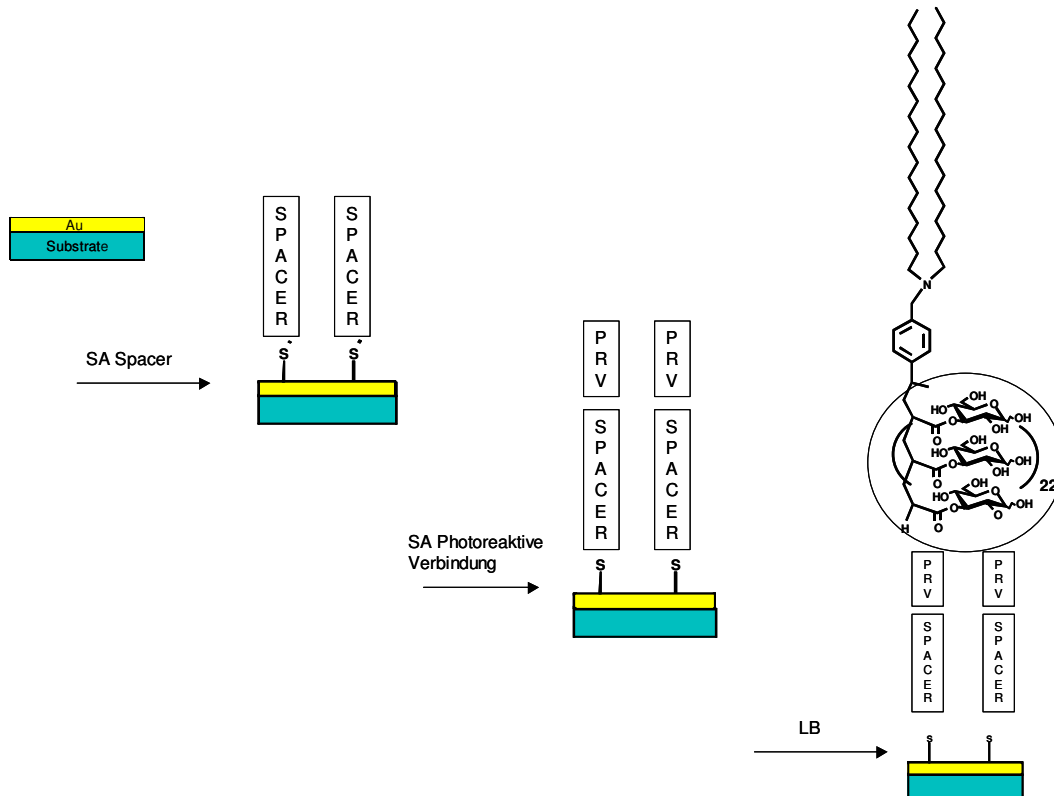


Abbildung 4-1: Allgemeine Darstellung der untersuchten Schichten; SA=self-assembly; spacer =Abstandhalter; prv=photoreaktive Verbindung; LB= Langmuir-Blodgett Transfer des Glykolipolymers (hier Homopolymer Ho5900)[Schiller 2003]

Abbildung 4-1 zeigt allgemein die für die Herstellung der untersuchten Systeme notwendigen Schritte. Beginnend mit dem thermischen Aufdampfen der Goldschicht (Au) auf die gereinigten Glasträger (substrate) folgt anschließend die Assemblierung des jeweils untersuchten Abstandhalters¹⁰ durch Selbstorganisation¹¹. Anschließend wird die photoreaktive Verbindung (PRV) auf der Abstandhalterschicht verankert. Es folgt die Vororientierung des Glykolipolymers an der Wasser-Luft Grenzfläche des Langmuir-Blodgett-Trogs und dessen Übertrag auf die Substrate. Nach einem

¹⁰ Abstandhalter, engl. spacer

¹¹ Selbstorganisation, engl. Self-assembly

zwischengeschalteten Trocknungsschritt wird die Monoschicht des Glykolipopolymer durch UV-Bestrahlung photochemisch kovalent an die photoreaktive Verbindung gebunden. Als letzter Schritt erfolgt die in Abbildung 4-2 schematisch dargestellte Fusion des Lipidmonolayers mit Liposomen. Hierbei bildet sich die komplette Lipiddoppelschicht.

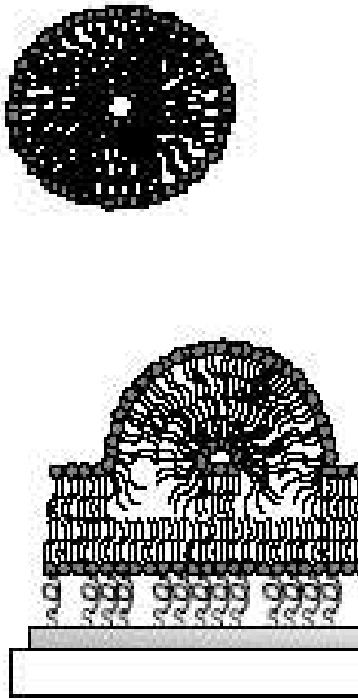


Abbildung 4-2 intaktes Liposom (Vesikel) in Lösung sowie Vesikel im Moment des sog. „Ausrollens“ auf der Glykolipopolymer-Monoschicht [Lauer 2001]

4.1.1 Beschreibung der untersuchten Abstandhalter

Alle Anbindungsreaktionen der untersuchten Abstandhaltersysteme beruhen auf der Schwefel-Gold-Wechselwirkung zwischen der auf die gereinigten Glassubstrate thermisch aufgedampften Goldschicht sowie den mit einer Schwefelgruppe funktionalisierten Abstandhaltermolekülen [Nuzzo 1983] [Jung 1998]. Die Abstandhalter dienen zum einen dazu, die nachfolgend aufgebrachtten Schichten auf der Goldoberfläche kovalent zu fixieren, daneben sollen sie einen ausreichenden Abstand zwischen der Goldoberfläche und den photoreaktiven Verbindungen erzeugen, um so den Einfluss des Förster Transfers (Kapitel 1.5.4) zu vermindern.

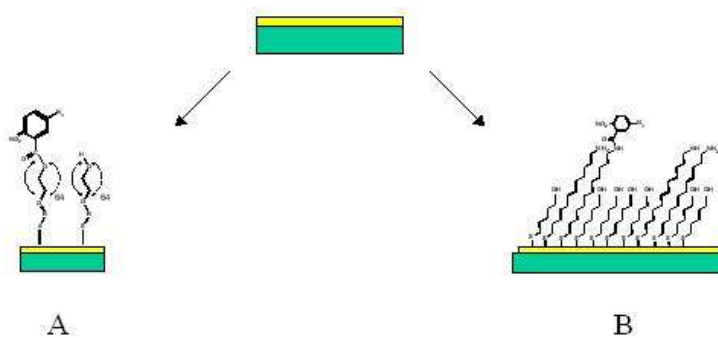


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der untersuchten Abstandhalter. Die Assemblierung erfolgt ausgehend von einer dünnen Goldschicht (gelb) auf einem Glassubstrat (grün). A Thiol-terminiertes HO-Polyoxyethylen-NH-CO(CH₂)₂-SH PEG3000; B binäre Thiol-Mischung aus 1-Thiohexanol und Bis(aminododecyl)disulfid.

Abbildung 4-3 verdeutlicht schematisch die zunächst vorgenommene Fixierung der unterschiedlichen untersuchten Abstandhalter-Komponenten auf der thermisch aufgedampften Goldoberfläche. Die nachfolgenden Kapitel erläutern die genannten Abstandhalter im Einzelnen.

4.1.1.1 Thio-Polyethylenglycol HO-Polyoxyethylen-NH-CO-C₂H₄-SH

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Thio-Polyethylenglycol HO-Polyoxyethylen-NH-CO-C₂H₄-SH (PEG 3000 bzw. Thio-PEG) wird auf der thermisch aufgedampften Goldoberfläche durch Selbstorganisation aus ethanolischer Lösung über Schwefel-Gold Wechselwirkungen kovalent fixiert.

Die Idee der Verwendung von Polymeren als Abstandhalter für Lipiddoppelschichten wurde bereits in der Einleitung erläutert. Da viele Reaktionen in Membranen auf der lateralen Mobilität und den fluiden Eigenschaften der Komponenten beruhen, wurden zahlreiche Versuche zur Entkopplung der Lipiddoppelschicht vom Substrat mittels Polymerkissen untersucht [Sackmann 1996]. Die bisher verwendeten Polymere konnten zwar als hydrophile Schicht unter den Lipiddoppelschichten aufgebaut werden, allerdings wiesen die erhaltenen Membranen oftmals Defekte auf.

4.1.1.2 Binäre Thiol-Mischung

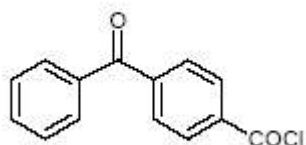
Das zweite untersuchte Abstandhaltersystem besteht aus einem Gemisch aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid. Es wird nachfolgend als binäre Thiol-Mischung bezeichnet. Beide Verbindungen zeigen durch ihre SH-Gruppe eine starke Affinität zur thermisch aufgedampften Goldoberfläche und werden bei Kontakt mit derselben kovalent gebunden.

Ziel der Verwendung des Gemisches aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid ist die Verdünnung der für die spätere Anbindung der photoreaktiven Verbindung benötigten Aminogruppe des Bis-(Aminododecyl)-disulfids. Die nach einem weiteren Assemblierungsschritt folgende Funktionalisierung der binären Thio-Mischung mittels photoreaktiver Verbindungen erfolgt durch Reaktion derselben mit der terminalen Amino-Gruppe des Disulfids. Um eine zu dichte Belegung der Oberfläche und daraus resultierende geringe Mobilität innerhalb der bei den nachfolgenden Anbindungsschritten mit photoreaktiven Molekülen untersuchten Glykolipopolymere zu vermeiden, wird die für die Anbindung genutzte Bis-(Aminododecyl)-disulfid-Konzentration durch Mischung mit 1-Thiohexanol verringert. Optimal für die spätere Anbindung der photoreaktiven Verbindung wäre ein Molekül Bis-(Aminododecyl)-disulfid umgeben von einem Kranz aus 1-Thiohexanol-Molekülen. Molekular betrachtet erfordert dies ein Mischungsverhältnis von 1:9 (Bis-(Aminododecyl)-disulfid:1-Thiohexanol) für die Assemblierungslösung [Schiller 2001].

4.1.2 Photoreaktive Verbindungen

Nach Assemblierung des Abstandhalter-Systems auf der thermisch aufgedampften Goldoberfläche wird die Abstandhalter-Schicht mit einer photoreaktiven Verbindung funktionalisiert. Diese Funktionalisierung erfolgt mit zwei unterschiedlichen photoreaktiven Verbindungen; sie werden in den beiden nachfolgenden Unterkapiteln genauer erläutert.

4.1.2.1 4-Bezoylbenzoesäurechlorid



Die Funktionalisierung des untersuchten Abstandhaltersystems mit 4-Benzoylbenzoesäurechlorid (Benzophenon) erfolgt aus methanolischer Lösung. Das photoreaktive Molekül reagiert über seine Säurechloridfunktion und bindet an die auf der Oberfläche vorhandenen reaktiven Gruppen. Im Falle der binären Thiol-Mischungen sind dies die Aminogruppen; es kommt zur Bildung eines Amids. Nach Vororientierung der untersuchten Glykolipopolymermoleküle an der Wasser-Luft Grenzfläche des LB-Troges sowie deren Übertrag auf die funktionalisierte Substratoberfläche werden die Träger mit UV-Licht bestrahlt. Benzophenon absorbiert UV-Licht im Wellenlängenbereich von 340nm aufgrund des n,π^* -Überganges innerhalb der Carbonyl-Gruppe. Dies resultiert in einem reaktiven Triplett-Zustand biradikalischer Natur der die photochemische Anbindung einer Vielzahl von Verbindungen ermöglicht .

Abbildung 4-4 veranschaulicht schematisch die durch UV-Bestrahlung ausgelöste Reaktion.

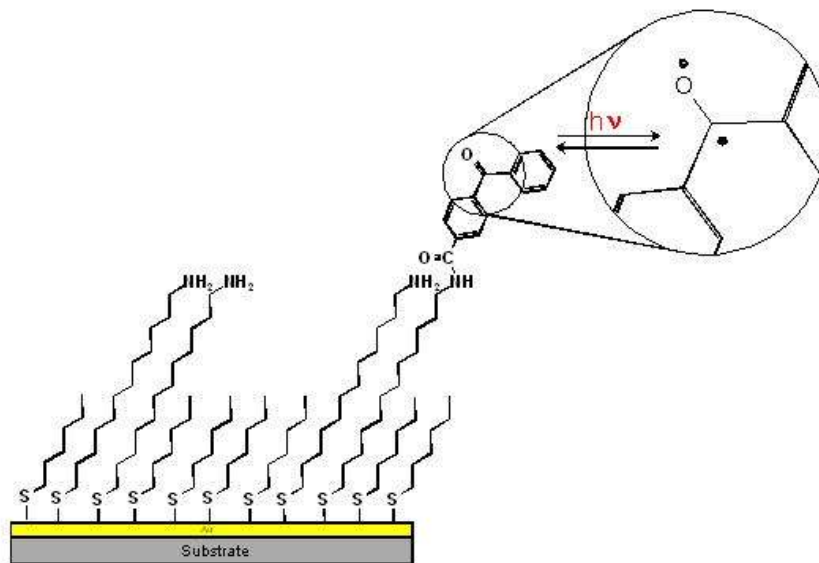
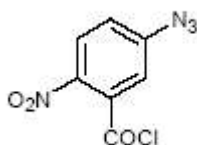


Abbildung 4-4 Reaktion des Benzophenons, ausgelöst durch UV-Bestrahlung nach dem LB Transfer des Glykolipopolymers. (Grau: Glassubstrat, gelb: aufgedampfte Goldschicht). Als Abstandhaltersystem: binäre Thiol-Mischung. Durch UV-Bestrahlung kommt es zur Anregung der Carbonylgruppe. Das entstandene Radikal reagiert mit dem Glykolipopolymer (in der Abbildung nicht gezeigt)[Schiller 2002].

Eine detaillierte Betrachtung der UV-induzierten Reaktionen des Benzophenons findet sich in Kapitel 1.5.2.

4.1.2.2 5-Azido-2-Nitro-Benzoessäurechlorid



Die kovalente Verankerung des 5-Azido-2-Nitro-Benzoessäurechlorids (Azid) erfolgt ebenfalls auf der mit dem jeweiligen Abstandhalter beschichteten Goldoberfläche. Abbildung 4-5 zeigt die Reaktion des Azids mit der vororientierten Glykolipopolymer-Monoschicht durch Bestrahlung mit UV-Licht. UV-Licht führt zur Photoelimination eines Moleküls Stickstoff aus der Azidogruppe. Das gebildete Nitren abstrahiert ein Wasserstoff-Molekül aus der OH-Gruppe eines Zuckerbausteins des Glykolipopolymers, die Bildung der kovalenten Bindung zwischen dem Zuckerbaustein des Glykolipopolymers und dem auf der

Substratoberfläche verankerten 5-Azido-2-Nitro-Benzoesäurechlorid führt zum Aufbau der Monoschicht.

Abbildung 4-5 veranschaulicht schematisch die durch UV-Bestrahlung ausgelöste Reaktion.

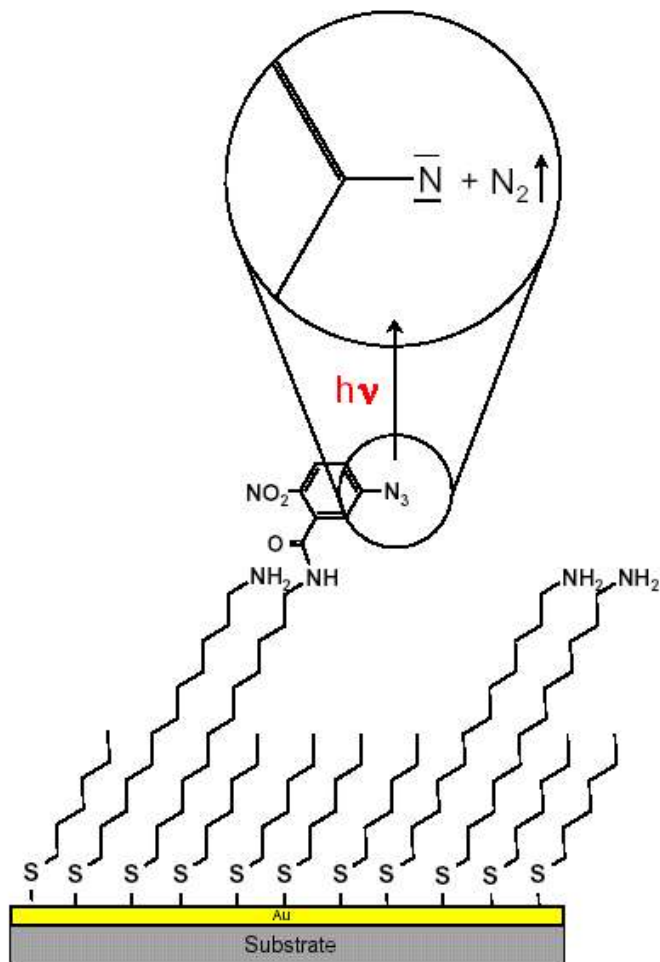


Abbildung 4-5 Reaktion des Azids ausgelöst durch UV-Bestrahlung nach LB Transfer des Glykolipopolymer. (Grau: Glassubstrat, gelb: aufgedampfte Goldschicht). Als Abstandhaltersystem: binäre Thiol-Mischung. Nach UV-Bestrahlung kommt es zur Elimination eines Moleküls Stickstoff. Das entstandene Nitren reagiert mit dem Glykolipopolymer (nicht gezeigt) [Schiller 2002]

Eine detaillierte Beschreibung der Photochemie des 5-Azido-2-Nitro-Benzoesäurechlorids findet sich in Kapitel 1.5.3.

4.1.3 Glykolipopolymer

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glykolipopolymermoleküle wurden von Stefan Schiller und Heide Götz am IBM Almaden Research Center in den USA synthetisiert [Götz 2002]. Aus der Gruppe der Copolymere wurde ein Molekül, das Copolymer Co 20; aus der Gruppe der Homopolymere wurden zwei Moleküle, die Homopolymere Ho5900 und Ho9000 untersucht.

4.1.3.1 Copolymer Co 20

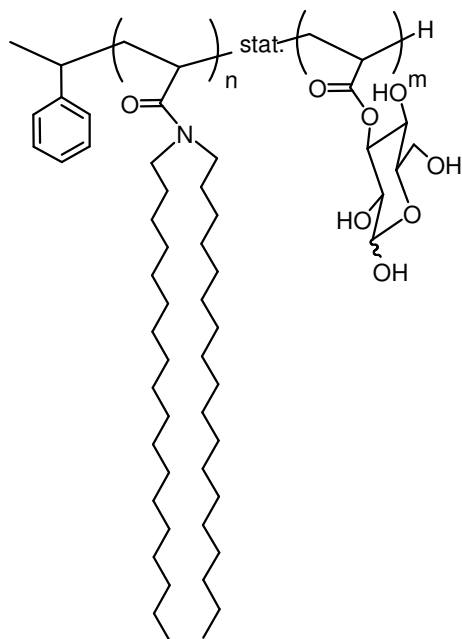


Abbildung 4-6 Copolymer Co20 (Co20: $n/m=1/4$; $M_w=13000$ g/mol)[Schiller 2005]

Abbildung 4-6 zeigt das untersuchte Copolymer Co 20, N,N-Dioctadecylacrylamid/D-Glucopyranose-2-acrylat-Copolymer. Das Molekül setzt sich aus einem Dioctadecylamin (DODA)-modifizierten Acrylamid-Anteil und einem D-Glucoseacrylat-Anteil zusammen. Ein Copolymermolekül Co20 enthält ca. 20mol% DODA-Acrylamid neben 80mol% Glucose-Acrylat. Aufgrund der vorgenommenen Untersuchungen am IBM geht man von einem Molverhältnis von 1 DODA-Lipidanteil zu etwa 4 Glucose-Acrylat-Anteilen aus. Das Copolymer zeigt demzufolge amphiphile Moleküleigenschaften. Durch die Synthese von Copolymeren mit lipid-funktionalisierten Glucose-Acrylat Wiederholungseinheiten erhoffte man sich vielfältige Einbaumöglichkeiten in synthetische Biomembranen [Götz 2002].

Die Verwendung der Glucopyranose sollte zudem die Möglichkeit der Schaffung eines hydrophilen Submembranraumes bieten.

Erste Untersuchungen von Copolymer-Molekülen bezüglich ihres Verhaltens an der Wasser-Luft Grenzfläche zeigten die Ausbildung von Monoschichten [Götz 2002].

4.1.3.2 Homopolymer Ho 5900/ Homopolymer Ho9000

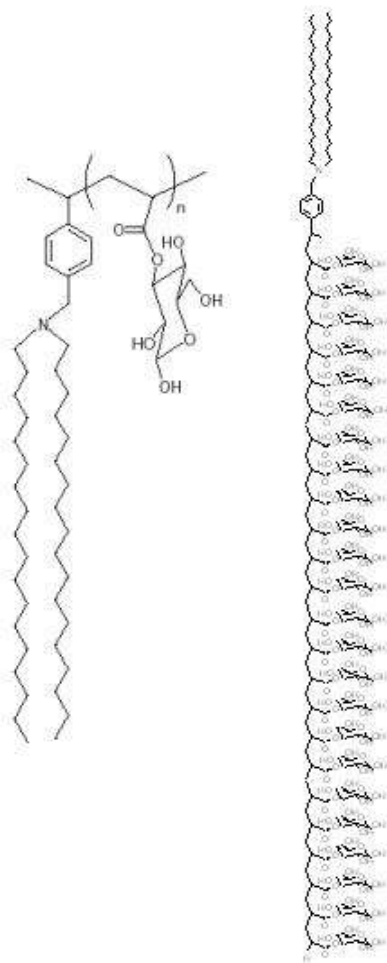


Abbildung 4-7 Homopolymergrundgerüst (Ho5900: $n=22$; M_w 5900 g/mol)[Schiller 2005]

Abbildung 4-7 zeigt das Grundgerüst der Homopolymere, der zweiten Gruppe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glykolipopolymere. Sie stellen N,N-Di(octadecyl)amino-funktionalisierte Poly-D-glucopyranose-acrylate dar. Die Homopolymere weisen ebenso wie die Copolymere amphiphile Struktur auf. Der lipophile Teil des Moleküls wird durch den DODA-Molekülteil gebildet, während

das mit den Glucosemolekülen verknüpfte Acrylat-Polymerrückgrat den hydrophilen Molekülanteil der Homopolymere bildet.

4.1.3.3 Lipidanteil der untersuchten Glykolipopolymere: Dioctadecylamin

Der Lipidanteil der untersuchten Glykolipopolymer-Moleküle besteht aus der Dioctadecylamin-Kopfgruppe (DODA). Die DODA-Kopfgruppe wurde ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Monoschichten gewählt [Götz 2002] [Naumann 2002]. Glykolipopolymere mit DODA-Kopfgruppen stellen aussichtsreiche Moleküle für die Präparation polymerunterstützter Biomembranmodelle dar.

Das Verhalten an der Wasser-Luft Grenzfläche sowohl des Lipids DODA, wie auch das der untersuchten Glykolipopolymere, wurde durch Aufnahme von Druck-Flächen Isothermen untersucht. Grundvoraussetzung für die Anordnung an der Wasser-Luft Grenzfläche sind amphiphile Moleküleigenschaften. Die Kurvenform der Druck-Flächen Isothermen bei Kompression zeigt Phasenänderungen innerhalb der untersuchten Monoschichten. Sie werden mit entsprechenden Modellen erklärt. So kann jede Phase bzw. jeder Phasenübergang als unterschiedliche molekulare Organisation der untersuchten Moleküle gedeutet werden.

Ergebnisse, die bei der Untersuchung von amphiphilen Molekülen gewonnen wurden, lassen sich nicht beliebig verallgemeinern. Bei Untersuchungen von Aminen fanden Flores und Mitarbeiter eigene Gesetzmäßigkeiten [Flores 2003]. Die Eigenschaften primärer Aminmonoschichten werden durch die Eigenschaften ihrer Gegenionen beeinflusst. Monoschichten, die auf einer alkalischen Subphase gespreitet werden, bilden sehr schnell Carbamate durch die Reaktion mit dem Kohlendioxid in der Luft. Dieses Verhalten wurde bei n-Oktadecylamin, n-Hexadecylamin und n-Docosylamin gefunden [Gaines 1982][Ganguly 1997][Ganguly 1997]. Bei sekundären Aminen ist eine freie Rotation der Ketten aufgrund der Wechselwirkung zwischen beiden Ketten unwahrscheinlich; die laterale Beweglichkeit ist eingeschränkt.

Flores et al untersuchten das Verhalten von Dioctadecylamin innerhalb von Langmuir-Monolayern [Flores 2003]. DODA ist als sekundäres Amin

wasserunlöslich und besitzt zwei lange aliphatische Ketten. Flores und Mitarbeiter fanden vier verschiedene Phasenzustände: G, LE, S1 und S2. Die Untersuchungen erfolgten bei unterschiedlichen pH Werten. Die zitierte Arbeit von Flores und Mitarbeitern ist besonders interessant, da sie nach Wissen des Autors die einzige ist, die das Verhalten des Dioctadecylamin-Moleküls an der Wasser-Luft Grenzfläche untersucht und somit als Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen dienen kann.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 System Thio-Polyethylenglycol/Azid/Homopolymer Ho5900

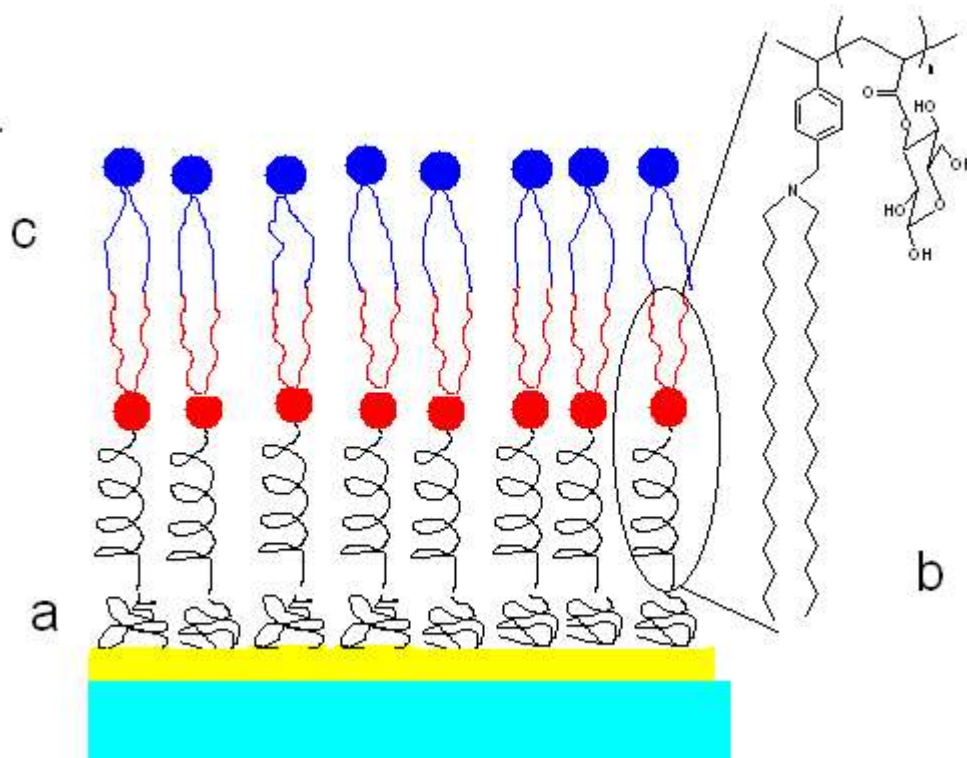


Abbildung 5-1 schematische Darstellung des Systems Thio-Polyethylenglycol/Azid/Homopolymer Ho5900 auf der Goldoberfläche: a) Thio-Polyethylenglycolschicht b) Glykolipopolymer c) Lipidschicht aus ausgerollten Diphytanylphosphatidylcholin-Vesikeln (blau)

Auf der thermisch aufgedampften Goldschicht wird zunächst das Thio-Polyethylenglycol HO-Polyoxyethylen-NH-CO-C₂H₄-SH (Thio-PEG) assembliert. Die Idee der Verwendung dieses Polymers wird in Kapitel 1.4.1 beschrieben. Durch Funktionalisierung der Polymerschicht mit der photoreaktiven Verbindung 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) wird die Oberfläche für die photochemische Fixierung des Homopolymers Ho5900 vorbereitet. Das Homopolymer kann aufgrund seiner amphiphilen Struktur an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientiert, auf die präparierten Schichten übertragen, getrocknet und durch Bestrahlung mit UV-Licht photochemisch kovalent gebunden werden. Die so erhaltene Monoschicht wird durch

Fusion von lipidhaltigen Vesikeln aus Diphytanoylphosphatidylcholin zur Doppelschicht komplettiert.

5.1.1 SPR Messungen

Mit Hilfe der in Kapitel 2.2 beschriebenen Oberflächenplasmonen-Spektroskopie (SPR) werden die optischen Schichtdicken der unterschiedlichen Schichten bis hin zur Monoschicht des Homopolymers Ho5900 sowie deren Komplettierung zur Doppelschicht mit Hilfe der Vesikelfusionstechnik gemessen. Durch die Verankerung der untersuchten Moleküle auf der Goldoberfläche kommt es zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels des angeregten Oberflächenplasmons. Diese Verschiebung wird in Kapitel 2.2 ausführlich erklärt. Die Verschiebung des Resonanzwinkels wird zur Auswertung der erhaltenen Messkurven mit Hilfe der Fresnel Gleichungen in eine Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta n \cdot d$ umgerechnet [Pockrand 1978] [Raether 1988].

Zunächst wird eine Reflexionskurve der frisch aufgedampften Goldschicht gegen Luft und anschließend gegen den verwendeten Puffer aufgenommen. Die aus diesen Messungen ermittelten Parameter ϵ_i und d_i des Systems Prisma/Goldfilm/Puffer bilden das Referenzsystem zu den anschließenden Messungen der Adsorption der Thio-PEG-Schicht, des Azids sowie der Homopolymer-Monoschicht. Zur Untersuchung der Komplettierung der Monoschicht zur Doppelschicht durch Vesikelspreitung wird eine Kinetikmessung aufgezeichnet. Mit Hilfe der durchgeführten Plasmonen-Messungen kann der stufenweise Aufbau der Schichten verfolgt werden. Alle erhaltenen SPR-Spektren werden unter Annahme eines Dreischichtenmodells ausgewertet, das Prisma, Goldschicht, und immobilisierte Monolage berücksichtigt. Nach erfolgter Vesikelfusion wird eine vierte Schicht eingeführt, die das Phospholipid der Vesikel berücksichtigt. Die Abbildungen zeigen die auf diese Weise simulierten Spektren (dargestellt durch durchgezogene Linien) im Vergleich zu den gemessenen Daten (dargestellt durch farbige Symbole) für ein Vierschichtsystem (Glas, Gold, assemblierte Schichten, Phospholipid aus den Vesikeln), die auf den Fresnel Gleichungen beruhen [Bunjés 1997].

Abbildung 5-2 zeigt die aufgenommenen Plasmonenspektren von der Goldschicht über die auf derselben fixierten Thio-PEG-Polymerschicht sowie deren Funktionalisierung durch die photoreaktive Verbindung Azid.

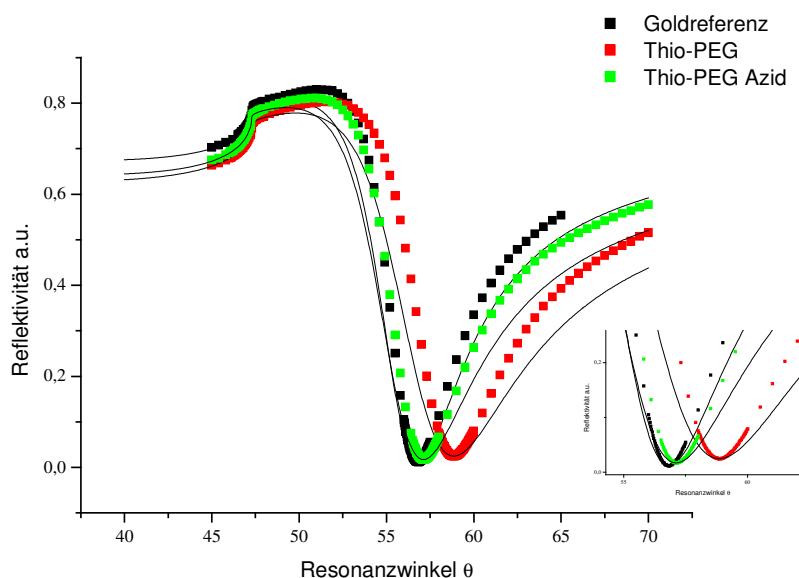


Abbildung 5-2 SPR Daten für schichtweisen Aufbau auf thermisch aufgedampfter Goldschicht (■Goldreferenz). Die Fixierung des Polyethylenglycol-Thiols (■Thio-PEG) auf der aufgedampften Goldschicht mit ruft eine Verschiebung des Resonanzwinkels entlang der x-Achse zu größeren Werten hervor; die nachfolgend vorgenommene Funktionalisierung mit Azid (■Thio-PEG Azid) zeigt eine Verschiebung des Resonanzwinkels zu kleineren Werten. Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Messkurven. Die durchgezogenen Linien stellen die gefitteten Daten dar.

Zunächst kann die kovalente Fixierung der Thio-PEG Moleküle auf der aufgedampften Goldschicht gezeigt werden. Diese wird durch Reaktion der terminalen SH-Funktion der PEG-Kette mit der Goldoberfläche erreicht. Die dergestalt polymerbeschichtete Goldoberfläche wird anschließend mit Hilfe der photoreaktiven Verbindung Azid funktionalisiert. Die Plasmonenspektren zeigen eine deutliche Zunahme der Schichtdicke, erkennbar an der Verschiebung des Minimums des Resonanzwinkels Θ zu größeren Werten, nach Fixierung der Thio-PEG-Polymerschicht. Die Funktionalisierung der Polymerschicht durch Azid verschiebt das Minimum von Θ jedoch wieder zu kleineren Werten, folglich nimmt also die optische Dicke der Thio-PEG Polymerschicht nach Funktionalisierung ab. Vermutlich ist das Eindringen des Azids in die Polymerschicht sowie die

nachfolgende Vernetzung der Polymermoleküle untereinander die Ursache dieses Phänomens. Die Vernetzung zeigt ebenfalls deutliche Auswirkungen auf die Quellung der Schichten in Pufferlösung (Abbildung 5-4).

Abbildung 5-3 zeigt Plasmonenspektren der Fixierung der vororientierten Homopolymer-Monoschicht auf der mittels Azid funktionalisierten Thio-PEG Schicht.

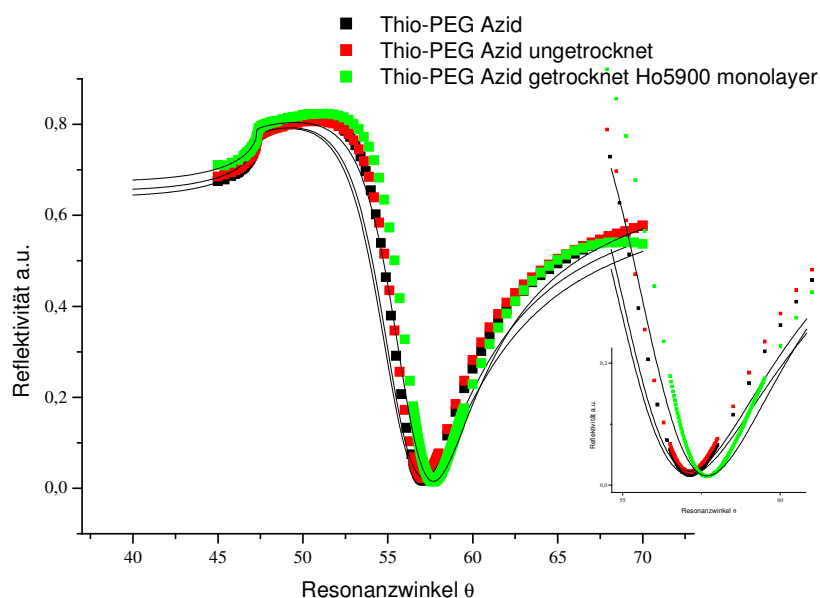


Abbildung 5-3 SPR Daten für den weitergehenden schichtweisen Aufbau des Systems auf thermisch aufgedampfter Goldschicht. Zunächst die modifizierte Polymerschicht (■Thio-PEG Azid). Die erfolgreiche Anbindung des Homopolymers gelingt nur auf getrockneten PEG-Oberflächen. Nur bei diesen Trägern (■Thio-PEG Azid getrocknet Ho5900 monolayer) zeigt sich eine Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Werten. Ungetrocknete Polymerfilme zeigen keine Anbindung des Homopolymers (■Thio-PEG ungetrocknet) und damit keine Verschiebung des Resonanzwinkels entlang der x-Achse zu größeren Werten. Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Messkurven. Die durchgezogenen Linien stellen die gefitteten Daten dar.

Die Versuche zur Anbindung der Homopolymer Ho5900 Monoschicht zeigen, dass eine Fixierung des Homopolymers nur auf getrockneten Polyethylenglycol-Schichten möglich ist. Ein zwischengeschalteter Trocknungsschritt ist essentiell für die photochemisch kovalente Fixierung der Homopolymer-Monolage. Auf

ungetrockneten Azid-funktionalisierten Thio-PEG-Schichten findet keine Anbindung des Glykolipopolymers statt.

Tabelle 5-1 fasst die genannten Beobachtungen der bisher gezeigten SPR-Messungen zusammen:

	Schichtdicke [nm] gemessen	Schichtdicke [nm] berechnet ¹²
Thio-PEG Schicht	14 ±3	20
Azid-funktionalisierte Thio-PEG-Schicht	2,5 ±0,5	20,5
Monoschicht Homopolmyer Ho5900 nach Übertrag und Fixierung	Schichtdicke [nm] gemessen ¹³	Schichtdicke [nm] Berechnet ¹⁴
auf ungetrockneter , funktionalisierter Thio-PEG- Schicht	2,5 ±0,5	6,5
auf getrockneter , funktionalisierter Thio-PEG-Schicht	6,5 ±0,5	6,5

Tabelle 5-1 mit Hilfe von SPR-Messungen ermittelte Schichtdicken System Thio-Polyethylenglycol/ Azid/ Homopolymer Ho5900. Schichtdickenangaben zur Monoschicht Ho5900 beziehen sich lediglich auf die Dicke der Ho5900 Homopolymerschicht. Die Schichtdicken wurden mit einer konstanten Dielektrizitätskonstante der PEG-Schicht von ϵ 1,51 [Raviv 2002] berechnet.

Mit Hilfe von SPR-Messungen im Kinetikmodus konnte ein weiteres Phänomen, das Quellungsverhalten der auf der Goldoberfläche fixierten Thio-Polyethylenglycol-Schichten, beobachtet werden.

¹² Basis bildet PEG-Molekül in vollständig gestrecktem Zustand [Schiller 2001]

¹³ Schichtdicke der Homopolymerschicht Ho5900 ohne „Unterbau“ aus Thio-PEG/Azid [Schiller 2001]

¹⁴ Basis bildet vollständig gestrecktes Homopolymermolekül Ho5900 [Schiller 2001]

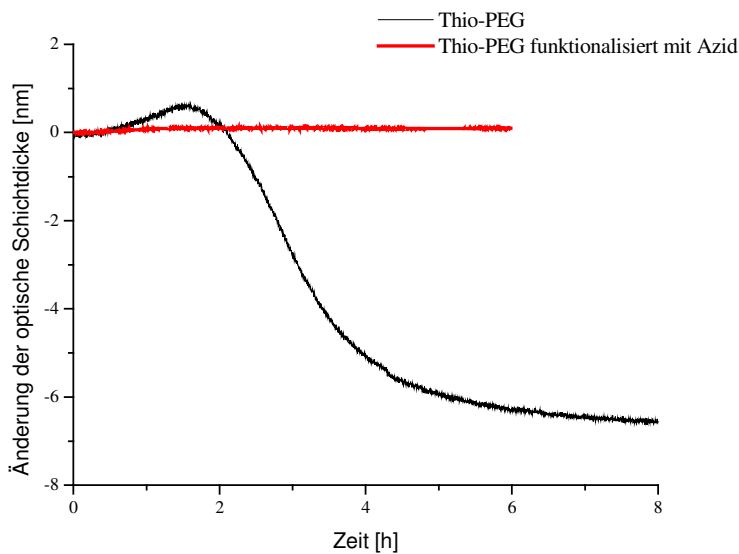


Abbildung 5-4 SPR-Kinetik-Messungen zum Quellungsverhalten von reinen Thio- PEG Schichten und Azid-funktionalisierten Thio-PEG Schichten. —Quellung einer Thio-PEG Schicht auf Goldoberfläche; —Quellung von Azid-funktionalisierter Thio-PEG Schicht.

Abbildung 5-4 zeigt eine Kinetikmessung des Quellungsverhaltens fixierter Thio-Polyethylenglycolschichten in Pufferlösung im Vergleich mit einem Spektrum des Quellungsverhaltens Azid-funktionalisierter Thio-PEG-Schichten. Deutlich sichtbar ist die Abnahme der optischen Schichtdicke, die auf die starke Wasseraufnahme der Thio-PEG-Schicht zurückgeführt werden kann (Brechungsindex Wasser < Brechungsindex Polymer). SPR-Messungen der Thio-PEG-Schicht in Puffer zeigen Schichtdicken vor Quellung von $14 \pm 3 \text{ nm}$. Nach Funktionalisierung mit der photoreaktiven Verbindung Azid finden sich Schichtdicken vor Quellung im Bereich von $2,5 \pm 0,5 \text{ nm}$. Quellung reiner Thio-PEG-Schichten führen zu einer Abnahme der optischen Schichtdicke von etwa 6-7nm, während Azid-funktionalisierte und damit vernetzte Thio-PEG-Schichten kaum Schichtdickenänderungen während der Quellung zeigen. Die Änderung bewegt sich im Bereich von etwa 0,5nm.

Abbildung 5-5 zeigt die durch SPR im Kinetikmodus ermittelte Schichtdickenzunahme bei Vesikelspreitung von Diphytanoylphosphatidylcholin-Vesikeln (DiphytPC). Eine Komplettierung der Homopolymer Ho5900 Monoschicht zur Doppelschicht ergäbe einen Schichtdickenzuwachs im Bereich von 2,5nm. Größere Werte weisen auf Vesikeladsorption hin.

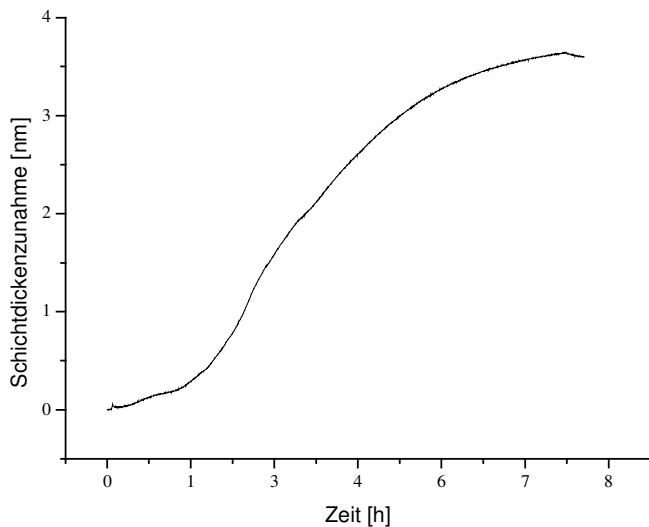


Abbildung 5-5 Reflektivität als Funktion der Zeit bei einem konstanten Winkel Θ von 55.3 Grad umgerechnet in die Schichtdickenzunahme während der Spreitung von Liposomen aus Diphytanoylphosphatidylcholin

5.1.2 Kontaktwinkelmessungen

Die Messung des Kontaktwinkels bietet die Möglichkeit der Messung von Oberflächenspannungen. Der Kontaktwinkel ist ein Mass für die Grenzflächenspannung an einem 3-Phasen-System. Die Bestimmung kann mit unterschiedlichen Flüssigkeitsphasen erfolgen. Wird eine Flüssigkeit auf eine Festkörperoberfläche gebracht, stellt sich zwischen den Kohäsionskräften in der Flüssigkeit sowie den Adhäsionskräften zwischen Flüssigkeit und Festkörper ein Gleichgewicht ein. Benetzt die Flüssigkeit die Oberfläche nicht vollständig, formt sie einen Tropfen. Die Form des Tropfens ergibt sich aus der Wechselwirkung zwischen der freien Energie des Tropfens und der Oberfläche. An der Phasengrenze fest/flüssig und gasförmig/flüssig stellt sich zwischen Festkörperoberfläche und Flüssigkeit ein Winkel, der sogenannte Kontaktwinkel θ ein.

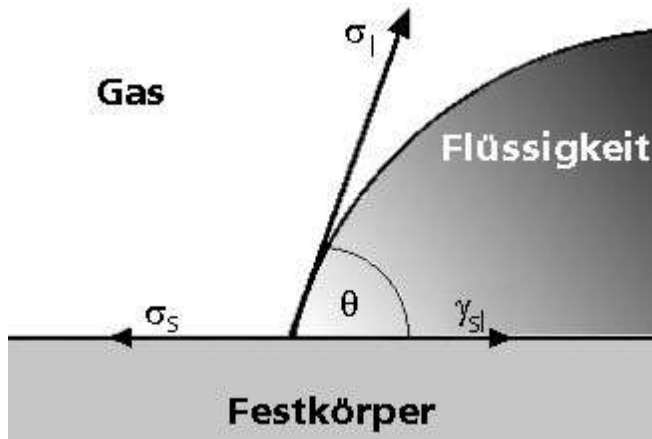


Abbildung 5-6 Kontaktwinkelbildung an einer Festkörperoberfläche. *s* und *l* stehen für „solid“ (Festkörper) und „liquid“ (Flüssigkeit); die Symbole σ_s und σ_l beschreiben die Oberflächenspannungskomponenten der beiden Phasen; das Symbol γ_{sl} gibt die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen wieder, und θ steht für den Kontaktwinkel, der dem Winkel zwischen den Vektoren σ_l und γ_{sl} entspricht¹⁵

Der Flüssigkeitstropfen wird auf die Oberfläche des Festkörpers mit Hilfe einer Nadel aufgebracht. Es gibt verschiedene Messmöglichkeiten, zum einen kann ein Kontaktwinkel an statischen Tropfen gemessen werden. Der Tropfen wird dabei vor der Messung erzeugt und hat während der Messung ein konstantes Volumen. Zum anderen kann ein Kontaktwinkel an einem dynamischen Tropfen gemessen werden. Der Kontaktwinkel wird gemessen, während der Tropfen vergrößert oder verkleinert wird; die Grenzfläche wird also während der Messung ständig neu gebildet. Kontaktwinkel, die an wachsenden Tropfen gemessen werden bezeichnet man als „Fortschreitwinkel“, während der Tropfenverkleinerung gemessene Kontaktwinkel als „Rückzugswinkel“.

Zur Messung des Fortschreitwinkels verbleibt die Spritzenadel während der gesamten Messung in Kontakt mit dem Tropfen. Ein Tropfen von etwa 3-5 μl wird auf der Festkörperoberfläche gebildet und dann langsam vergrößert. Dabei wandert die Grenzfläche nach außen.

¹⁵ URL http://www.kruss.de/messtechnik/kontaktwinkel_de.html, 28.11.2005.

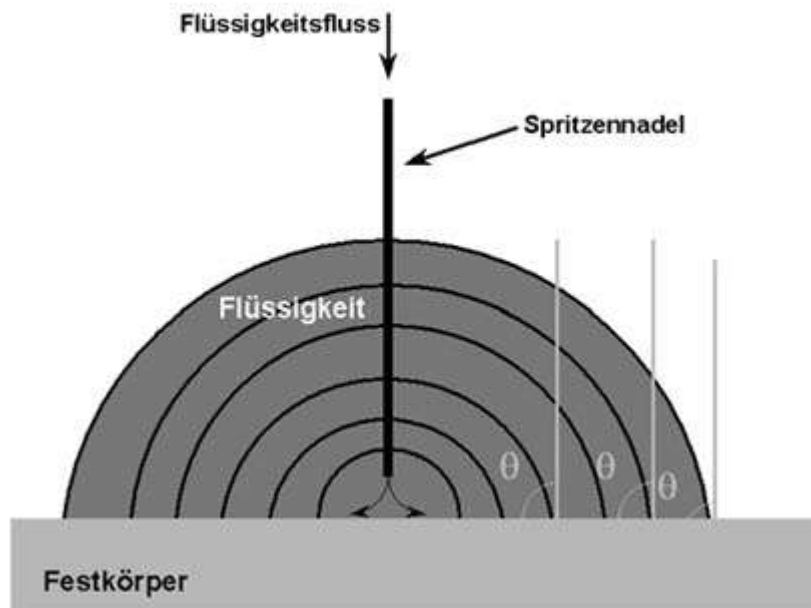


Abbildung 5-7 Messprinzip des Fortschreitwinkels¹⁶

Zu Beginn der Messung ist der gemessene Winkel noch abhängig vom Tropfenvolumen, weil der Nadelkontakt Auswirkungen auf die Tropfenform hat. Der Fortschreitwinkel simuliert durch immer wieder neue Bildung der Oberfläche den Kontaktwinkel, der sich direkt nach dem Entstehen des Kontaktes von Flüssigkeit und Oberfläche einstellt. Die Messung ist daher die am besten reproduzierbare Art, Kontaktwinkel zu messen. In der Regel werden deshalb zur Bestimmung der freien Oberflächenenergie eines Festkörpers Fortschreitwinkel gemessen. Bei der Messung des Rückzugswinkels wird der Kontaktwinkel während der Verkleinerung des Tropfens, also während der Entnetzung der Festkörperoberfläche gemessen. Mit Hilfe der Differenz zwischen Fortschreitwinkel und Rückzugswinkel lassen sich Aussagen über die Rauigkeit der Festkörperoberfläche treffen.

¹⁶ URL http://www.kruss.de/messtechnik/kontaktwinkel_de.html , 28.11.2005.

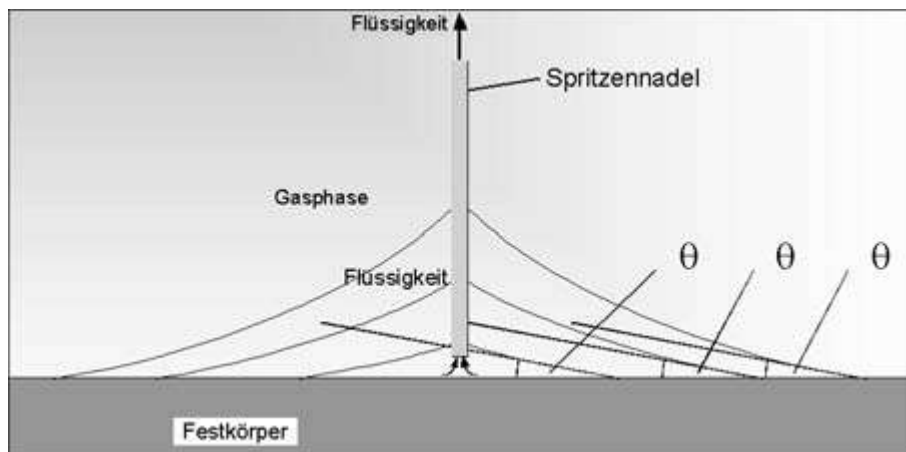


Abbildung 5-8 Messung des Rückzugwinkels¹⁷

Die bereits beschriebene Änderung der Eigenschaften der untersuchten Thio-PEG Schicht vor und nach Funktionalisierung mit Azids wird auch bei Betrachtung der gemessenen Kontaktwinkeldaten deutlich.

	Fortschreitwinkel (Mittelwert)	Rückzugswinkel (Mittelwert)
Thio-PEG Schicht	26,9° ±5,8	17,4° ±7,1
Azid-funktionalisierte Thio-PEG Schicht	55,2° ±5,0	49,1° ±7,8

Tabelle 5-2 Kontaktwinkelmessungen Thio-PEG Schicht im Vergleich mit Azid-funktionalisierter Thio-PEG Schicht

So findet man für die reinen Thio-Polyethylenglycolschichten deutlich hydrophilere Werte als nach Azid-Funktionalisierung. Fixierte Thio-PEG-Filme zeigen Fortschreitwinkel von 26,9° (Mittelwert; Standardabweichung: 5,8°) sowie Rückzugswinkel von 17,4° (Mittelwert; Standardabweichung 7,1°). Die mit der photoreaktiven Verbindung Azid funktionalisierte Thio-PEG-Oberfläche zeigt Fortschreitwinkel von 55,2° (Mittelwert; Standardabweichung 5,0°) und Rückzugswinkel von 49,1° (Mittelwert; Standardabweichung 7,8°).

Die Werte der Kontaktwinkelmessungen erfolgten an 5 unterschiedlichen Positionen der Probenoberfläche.

¹⁷ URL http://www.kruss.de/messtechnik/kontaktwinkel_de.html , 28.11.2005.

5.1.3 Impedanzmessungen

Die Proben werden in einem Messaufbau zur simultanen Anwendung der SPR und EIS (Abbildung 2-9). Die neben der SPR verwendete Technik der Impedanzspektroskopie soll zur Bestimmung der elektrochemischen Eigenschaften der untersuchten Schichten, insbesondere der Kapazität sowie des Widerstandes, herangezogen werden. Zur Auswertung der erhaltenen Messungen werden die erhaltenen Spektren mit entsprechenden Ersatzschaltkreisen angefüttet [MacDonald 1987].

Der kombinierte SPR/EIS-Messaufbau ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung von optischen und elektrischen Eigenschaften der untersuchten Schichten [Lingler 1998] [Schmidt 1998] [Wieder 2000]. Die impedanzspektroskopisch ermittelten Messkurven werden unter Verwendung des nachfolgenden Ersatzschaltbildes und dem Auswerteprogramm Zview¹⁸ angefüttet. Für den Elektrolytwiderstand R wird ein konstanter Wert von $50\Omega\text{cm}^2$ angenommen. Dieser beeinflusst die Membraneigenschaften nicht [Steinem 1996].

Die untersuchten auf der Goldoberfläche fixierten Thio-PEG-Schichten zeigen Kapazitäten in Bereichen von $25\pm 10\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Widerstände von $0,15\pm 0,05\text{M}\Omega\text{cm}^2$. Nach Funktionalisierung mit der photoreaktiven Verbindung Azid gehen die Kapazitäten der Schichten auf Werte zwischen $10\text{-}12\mu\text{F}/\text{cm}^2$ zurück. Die Widerstände steigen in den Bereich von $0,5\text{M}\Omega\text{cm}^2$.

Es wird angenommen, dass die kovalente Bindung der Aminogruppe des Azids an die terminale OH-Gruppe des Thio-PEG (Kapitel 1.5.3) zu einer Strukturänderung innerhalb der Polymerschicht führt, die Moleküle scheinen zu vernetzen (siehe SPR Daten Kapitel 5.1.1). Die Schicht scheint durch die stattgefundene Vernetzung stabilisiert und ein Eindringen des Puffers scheint im Vergleich zu den reinen Thio-PEG-Schichten weniger gut möglich (siehe SPR Daten im Kapitel 5.1.1).

Der LB-Übertrag des Glykolipolymers Ho5900 spiegelt sich ebenfalls in den gemessenen Impedanz-Spektren wieder. Ein Beispiel für die elektrischen

¹⁸ Fa. Scribner Associates, Inc., Charlottesville, USA, Version 2.1b

Eigenschaften des Monolayers wird in Abbildung 5-10 gezeigt. Abbildung 5-9 zeigt das verwendete Ersatzschaltbild:

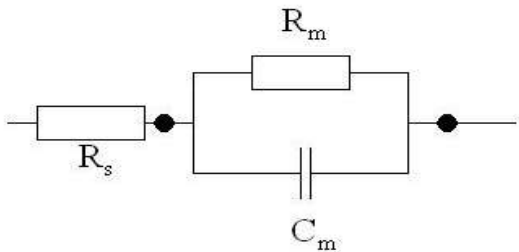


Abbildung 5-9 verwendetes Ersatzschaltbild, an das die experimentellen Impedanz-Messkurven angefitet werden. R_s : Widerstand des Elektrolyten; R_m : Widerstand der Membran; C_m : Kapazität der Membran. C_m wurde im Rahmen der Untersuchungen der PEG Schichten als CPE gefittet.

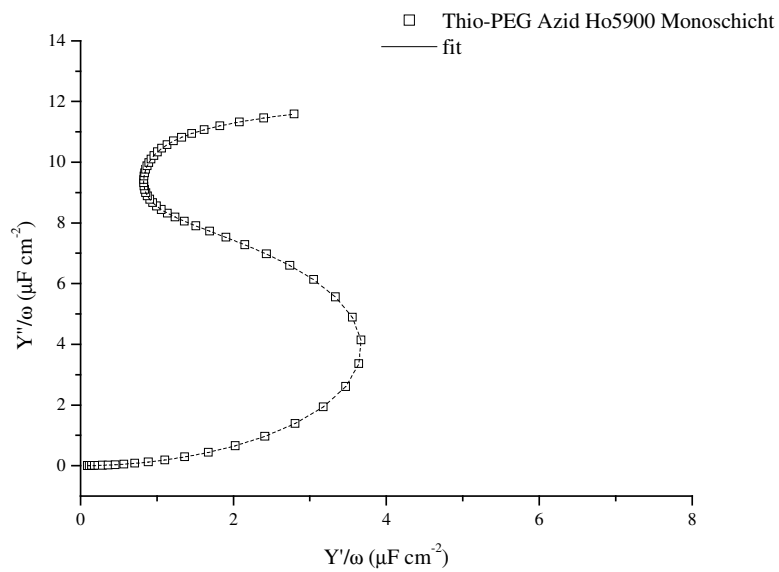


Abbildung 5-10 Impedanzspektrum des Systems Thio-PEG/Azid/Ho5900.

Tabelle 5-3 fasst die Impedanzdaten zusammen:

	Kapazität [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Widerstand [$\text{M}\Omega\text{cm}^2$]
Thio-PEG	25 ± 10	$0,15 \pm 0,05$
Thio-PEG, Azid-funktionalisiert	11 ± 1	$0,6 \pm 0,1$
Thio-PEG/Azid/Homopolymer Ho5900 Monolayer	11 ± 2	$0,8 \pm 0,1$

Tabelle 5-3 Impedanz-Meßdaten für die einzelnen Schichten des Systems Thio-PEG/Azid/Homopolymer Ho5900

5.1.4 Diskussion

Die SPR-Daten belegen den stufenweisen Aufbau der untersuchten Schichten. Die ermittelten Schichtdicken für die zunächst auf der Goldoberfläche assemblierte Thio-PEG-Polymermonoschicht zeigen deutliche Schwankungen. Diese Tatsache lässt sich auf die hydrophilen Eigenschaften der PEG-Polymermoleküle zurückführen (siehe auch 1.4.2.4). Polyethylenglycole zeigen aufgrund ihrer molekularen Struktur in wässrigen Medien eine starke Wasseraufnahme. Sind die Moleküle an einem Ende auf einer Substratoberfläche fixiert, so resultiert die Wasseraufnahme in Konformationsänderungen der Moleküle, die sich wiederum in differierenden Schichtdicken äussern.

Die Konformation von an einem Kettenende fixierten Polymeren ist abhängig von der Anbindungsichte, den Wechselwirkungen zwischen den Einzelsegmenten, dem Lösungsmittel sowie der jeweils beschichteten Oberfläche [de Gennes 1988] [Currie 1999]. Tritt ein PEG-Molekül aus der Lösung mit einer Oberfläche in Kontakt, so optimiert es seinen Oberflächenkontakt durch Annahme einer günstigen Konformation, meist einer relativ flachen Konformation wie beispielsweise die sog. pancake Konformation [Alexander 1977]. Voraussetzung hierfür ist natürlich ein ausreichend hohes Molekulargewicht des PEG-Moleküls und damit eine entsprechend lange Polymerkette. Mit steigender Belegungsdichte wird die PEG-Kette durch sterische Wechselwirkungen in andere Konformationen übergehen; es kann zur Bildung von büstenförmigen Strukturen auf der Oberfläche kommen.

Ethylenglycol-Filme auf Gold bevorzugen eine helikale Anordnung [Pertsin 2000]. Allerdings hängt die Anordnung auch von der Substratoberfläche ab. Bei Verwendung von nicht getempertem, polykristallinem Gold kann es durch die relativ rauhe Goldoberfläche zu anderen Konformationen als der helikalen kommen [Zwahlen 2003]. (Eigenschaften von PEG siehe auch Kapitel 1.4.2.4).

Thermisch aufgedampfte Goldfilme sind sehr heterogen aufgebaut. Die Idee der Verwendung eines Polymersystems als Abstandhalter war es daher ursprünglich den Einfluß der Rauigkeit der Goldoberfläche durch ein Polymerkissen zu vermindern.

Für die Anwendung als Modellmembran ist eine dichte Packung des Polymers auf der Goldoberfläche nicht wünschenswert, da hierdurch der den Membranproteinen zur Verfügung stehende Submembranraum erheblich eingeschränkt würde. Die SPR- sowie Impedanzdaten des Systems auf Thio-PEG Basis weisen auf die gewünschte lockere Packung des Polymers auf der Goldoberfläche hin.

Die Funktionalisierung der Thio-PEG-Polymeroberfläche mit der photoreaktiven Verbindung Azid führt anschliessend zu einer deutlichen Abnahme der mittels SPR bestimmten optischen Schichtdicken. Dieses Ergebnis lässt sich durch offenbar stattgefundene Vernetzungsprozesse innerhalb der Polymerschicht erklären, durch die es zu Änderungen der Dielektrizitätskonstante ϵ kommt.

Durchgeführte SPR Kinetikmessungen in Pufferlösung zeigen dann ein deutlich unterschiedliches Quellungsverhalten der reinen Thio-PEG-Schichten im Vergleich zu den Azid-funktionalisierten Thio-PEG-Schichten. Die unfunktionalisierten Thio-PEG-Polymerschichten zeigen eine starke Wasseraufnahme. Im Gegensatz dazu zeigen sich nach Funktionalisierung mit Azid nur minimale Änderungen der Schichtdicke in Pufferlösung. Die Reaktion zwischen Azid und der Thio-PEG-Schicht verändert offensichtlich die Eigenschaften des Thio-PEG-Polymerfilmes und beeinflusst die Möglichkeit der Wasseraufnahme.

Auch durch Kontaktwinkelmessungen lässt sich die unterschiedliche Oberflächenstruktur der Thio-PEG-Filme bzw. der Azid-funktionalisierten Thio-PEG-Filme verfolgen. Thio-Polymerfilme sind deutlich hydrophiler als Azid-funktionalisierte Polymerfilme.

Die veränderten Eigenschaften der Thio-PEG-Polymerfilme nach Funktionalisierung mit Azid fanden sich auch bei durchgeführten

Neutronenstreuungsexperimenten in Los Alamos. Diese Experimente zeigten für die Azid-funktionalisierte Thio-PEG-Schicht in Wasserdampfatosphäre eine deutlich geringere Quellungsneigung und stimmen mit den am MPI-P durchgeführten SPR-Messungen bezüglich gemessener Schichtdicken sehr gut überein.

Die kovalente Fixierung der mit Hilfe der Langmuir-Blodgett Technik übertragenen Homopolymer Ho5900-Monoschicht auf den Azid-funktionalisierten Thio-PEG-Schichten ist möglich, jedoch ist ein zwischengeschalteter Trocknungsschritt erforderlich. Die Trocknung der Schichten ist notwendig, da in den Schichten enthaltenes Wasser offenbar zu einer Konkurrenzreaktion führt. Das durch UV-Licht aktivierte Azid bzw. dessen Azidofunktion reagiert bei Anwesenheit von Wasser zum Hydroxylamin. Damit kann die für die kovalente Fixierung notwendige Reaktion der Azidogruppe mit der Hydroxylgruppe einer der terminalen Glucoseeinheiten des vororientierten Homopolymers Ho5900 nicht stattfinden. Der zwischengeschaltete Trocknungsschritt reduziert das während dem LB-Transfer eingedrungene Wasser offenbar auf ein Maß, das die Anbindung des Homopolymers Ho5900 ermöglicht. Werden ungetrocknete Filme verwendet, findet die kovalente Anbindung des Homopolymers Ho5900 nicht statt.

Impedanzmessungen der untersuchten Schichten zeigen für die Thio-PEG-Schichten hohe Kapazitätswerte bei niedrigen Widerständen (Tabelle 5-3). Diese Daten deuten auf einen hohen Wassergehalt der betrachteten Schichten hin. Die Funktionalisierung der Thio-PEG-Monoschicht mit der photoreaktiven Verbindung Azid senkt die Werte für die Kapazität und erhöht den Widerstand. Dieses Ergebnis deutet, ebenso wie die SPR-Untersuchungen, auf Veränderungen innerhalb Thio-PEG-Polymerschicht durch die Funktionalisierung hin.

Nach Übertrag des Homopolymer-Monolayers sinkt die Kapazität erneut während der Widerstand weiter ansteigt. Auch dieses Messergebnis belegt den Aufbau der Schicht auf der Goldoberfläche.

Aufgrund der Eigenschaften des Gesamtsystems, die eine spätere Verwendung als Modellmembran ausschliessen, wurde auf eine genauere Untersuchung insbesondere des Phänomens der Wasseraufnahme in die Schichten verzichtet. Optimierungsversuche zeigten keine signifikante Änderung der Messdaten. Es muß

daher festgestellt werden, dass bei einer weiteren Verwendung des Systems eine systematische Untersuchung mit kontrollierten Luftfeuchten zu unternehmen wäre. Dies ist jedoch schwierig, da bei der Präparation alleine durch die verwendete LB-Technik trotz anschließender Trocknungsschritte ein Eindringen von Wasser in die präparierten Schichten nicht ausgeschlossen werden kann.

Die durchgeführten Versuche auf Basis der Thio-PEG-Polymerfilme haben gezeigt, dass eine vorhersagbare und von äusseren Einflüssen unabhängige Anordnung des Abstandhalters auf der Goldoberfläche notwendig ist. So wurden für die weiteren Versuche Schichten aus Alkanthiolen als Abstandhalter gewählt.

5.2 System binäre Thiolmischung/Benzophenon/Copolymer C20

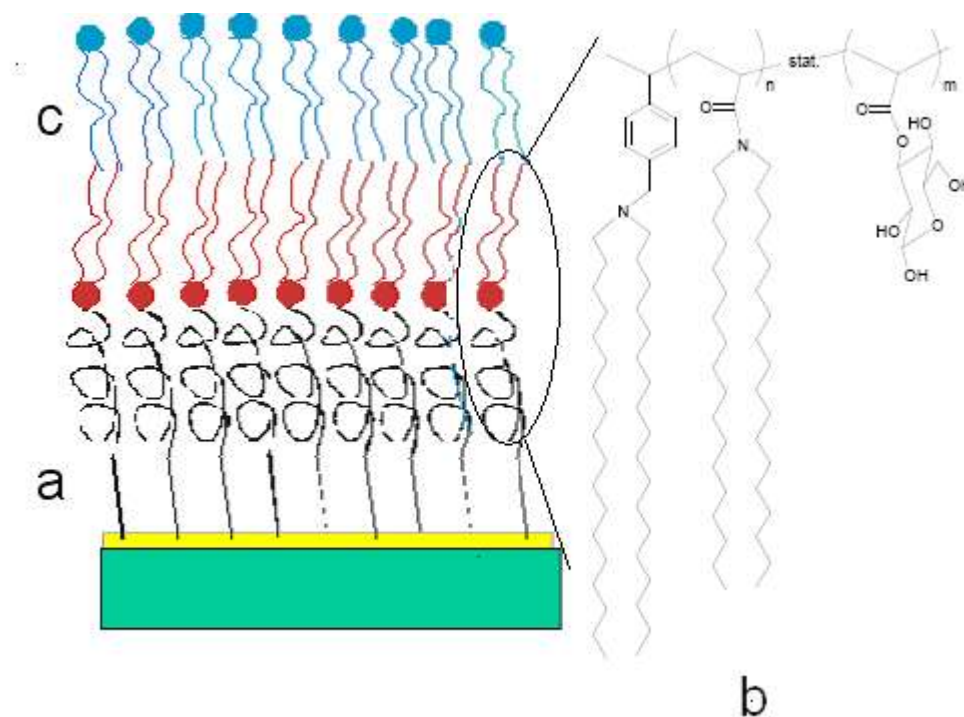


Abbildung 5-11 System binäre Thiolmischung/Benzophenon/Copolymer Co20 auf Gold: a) Thiolmischung aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid b) Copolymerschicht $n=1$; $m=8$ c) Schicht aus ausgerollten Lipidvesikeln

Auf der thermisch aufgedampften Goldschicht wird zunächst eine Mischung aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid (binäre Thiolmischung) assembliert. Gründe für die Verwendung der binären Thiolmischung werden in 4.1.1 genannt.

Durch Funktionalisierung der Thioloberfläche mit der photoreaktiven Verbindung 4-Benzoylbenzoesäurechlorid (Benzophenon) wird die Oberfläche für die photochemische Anbindung des Copolymers N,N-Dioctadecylacrylamid/D-Glucopyranose-2-acrylat (Co20) vorbereitet. Dieses setzt sich zusammen aus Dioctadecylamin (DODA)-funktionalisierten Acrylamid-Einheiten und Glucose-funktionalisierten Acrylat-Einheiten. Aufgrund seiner amphiphilen Struktur lässt sich das an der Wasser-Luft-Grenzfläche vororientieren. Nach Bildung einer Monoschicht wird das Copolymer Co20 durch Langmuir-Blodgett Transfer auf die präparierten Träger übertragen, getrocknet und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Substratoberfläche fixiert. Die Copolymermonoschicht wird durch Vesikelfusionstechnik mit Diphytanylphosphatidylcholinvesikeln zur Doppelschicht komplettiert.

5.2.1 SPR Messungen

Abbildung 5-12 und Abbildung 5-13 zeigen den schichtweisen Aufbau des untersuchten Systems auf der Goldoberfläche. Die Verschiebung der Minima der Resonanzwinkel der Messkurven zeigen die jeweils erfolgte Schichtdickenänderung an. Zunächst kann die Fixierung des binären Thiolgemisches auf der aufgedampften Goldoberfläche beobachtet werden. Die nachfolgende Funktionalisierung mit der photoreaktiven Verbindung kann ebenso wie die anschließende kovalente Fixierung der vororientierten Copolymer Co20-Monoschicht nachvollzogen werden.

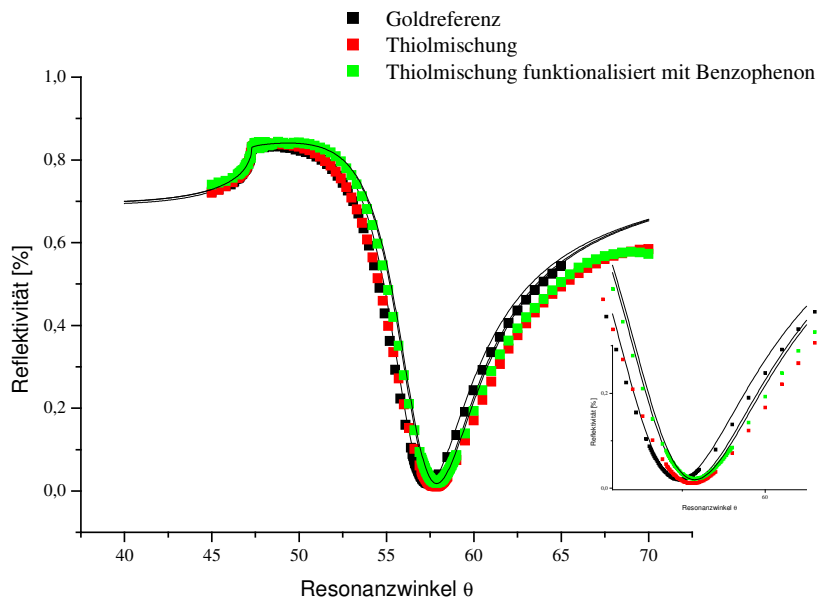


Abbildung 5-12 SPR Daten für schichtweisen Aufbau auf thermisch aufgedampfter Goldschicht (■Goldreferenz). Die Fixierung der binäre Thioldmischung (■Thioldmischung) auf der aufgedampften Goldschicht ruft eine Verschiebung des Resonanzwinkels entlang der x-Achse zu größeren Werten hervor; ebenso die nachfolgend vorgenommene Funktionalisierung der binären Thioldmischung mit Benzophenon (■Thioldmischung funktionalisiert mit Benzophenon). Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Messkurven sowie deren jeweilige Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Werten. Die durchgezogenen Linien stellen die gefitteten Daten dar.

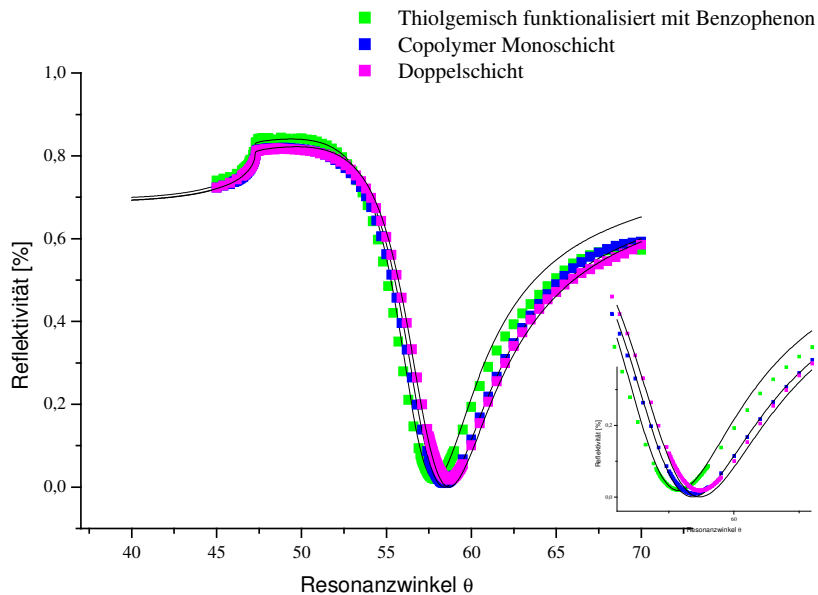


Abbildung 5-13 SPR Daten für weitergehenden schichtweisen Aufbau. Zunächst die Resonanzkurve der mittels Benzophenon funktionalisierten binären Thiolmischung auf der Goldoberfläche (■Thiolgemisch funktionalisiert mit Benzophenon). Der anschließend vorgenommene Langmuir-Blodgett Übertrag des Copolymers bzw. die nach Trocknung und Bestrahlung stattfindende Photoreaktion führt zur Anbindung der Copolymer-Monoschicht (■Monoschicht). Diese ruft wieder eine Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Werten auf der x-Achse hervor. Abschließend kann die Komplettierung zur Doppelschicht (■Doppelschicht) mit Hilfe der Vesikelspreitungstechnik mit Diphityanylphosphatidylcholin-Vesikeln durch eine erneute Verschiebung des Minimums der Reflexionskurve gezeigt werden. Hervorgehoben sind wiederum die Minima der jeweiligen Messkurven sowie deren jeweilige Verschiebung des Resonanzwinkels zu größeren Werten.

Um die Copolymer-Monoschicht zur Doppelschicht zu komplettieren, wird eine Suspension von Liposomen aus Diphityanylphosphatidylcholin auf die Oberfläche gebracht. Die Fusion der Vesikel wird mit SPR-Messungen im Kinetik-Modus verfolgt. Die Messung ist beendet, wenn die Messkurve einen stationären Zustand erreicht. Es kommt dann zu keiner weiteren Zunahme der Reflektivität. Durch Messung einer Reflexionskurve wird die Verschiebung des Resonanzwinkels bestimmt und durch Simulation auf der Basis der Fresnel Gleichungen unter Verwendung des Brechungsindex $n=1,5$ in eine optische Schichtdicke umgerechnet [Ulman 1981].

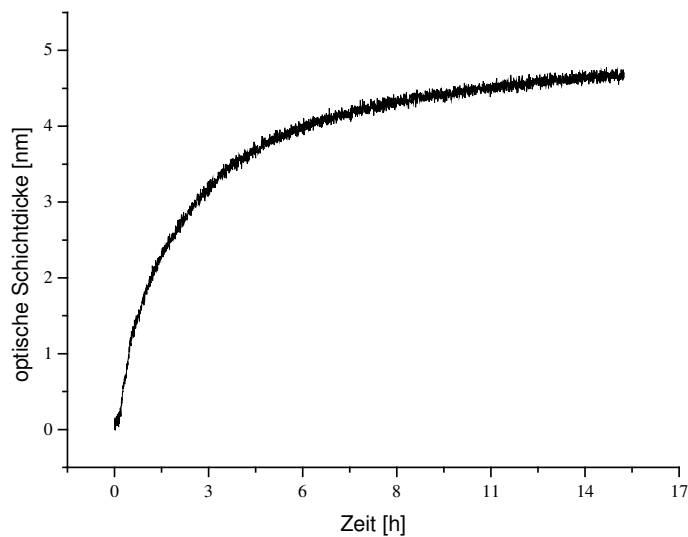


Abbildung 5-14 SPR-Messung im Kinetik-Modus während der Vesikelfusion mit Diphytanylphosphatidylcholin-Vesikeln

Tabelle 5-4 fasst gemessene und berechnete Schichtdicken zusammen:

	Schichtdicke [nm] gemessen	Schichtdicke [nm] berechnet ¹⁹
Binäre Thiolmischung	2,7±0,2	2,5
Benzophenon-funktionalisierte binäre Thiolmischung	3,2±0,1	3
Copolymer Monolayer auf funktionalisierter binärer Thiolmischung	9,3±1,0	6 ²⁰
Bilayer nach Vesikelspreitung	13,0±1,5	8,5

Tabelle 5-4 SPR-Messergebnisse System binäre Thiolmischung/ Benzophenon/ Co20 (gemessene und berechnete Werte). Die Werte beziehen sich auf die Gesamtschichtdicke des Systems, also die Summe der einzelnen Schichtdicken.

Die experimentell ermittelten Schichtdicken werden mit den Dimensionen der Moleküle, die durch Molecular Modeling mit Hilfe des Programms CS Chem 3D Pro erhalten werden, verglichen [Schiller 2001]. Die berechnete Schichtdicke der binären

¹⁹ [Schiller 2001]

²⁰ Basis der Berechnung bildet Copolymer Co20-Molekül in vollständig gestrecktem Zustand

Thiolmischung nach Assemblierung auf der Goldoberfläche beträgt etwa 2,7nm; die gemessenen Schichtdicken stimmen mit dem theoretischen Wert nahezu überein. Dieses Ergebnis zeigt eine dichte Belegung der Goldoberfläche mit der binären Thiolmischung an, eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Funktionalisierung mit der photoreaktiven Verbindung. Die Funktionalisierung der Oberfläche mit Benzophenon erhöht die Schichtdicke um etwa 0,5nm; auch dieses Ergebnis zeigt gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Das vororientierte und anschließend photochemisch kovalent angebundene Copolymer Co20 weist in gestrecktem Zustand eine Länge von etwa 3nm auf. Hier zeigen sich erste Abweichungen der gemessenen von den berechneten Schichtdicken. Diese lassen sich durch den Aufbau des untersuchten Copolymers erklären (5.2.3).

Die photochemische Anbindung des vororientierten Copolymers Co20 auf der Goldoberfläche konnte damit erfolgreich nachgewiesen werden. Das Phänomen des Försterschen strahlungslosen Energietransfers (1.5.4) behinderte die Fixierung des Glykolipopolymer auf der funktionalisierten Goldoberfläche nicht.

5.2.2 Impedanzspektroskopie Messungen

Abbildung 5-15 zeigt das frequenzreduzierte Admittanzspektrum des Systems binäre Thiolmischung/Benzophenon/Copolymer Co20. Das Impedanzspektrum weist zwei Zeitkonstanten und damit zwei Kapazitäten auf. Das Spektrum wurde daher mit dem Ersatzschaltbild aus Abbildung 5-16 mit zwei RC-Gliedern angepasst. Das erste RC-Glied gibt die Kapazität C_m und den Widerstand R_m der Membran wieder. Das zweite RC-Glied beinhaltet mit der Kapazität C_s und dem Widerstand R_s die entsprechenden Werte des spacers, hier des Polymerteils des Glykolipopolymer.

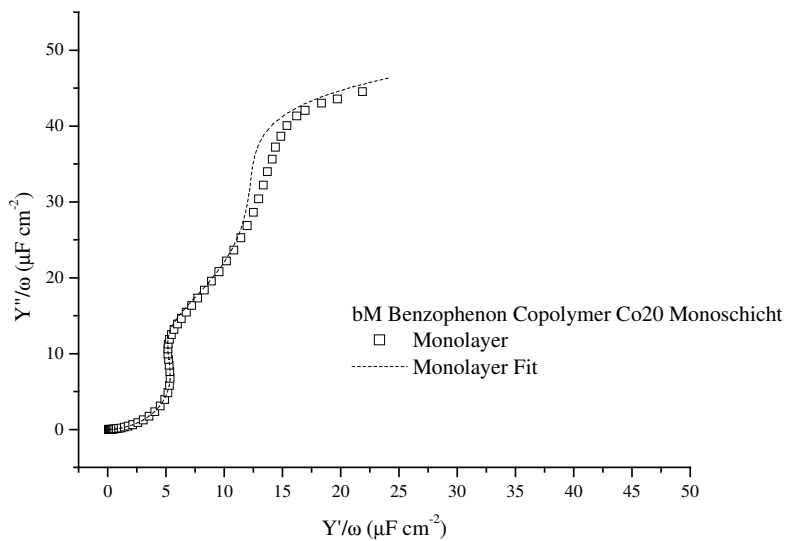


Abbildung 5-15 Frequenzreduziertes Admittanzspektrum des Systems binäre Thiolmischung/Benzophenon/Copolymer Co20 auf Gold. Gezeigt wird das Spektrum des Monolayers(□) sowie die zugehörige Anpassung (fit)

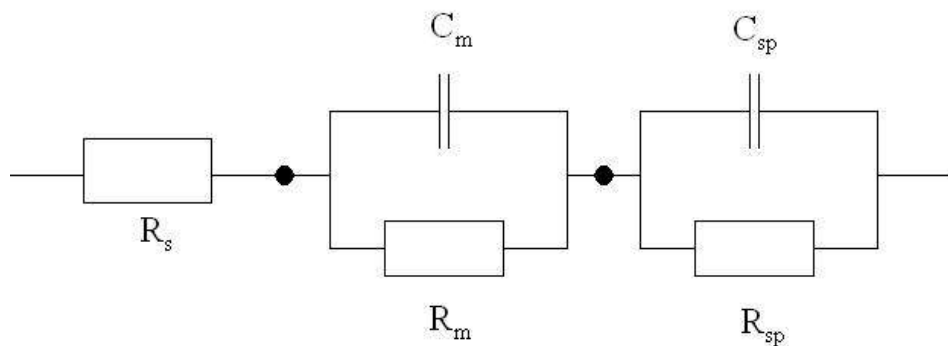


Abbildung 5-16 verwendetes Ersatzschaltbild für gezeigte Messungen am System binäre Thiol-Mischung/ Benzophenon/ Copolymer Co20. R_s Widerstand des Elektrolyten; C_m Kapazität der Membran; R_m Widerstand der Membran; C_{sp} Kapazität des spacers (hier Polymerteil des Lipopolymers); R_{sp} Widerstand des spacers (hier Polymerteil des Lipopolymers)

Die Kapazität der Copolymer-Monoschicht liegt mit $18\mu\text{F}/\text{cm}^2$ deutlich über der von Thiolipidmonoschichten von $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die untersuchte Vesikelspreitung bzw. die Doppelschicht vergrößerte die gemessenen Kapazitätswerte noch erheblich, was auf Vesikeladsorption auf dem unvollständigen Lipidmonolayer schließen lässt.

Tabelle 5-5 fasst die gemessenen Impedanzdaten zusammen:

	Kapazität $C_m[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$	Widerstand R_m [$\text{M}\Omega$ cm^2]
Binäre Thiolmischung	$2,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,5$
binäre Thiolmischung/ Benzophenon/Copolymer Co20- Monoschicht	18 ± 7	$0,04 \pm 0,01$
Doppelschicht nach Vesikelfusion	35 ± 5	$0,014 \pm 0,003$

Tabelle 5-5 Ergebnisse der Impedanzmessungen System binäre Thiolmischung I/Benzophenon/Copolymer Co20; die Werte stellen Mittelwerte aus Einzelmessungen mit entsprechenden Standardabweichungen dar.

5.2.3 Diskussion

Die durchgeführten SPR-Messungen belegen den stufenweisen Aufbau der Schichten auf der Goldoberfläche. SPR Messungen der binären Alkanthiol-Abstandhalterschicht zeigen wie erwartet im Unterschied zu den zuvor untersuchten Thio-PEG-Polymerschichten konstante Schichtdicken. Die verwendete Thiolmischung verhält sich also analog bisher untersuchter Alkanthiolschichten auf Gold. Auch diese zeigten gut reproduzierbare Schichtdicken auf der Metalloberfläche [Finklea 1996].

Bereits Ende der Achziger Jahre des letzten Jahrhunderts untersuchte Nuzzo die Anordnung sowohl von Thiolen als auch von Disulfiden auf polykristallinen Goldoberflächen [Nuzzo 1987][Bain 1989] [Nuzzo 1990]. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen die dicht gepackte, kristalline Struktur der assemblierten Verbindungen auf der Goldoberfläche. Nuzzo fand einen Neigungswinkel von 34° bei einer Rotation um die Kettenachse von etwa 55° . Eine Variation in den funktionellen Endgruppen der untersuchten Moleküle scheint nur geringen Einfluss auf die Filmstruktur im Bereich der Kohlenwasserstoffketten auszuüben [Nuzzo 1990]. Die Assemblierung von Disulfidmolekülen auf Goldoberflächen findet wahrscheinlich durch Dissoziation der schwachen S-S Bindung und Chemisorption der gebildeten Thiolaten statt [Lavrich 1998].

Impedanzmessungen der auf der aufgedampften Goldoberfläche assemblierten binären Thiol-Mischung zeigen niedrige Kapazitäten und hohe Widerstände. Sie auf eine dichte Packung der Thiol-Moleküle schliessen. Die gemessenen Werte liegen im Bereich der Alkanthiole der Kettenlänge C₆ [Finklea 1996]. Die Funktionalisierung der Thiol-Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung Benzophenon verändert die elektrischen Eigenschaften der Schicht drastisch. Die Literatur bietet keinerlei Anhaltspunkt für dieses Phänomen. Denkbar wäre eine Störung innerhalb der ursprünglich dicht gepackten Alkanketten der binären Thiol-Mischung. Obwohl die „Aufweitung“ der dicht gepackten Alkanthiolschicht im Hinblick auf die weitere Verwendung der beschriebenen Systeme als Modellmembranen erwünscht ist, überwiegen jedoch die Nachteile von Benzophenon als photoreaktive Verbindung (siehe auch Kapitel 1.5.2). So wurde auf die weitere Verwendung von Benzophenon verzichtet und weitere Funktionalisierungen statt dessen mit der photoreaktiven Verbindung 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) durchgeführt.

Für die photochemisch kovalent gebundene Copolymer Co20-Schicht auf der Oberfläche weichen die mittels SPR gemessenen Schichtdicken von den theoretisch berechneten Werten nach oben hin ab [Schiller 2001]. Diese Abweichungen lassen sich durch die Struktur des untersuchten Copolymermoleküls erklären. Betrachtet man die Orientierung des Moleküls an der Wasser Luft-Grenzfläche werden die Auswirkungen des molekularen Aufbaus des Copolymers besonders deutlich.

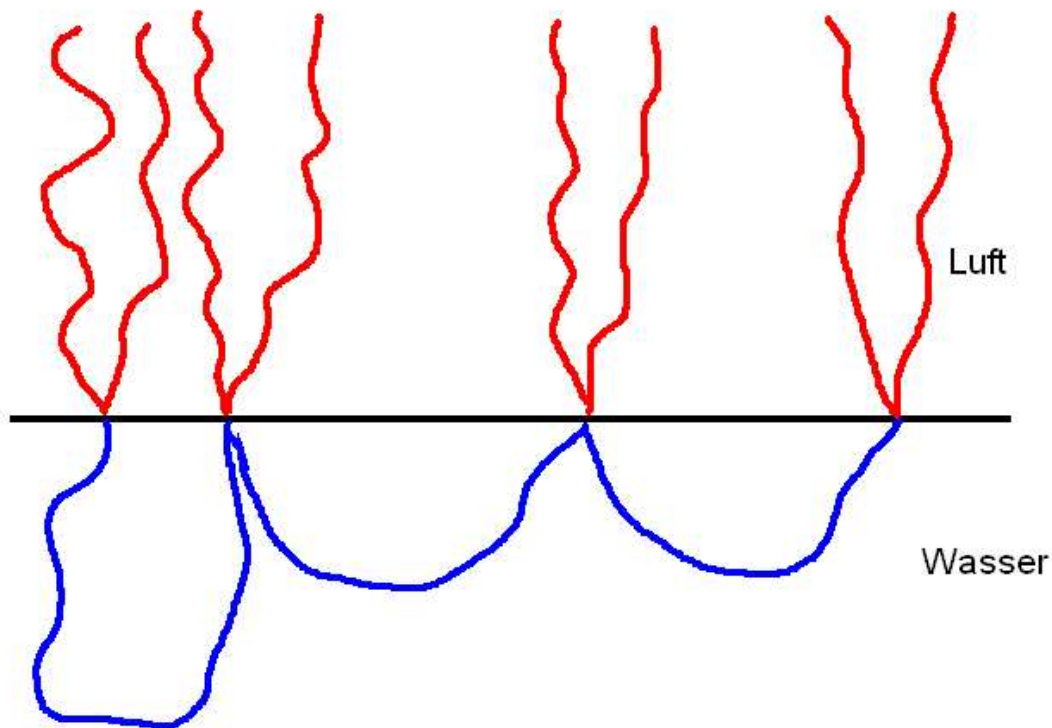


Abbildung 5-17 schematische Anordnung des Copolymers an der Wasser-Luft Grenzfläche (— Lipidanteil des Moleküls; — Kohlenhydrat-Anteil des Moleküls)

Abbildung 5-17 zeigt schematisch die Anordnung des Copolymer-Moleküls an der Wasser-Luft Grenzfläche. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften ordnen sich die hydrophoben Lipidanteile an der Wasseroberfläche an, während die hydrophilen Zucker-Bausteine sich in die wässrige Subphase orientieren. Das Molverhältnis der beiden Komponenten, das bei 1 zu etwa 4 (Lipid: Zucker) liegt, resultiert in schlaufenförmigen Glucose-Acrylat-Ketten in der wässrigen Subphase. Bei Kompression der Schicht erschweren diese eine dichte Packung der Lipidketten. Die Packung der Lipidketten beeinflusst die Eigenschaften der Monoschicht nach dem Langmuir-Blodgett-Übertrag auf die Substrate. Die mittels SPR bestimmten Schichtdicken weisen also auf im Bereich der Lipidkopfgruppen nicht dicht gepackte Schichten des untersuchten Copolymer-Moleküls hin; dieses Ergebnis untermauern auch die gemessenen Impedanzdaten. Die IS-Daten zeigen niedrige Widerstandswerte. Das Vorliegen einer zweiten Zeitkonstante und damit einer zweiten Kapazität ist ebenfalls ein Hinweis für die lockere Packung der Monoschicht

im Bereich der Lipidketten. Die Widerstände der hergestellten Schichten erreichen ebenso in keinem Fall die durch die Thiolipide vorgegebenen Standards, wiederum ein Hinweis auf die nicht dicht gepackten Schichten. Die durch die lockere Packung der Lipidkopfgruppen resultierende unregelmäßige Oberflächenstruktur der Polymermonoschicht beeinträchtigt naturgemäß auch deren Komplettierung zur Doppelschicht mit Hilfe der Vesikelfusionstechnik. Die nach Vesikelfusion gefundenen Schichtdicken des betrachteten Systems zeigen deutlich höhere Werte als zur Komplettierung der Doppelschicht notwendig. Es kommt also zur Vesikeladsorption.

Aufgrund der aufgezeigten Eigenschaften der Copolymere sowie den auf Copolymers Co20 basierenden Schichten, wurde auf die weitere Untersuchung desselben zugunsten der aussichtsreicheren Homopolymere Ho5900 sowie Ho9000 verzichtet.

5.3 System binäre Thiol-Mischung/Azid/Homopolymer Ho5900

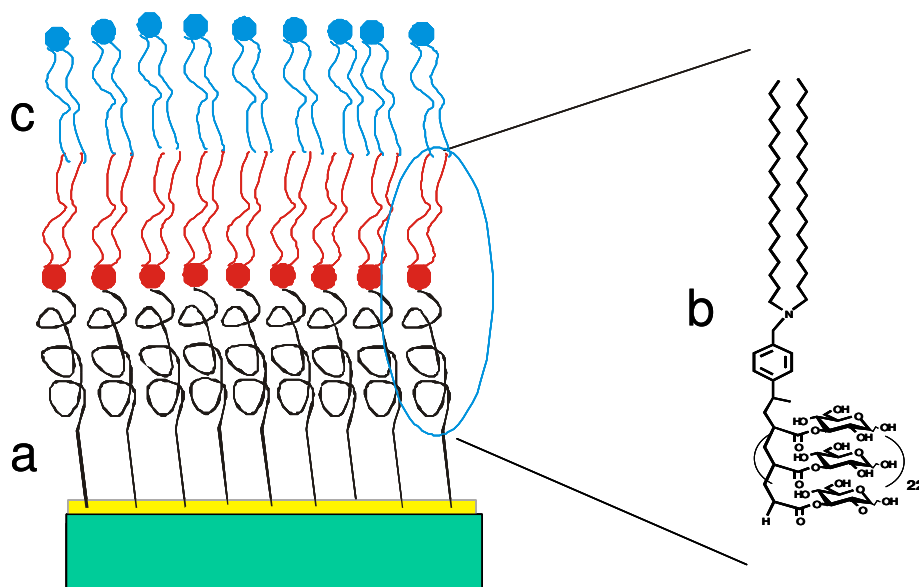


Abbildung 5-18 System binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho5900 auf Gold: a) binäre Thiolmischung b) Homopolymer Ho5900-Monoschicht c) Lipidschicht aus ausgerollten Vesikeln (komplettiert die Homopolymer-Monoschicht zur Doppelschicht).

Auf der thermisch aufgedampften Goldschicht wird wiederum eine Mischung aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid (binäre Thiolmischung) assembliert.

Durch Funktionalisierung der Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) wird die Schicht für die photochemische Anbindung des Homopolymers Ho5900 vorbereitet. Das an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientierte Homopolymer wird durch Langmuir-Blodgett-Transfer auf die präparierten Träger übertragen, getrocknet und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht angebonden. Die Polymermonoschicht wird durch Vesikelfusion mit Diphytanylphosphatidylcholinvesikeln zur Doppelschicht komplettiert.

5.3.1 SPR Messungen

Die Plasmonenmessungen der assemblierten binären Thiol-Schicht aus Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid zeigen vergleichbare Ergebnisse wie die der Thiol-Schichten aus den bereits genannten Systemen. Die gemessenen Schichtdicken liegen im Bereich von etwa $2,5 \pm 0,5$ nm. Die Funktionalisierung der Thioloberfläche mit 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) als photoreaktive Verbindung verursacht einen Schichtdickenzuwachs von etwa 0,5 nm. Die photochemisch kovalente Anbindung des Homopolymers Ho5900 auf den Schichten ist ebenfalls durch SPR Messungen zu belegen.

Abbildung 5-19 zeigt Plasmonenspektren des schichtweisen Aufbaus des Systems. Die gezeigten Messungen untermauern die erstmals gezeigte erfolgreiche photochemische Fixierung des Homopolymers auf der Goldoberfläche.

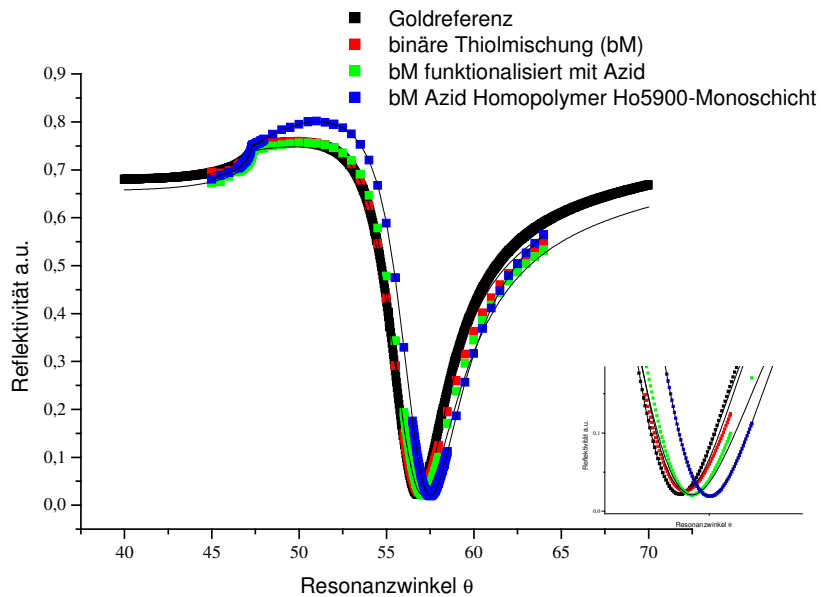


Abbildung 5-19 SPR Messungen des schichtweisen Aufbaus beginnend mit der Goldreferenz (■Goldreferenz), der auf der Goldoberfläche assemblierten binären Thiolmischung (■binäre Thiolmischung), sowie der anschließenden Funktionalisierung der Thiol-Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung Azid (■binäre Thiolmischung funktionalisiert mit Azid). Zuletzt blau dargestellt die angebundene Homopolymer Ho5900 Monoschicht (■bM Azid mit angebundenem Homopolymer Ho5900). Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Resonanzkurven.

Tabelle 5-6 vergleicht die Messdaten der durch Plasmonenmessungen ermittelten Gesamtschichtdicken mit den theoretisch berechneten Werten.

	Schichtdicke [nm] gemessen	Schichtdicke [nm] berechnet ²¹
Binäre Thiolmischung	2,7±0,2	2,5
Azid-funktionalisierte binäre Thiolmischung	3,2±0,1	3,0
Homopolymer Monolayer auf Azid- funktionalisierter binärer Thiolmischung	8,2±1,5	8,2 ²²
Bilayer nach Vesikelspreitung	10,7±2	10,7

Tabelle 5-6 SPR-Messergebnisse System binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho5900. Die angegebenen Schichtdicken sind Gesamtschichtdicken; also die Summe der Einzelschichtdicken.

Die nach Aufbau der Polymer-Monoschicht vorgenommene Fusion von Vesikeln zur Doppelschicht ergibt Werte im Bereich der für eine Lipidmonoschicht typischen 2,5nm (Abbildung 5-20). Abweichungen bewegen sich hier nach oben im Bereich von 1nm. Dies deutet darauf hin, dass es nicht ausschliesslich zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht kommt, sondern teilweise auch zur Adsorption ganzer Vesikel.

²¹ [Schiller 2001]

²² Basis bildet Homopolymer Ho5900-Molekül in vollständig gestrecktem Zustand

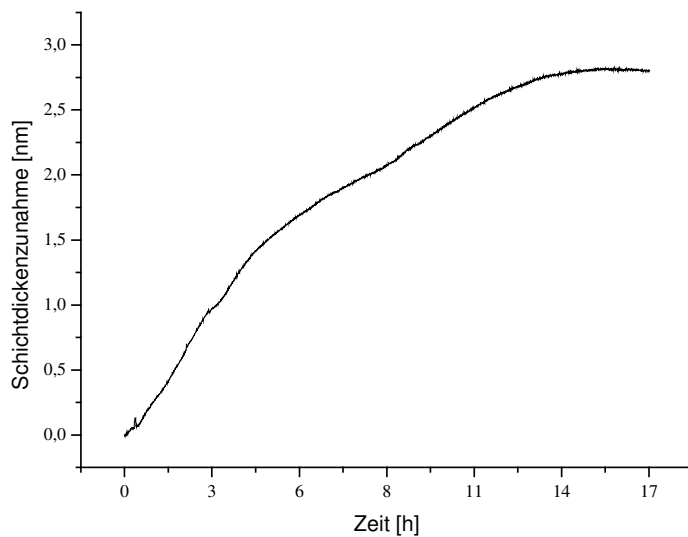


Abbildung 5-20 SPR Messung im Kinetikmodus für die Schichtdickenzunahme bei der Vesikelfusion auf der Homopolymer Ho5900 Monoschicht

Weitere Aussagen über die Belegung bzw. Ausbildung der Lipiddoppelschicht können mit im folgenden Kapitel beschriebenen Impedanzmessungen getroffen werden.

5.3.2 Impedanzmessungen

Abbildung 5-21 zeigt die frequenzreduzierten Admittanzspektren des Polymermonolayers sowie der nach Vesikelfusion erhaltenen Doppelschicht. Die Schicht der zunächst auf der aufgedampften Goldoberfläche assemblierten binären Thiol-Mischung weist Kapazitäten von etwa $1,5\text{-}2,0\mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf (in Abbildung 5-21 nicht gezeigt). Diese liegen etwas über dem Bereich der reinen Alkanthiole, für die Kapazitäten von etwa $1\pm 0,3\mu\text{F}/\text{cm}^2$ gemessen werden [Steinem 1996][Finklea 1996][Wiegand 2002].

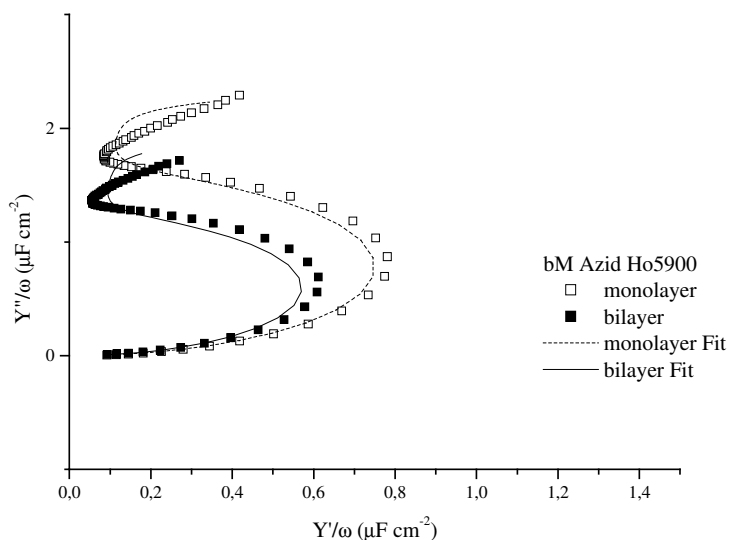


Abbildung 5-21: Die Abbildung zeigt die frequenzreduzierte Admittanz Y/ω . Aufgetragen sind die Spektren der auf den Goldträgern photochemisch kovalent angebundenen Homopolymer-Monoschicht (Ho5900, Monolayer), sowie der durch Vesikelfusion erzeugten Doppelschicht (bilayer). BM= binäre Thiol-Mischung; Azid= photoreaktive Komponente; Ho5900= Homopolymer Ho5900. Die Messungen sind jeweils als Symbol aufgetragen, die zugehörigen Anpassungen als Linien. [2001-1009 (821 monolayer/ 837 bilayer)]

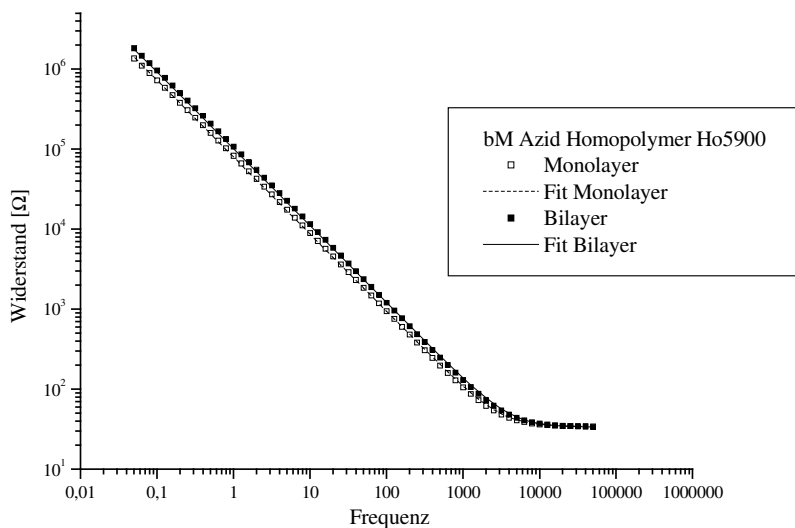


Abbildung 5-22 Impedanzspektrum der Bode-Darstellung zum System binäre Thiolmischung/ Azid/ Homopolymer Ho5900. Aus der Darstellung werden die Systemwiderstände der Homopolymer Ho5900-Monoschicht sowie der Doppelschicht nach Fusion der Lipidvesikel erhalten.

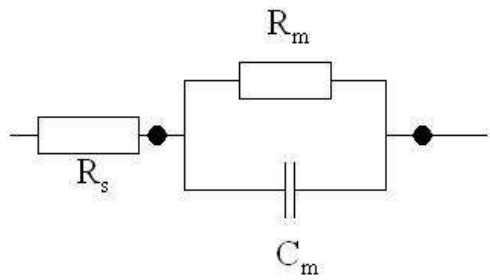


Abbildung 5-23 Ersatzschaltbild, an das die experimentellen Impedanzmesskurven angefügt werden [Wiegand 2002][Steinem 1996]. R_s steht für den Widerstand des Elektrolyten; R_m für den der Membran. C_m stellt die Kapazität der Membran dar und wurde als CPE gefittet

Nach Funktionalisierung der Thiol-Oberfläche mit dem photoreaktiven Molekül Azid zeigen die Schichten Kapazitäten im Bereich von $4\text{-}10\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Diese Werte liegen deutlich unter den für Benzophenon gefundenen Kapazitätswerten (Kapitel 5.2.2), dennoch weisen sie auf eine Störung der dicht gepackten Thiolschicht durch die stattfindende Reaktion mit Azid hin. Auch die Widerstandswerte nach Funktionalisierung der binären Thiolschicht weisen auf Störungen im Schichtaufbau hin. Sie können aus der Bode-Darstellung in Abbildung 5-22 bestimmt werden und liegen in Bereichen von $0,05\text{-}0,4\text{M}\Omega$. Die Literatur bietet keinerlei Anhaltspunkte für mögliche Ursachen dieses beobachteten Phänomens.

Nach Langmuir-Blodgett Übertrag des Homopolymers Ho5900 werden Kapazitätswerte von $2,1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerständen von $11\text{M}\Omega\text{cm}^2$ gemessen. Diese Messdaten zeigen die dichte Packung des Homopolymers Ho5900 auf der Substratoberfläche insbesondere im Bereich der Lipidketten. Theoretisch müsste eine Lipidmonoschicht einer Alkankettenlänge von 12 CH_2 -Einheiten eine Kapazität von etwa $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ aufweisen, die durch Ausbildung der Lipiddoppelschicht auf $\sim 0,5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ abnimmt. Die Abnahme der Kapazität nach Vesikelfusion mit 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-Phosphatidylcholin-Vesikeln von $2,1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $1,7\mu\text{F}/\text{cm}^2$ weist daher deutlich auf die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht hin. Nach Vesikelfusion werden Widerstände von $18 \pm 1,8\text{M}\Omega\text{cm}^2$ gemessen.

Tabelle 5-7 fasst die Impedanzdaten des Systems zusammen:

	Kapazität $C_m[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$	Widerstand R_m [Ωcm^2]
Binäre Thiolmischung	$2,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,5$
Binäre Thiolmischung/ Azid	7 ± 3	$0,2 \pm 0,15$
binäre Thiolmischung/ Azid/Homopolymer Ho5900- Monoschicht	$2,1 \pm 0,2$	11 ± 2
Doppelschicht nach Vesikelfusion	$1,7 \pm 0,2$	$18 \pm 1,8$

Tabelle 5-7 Impedanzspektroskopische Daten des Systems Binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho5900

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die gebildeten Homopolymer-Monoschichten auf den Goldoberflächen im Vergleich mit anderen polymergestützten Systemen wesentlich verbesserte elektrische Eigenschaften aufweisen. Sie sind in der Lage durch Vesikelfusion Lipiddoppelschichten auszubilden, deren elektrische Eigenschaften denen der black lipid membranes sehr nahe kommen.

5.3.3 FRAP Messungen

Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sollen Aussagen zur Fluidität der untersuchten Schichten gemacht werden. Der verwendete Fluoreszenzmarker N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz (NBD-PE) wird in 1mol% Verdünnung, bezogen auf das verwendete Lipid DiphytPC eingesetzt. Die ersten beiden Abbildungen (Abbildung 5-24Abbildung 5-25) zeigen die Schicht nach Fusion von lipidhaltigen fluoreszenzgelabelten Vesikeln. Abbildung 5-24 zeigt die Schicht nach Bleichen durch den Laserblitz. Der konstant erhalten gebliebene Bleichfleck (Durchmesser etwa $4\mu\text{m}$) weist darauf hin, dass die Lipidschicht keine Fluidität aufweist.

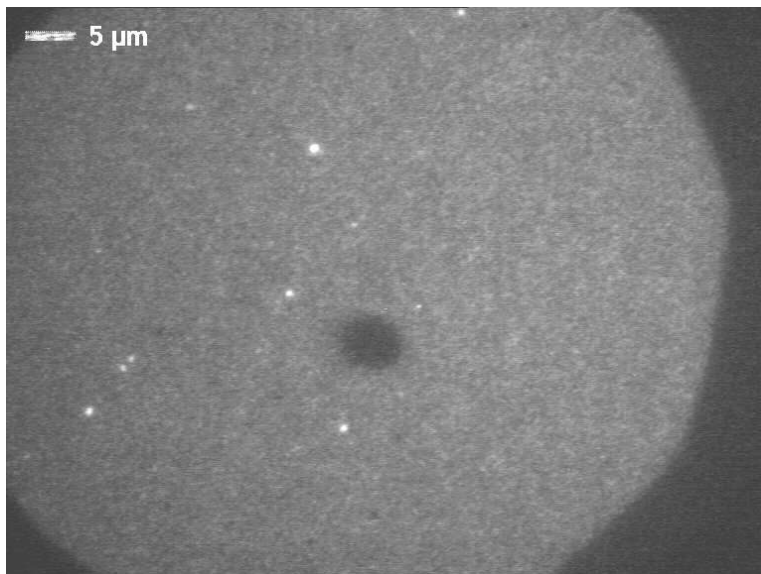


Abbildung 5-24 FRAP-Aufnahme des Systems binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho5900 nach Vesikelfusion mit DiphytPC-Vesikeln (Fluoreszenzmarker N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, triethylammoniumsalz (NBD-PE)).

Abbildung 5-25 zeigt die Erholung der Fluoreszenzintensität nach Bleichen der Schicht durch den Argon-Laser. Es kommt zu keiner Erholung der Intensität.

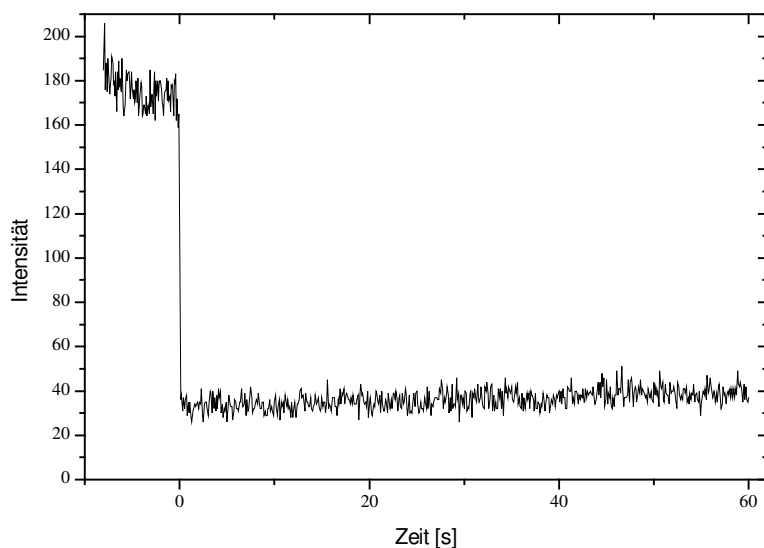


Abbildung 5-25 Erholung der Intensität der Fluoreszenz des Bleichflecks nach Bleichung der Schicht durch den Laserblitz.

Nach dem Versuch der Fusion von lipidhaltigen fluoreszenzgelabelten Vesikeln wurde das Lipids mit Hilfe der Langmuir-Schäfer Technik übertragen. Bei diesen

Versuchen wird nach Bleichung der Schicht durch den Laser eine deutliche Erholung der Fluoreszenz gemessen. Abbildung 5-26 zeigt die Schicht nach Bleichung durch den Laser. Der Bleichfleck ist bei dieser Aufnahme nicht mehr erkennbar; die Lipidmoleküle sind also auf der Polymeroberfläche beweglich.

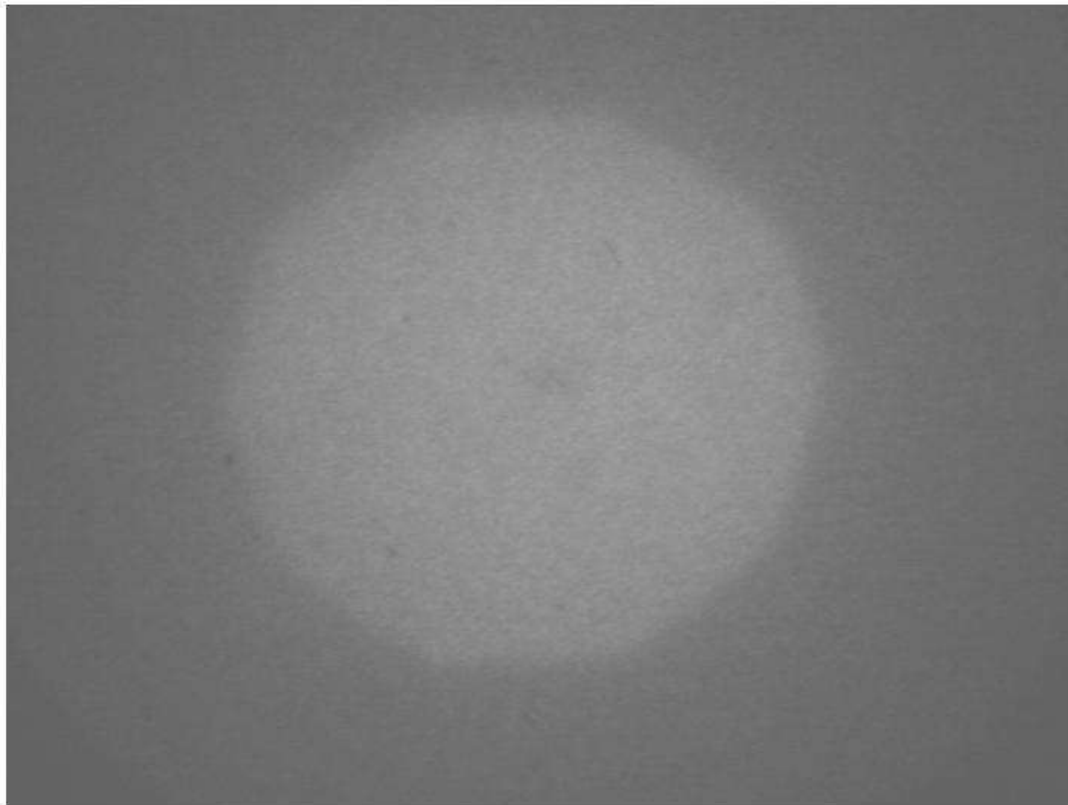


Abbildung 5-26 FRAP-Aufnahme des Systems binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho5900 nach Langmuir-Schäfer-Transfer von DiphytPC (Fluoreszenzmarker N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, triethylammoniumsalz (NBD-PE). Nach erfolgter Bleichung durch den Laser erkennt man keinen Bleichfleck. Es kommt zur Erholung der Fluoreszenz.

Abbildung 5-27 zeigt die zu Abbildung 5-26 zugehörige Messkurve der Erholung der Fluoreszenzintensität. Aus ihr lässt sich der Diffusionskoeffizient D bestimmen. Der Diffusionskoeffizient D beträgt hier $D=8\mu\text{m}^2/\text{s}$.

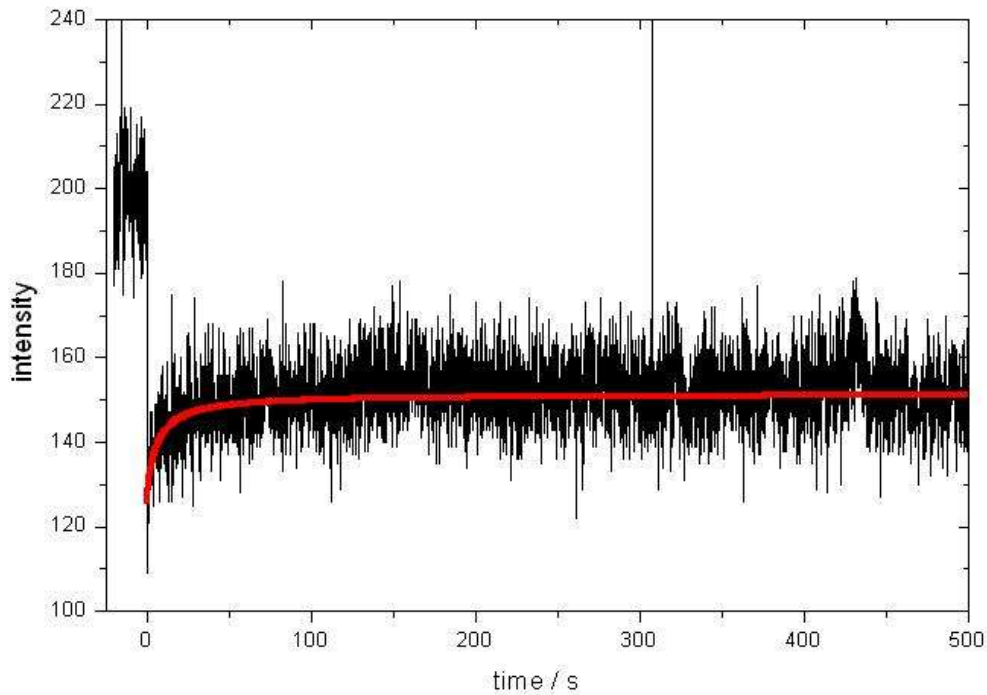


Abbildung 5-27 Erholung der Intensität der Fluoreszenz nach Bleichung der Schicht durch den Laserblitz.

5.3.4 Diskussion

SPR-Messungen belegen die photochemisch kovalente Anbindung des Homopolymers Ho5900 auf der Azid-funktionalisierten binären Alkanthiol-Oberfläche. Die gemessenen Schichtdicken sind übereinstimmend mit durchgeführten molecular modeling Berechnungen [Schiller 2001]. Dieses Ergebnis belegt die angenommene unterschiedliche Anordnung der Homopolymere im Vergleich mit den Copolymeren an der Wasser-Luft Grenzfläche. Die lipophile Kopfgruppe der Homopolymere wird von DODA gebildet. Sie orientiert sich vom Wasser weg, während sich das hydrophile Acrylat-Polymerrückgrat mit den ungefähr 22 Glucoseeinheiten in die wässrige Subphase orientiert. Der Aufbau der Homopolymere weist im Unterschied zu den Copolymeren keine schlaufenförmigen Strukturen in der Subphase auf, die eine Kompression der Monoschicht auf dem Langmuir-Blodgett Trog erschweren.

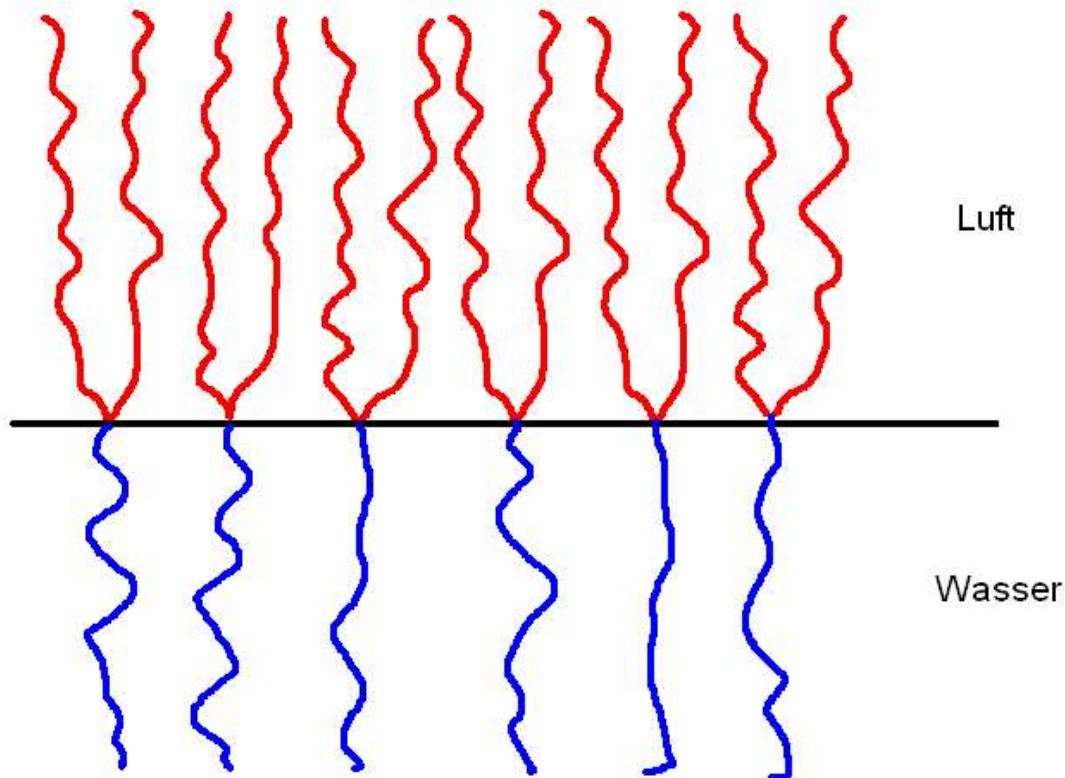


Abbildung 5-28 schematische Darstellung der Anordnung der Homopolymer-Moleküle an der Wasser-Luft Grenzfläche (— Lipidanteil des Moleküls; — Kohlenhydrat-Anteil des Moleküls)

Abbildung 5-28 verdeutlicht schematisch die Anordnung der Homopolymer-Moleküle an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Wird die Monoschicht komprimiert, ist eine dichte Packung im Bereich der Lipidketten (—) anzunehmen.

Impedanzmessungen zeigen Schichten mit Kapazitäten unter $2\mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die komplettierte Doppelschicht. Damit erreichen sie Werte, die durchaus im Bereich der Werte für Schwarzfilmmembranen liegen. Vor allem aber weisen die Verminderung der Kapazität und die Erhöhung des Widerstandes durch die Fusion von Lipidvesikeln auf der Monoschicht auf die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht hin. Der Vergleich mit Literaturangaben untersuchter Alkanthiolschichten zeigt, dass diese Kapazitäten im Bereich von $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Monoschicht, sowie $0,5\pm 0,1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Lipiddoppelschicht aufweisen [Steinem 1996]. Alkanthiolschichten gelten als Standard, sie bilden dicht gepackte Schichten auf der Goldoberfläche, eine Vesikelfusion findet aufgrund der hydrophoben Thioloberfläche sehr leicht statt.

Fluoreszenzmessungen nach Photobleichung (FRAP) Messungen des Systems zeigen homogene Schichten, die nach Fusion von lipidhaltigen fluoreszenzgelabelten Vesikeln keine Fluidität aufweisen. Die fehlende Fluidität zeigt eine dichte Belegung der Substratoberfläche mit verankerten Glykolipopolymer-Molekülen. Durch die dichte Belegung ist eine Beweglichkeit der Moleküle nicht zu erwarten, die hergestellten Schichten stellen jedoch eine solide Basis für weitere Untersuchungen dar. Betrachtet man hingegen Schichten, deren Komplettierung zur Doppelschicht mit Hilfe der Langmuir-Schäfer Technik erfolgte, so zeigen diese eine deutliche Erholung der Fluoreszenz nach Bleichung der Schicht durch den Laser. Der Diffusionskoeffizient D beträgt in diesem Falle $D=8\mu\text{m}^2/\text{s}$. Dieser Wert hält durchaus einem Vergleich mit Literaturwerten der Gruppe Naumann und Mitarbeitern stand. Diese ermittelten Diffusionskoeffizienten von $0,9\pm 0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$ in gemischten Phospholipid-Lipopolymer-Schichten. Diese setzten sich zusammen aus einer Mischungen von 1,2-Dimyristoyl-3-glycero-phosphocholin als Phospholipid-Komponente sowie 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[poly(ethylenglycol)2000] als Lipopolymer-Komponente [Naumann 2001].

5.3.5 Zusammenfassung Homopolymer Ho5900

Die Untersuchungen konnten erstmalig die photochemisch kovalente Anbindung des Glykoliphomopolymers auf der Goldoberflächen zeigen. Das System wurde schrittweise optimiert und lässt nun die Bildung einer verankerten Lipidmonolage zu. Die Verankerung der Moleküle kann nicht direkt auf der Goldoberfläche stattfinden; es musste zunächst ein geeignetes Abstandhaltersystem gefunden werden. Die untersuchten Moleküle waren zum einen ein hydrophiles Polymer, das Thio-Polyethylenglycol, zum anderen eine Mischung zweier Alkanthiole, 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid. Alle genannten Moleküle wurden über ihre Schwefelgruppe auf den Goldoberflächen gebunden. Die nachfolgende Funktionalisierung erfolgte mit einer photochemisch aktiven Komponente, wahlweise 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) sowie 4-Benzoylbenzoesäurechlorid. Die Untersuchungen liessen Azid die geeignetere Verbindung erscheinen, so dass weitere Untersuchungen mit Azid durchgeführt wurden. Das untersuchte Homopolymer-Molekül Ho5900 liess sich aufgrund seiner

amphiphilen Struktur an der Wasser-Luft Grenzfläche orientieren, die Kompression zu dichten Schichten war aufgrund seiner molekularen Struktur ebenfalls möglich. Nach LB-Übertrag auf die präparierten Substrate erwies sich ein zwischengeschalteter Trocknungsschritt als essentiell für die photochemisch kovalente Fixierung. Der Förster Energietransfer beeinflusste die Anbindung offenbar nur wenig; der Abstand der anzubindenden Moleküle von der Goldoberfläche war offensichtlich ausreichend um den Förster Radius zu überbrücken und den Energietransfer zumindest abzumildern. Die Fusion von Lipidvesikeln führt letztlich zur Lipiddoppelschicht. Alle Anbindungsschritte liessen sich durch SPR-Messungen nachvollziehen; die gemessenen Moleküldimensionen stimmen mit den theoretisch berechneten Werten sehr gut überein. Die mit Hilfe der Impedanzspektroskopie ermittelten elektrochemischen Daten kamen den Werte der Schwarzfilmmembranen sehr nahe.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Homopolymers Ho5900 wurde ein weiteres Homopolymer, das Ho9000 untersucht. Im Vergleich zu Ho5900 zeichnet sich Ho9000 durch eine größere Anzahl von Glucosebausteinen aus. Ho5900 weist ungefähr 22 Wiederholungseinheiten auf, bestehend jeweils aus einem Acrylatmonomer verknüpft mit einer Glucoseeinheit; das Homopolymer Ho9000 dagegen etwa 36 Wiederholungseinheiten. Diese ermöglichen durch die erfolgte Vororientierung an der Wasser-Luft-Grenzfläche, die Kompression und damit Fixierung im möglichst gestreckten Zustand einen noch größeren Abstand von der Goldoberfläche. Der Einsatz des längerkettigen Homopolymers Ho9000 und die Untersuchung seiner Eigenschaften lässt auf bessere Bedingungen für die Inkorporation von Membranproteinen hoffen.

5.4 System binäre Thiol-Mischung/Azid/Homopolymer Ho9000

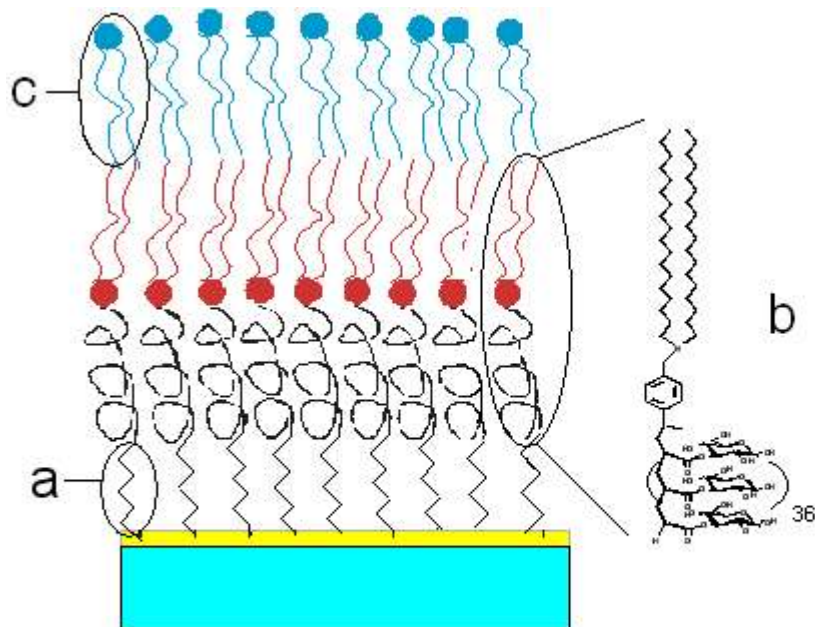


Abbildung 5-29 System binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho9000 auf Gold: a) binäre Thiolmischung b) Homopolymer Ho9000-Monoschicht c) Lipidschicht aus ausgerollten Vesikeln (komplettiert die Homopolymer-Monoschicht zur Doppelschicht).

Auf der thermisch aufgedampften Goldschicht wird zunächst wiederum eine Mischung aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid (binäre Thiolmischung) assembliert. Die Funktionalisierung der Thiol-Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) ermöglicht die photochemisch kovalente Fixierung des Homopolymers Ho9000. Das an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientierte Homopolymer wird durch LB-Transfer auf die Träger übertragen, getrocknet und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht angebunden. Die Polymermonoschicht wird durch Vesikelfusion zur Doppelschicht komplettiert.

5.4.1 *Isotherme der Homopolymer Ho9000 Monoschicht- Vergleich mit dem reinen Lipid Dioctadecylamin*

Monoschichten sind definiert als ultradünne Filme, die aus einer einzelnen Moleküllage bestehen. Sie bilden sich durch spontane Selbstorganisation von Molekülen an der Wasser-Luft Grenzfläche.

Wird eine verdünnte Lösung des Homopolymers Ho9000 auf die Wasseroberfläche eines Langmuir-Blodgett Troges aufgebracht, so verbleibt nach Verdunsten des Lösungsmittels Dichlormethan ein zweidimensionaler Molekülfilm auf der Wasseroberfläche. Die Moleküle weisen nun eine Orientierung auf, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie hydrophilen Molekülbereiche ins wässrige Medium eintauchen, während die hydrophoben Bereiche der Luft zugewandt sind. Die physikalischen Eigenschaften der Schicht können mit Hilfe einer Filmwaage charakterisiert werden. Im allgemeinen werden Druck-Flächen Diagramme (Isothermen) oder Flächen-Temperatur Diagramme (Isobaren) aufgenommen. Druck-Flächen Diagramme stellen die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers durch die Monoschicht als Funktion der dem Molekül zur Verfügung stehenden Fläche dar. Die Temperatur wird während der Messung konstant gehalten.

Abbildung 5-30 zeigt ein typisches Druck-Flächen Diagramm für das Homopolymer Ho9000 (rot) im Vergleich mit Dioctadecylamin (DODA) (schwarz) bei 20°C. Das untersuchte Dioctadecylamin stellt hierbei den reinen Lipid-Anteil des Homopolymers Ho9000 dar. Die Homopolymer Ho9000-Isotherme zeigt nach zunächst langsamem Druckanstieg eine sogenannte Schulter bei einer Molekülfläche von etwa 150 \AA^2 zu erkennen. Diese entspricht einem Phasenübergang innerhalb der Monoschicht. Der flache Bereich der Isotherme bis zu einer Molekülfläche von etwa 130 \AA^2 entspricht dem gasanalogen Zustand der Moleküle. Diese haben im gasanalogen Zustand wenig Kontakt zueinander. Die Schulter zwischen Molekülflächen von $130-85 \text{ \AA}^2$ markiert den Phasenübergang vom gasanalogen Zustand in die kondensierte Phase. Der bei zunehmender Kompression erfolgte steile Anstieg der Isotherme ist auf eine zunehmende Verdichtung der Molekül-Packung zurückzuführen. Die Moleküle liegen dicht gepackt in einem feststoffähnlichen

Zustand vor. Weitergehende Kompression der Schicht führt bei einer Fläche pro Molekül von etwa 60 Å zum sogenannten Kollaps der Schicht. Die Moleküle der Monoschicht werden übereinander geschoben, es kommt zur Bildung von Multischichten.

Die Isotherme des Lipids DODA besitzt die für Fettsäuren typische Form [Ulman 1995]. Es sind keine Phasenübergänge erkennbar. Bei 20°C geht die Monoschicht vom gasanalogen Zustand direkt in die festanaloge Packung über. Der Filmkollaps findet bei 58 Å² statt. Die Fläche am Kollaspunkt ist etwas größer als die Querschnittsflächen einfacher Alkylketten [Ulman 1995].

Die Kollaspunkte beider Monoschichten sind gut vergleichbar. Das Homopolymer lässt sich auf ähnliche Dimensionen komprimieren wie das Lipid. Dies spricht für eine dichte Packung des untersuchten Homopolymers Ho9000 im Bereich der Lipidschicht, dessen Fläche pro individuellem Molekül mit etwa 62 Å² nur geringfügig von der Fläche des Lipids DODA mit 58 Å² abweicht.

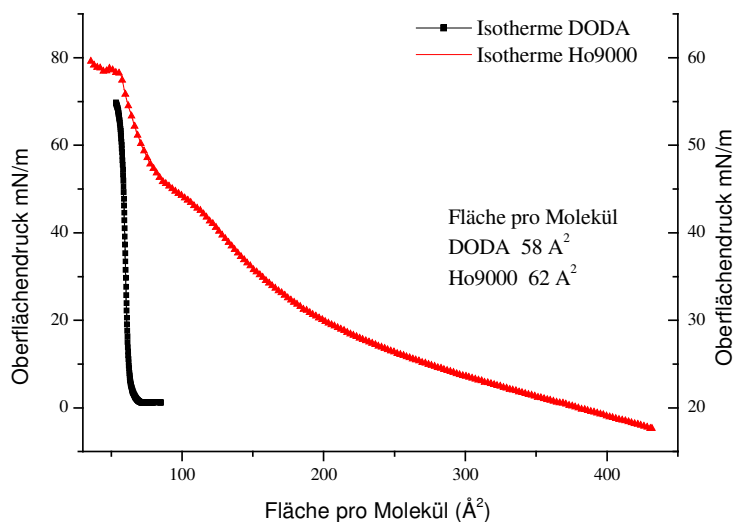


Abbildung 5-30 zeigt die Druck-Flächen Diagramme (Isothermen) des untersuchten Homopolymers Ho9000 ■ im direkten Vergleich mit dem Lipid Dioctadecylamin■ (DODA).

Aufgrund der vorgenommenen Untersuchungen lässt sich feststellen, dass die Komprimierbarkeit des Homopolymers der des Lipids DODA sehr nahe kommt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Polymereinheit des Moleküls dem vollständig gestreckten Zustand recht nahe kommen muss. Die Fläche des Ho9000 wird also

demzufolge hauptsächlich von seinem Lipidanteil bestimmt; offenbar beeinträchtigt die hydrophile Polymereinheit die Möglichkeit der dichten Molekülpackung wenig.

5.4.2 SPR Messungen

Abbildung 5-31 zeigt Plasmonenspektren zum schichtweisen Aufbau der untersuchten Moleküle. Beginnend mit der Goldreferenz erfolgt zunächst die Assemblierung der binären Thiolmischung. Die Funktionalisierung der Thioloberfläche mit der photoreaktiven Verbindung (in der Abbildung nicht gezeigt) ermöglicht nach LB-Übertrag und Trocknung die photochemisch kovalente Fixierung des Homopolymers Ho9000.

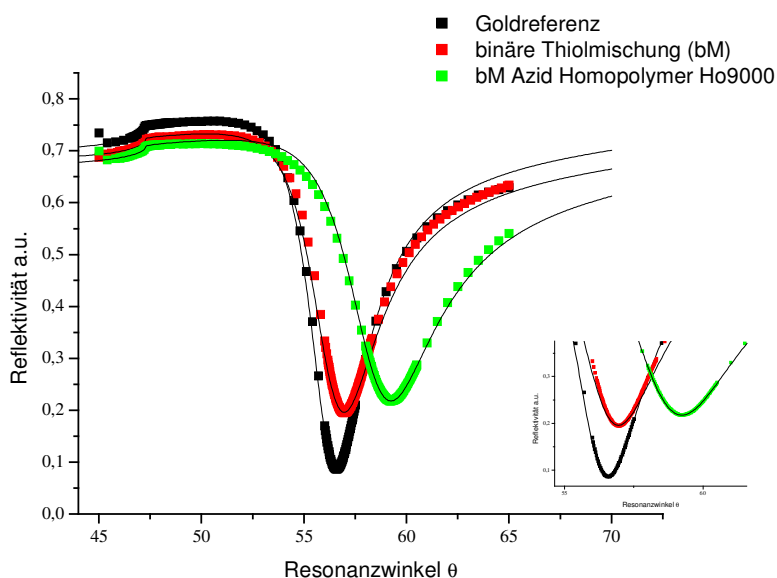


Abbildung 5-31 SPR Messungen des schichtweisen Aufbaus des Systems binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho9000. ■Goldreferenz, anschließend Fixierung der binären Thiolmischung (■binäre Thiolmischung) auf der Goldoberfläche und nachfolgend Funktionalisierung der Thiol-Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung Azid (nicht gezeigt). Abschließend photochemisch kovalente Anbindung der vororientierten Homopolymer-Monoschicht (■bM Azid Hoopolymer Ho9000). Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Resonanzkurven.

Die untersuchten Schichten der binären Thiolmischung zeigen vergleichbare Schichtdicken wie die der bereits untersuchten Systeme. So werden für das Thiolgemisch wiederum Schichtdicken im Bereich von 2,5nm gefunden. Die anschließende Funktionalisierung der Thioloberfläche mit der photoreaktiven

Verbindung Azid führt zu einer Schichtdickenzunahme von 0,5nm. Die nach Langmuir-Blodgett Übertrag und photochemisch kovalenter Anbindung des an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientierten Homopolymers Ho9000 durchgeführten Plasmonenmessungen zeigen die erfolgte Fixierung der Monoschicht. Für diese werden Schichtdicken im Bereich von etwa 7-10nm gemessen. Auch diese Werte bewegen sich im Rahmen der ermittelten molecular modeling Werte [Schiller 2001]. Die Schichtdicken nach Vesikelspreitung lipidhaltiger Liposomen liegen etwas zu hoch für einen perfekten bilayer; es ist hier mit Tendenzen von Vesikeladsorption zu rechnen. Tabelle 5-8 fasst die Ergebnisse der Plasmonenmessungen zusammen:

	Schichtdicke [nm] gemessen	Schichtdicke [nm] berechnet ²³
Binäre Thiolmischung	2,5±0,2	2,5
Azid-funktionalisierte binäre Thiolmischung	3,0±0,1	3,0
Homopolymer Monolayer auf Azid-funktionalisierter binärer Thiolmischung	11,5±1,5	12 ²⁴
Bilayer nach Vesikelspreitung	14,5±2	14,5

Tabelle 5-8 SPR-Messergebnisse System binäre Thiolmischung/ Azid/ Homopolymer Ho9000. Die gemessenen Schichtdicken sind Gesamtschichtdicken, also die Summe der Einzellagen.

5.4.3 Impedanzmessungen

Impedanzmessungen nach Fixierung der binären Thiol-Mischung auf der Goldoberfläche zeigen Kapazitäten von etwa $2\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dies entspricht, wie bereits mehrfach erwähnt, den Werten für die reinen Alkanthiole. Nach Funktionalisierung der Thiolmischung mit Azid als photoreaktiver Verbindung und anschließendem Übertrag des vororientierten Homopolymer Ho9000-Monolayers mittels Langmuir-Blodgett Technik werden Kapazitätswerte von $2\mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerständen von

²³ [Schiller 2001]

²⁴ Molekül in vollständig gestrecktem Zustand

6,5MΩcm² gemessen. Abbildung 5-32 zeigt den Admittanzspektren des Homopolymer Ho9000 monolayers sowie des bilayers nach erfolgter Vesikelfusion.

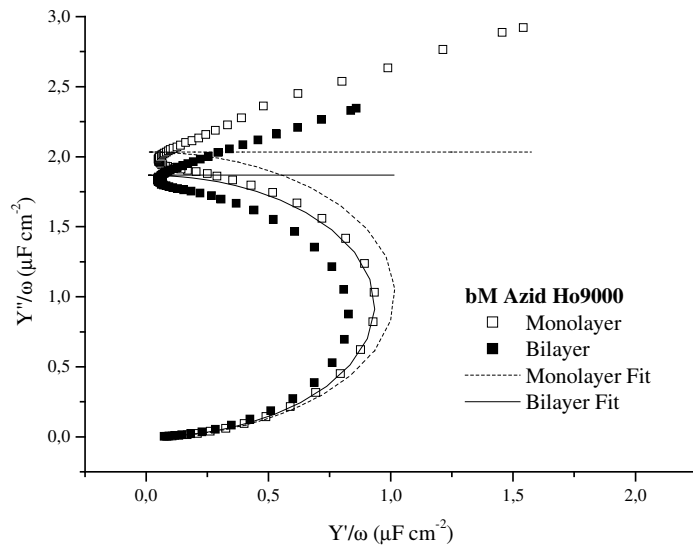


Abbildung 5-32 Frequenzreduzierte Admittanzspektren der Homopolymer Ho9000 Monoschicht. Die anschließende Vesikelfusion mit DiphytPC-Vesikeln verringert die Kapazität auf Werte unter 2μF/cm².

Tabelle 5-9 fasst die Ergebnisse der Impedanzmessungen zusammen:.

	Kapazität C _m [μF/cm ²]	Widerstand R _m [MΩ cm ²]
Binäre Thiolmischung	2,0± 0,1	1,4±0,5
Binäre Thiolmischung/Azid	8±3	0,05±0,01
binäre Thiolmischung/ Azid/Homopolmyer Ho9000- Monoschicht	2,1± 0,2	6,5 ±0,5
Doppelschicht nach Vesikelfusion	1,6± 0,2	10±1

Tabelle 5-9 Impedanzspektroskopische Daten des Systems Binäre Thiolmischung/Azid/Homopolymer Ho9000

5.4.3.1 Einbau von Valinomycin

Valinomycin wurde 1955 aus dem Bakterium Streptomyces fulvissimus isoliert. Manche Mikroorganismen synthetisieren Verbindungen, die die Membranen anderer

Organismen abnorm durchlässig machen und diese so ausser Gefecht setzen. Diese als Transportantibiotika bezeichneten Verbindungen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Es handelt sich einmal um carrier, zum anderen um Kanalbildner. Carrier binden ein Molekül auf der einen Seite der Membran und transportieren es anschliessend zur anderen; Kanalbildner schaffen einen durchgängigen Kanal. Valinomycin gehört zur Gruppe der carrier-Antibiotika. Diese besitzen die Form eines Reifens. Valinomycin stellt ein zyklisches Molekül aus L-Acetat, L-Valin, D-Hydroxyisovalerat und D-Valinresten dar, diese wiederholen sich und sind über Ester- sowie Peptidbindungen verknüpft.

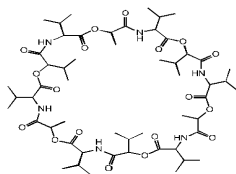


Abbildung 5-33 Strukturformel Valinomycin [Löw 1998]

Valinomycin bildet einen Komplex mit Kaliumionen, die es aufnimmt und wieder abgibt. Die Chelatisierung des K^+ -Ions ist ein schrittweiser Prozess, bei dem Wassermoleküle der Hydrathülle nach und nach durch Sauerstoffatome des Antibiotikums ersetzt werden. Der Einbau von Valinomycin in die Membran ändert deren Durchlässigkeit für Kaliumionen. Der stattfindende Ionenfluss kann gemessen werden und spiegelt sich in aufgenommenen Impedanzspektren wieder. Der Einbau von Valinomycin in Membran-Modellsysteme stellt eine Möglichkeit dar, Modellmembranen auf ihre Eignung als solche zu testen. Die Methode des Valinomycin-Einbaus in Modellmembranen bewährt sich vor allem dann, wenn untersucht werden soll, ob bei einem Membransystem mit hydrophilem Abstandhalter, das auf der Elektrodenoberfläche kovalent angebunden vorliegt, ein ausreichender Raum zwischen der Elektrodenoberfläche und dem Modellsystem vorhanden ist. Dieser Raum ist für den Austausch von Ionen bzw. als Ionenreservoir notwendig. Ein erfolgreicher Einbau von Valinomycin in Modellmembranen beweist zum einen die Möglichkeit der Inkorporation von zusätzlichen Membranbausteinen; zum anderen ist eine erfolgreiche Messung ein Nachweis für eine elektrisch dichte Membran, da der Kaliumtransport separat beobachtet werden kann. Der gelungene

Einbau von Valinomycin lässt sich durch eine Steigerung der Leitfähigkeit der Membran feststellen.

Das nachfolgende Impedanzspektrum des Widerstandes zeigt den erfolgreichen Einbau von Valinomycin in die auf Basis des Homopolymer Ho9000 polymerunterstützten Lipiddoppelschichten. Die Schicht wird durch den Einbau von Valinomycin für im Messpuffer enthaltene Kalium-Ionen durchlässig. Dies lässt sich durch Impedanzmessungen anhand eines Absinkens der Werte für den Widerstand beobachten. Die Werte für die Kapazität ändern sich dagegen kaum. Das verwendete Ersatzschaltbild zeigt Abbildung 5-36.

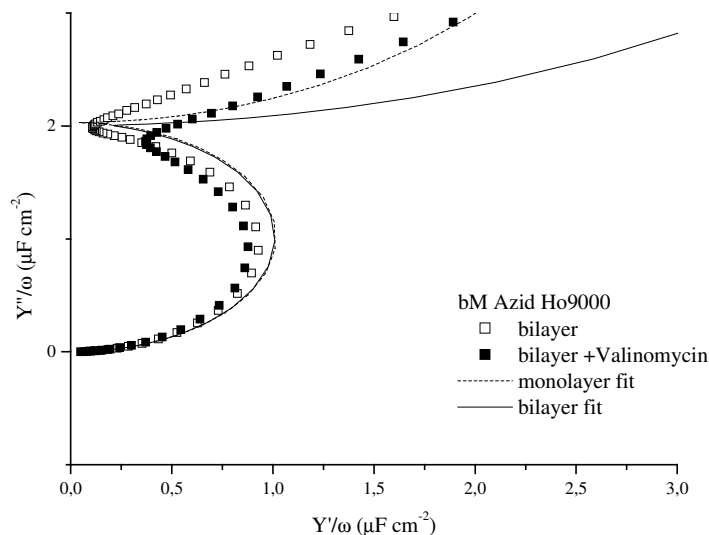


Abbildung 5-34 Frequenzreduzierte Admittanzwerte für Mono- bzw. Bilayer. Die Kapazität wird vor und nach Einbau von Valinomycin gezeigt.

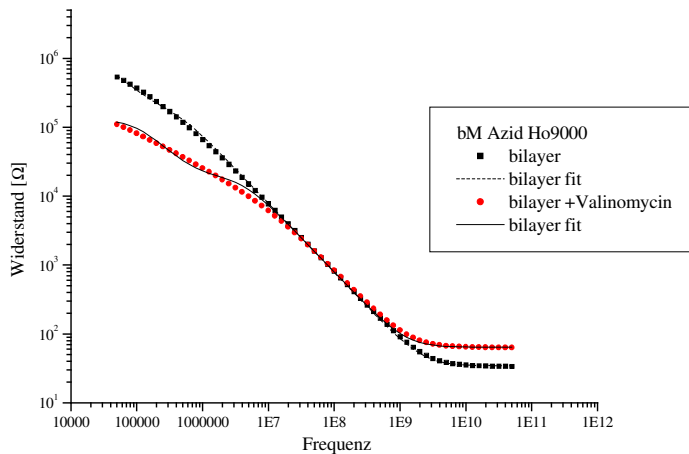


Abbildung 5-35 Bode-plot der Doppelschicht fit vor (■) und nach Valinomycin-Einbau (●); jeweils mit fit(-).

Tabelle 5-10 fasst die Werte für den Widerstand der Ho9000- Monoschicht, der Doppelschicht nach Vesikelfusion, sowie der Doppelschicht nach dem erfolgten Einbau von Valinomycin zusammen:

	Widerstand Monoschicht R [$M\Omega \text{ cm}^2$]	Widerstand Doppelschicht R [$M\Omega \text{ cm}^2$]	Widerstand Doppelschicht +Valinomycin R [$M\Omega \text{ cm}^2$]
Homopolymer Ho9000	$6,5 \pm 0,5$	10 ± 1	$0,01 \pm 0,002$

Tabelle 5-10 Werte des Widerstandes System bM/ Azid/ Ho9000 der impedanzspektroskopischen Messungen vor bzw. nach Einbau von Valinomycin

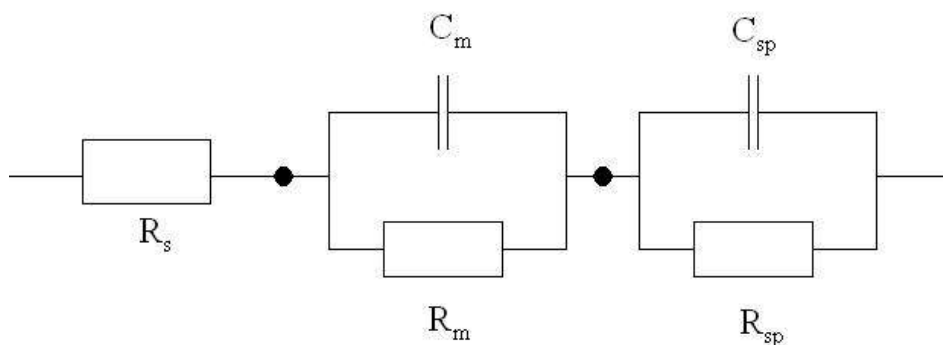


Abbildung 5-36 Ersatzschaltbild, an das die experimentellen Impedanz-Messkurven vor sowie nach Valinomycin-Einbau im System binäre Thiolmischung/ Azid/ Homopolymer Ho9000 angefüttet werden.

5.4.4 Diskussion

Mit Hilfe der durchgeführten SPR-Messungen lässt sich die schichtweise photochemisch kovalente Anbindung der Homopolymer Ho9000-Monoschicht auf den präparierten Goldträgern bestätigen. Das untersuchte Homopolymer-Molekül Ho9000 liess sich aufgrund seiner amphiphilen Struktur an der Wasser-Luft Grenzfläche orientieren, und nach Kompression auf die präparierten Substrate übertragen. Ein zwischengeschalteter Trocknungsschritt erwies sich als notwendig für die photochemisch kovalente Fixierung. Der Förster Energietransfer beeinflusste die Anbindung offenbar nur wenig. Durchgeführte Kinetikmessungen während der Fusion von lipidhaltigen Vesikeln bestätigen die Komplettierung der Monoschicht zur Doppelschicht. Impedanzmessungen des Systems zeigen für die aufgebaute Doppelschicht Kapazitätswerte von $1,6 \pm 0,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerstandswerten von $10 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. Der Einbau von Valinomycin in die Modellmembran ist möglich; der Transport von Kaliumionen durch dieselbe kann ebenfalls impedanzspektroskopisch gemessen werden.

Tabelle 5-11 fasst die gemessenen SPR- sowie Impedanzdaten des Systems binäre Mischung/Azid/Homopolymer Ho9000 zusammen:

	Schichtdicke [nm]	Kapazität C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Widerstand R_m [$\text{M}\Omega\text{cm}^2$]
Binäre Thiolmischung	$2,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,4$
Homopolymer Ho9000 monolayer	$11,5 \pm 1,5$	$2,1 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,5$
Bilayer nach Vesikelfusion	$14,5 \pm 2$	$1,6 \pm 0,2$	10 ± 1

Tabelle 5-11 Messwerte der SPR- sowie Impedanzmessungen System binäre Mischung/ Azid/ Homopolymer Ho9000. Die Schichtdicken sind angegeben als Gesamtschichtdicken.

Im Vergleich mit Ho5900 weist Ho9000 die besseren Ergebnisse auf; das Ziel der Optimierung wurde also erreicht.

Die gebildeten polymerunterstützten Lipidbilayer weisen jedoch nur eine Fluidität im Bereich der frei beweglichen distalen Lipidschicht nicht aber in der kovalent gebundenen proximalen polymerunterstützten Monoschicht auf. Dieses Ergebnis lässt sich auf die dichte Belegung der Oberfläche mit den Glykolipopolymer-

Molekülen zurückführen. Die Erkenntnisse zur Oberflächenbelegung mit Glykolipopolymer-Molekülen sollen als Grundlage weiterer Untersuchungen dienen. Um die Belegungsdichte zu verringern werden sogenannte „gemischte Schichten“ untersucht.

„Gemischte Schichten“ bestehen aus einer Mischung von auf der Substratoberfläche verankerten Glykolipopolymeren mit nicht verankerten, „freien“ Membranbausteinen, in diesem Fall dem Lipid Diphytanylglycerin. Die fest verankerten Membranbausteine sind starr auf der Oberfläche gebunden und bilden ein festes Gerüst, während die freien Lipide innerhalb der fixierten Schichten eindimensional beweglich sind. Dergestalt aufgebaute Membransysteme eignen sich hervorragend als Studienobjekte für Membrandynamiken. Durch Einsatz von Gemischen aus Glykolipopolymeren und Lipiden können Schichten hergestellt werden, die der natürlichen Biomembran noch ähnlicher sind. Wird nachfolgend etwa die Untersuchung diverser Proteine angestrebt, so ist ein dynamisches Membransystem eindeutig von Vorteil [Sackmann 1996].

Eine Stabilisierung der erzeugten Systeme durch kovalente Anbindung auf der Substratoberfläche ist im Optimalfall kontrolliert möglich. So untersuchte bereits die Gruppe um Naumann die kovalente Anbindung von gemischten Systemen aus Phospholipid und Lipopolymeren [Naumann 2001]; während die Arbeitsgruppe um Israelachvili Anbindungsversuche durch elektrostatische Wechselwirkungen untersuchte [Wong 1999]. Naumann und Mitarbeiter fokussierten sich jedoch auf Untersuchungsmethoden wie FRAP sowie das Verhalten der Schichten an der Wasser-Luft Grenzfläche. Es wurden jedoch keinerlei Aussagen zu den elektrischen Eigenschaften der untersuchten Systeme gemacht.

Die elektrischen Eigenschaften sollen nun, ebenso wie SPR neben Untersuchungen zur Fluidität, für gemischte Monoschichten aus Homopolymer Ho9000 und freiem Lipid untersucht werden.

5.5 System binäre Thiolmischung/Azid/Mischungen Ho9000/freies Lipid

Wie bereits in Kapitel 5.4.4 erläutert, werden nachfolgend Untersuchungen der sogenannten „gemischten Schichten“ beschrieben. Insbesondere die fluorszenzmikroskopischen Untersuchungen der Glykolipopolymer-Schichten in vorangegangenen Kapiteln zeigten zwar homogene aber nicht fluide Schichten der kovalent auf der Goldoberfläche fixierten Glykolipopolymeren. Da die Fluidität eines der Hauptmerkmale der natürlichen Biomembranen ist, muss dieser Eigenschaft bei der Mimesis von Membranen ein besonderes Augenmerk gelten. Eine Möglichkeit zum Erreichen dieses Ziels stellt die Mischung der Glykolipopolymer-Monoschicht mit freiem Lipid dar. Wird dieses Gemisch bereits vor dem Übertrag auf die Substrate an der Wasser-Luft Grenzfläche des Langmuir-Blodgett Troges vororientiert, kann nachfolgend die Fixierung der Glykolipopolymer-Moleküle, die somit als Ankerpunkte auf der Substratoberfläche dienen, erfolgen. Die Lipidmoleküle werden nicht fixiert und sind somit innerhalb der Monoschicht frei beweglich.

Abbildung 5-37 zeigt die Technik der Herstellung der „gemischten Schichten“. Zunächst wird die binäre Thiolmischung, bestehend aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid, auf der thermisch aufgedampften Goldoberfläche assembliert. Diese wird einem zweiten Reaktionsschritt durch die photoreaktive Verbindung 5-Azido-2-Nitro-Benzoesäurechlorid (Azid) funktionalisiert. Auf die auf diese Weise präparierten Träger wird das an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientierte Gemisch aus Glykolipopolymer und Lipid durch LB-Transfer übertragen und, nach Trocknung, durch UV-Bestrahlung kovalent fixiert.

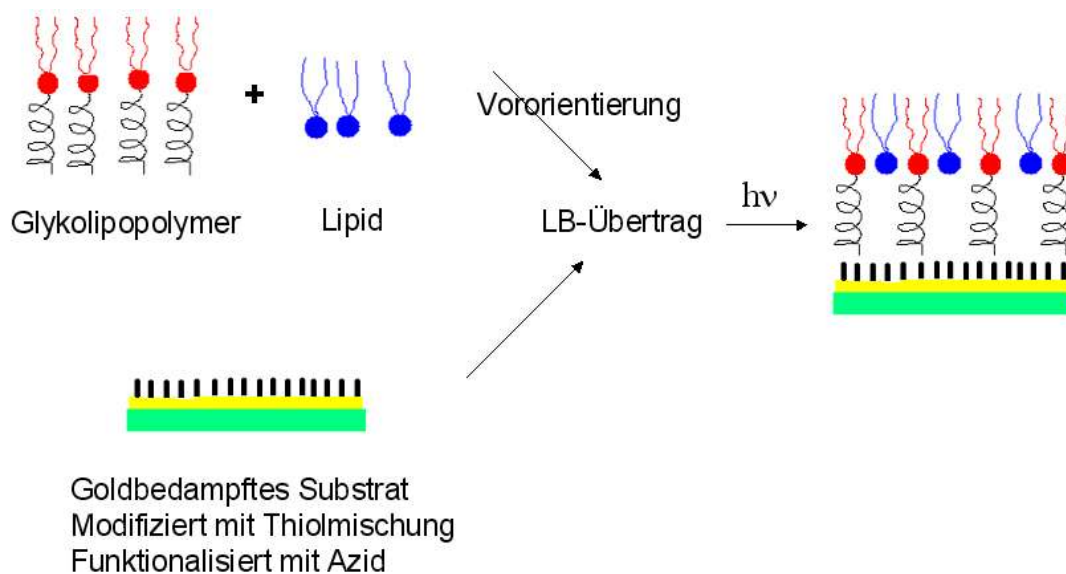


Abbildung 5-37 Schematische Darstellung der Herstellung der sogenannten gemischten Schichten. Zunächst wird das goldbedampfte Substrat mit der kovalent angebundenen Thiolmischung modifiziert, anschließend mit der photoreaktiven Verbindung funktionalisiert. Parallel erfolgt eine Vororientierung eines Gemisches aus Glykolipopolymer mit freiem Lipid an der Wasser-Luft Grenzfläche. Das Gemisch wird anschließend auf die Substrate übertragen und nach Trocknung photochemisch angebonden. Der so erzeugte Monolayer wird mit Hilfe von Vesikelfusion zum Bilayer komplettiert (nicht abgebildet).

Gemische aus Homopolymer Ho9000 mit freiem Lipid unterschiedlicher Konzentrationen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse werden nachfolgend im Einzelnen vorgestellt.

5.5.1 Referenz für Anbindungsversuch ohne Bestrahlung: Mischung

Homopolymer Ho9000/Diphytanylglycerin

Der folgende Versuch soll die Frage klären, ob eine Physisorption der Glykolipopolymer/Lipid-Monoschicht zur Herstellung stabiler Modellmembransysteme auf der Oberfläche ausreichend ist. Durch die fehlende UV-Bestrahlung fehlt die Anregung der photoreaktiven Verbindung und damit die kovalente Fixierung der durch LB-Technik übertragenen gemischten Monoschicht.

Dazu wird nach Assemblierung der binären Thiolschicht sowie deren Funktionalisierung mit Azid das an der Wasser-Luft Grenzfläche vororientierte Homopolymer Ho9000/Diphytanylglycerin-Lipid-Gemisch durch LB-Transfer auf die Substrate übertragen. Die erhaltene Schicht wird nicht getrocknet bzw. mit UV-

Licht bestrahlt sondern direkt weiter untersucht. Abbildung 5-38 zeigt den Aufbau des untersuchten Lipids [Schiller 2006].

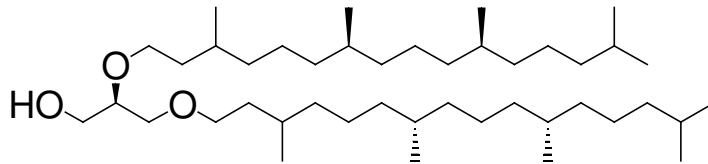


Abbildung 5-38 2,3-Di-o-phytanyl-sn-glycerin

5.5.1.1 SPR Messungen

SPR Untersuchungen der unbestrahlten Schichten nach LB-Übertrag zeigen Schichtdicken im Bereich von 2-3nm. Diese Schichtdicken weisen darauf hin, dass eine Anbindung des Glykolipopolymer-Lipid Gemisches nicht stattgefunden hat; die gemessenen Schichtdicken für die vermeintliche Monoschicht liegen im Bereich der Dimensionen für die assemblierte Alkanthiolschicht [Finklea 1996]. Abbildung 5-39 zeigt die gemessenen Plasmonenkurven der Goldschicht, der assemblierten binären Thiolmischung sowie die Messkurve nach LB-Übertrag der gemischten Monoschicht. (nicht gezeigt wird die Funktionalisierung der binären Thiolmischung durch die photoreaktive Verbindung Azid).

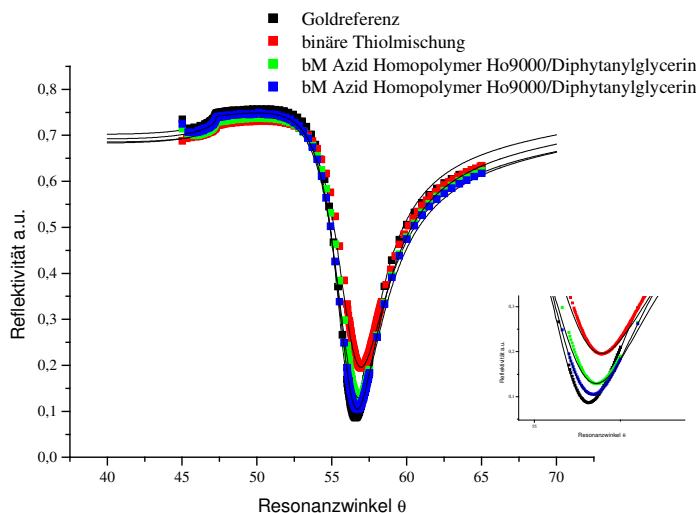


Abbildung 5-39 zeigt die Plasmonenkurven zu den Messungen der Goldreferenz (■), der binären Thiolmischung (■ binäre Thiolmischung), sowie zwei Messungen der nach Langmuir-Blodgett Übertrag direkt gemessenen Schichten der Homopolymer Ho9000/DPG-Lipidmischung (■/■binäre Thiolmischung/Azid/Gemisch aus Homopolymer Ho9000 und Diphytanylglycerin)

Eine SPR-Messung im Kinetikmodus während der Vesikelfusion mit Diphytanoylphosphatidylcholin-Vesikeln als Lipidkomponente zeigt einen Schichtdickenzuwachs von 2,5nm. Dieser Wert entspricht genau dem theoretischen Wert für eine Monolage Lipid.

Alkanthiole bilden hydrophobe Oberflächen, die das Aufplatzen und Ausrollen von Lipidvesikel leicht ermöglichen. Im Zusammenhang mit den anderen SPR-Messungen gesehen ist auch dieses Messergebnis ein Hinweis darauf, dass eine kovalente Anbindung des Homopolymer Ho9000-Monolayers auf der funktionalisierten Thioloberfläche nicht stattgefunden hat. Die funktionalisierte Thioloberfläche bietet ideale Bedingungen für die Vesikelspreitung, so kommt es zur Bildung einer Lipidmonolage von 2,5nm Dicke auf der funktionalisierten Thioloberfläche.

Die nachfolgende Tabelle 5-12 fasst die Messwerte der Plasmonenmessungen zusammen:

	Schichtdicke [nm] gemessen	Schichtdicke [nm] berechnet ²⁵
Binäre Thiolmischung	2,7±0,2	2,5
Azid-funktionalisierte binäre Thiolmischung	3,2±0,1	3,0
Gemischter Homopolymer Ho9000/DPG Monolayer auf Azid-funktionalisierter binärer Thiolmischung	3,2±0,2	12
Bilayer nach Vesikelspreitung	5,7±0,1	14,5

Tabelle 5-12 SPR-Messergebnisse System binäre Thiolmischung/ Azid/ Ho9000/Diphytanyllycerin-Gemisch. Die angegebenen Schichtdicken sind Gesamtschichtdicken (Summe der Einzellagen).

5.5.1.2 Impedanzmessungen

²⁵ Schiller [2001]

Impedanzmessungen weisen für die untersuchten Schichten für den Monolayer Werte von $2,25\mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerständen von $5\text{M}\Omega\text{cm}^2$ auf. Die Spreitung von Vesikeln senkt die Kapazität auf $0,8\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Untersuchungen von S.Lingler zeigten vergleichbare Werte [Diss Lingler 1998].

Die gemessenen Werte sind zusammen mit den SPR-Ergebnissen ein Hinweis dafür, dass die untersuchten Schichten lediglich aus der binären Thiolmischung bestehen auf deren hydrophober Oberfläche sehr leicht Vesikelfusion stattfinden kann.

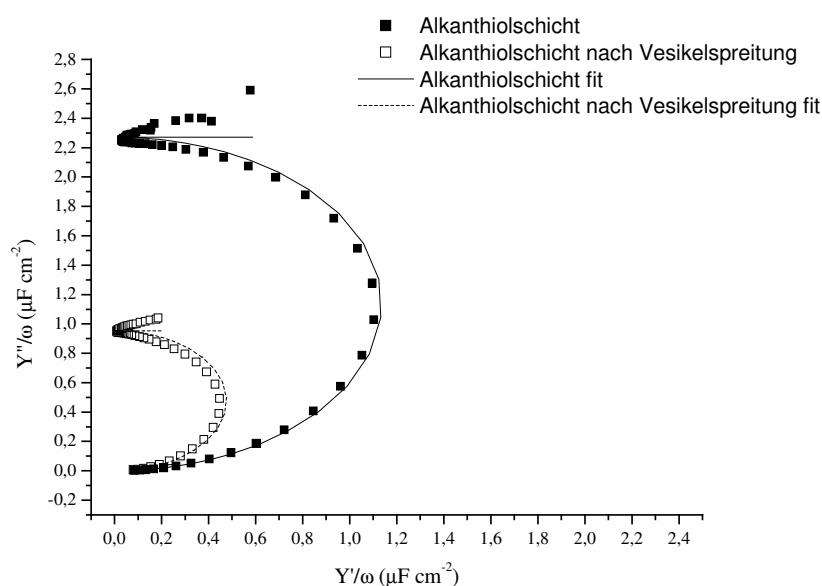


Abbildung 5-40 Frequenzreduzierte Admittanzplots der Monolage (■) vor sowie (□) nach Vesikelspreitung, jeweils mit zugehörigen fits.

5.5.1.3 Diskussion

In Archaeobakterien sind die Zellmembranen nicht aus Acyllipiden aufgebaut, sondern bestehen hauptsächlich aus Diphytanylglycerin-Phospholipiden (C_{20}) oder Dibisphytanylethern (C_{40}). Phytanol stellt ein gesättigtes Tetraterpen dar [Müller 2003]. Zur Idee der Verwendung von Diphytanylglycerin-Phospholipen als Membranbestandteile siehe [Schiller 2005].

Die Versuche zum gemischten System Homopolymer Ho9000/Diphytanylglycerin (DPG) zeigen, dass eine dauerhafte und somit haltbare Fixierung der gemischten Schichten durch Physisorption nicht möglich ist. Sowohl die SPR Daten, wie auch die Impedanz-Daten zeigen, dass die untersuchten

Schichten lediglich aus binärer Thiolmischung bestanden. Die Impedanzdaten für sich genommen zeigen die Bildung einer Lipiddoppelschicht, die Kombination mit SPR Messungen zeigt jedoch, dass die durchgeführte Vesikelfusion direkt auf der Alkanthiolschicht und nicht auf dem Ho9000/DPG Monolayer stattfindet.

Die Versuche zum System binäre Thiolmischung/Azid/ Ho9000/DPG dienen als Referenzexperimente. Es zeigt sich, dass Physisorption nach Übertrag der gemischten Schicht aus Ho9000/DPG auf die Substrate nicht ausreicht, um stabile Schichten zu erzeugen; die UV-Bestrahlung und dadurch initiierte Reaktionen sind absolut notwendig um eine dauerhafte Verankerung der Modellmembransysteme zu gewährleisten.

Alle weiteren Versuche werden demzufolge mit photochemisch kovalent fixierten Schichten durchgeführt.

5.5.2 Mischungen Homopolymer Ho9000/1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin

Auf die Azid-funktionalisierte binäre Mischung wird die vororientierte und komprimierte Monoschicht aus Homopolymer Ho9000 und 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin-Lipid durch LB-Transfer übertragen, getrocknet und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent fixiert. Die so hergestellte Polymer-Lipid-Monoschicht wird durch Vesikelfusion zur Doppelschicht komplettiert.

Abbildung 5-41 zeigt die Struktur des zur Herstellung des Gemisches verwendeten freien Lipids:

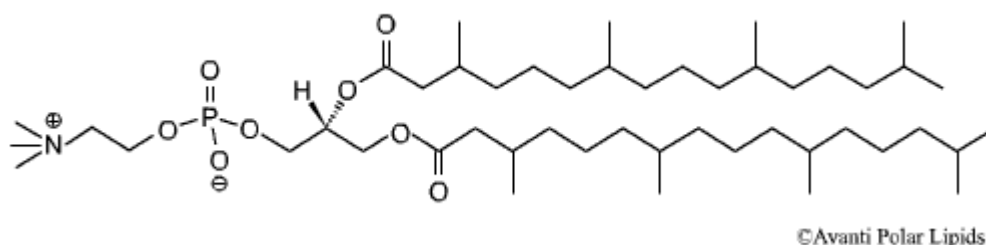


Abbildung 5-41 Struktur des Lipids 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DiphytPC)²⁶

²⁶ URL www.avantilipids.com

5.5.2.1 SPR Messungen

Für die auf der Goldoberfläche zunächst angebundene binäre Thiol-Mischung bzw. deren Funktionalisierung mit Azid werden die bereits mehrfach genannten Schichtdicken von etwa 2,5nm für die Thiolschicht sowie zusätzlich etwa 0,5nm für die photoreaktive Verbindung Azid gemessen. Anschließend werden drei unterschiedliche Mischungsverhältnisse aus Polymer/ Lipid untersucht. Diese wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Naumann und Mitarbeitern gewählt [Naumann 2001] [Ke 2001a].

Untersucht werden Mischungen aus jeweils Polymer/Lipid 80:20mol%; 50:50mol% und 20:80mol%. Die abnehmende Polymerkonzentration führt zu dünneren Schichten. Abbildung 5-42 zeigt die Resonanzkurven der drei untersuchten Ho9000/DiphytPC-Mischungsverhältnisse.

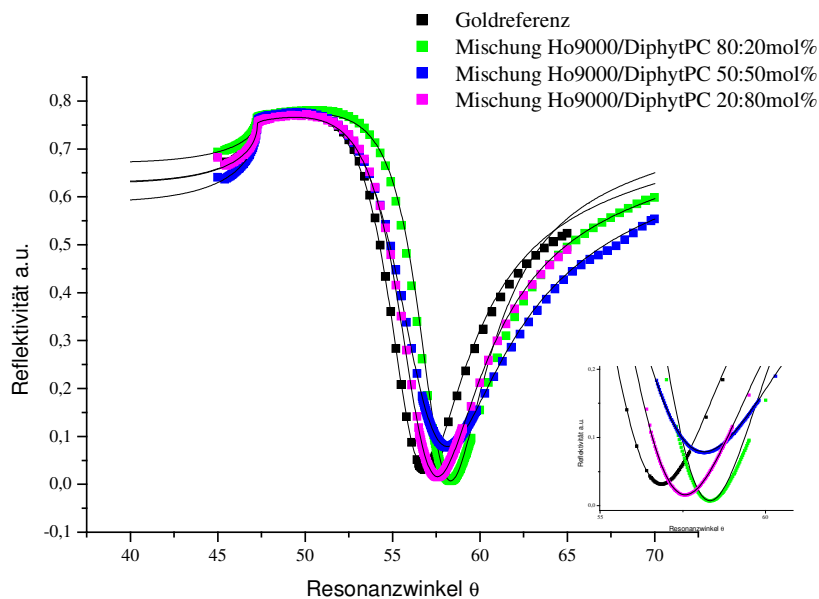


Abbildung 5-42 SPR Messungen der Mischungen aus Homopolymer Ho9000 sowie DiphytPC als freiem Lipid für den Monolayer. Zunächst die Goldreferenz (■Goldreferenz), sowie anschließend die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse 80:20; 50:50 und 20:80 jeweils in mol%. (■Mischung Homopolymer Ho9000/DiphytPC 80:20mol%, ■Mischung Homopolymer Ho5900 DiphytPC 50:50mol% ■ Mischung Homopolymer Ho5900 DiphytPC 20:80mol%). Hervorgehoben dargestellt sind die Minima der jeweiligen Resonanzkurven.

Die Zusammenfassung der durch Plasmonenmessungen erhaltenen Schichtdicken der Gemische finden sich in Tabelle 5-13:

Monoschicht aus Homopolymer Ho9000:DiphytPC Mischungsverhältnis (mol%) ²⁷	Schichtdicke [nm]	Schichtdicke nach Vesikelspreitung [nm]
80:20	8,2±0,5	6,4±3,2
50:50	4,0±0,8	6,0±0,4
20:80	2,1±0,7	4,9±0,5

Tabelle 5-13 Mit Hilfe von SPR Messungen ermittelte Schichtdicken der Monoschichten der Mischungen aus Homopolymer Ho9000 und DiphytPC (ohne „Unterbau“ azid-funktionalisierte binäre Thiolmischung)

Die gemessenen Schichtdicken zeigen bei abnehmender Polymerkonzentration zunehmende Dominanz der Lipidfraktion bezüglich der gemessenen Schichtdicken.

SPR-Messungen der Homopolymer Ho9000-Monoschicht (Kapitel 5.4.2) zeigten, dass die Homopolymer- Monoschicht nach LB-Übertrag eine Schichtdicke von 8,5±1,5nm aufweist. Die übertragenen Homopolymermoleküle liegen also nicht vollständig gestreckt vor. In vollständig gestrecktem Zustand müssten sie eine Länge von 12nm aufweisen, es werden jedoch lediglich Schichtdicken von etwa 8nm gemessen. Tabelle 5-14 zeigt nochmals die bereits erläuterten SPR-Ergebnisse der Homopolymer Ho9000-Monoschicht:

²⁷ auf Azid-funktionalisierter binärer Thiolmischung

	Schichtdicke [nm] gemessen ²⁸	Schichtdicke [nm] berechnet ²⁹
Homopolymer Ho9000 Monoschicht	8,5±1,5	9,0 ³⁰
Bilayer nach Vesikelspreitung	12±1,5	11,5

Tabelle 5-14 Mit Hilfe von SPR-Untersuchungen bestimmte Schichtdicken der Homopolymer Ho9000 Monoschicht sowie der Doppelschicht nach Vesikelspreitung

Der Vergleich mit den gemischten Schichten aus Homopolymer Ho9000 und freiem Lipid 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin zeigt, dass die Anordnung des Homopolymers innerhalb der gemischten Schichten von der des ungemischten Moleküls abweichen muss. Die gemischten Schichten aus 80mol% Glykolipopolymer gemischt mit 20mol% Lipid weisen deutlich grössere Schichtdicken auf, als die ungemischten. Da das Lipid Dimensionen von etwa 2 nm aufweist, kann diese Tatsache nur auf das Vorliegen einer grösseren Anzahl gestreckter Homopolymer-Moleküle innerhalb der Mischung zurückzuführen sein. Die Verdünnung des Lipidanteils des Homopolymers mit freiem Lipid bei Vororientierung an der Wasser-Luft Grenzfläche scheint sich vorteilhaft auf die Anordnung der Zuckerketten auszuwirken. Die gemessenen Plasmonendaten sprechen für eine höhere Anzahl gestreckter Zuckerketten innerhalb der gemischten Schicht, verglichen mit der ungemischten Monoschicht. Verdünnt man das zunächst untersuchte Glykolipohomopolymer-Lipidgemisch (80:20mol%) weiter mit Lipid (50:50mol%), so werden die mit Hilfe von Plasmonenmessungen bestimmten Schichtdicken kleiner. Dies zeigt die abnehmende Polymerkonzentration. Die untersuchten Schichten aus 20mol% Polymer und 80mol% Lipid untermauern die zunehmende Rolle des Lipidanteils innerhalb der gemischten Schicht. Allen

²⁸ ohne „Unterbau“ binäre Thiolmischung/Azid

²⁹ Schiller [2001]

³⁰ Molekül vollständig gestreckt

gemischten Schichten ist gemeinsam, dass eine Vesikelfusion bei Spreitung von Liposomen nicht beobachtet werden konnte. Es kommt zur Vesikeladsorption.

5.5.2.2 Impedanzmessungen

Impedanzmessungen von gemischten Schichten zusammengesetzt aus 80mol% Ho9000 und 20mol% DiphytPC zeigen Kapazitäten im Bereich von $27\mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei Widerständen von $1\text{M}\Omega\text{cm}^2$. Die anschließende Vesikelfusion reduziert die gemessenen Kapazitäten auf etwa $14\mu\text{F}/\text{cm}^2$, die nach Vesikelfusion gemessenen Widerstände sinken jedoch ebenfalls auf Werte um $0,5\text{M}\Omega\text{cm}^2$. Impedanz-Versuchsreihen für das Mischungsverhältnis Homopolymer Ho9000: Diphytanoylphosphatidylcholin 50:50mol% zeigen Kapazitäten von $7,5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Widerstände von $1\text{M}\Omega\text{cm}^2$ für die Monoschicht. Durch Vesikelfusion ändern sich die Messdaten nur wenig. Untersuchungen gemischter Monoschichten aus 20mol% Homopolymer Ho9000 und 80mol% DiphytPC-Lipid zeigen Kapazitäten von $18\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Widerstände im Bereich von $0,7\text{M}\Omega\text{cm}^2$ gemessen. Es finden sich also ähnliche Ergebnisse wie bei den untersuchten 80:20mol% Verdünnungen (Ho9000:DiphytPC). Tabelle 5-15 fasst die impedanzspektroskopischen Untersuchungen zu den einzelnen Homopolymer-Lipid Mischungen zusammen:

	Kapazität $C_m[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$		Widerstand $R_m[\text{M}\Omega\text{cm}^2]$	
	Vor Vesikelspreitung	Nach Vesikelspreitung	Vor Vesikelspreitung	Nach Vesikelspreitung
Ho9000/DiphytPC 80:20mol%	$27\pm 2,5$	$14\pm 0,5$	$0,86\pm 0,15$	$0,45\pm 0,05$
Ho9000/DiphytPC 50:50mol%	$7,5\pm 0,5$	$7\pm 1,5$	$1,2\pm 0,1$	$0,9\pm 0,05$
Ho9000/DiphytPC 20:80mol%	18 ± 2	22 ± 3	$0,7\pm 0,1$	$0,49\pm 0,05$

Tabelle 5-15 Impedanzdaten für gemischte Schichten Ho9000/ DiphytPC

Betrachtet man die impedanzspektroskopischen Daten der gemischten Schichten so zeigt sich, dass sie nicht mit den angestrebten Daten von BLMs vergleichbar sind.

Lediglich die ungemischten Schichten zeigten Kapazitäts- sowie Widerstandswerte die denen der Schwarzfilmmembranen nahe kamen (siehe Tabelle 5-16).

	Kapazität C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Widerstand R_m [$\text{M}\Omega \text{cm}^2$]
Homopolymer Ho9000 Monoschicht	2,1 \pm 0,2	6,5 \pm 0,5
Ho9000 Bilayer nach Vesikelfusion	1,6 \pm 0,2	10 \pm 1

Tabelle 5-16 Impedanzdaten für ungemischte Schicht Homopolymer Ho9000

Die Mischung Ho9000:DiphytPC 50:50mol% weist von allen untersuchten Mischungen die besten Eigenschaften auf und soll daher noch weiter untersucht werden.

5.5.2.3 Einbau von Valinomycin

Ein einfaches aber sehr wirkungsvolles Mittel die elektrischen Eigenschaften einer Modellmembran zu charakterisieren, ist die Verwendung von Valinomycin als Kalium-selektiver Ionenkanal. Der Einbau von Valinomycin in die Modellmembran ermöglicht die Beobachtung des Kaliumtransports durch die Membran. Ein Einbau von Valinomycin gelingt lediglich in die gemischte Schicht aus Homopolymer Ho9000: Diphytanoylphosphatidylcholin 50:50mol% ein (näheres zu Valinomycin siehe 5.4.3.1). Abbildung 5-43 zeigt die Bode Darstellung, aus der die Widerstandswerte für die Schichten berechnet werden. Man erkennt die Monoschicht (blau); nach Vesikelspreitung steigt der Widerstand (schwarze Kurve). Die Zugabe von Valinomycin lässt die Kurve absinken, der Widerstand wird durch den Einbau von Valinomycin geringer.

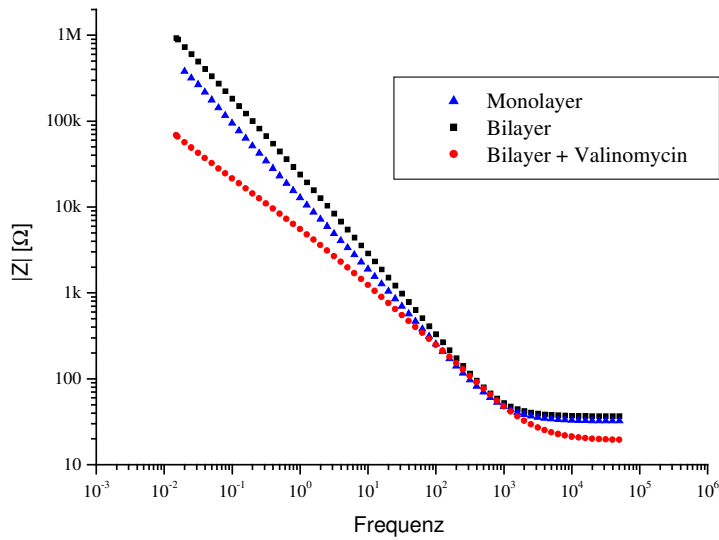


Abbildung 5-43 Widerstandswerte für die gemischte Mono-Schicht aus Homopolymer Ho9000: Diphytanoylphosphatidylcholin 50:50mol% (Monolayer). Die Vesikelspreitung lässt die Werte ansteigen (bilayer), der Einbau von Valinomycin lässt sie sinken.

Tabelle 5-17 zeigt die Werte der Impedanzmessungen des ungemischten Homopolymers Ho9000 im Vergleich mit der gemischten Schicht aus Ho9000 und DiphytPC (50:50mol%).

	Widerstand Monoschicht R [$M\Omega\text{ cm}^2$]	Widerstand Doppelschicht R [$M\Omega\text{ cm}^2$]	Widerstand Doppelschicht +Valinomycin R [$M\Omega\text{ cm}^2$]
Homopolymer Ho9000	6,5±0,5	10±1	0,001±0,0005
Ho9000: Lipid (50:50mol%)	1,2±0,1	0,9±0,05	0,1±0,03

Tabelle 5-17 Werte der Impedanzmessungen Homopolymer Ho9000 im Vergleich mit gemischter Schicht aus Homopolymer Ho9000:DiphytPC (50:50mol%).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verdünnung 50:50mol% (Ho9000:Lipid) den für ein Modellsystem gewünschten Werten am nächsten kommt. Der erfolgreiche Einbau von Valinomycin weist darauf hin, dass ein Lipidbilayer vorliegt.

5.5.3 FRAP Messungen

Mit Hilfe der Technik der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich Aussagen zur Mischbarkeit des Homopolymers Ho9000 mit dem Lipid Diphytanoylcholin treffen. Die nachfolgend gezeigten Abbildungen zeigen unterschiedliche Mischungsverhältnisse Homopolymer: Lipid.

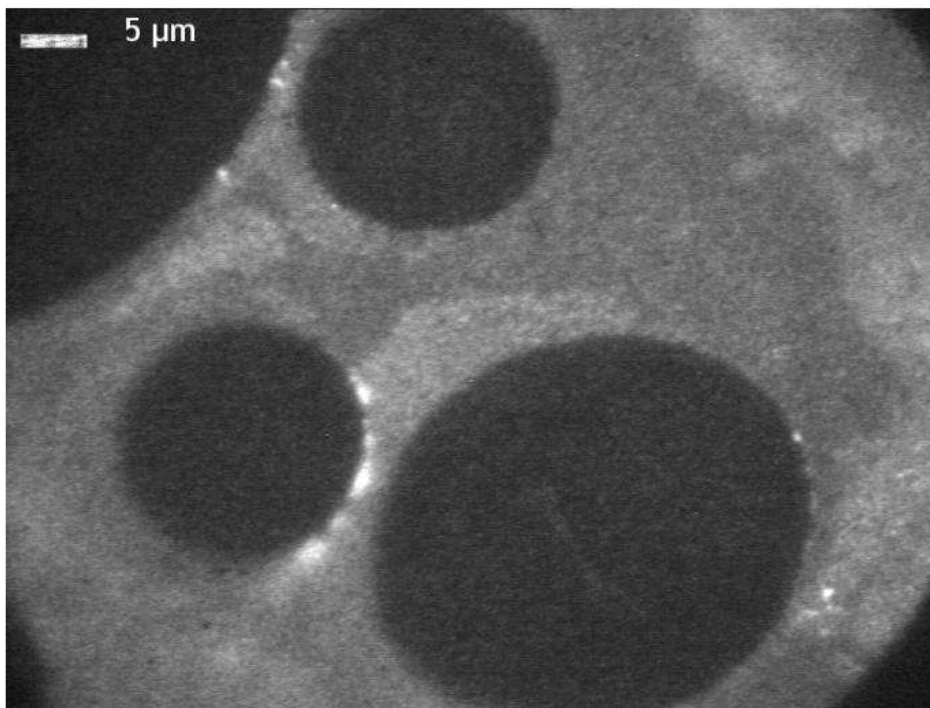


Abbildung 5-44 Fluoreszenzspektroskopische Aufnahme des Systems 80:20mol% (Ho9000:DiphytPC). Erkennbar sind deutliche Inhomogenitäten; die Mischbarkeit der beiden Komponenten ist offenbar nicht gegeben.

Fluoreszenzspektroskopische Messungen des Systems 80:20 mol% (Ho9000: DiphytPC) zeigen deutliche Inhomogenitäten der hergestellten Schicht (Abbildung 5-44). Für die Mischung 20:80mol% zeigt sich ein ähnliches Bild wie für das System 80:20mol%. Lediglich das System 50:50mol% zeigt eine deutlich homogene, leicht strukturierte Oberfläche (Abbildung 5-45).

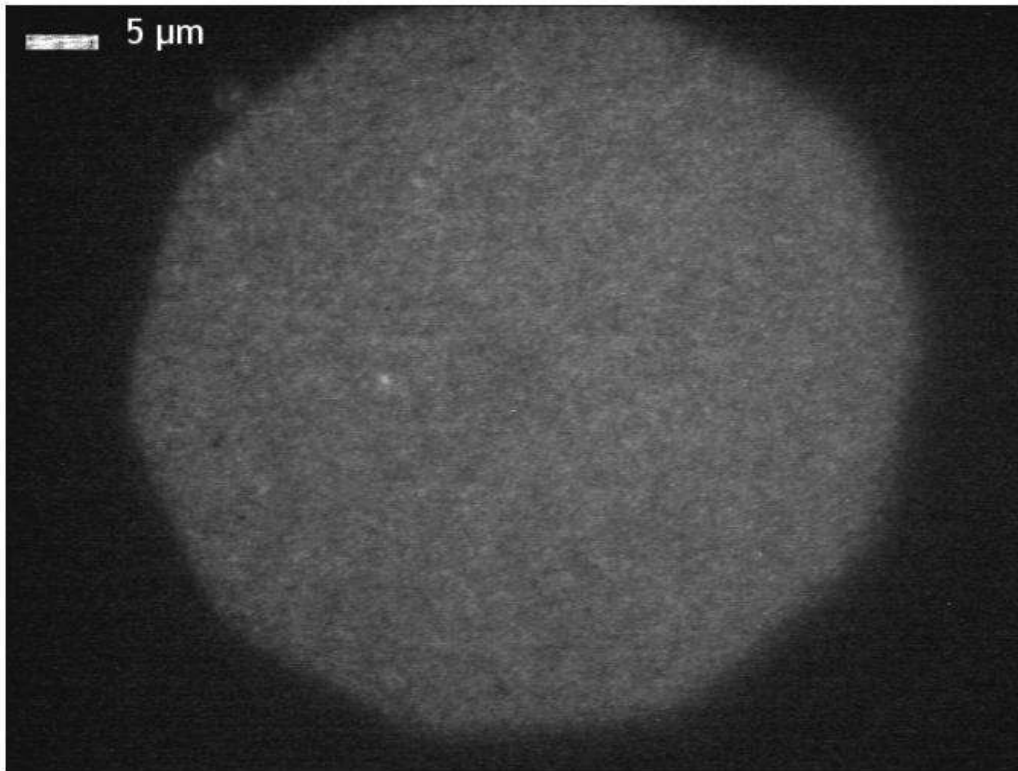


Abbildung 5-45 Mikroskopisches Bild der gemischten Schicht aus Homopolymer Ho9000/ 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin 50:50mol%

Abbildung 5-46 zeigt die Erholung der Fluoreszenzintensität nach Photobleichung durch den Laser. Der Wert für den Diffusionskoeffizienten D ist mit $D=2 \cdot 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ sehr niedrig. Ursache hierfür ist der hohe Anteil an fixierten Homopolymermolekülen und die dadurch gegebene hohe Ankerdichte. Dennoch zeigt das System eine Erholung von 86% nach Photobleichung, was auf ein Vorliegen von beweglichen Lipidmolekülen innerhalb der gemischten Schicht hinweist. Versuche von C.Naumann an Dioctadecylamin[poly(ethyloxazolin)]Schichten gemischt mit dem freien Lipid 1,2-Dimyristoyl-3-glycero-phosphocholin zeigten für einen Anteil von 80% fixiertem Lipopolymer Diffusionskoeffizienten $D=1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Naumann 2001]. Dieses Ergebnis ist mit dem unseren vergleichbar und zeigt den Einfluss der immobilisierten Fraktion auf die Beweglichkeit innerhalb der Schichten.

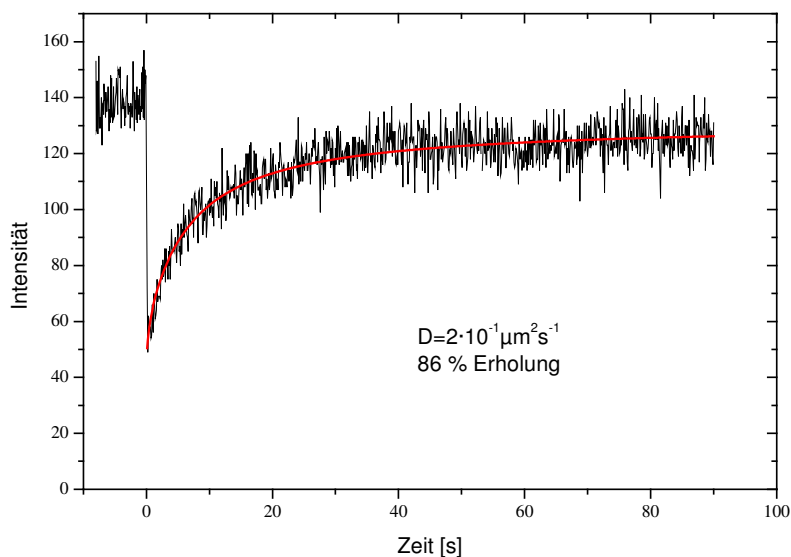


Abbildung 5-46 Erholung der Fluoreszenz nach Photobleichung System Ho9000/DiphytPC 50:50mol%

5.5.4 Diskussion

Die SPR-Daten zeigen für die untersuchten Mischungen mit zunehmender Lipidkonzentration eine abnehmende Schichtdicke des Gesamtsystems. Dies ist einerseits zu erwarten, da das reine Lipid-Molekül deutlich geringere Dimensionen aufweist als das untersuchte Homopolymer Ho9000, weist aber andererseits auf die Problematik des Übertrages der gemischten Schicht hin. Bei höheren Lipidkonzentrationen stehen weniger Homopolymermoleküle als Ankerpunkte zur Verfügung. Da diese die Stütze des Filmes darstellen, nimmt eine abnehmende Zahl an Polymer-Molekülen Einfluss auf die Stabilität des Gesamtsystems. Da die Homopolymermoleküle in vollständig gestrecktem Zustand Dimensionen in Bereichen von etwa 12 nm aufweisen, das Lipid DiphytPC aber nur eine Länge von etwa 2,5nm aufweist, ist bei zunehmender Lipidkonzentration die Stabilität des Gesamtsystems eventuell nicht mehr gewährleistet, weil zum Zeitpunkt der kovalenten Fixierung durch UV-Bestrahlung kein Wasser auf dem Monolayer sein darf, haben die freien Lipide keine Möglichkeit, sich zwischen den polymergestützten Lipidanteil der gemischten Schicht zu assemblieren. Es ist

fraglich, ob hydrophobe bzw. van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen überhaupt für eine ausreichend stabile Schicht sorgen können. Des weiteren beeinflusst sicherlich der für die kovalente Fixierung notwendige Trocknungsprozess die Molekülanordnung bzw. Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen.

6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung festkörperunterstützter Membransysteme aus Glykolipopolymeren auf Goldoberflächen. Die besondere Herausforderung bestand darin, elektrische Eigenschaften der Membransysteme anzustreben, die denen der Schwarzfilmmembranen entsprechen. Voraussetzung hierfür ist eine dichte supramolekulare Anordnung der polymerverankerten Lipidmonolayer im Bereich der Lipidmoleküle. Die darunter liegenden glykosidischen Molekülanteile sollen dabei einen hydrophilen Submembranraum bilden. Dieser ist insbesondere für den Einbau von Membranproteinen notwendig, und auch als Reservoir für Ionen.

Um die elektrischen Eigenschaften der Modellmembranen mit Hilfe von impedanzspektroskopischen Techniken messen zu können, ist die Präparation der Membranen auf Goldfilmen notwendig. Eine direkte Verankerung der Glykolipopolymermoleküle auf der Goldoberfläche ist nicht möglich, daher werden die untersuchten Glykolipopolymermoleküle mit Hilfe von photoreaktiven Molekülen kovalent auf der Goldoberfläche immobilisiert.

Die photochemisch kovalente Fixierung von Molekülen auf Gold wird durch das Phänomen des Förster Energietransfers erschwert. Die Effizienz der Energieübertragung nimmt mit zunehmendem Abstand von der Goldoberfläche jedoch ab; daher wird die photochemische Fixierung über einen Abstandhalter durchgeführt. Alle hierbei betrachteten Moleküle liessen sich aufgrund ihrer durch Schwefel-Endgruppen hervorgerufenen Affinität zu Gold auf der Substratoberfläche anordnen.

Die untersuchten Abstandhalter waren zum einen ein hydrophiles Polymer, ein Thio-Polyethylenglykol, zum anderen eine binäre Mischung zweier Alkanthiole, bestehend aus 1-Thiohexanol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid.

Die Thio-PEG-Monoschichten zeigten sehr unterschiedliche Schichtdicken. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass die PEG-Moleküle auf der Oberfläche sehr unterschiedliche Konformationen annehmen können. Dadurch

können sie sich nicht in einer regelmässigen Anordnung aneinander lagern. Dies erkennt man auch an hand des sehr unterschiedlichen Verlaufs der optischen Schichtdicke bei der Aufnahme von Wasser. Dennoch wurden die PEG-Schichten mit Azid als photoreaktiver Verbindung umgesetzt, um die anschliessende photoreaktive Immobilisierung des Glykolipopolymer vornehmen zu können. Die Funktionalisierung der Thio-PEG-Oberfläche mit der photoreaktiven Verbindung führt zu einer drastischen Abnahme der gemessenen Schichtdicken und ausserdem zu einer deutlichen Minderung der Quellungsneigung. Diese Beobachtungen deuten auf Veränderungen durch die Funktionalisierung innerhalb der betrachteten Thio-PEG Schichten hin, beispielsweise durch Vernetzung. Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass nach LB-Übertrag der Glykolipopolymer-Monoschicht ein zwischengeschalteter Trocknungsschritt essentiell für deren photochemisch kovalente Fixierung auf der Goldoberfläche ist. Dieses Phänomen erklärt sich aus der Konkurrenzsituation der Wassermoleküle mit den glykosidischen Ketten der Glykolipopolymer bei der Photoreaktion. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der Langmuir-Blodgett Übertrag sowie die nachfolgend durchgeführte photochemische Fixierung der Glykolipopolymer-Moleküle auf den Thio-PEG Schichten zu Schichtdicken und elektrischen Eigenschaften führte, die auf den Aufbau einer Lipidmonolage hinweisen. Diese stellte jedoch offensichtlich im Bereich der Lipidmoleküle keine geschlossene Schicht dar. So kam es bei der zum Aufbau der Lipiddoppelschicht durchgeführten Vesikelfusion zur Adsorption der Lipidvesikel aufgrund der offensichtlich inhomogenen Oberfläche der Lipidmonoschicht.

Die Versuche mit dem Thio-PEG haben gezeigt, dass als Abstandhaltermoleküle für die Photofunktionalisierung nur solche Moleküle in Frage kommen, die aufgrund ihrer Eigenschaften eine regelmässige Anordnung auf der Goldoberfläche anstreben. Diese Voraussetzung erfüllt am besten die Gruppe der Alkanthiole. Als funktionelle Endgruppe für die Reaktion mit der photoreaktiven Verbindung wurde eine Aminogruppe gewählt. Daraus folgte die Verwendung von Bis-(Aminododecyl)-disulfid als Abstandhaltermolekül. Terminal funktionalisierte Alkanthiole müssen jedoch mit nicht oder anderweitig funktionalisierten Alkanthiolen verdünnt assembliert werden, um weitergehende Funktionalisierungen eingehen zu können. Diese Tatsache ist aus vielen Untersuchungen bekannt. Am

günstigsten wirkt sich dabei eine unterschiedliche Längenverteilung aus. Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein Gemisch aus Bis-(Aminododecyl)-disulfid und 1-Thiohexanol verwendet. Das 1-Thiohexanol soll die für die photochemische Fixierung notwendigen reaktiven Amino-Gruppen des Disulfids dergestalt „verdünnen“, daß 1 Disulfid-Molekül in einen Ring von Thiohexanol-Molekülen gebettet vorliegt.

Die Annahme, daß Alkanthiole, auch unterschiedlicher Kettenlänge und mit unterschiedlichen Endgruppen, sich zu regelmässigen supramolekularen Anordnungen zusammenlagern, hat sich auch in der vorliegenden Arbeit voll bestätigt. Das ergibt sich sowohl aus den hervorragend reproduzierbaren Schichtdicken, die den berechneten sehr nahe kommen, als auch den elektrischen Daten, insbesondere den Kapazitäten, die auf eine dichte Packung im Bereich der Alkanthiole hinweisen.

Diese Ordnung wird dann allerdings bei der Reaktion mit einer der beiden photoreaktiven Verbindungen, einmal dem Benzophenon und zum anderen dem Azid, gestört. Diese Tatsache läßt sich aus der Änderung der elektrischen Daten ablesen. Das Phänomen läßt sich nur so erklären, daß die Endgruppenfunktionalisierung zur Aufhebung der intermolekularen Wechselwirkung im Bereich der Alkanketten führt. Dennoch bleibt die Homogenität bezüglich der Schichtdicke erhalten, so daß die nachfolgende Immobilisierung der Glykolipopolymeren, insbesondere der Homopolymere, offenbar zu einer regelmässigen Anordnung in Bezug auf sämtliche Teilbereiche der Oberflächenkonstrukte führt.

Die untersuchten Glykolipopolymer-Moleküle lassen sich alle aufgrund ihrer amphiphilen Struktur an der Wasser-Luft Grenzfläche des Langmuir-Blodgett-Troges vororientieren. In allen Fällen gelingt auch der Langmuir-Blodgett Übertrag der komprimierten Schicht, sowie, nach der für die Anbindung notwendigen Trocknung, die photochemisch kovalente Fixierung der Monoschicht durch Bestrahlung mit UV-Licht. Das ist zweifelsfrei aus Schichtdicken und elektrochemischen Daten zu entnehmen. Damit konnte erstmals die photochemisch kovalente Fixierung eines Glykolipopolymermoleküls auf der Goldoberfläche gezeigt werden.

Untersuchungen erfolgten an einem Copolymer (Co20) sowie zwei unterschiedlichen Homopolymermolekülen (Ho5900 bzw. Ho9000). Der unterschiedliche molekulare Aufbau der Glykolipopolymermoleküle spiegelt sich in ihrem Verhalten an der Wasser-Luft Grenzfläche sowie in den Eigenschaften der gebildeten Monoschichten wieder.

Die Copolymer-Schichten zeigten sehr unterschiedliche Schichtdicken, wie aus den SPR-Daten zu entnehmen ist. Auch die EIS-Daten sind schlecht reproduzierbar. Die mit Hilfe von Oberflächenplasmonen-Messungen gemessenen Schichtdicken liegen unter den theoretisch berechneten. Diese Ergebnisse sind auf die molekulare Struktur des Copolymers und damit auf dessen Verhalten während der Kompression bzw. den LB-Übertrag der Monoschichten zurückzuführen.

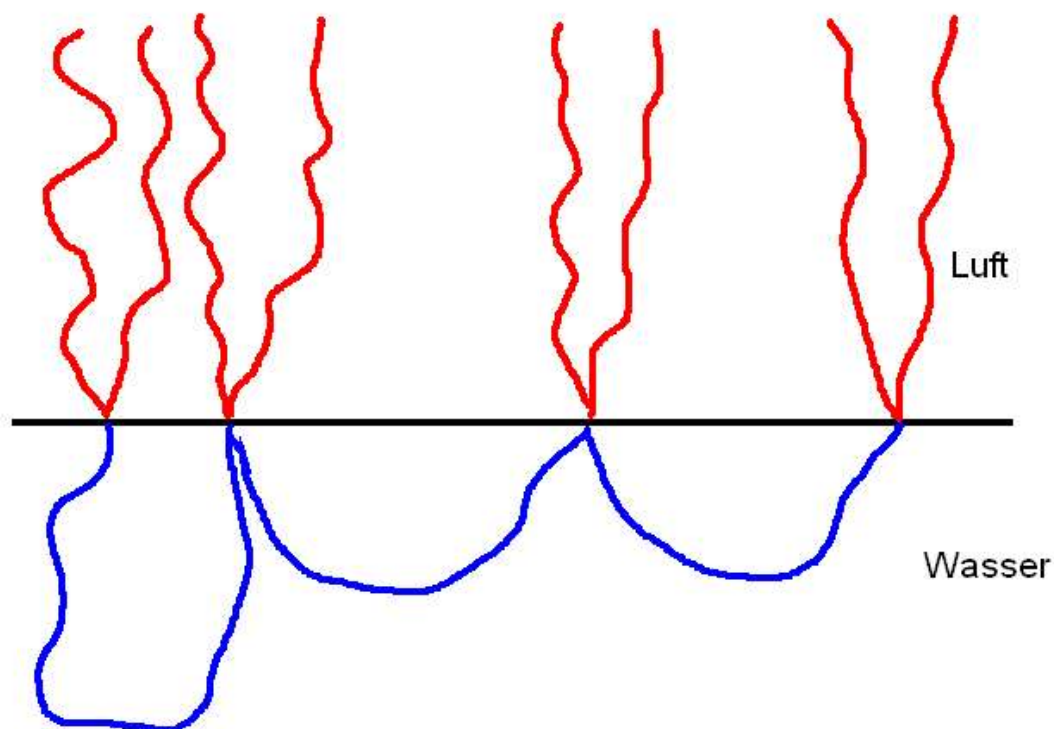


Abbildung 6-1 schematische Darstellung der Anordnung der Copolymer-Moleküle an der Wasser-Luft Grenzfläche (— Lipidkopfgruppe, — Glykosidanteil des Moleküls)

Abbildung 6-1 zeigt schematisch die Anordnung der Copolymere an der Wasser-Luft Grenzfläche. Die Copolymermoleküle enthalten pro Einzelmolekül zahlreiche

Lipidfunktionalitäten (20mol%) mit dazwischen angeordneten glykosidischen Polyacrylatketten (80mol%). Dieser Aufbau resultiert darin, dass sich das Molekül nicht in gestreckter Form an der Wasser-Luft-Grenzfläche anordnen kann. Die Lipidmoleküle sind durch die in die Subphase weisenden glykosidischen Gruppen schlaufenförmig verbunden. Dadurch ist eine dichte Packung der Lipidkopfgruppen aufgrund des Raumbedarfs des Glykosids in der wässrigen Subphase erschwert. Es kann also selbst durch Kompression nicht zu einer geschlossenen Lipidmonolage kommen. Die unregelmässige Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Teilen führt vor allem zu sehr inhomogenen Schichten. Das erklärt die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Copolymers.

Gänzlich unterschiedlich verhalten sich die Homopolymere. Ihre Struktur weist am Ende eines jeden glykosidfunktionalisierten Polyacrylats nur eine Dialkylaminogruppe auf. So können sich die Moleküle in gestreckter Form an der Wasser-Luft Grenzfläche anordnen und werden auch in dieser Form auf das Substrat übertragen.

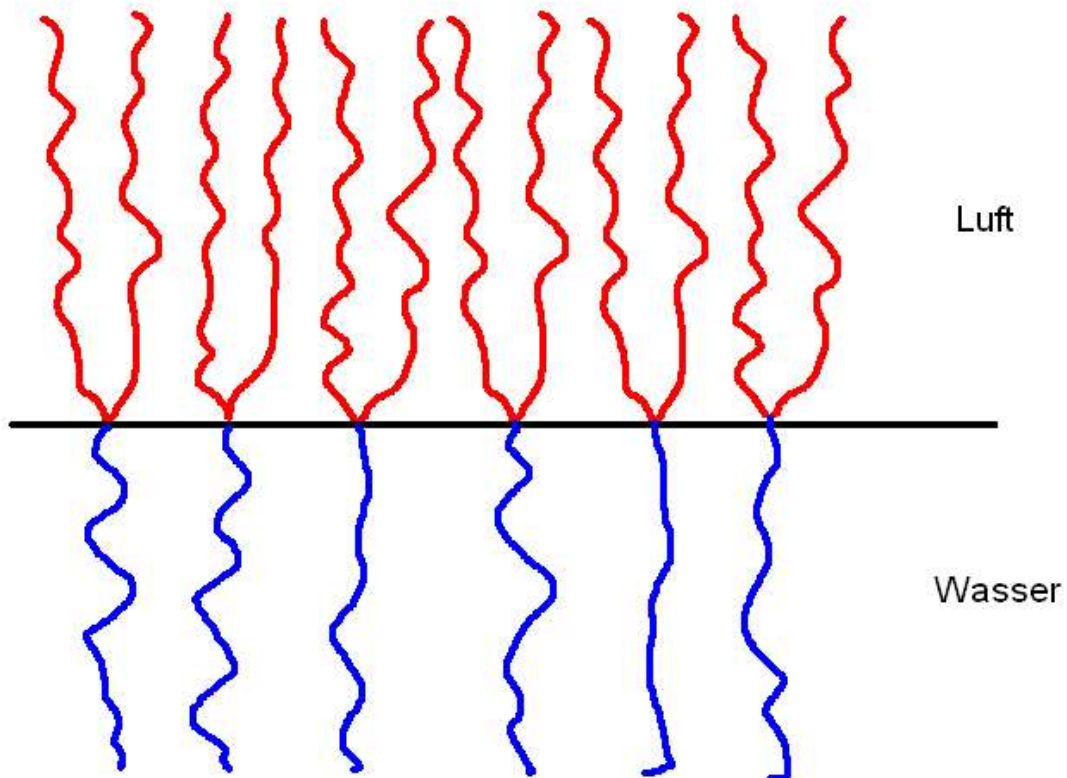


Abbildung 6-2 schematische Darstellung der Anordnung der Homopolymer-Moleküle an der Wasser-Luft Grenzfläche (— Lipidkopfgruppe, — Glykosidanteil des Moleküls)

Abbildung 6-2 verdeutlicht die schematische Anordnung der Homopolymer-Moleküle an der Wasser-Luft Grenzfläche. Der Aufbau der Moleküle bedingt die gezeigte Anordnung, die auch nach dem LB-Übertrag erhalten bleibt. Dadurch sind hauptsächlich die Enden des hydrophilen Teils der photochemisch aktiven Oberfläche zugewandt und werden vorzugsweise dort anbinden. Das Glykolipophomopolymer lässt sich auf die gleiche Packungsdichte komprimieren wie das Dialkylamin [Di-(octadecyl)-amin, DODA) ohne Glykosidanteil (Kapitel 4.1.3.3). Dieses Ergebnis zeigt, dass im Unterschied zum Copolymer der Lipidanteil für die Packungsdichte dominierend ist. Damit erklären sich auch die hydrophoben Eigenschaften der Monolayer, sowie die SPR- und elektrischen Daten. Diese bilden gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Vesikelfusion und Bildung eines Lipidbilayers. Ein starkes Indiz für dessen Bildung ist die Abnahme der Kapazität und die Zunahme des Widerstandes während der Vesikelfusion.

Tabelle 6-1 zeigt einen Überblick über die untersuchten Polymere:

	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]			R_m [$\text{M}\Omega\text{cm}$]		
Binäre Mischung	2±0,1			1,4±0,4		
Funktionalisierung Azid	7±3			0,2±0,15		
Polymermonoschicht	Co20	Ho5900	Ho9000	Co20	Ho5900	Ho9000
	18±7	2±0,2	2,1±0,15	0,04±0,01	11±2	6,5±0,5
Nach Vesikelfusion	35±5	1,7±0,2	1,6±0,2	0,014±0,003	18±1,8	10±1

Tabelle 6-1 Impedanzspektroskopische Daten der Polymere Co20, Ho5900 sowie Ho9000

Messungen der Fluoreszenzerholung nach Photobleichung (engl. fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) zeigen homogene aber nicht fluide Schichten. Aufgrund der vielversprechenden Untersuchungen des Homopolymers Ho5900 wurden die Untersuchungen mit dem Homopolymer Ho9000 fortgesetzt, das ein im Vergleich mit dem Ho5900 ein um einige Einheiten verlängertes Polymerrückgrat

mit glykosidisch verknüpften Glucosebausteinen aufweist und damit bei gestreckter Anordnung eine noch grössere Distanz zur Goldoberfläche ermöglicht. Diese Distanz ist im Hinblick auf spätere Möglichkeiten der Proteininkorporation in die Modellmembran erstrebenswert.

Nach ersten orientierenden Versuchen konnte wiederum die photochemisch kovalente Fixierung des Moleküls auf der Goldoberfläche zweifelsfrei durch SPR- sowie Impedanzmessungen nachgewiesen werden. Die Impedanzmessungen zeigen Werte, die sich wiederum in Bereichen der idealen Modellmembran bewegen. Vor allem konnte der erfolgreiche Einbau von Valinomycin durch Impedanzmessungen bestätigt werden. Ein Einbau von Valinomycin als Ionenporter ist ein sehr überzeugendes Indiz für die Bildung einer Membran. Der impedanzspektroskopische Nachweis des durch Valinomycin induzierten Kalium-Ionenports durch die Modellmembran bedarf einer dichten Barriere sowie einer submembran-Schicht, die als Ionenreservoir wirkt.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten die Bildung homogener Schichten. Diese Schichten sind jedoch im Bereich der proximalen Lipidschicht nicht fluide. Um die Fluidität in Anlehnung an die Eigenschaften der natürlichen Membranen zu erhöhen, wurden die photochemisch kovalent fixierten Anker-Glykolipopolymer-Moleküle durch Mischung mit freien Lipiden lateral verdünnt. Diese Verdünnung erfolgte bereits auf dem Langmuir-Blodgett-Trog durch Spreiten von Lösungen aus Glykolipopolymeren im Gemisch mit dem Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin. Nach Kompression konnten die gebildeten Monoschichten auf die präparierten Goldoberflächen übertragen werden. Auch die kovalente Fixierung der Glykolipopolymer-Bausteine innerhalb gemischten Schichten konnte erfolgreich demonstriert werden. Die durch Mischung des Homopolymers Ho9000 mit dem Lipid DiphytPC in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen hergestellten Schichten zeigten mit abnehmender Polymerkonzentration geringere optische Schichtdicken. Dieses Ergebnis ist angesichts eines geringeren Polymergehaltes der Schichten zu erwarten. Die Schichten zeigten sich jedoch, mit Ausnahme der Schichten aus 50mol% Homopolymer und 50mol% Lipid, inhomogen. Nach Photobleichung durch den Laserblitz kam es nur bei den 50mol%:50mol% -Schichten (Ho: Lipid) zur Erholung

der Fluoreszenz, was auf das Vorliegen von beweglichen Lipidmolekülen innerhalb der Membran schließen lässt. Der Versuch der Inkorporation von Valinomycin gelang ebenfalls lediglich in die Monoschicht einer Mischung aus 50mol% Homopolymer und 50mol% Lipid.

Alle genannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die molekulare Architektur der hergestellten Schichten durch die unterschiedlichen Längendimensionen des Homopolymer-Moleküls einerseits, sowie des Lipids andererseits nicht für alle Mischungsverhältnisse ausreichend stabil ist. Die für die kovalente Fixierung erforderliche Trocknung der Schicht führt zu einer deutlichen Verminderung des Wassergehaltes des Systems. Dieser resultiert offenbar in einer starken Destabilisierung der aufgebauten Schichten.

Insgesamt gesehen stellt somit die photochemische Fixierung der glykosidischen Homopolymer-Membranen ein vielversprechendes Modellsystem dar.

7 Anhang

Die Untersuchung der präparierten Schichten erfolgt im Rahmen dieser Arbeit durch Kombination der Oberflächenplasmonenspektroskopie (engl. surface plasmon resonance spectroscopy, SPR) mit der ebenfalls bereits beschriebenen Impedanz-Spektroskopie. Der kombinierte Messaufbau ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung von optischen und elektrischen Eigenschaften der untersuchten Schichten [Lingler 1998] [Schmidt 1998] [Wieder 2000].

Mit Hilfe der im Kapitel 2.2 beschriebenen Technik der Oberflächenplasmonen-Spektroskopie werden die optischen Schichtdicken der Schichten, sowie der Aufbau von Lipiddoppelschichten untersucht. Durch die Chemisorption der verwendeten Verbindungen kommt es zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels. Diese wird mit Hilfe der Fresnel-Gleichungen in eine Änderung der optischen Schichtdicke umgerechnet. [Pockrand 1978] [Raether 1988].

Die neben der SPR verwendete Technik der Impedanzspektroskopie soll zur Bestimmung der elektrochemischen Eigenschaften der untersuchten Schichten, insbesondere der Kapazität sowie des Widerstandes, herangezogen werden. Zur Auswertung der erhaltenen Messungen werden die erhaltenen Spektren mit entsprechenden Ersatzschaltkreisen angefüttet [MacDonald 1987].

7.1 Materialien

7.1.1 *Glykolipopolymere Co20/ Ho5900/ Ho9000*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polymere Ho5900, Ho9000 sowie Co20 wurden am IBM Almaden Research Center, CA in den USA von Stefan Schiller, Heide Götz et al. synthetisiert [Götz 2002]. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Polymere wurden ohne weitere Reinigungsschritte direkt verwendet.

7.1.2 *Lipide*

Das verwendete Eigelb PC wurde von der Firma Lipid Products bezogen. ES liegt in gelöster Form in Chloroform vor und wird bei -30°C gelagert.

1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DiphytPC) stammt von der Firma Avanti Polar Lipids, USA. Es liegt in pulverisierter Form vor, wird vor Verwendung hydratisiert und anschließend durch Extrusion in Vesikel umgesetzt.

7.1.3 Salze

Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Natriumhydroxid (NaOH), Magnesiumsulfat (MgSO₄), Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) wurden von der Firma Fluka bezogen und direkt verwendet.

7.1.4 Lösungsmittel

Ethanol, Chloroform, Dichlormethan und Methanol stammen von der Firma Riedel de Haen und weisen Chromasolv Qualität auf. Das verwendete N,N-Dimethylformamid stammt ebenfalls von Riedel de Haen, weist allerdings p.a. Qualität auf. Für alle Reinigungsschritte sowie die wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage der Firma Millipore (Milli-Q, R=18,2 MΩ/cm) verwendet.

7.1.5 Pufferlösungen

7.1.5.1 Vesikelpräparation

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Präparation der Vesikel ausschließlich durch Extrusionsverfahren. Das verwendete Eigelb PC, das in Chloroform gelöst vorliegt, wird mit Hilfe einer gasdichten Glasspritze der Firma Hamilton entnommen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels und der anschließenden Trocknung im Hochvakuum wird das Lipid in Pufferlösung hydratisiert. Dabei wurde eine Standzeit von mindestens einer Stunde gewählt während der häufiger im Vortexer (Fa. Heidolph, Modell Reax 2000) geschüttelt wurde. Nach Beendigung der Standzeit wurde ein weiteres Mal im Vortexer homogenisiert und anschließend die Vesikel extrudiert. Der Extruder stammt von der Firma Milsch, LiposoFast; die

Extrusion erfolgte durch einen Polycarbonat-Filter der Firma Milsch mit einer Porengrösse von 50nm. Die Lipiddispersion wurde 10-mal extrudiert.

7.2 Reinigung der Glasträger und thermische Bedampfung

7.2.1 *Reinigung neuer Glasträger*

Die Präparation der zu untersuchenden Schichten wird auf Glasträgern durchgeführt. Man verwendet entweder LaSFN9-Glas (n=1,845) für die Plasmonenmessungen oder alternativ BK7 Glas bei ausschließlicher Durchführung von Impedanz-Messungen. Die Reinigung der Glasträger werden vor der thermischen Bedampfung mit Gold nach folgendem Verfahren gereinigt [Wieder 1998]: die Träger werden zunächst in einem Färbekasten in 2% alkalischer Detergenzlösung (Hellmanex Lösung, Firma Helma) für 15min in einem Ultraschallbad gereinigt. Anschließend werden sie mehrfach gründlichst mit MQ-Wasser gespült, dabei auch einzeln mit einer Pinzette gefasst und unter dem fließenden Wasser abgespült. In einem frischen Färbekasten werden sie anschließend in reinem MQ-Wasser für weitere 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Wieder wird mit MQ-Wasser gespült. Die abschließende Reinigung erfolgt mit Ethanol 96%, in dem die Träger wiederum im Ultraschallbad für 15min beschallt werden. Alle Reinigungsschritte im Ultraschallbad erfolgen bei Raumtemperatur. Bis zu ihrer Verwendung werden die Glasträger unter Ethanol aufbewahrt.

7.2.2 *Reinigung bereits verwendeter Glasträger*

Da die für die optischen Messungen verwendeten LaSFN9 Gläser mehrfach verwendet werden, müssen sowohl vorhandene assemblierte Schichten, sowie auch aufgedampfte Gold- und Chromschichten entfernt werden. Im ersten Reinigungsschritt erfolgt die Ablösung der thermisch aufgedampften Goldschicht. Sie erfolgt mit einer stark oxidierenden Jodlösung, zusammengesetzt aus 20g Jod und 80g Kaliumjodid/ 1l MQ-Wasser. Die Glasträger werden in einem Färbekasten mit der Jodlösung versetzt und anschließend für 5min in ein Ultraschallbad gestellt. Danach spült man gründlich mit Wasser und entsorgt anfallende Abfälle bzw. Verfärbungen mit Thiosulfat-Lösung. Die nachfolgende Ablösung der

Chromadhäsionsschicht erfolgt mit der sogenannten Chromätze, einer Lösung aus 10g Ammoniumcernitrat in 50 ml MQ-Wasser.

Eine anschließende Reinigung der so behandelten LaSFN9 Träger erfolgt wie unter Reinigung der Glaträger bereits beschrieben.

7.2.3 Bedampfung

7.2.4 Gold auf BK7-Gläsern

In einer Aufdampfanlage der Firma Balzers (Fa.Edwards, Modell BAE 250) werden ca. 50nm Gold mit einer Rate von 0,1-0,2nm/s unter einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ mbar auf die gereinigten trockenen Glaträger aufgedampft. Die Zunahme der Goldschicht wird mit Hilfe eines Schwingquarzes verfolgt, der die aufgedampfte Golddicke dokumentiert. Nach einer Abkühlzeit von etwa 15 min wird die Anlage belüftet und die frisch bedampften Substrate sofort in die entsprechenden Assemblierungslösungen getaucht.

7.2.5 Gold auf LaSFN9-Gläsern

In einer Aufdampfanlage der Firma Balzers (Fa.Edwards, Modell BAE 250) werden zunächst 2-3nm Cr als Adhäsionsschicht thermisch aufgedampft. Anschließend erfolgt ein weiterer Aufdampfschritt von ca. 50nm Gold. Beide Aufdampfschritte werden mit einer Rate von 0,1-0,2 nm/s und unter einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ mbar aufgedampft. Nach einer Abkühlzeit von etwa 15 min wird die Anlage belüftet und die frisch bedampften Substrate sofort in die entsprechenden Assemblierungslösungen getaucht.

7.3 Probenpräparation

7.3.1 Assemblierung der verwendeten Spacer-Systeme

7.3.1.1 Assemblierung ausgehend von binärer Thiol-Mischung

Die frisch aufgedampften Goldträger werden direkt in eine methanolische Lösung aus 1-Hexanthiol und Bis-(Aminododecyl)-disulfid [Schiller 2001] getaucht, sie sind

dabei vollständig von der Assemblierungslösung bedeckt. Die verwendete Lösung wird zuvor frisch hergestellt. 18mg 1-Hexanthiol und anschließend 3,9mg des Disulfids werden in 100ml Methanol gelöst. Die Assemblierung der sogenannten binären Mischung erfolgt jeweils über Nacht mit einer Dauer von 16h. Nachdem die Träger in die Lösung eingetaucht wurden, wird der überstehende Raum des Färbekastens mit N₂ oder Argon befüllt und mit Parafilm abgedichtet. Nach dem Assemblierungsschritt werden die Träger einzeln entnommen, mit reinem Methanol mehrmals gespült und bis zur weiteren Verwendung einzeln in Kunststoff-Röhrchen (wiederum unter N₂ oder alternativ Argon-Atmosphäre) aufbewahrt.

7.3.1.2 Assemblierung ausgehend von Polyethylenglykol 3000

Die frisch bedampften Goldträger werden in einen Färbekasten in die ethanolische Lösung des Polyethylenglykol 3000 (PEG 3000)(c=1mg/ml) getaucht. Der für die Herstellung der Lösung verwendete Ethanol wird vor Verwendung mit Na₂SO₄ getrocknet. Die Assemblierung erfolgt in Zeiträumen von 24-70h. Die Assemblierungslösung mit enthaltenen Trägern im Färbekasten wird mit N₂ überschichtet und mit Parafilm abgedichtet. Nach dem Ende der Assemblierungszeit wird die Assemblierungslösung abgeschüttet und der Färbekasten mit reinem Ethanol befüllt. Es wird eine „Extraktion“ durchgeführt, bei der die Träger bei Raumtemperatur für ca. 1h in reinem Ethanol 96% stehen bleiben und anschließend wiederum mit Ethanol abgespült werden. Nach Trocknung im Stickstoffstrom werden die Träger bis zur weiteren Verwendung unter Argon aufbewahrt. Die Aufbewahrung unter Argon bis zur weiteren Verwendung ist in diesem Fall besonders wichtig, da Polyethylenglykole zur Quellung neigen und daher schon bei Lagerung an der Luft Wasser adsorbieren.

7.3.2 Assemblierung der photoreaktiven Verbindungen

Die durch Selbstorganisation hergestellten Schichten der jeweils untersuchten Abstandhaltersysteme werden in einem zweiten Assemblierungsschritt mit einer photoreaktiven Verbindung funktionalisiert. Es handelt sich entweder um 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid (Azid) oder um Benzophenon. Die erhaltenen Schichten

werden bis zum Übertrag des jeweils auf dem Langmuir-Blodgett Trog vororientierten Glykolipopolyers unter Lichtschutz aufbewahrt.

7.3.2.1 5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid

50mg 5-Azido-2-Nitrobenzoesäure werden in 10ml Rundkolben mit 50mg PCl_5 versetzt, es werden ca. 8ml Diethylether zugegeben und mehrere Minuten unter Lichtschutz geschüttelt. Ungelöstes PCl_5 sammelt sich nach dem Stehenlassen am Boden des Rundkolbens, die überstehende klare Lösung wird in einen sauberen Rundkolben abpipettiert. Der Ether wird am Rotationsverdampfer bei einer Wassertemperatur von etwa 30 °C abrotiert; der Druck wird nach vollständigem Abdampfen des Ethers bis auf 0mbar gesenkt. Der bräunliche Rückstand, das Säurechlorid (Azid), wird in 40ml CH_2Cl_2 gelöst und die Lösung auf die Assemblierungsgefäße verteilt. Pro Assemblierungsgefäß wird soviel Lösung eingefüllt, dass die zu beschichtenden goldbedampften Träger mit der Lösung vollständig bedeckt sind. Die Träger werden in die Lösung eingetaucht und die Gefäße mit Argon befüllt. Jedes Gefäß wird für die Dauer der Assemblierung mit Parafilm abgedichtet und mit Hilfe von Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach der Assemblierungszeit von etwa 18h wird die Lösung abgeschüttet und die Träger werden einzeln in Methylenchlorid gespült. Anschließend werden sie unter N_2 Atmosphäre in Kunststoffröhrchen unter Lichtschutz gelagert.

7.3.2.2 4-Benzoylbenzoesäurechlorid

1,33g 4-Benzoylbenzoesäure werden in einem 100ml Rundkolben mit 1,22g PCl_5 versetzt und in 10ml Diethylether gelöst. Der Kolben wird wenige Minuten geschüttelt, bis die Feststoffe gelöst sind. Anschließend wird der Diethylether am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von etwa 30°C abrotiert. Der Druck wird dabei allmählich auf 0mbar abgesenkt. Der getrocknete Rückstand, bestehend aus dem 4-Benzoylbenzoesäurechlorid, wird in 100ml Toluol aufgenommen. Die so vorbereitete Lösung wird in Assemblierungsgefäße gefüllt und die frisch aufgedampften Goldträger vollständig eingetaucht. Nach einer Reaktionszeit von 23h werden die Träger einzeln mit CH_2Cl_2 und Toluol gespült und unter N_2 Atmosphäre gelagert.

7.3.3 *Monolayerpräparation mit Polymer Ho5900/Ho9000*

7.3.3.1 Reinigung des Langmuir-Blodgett-Trog

Der Langmuir-Blodgett Trog wird zunächst mit einem mit Diethylether getränkten staubfreien Tuch ausgerieben. Danach wird er drei Mal mit MQ-Wasser komplett befüllt und das Wasser anschließend abgesaugt. Nach erneutem Befüllen des Troges mit MQ-Wasser wird die Reinheit der Wasseroberfläche mit Hilfe der Plattenmethode nach Wilhelmy überprüft [Wilhelmy 1863]. Erst wenn der Oberflächendruck auch nach dem Zusammenfahren der Barrieren nicht ansteigt wird mit der Spreitung der vorbereiteten Polymerlösung begonnen.

7.3.3.2 Spreitung

Auf die wässrige Subphase des gereinigten LB-Trogs wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze die in CHCl_3 gelöste Substanz dicht über der Wasseroberfläche aufgebracht. Der Druck sollte nach dem Aufbringen einen Wert von 1 mN/m nicht übersteigen. Je nach gewünschtem Zieldruck kann ein Start der Kompression bei höheren Filmdrücken notwendig werden. Nach Abschluß der Spreitung wird etwa 15 min gewartet, um dem Lösungsmittel Zeit zum vollständigen Verdampfen zu geben. Währenddessen wird der Oberflächendruck beobachtet. Stellen sich keine wesentlichen Änderungen mehr ein, kann mit der Kompression, sowie nachfolgend mit dem Übertrag der Schicht auf feste Substrate, begonnen werden.

7.3.3.3 Übertrag

Nach dem Spreiten wird der Polymerfilm mit Hilfe der beweglichen Barrieren des Troges bis zum gewünschten Zieldruck bzw. Übertragungsdruck komprimiert. Der Wert des Zieldrucks wird abhängig von der jeweils verwendeten amphiphilen Substanz mit Hilfe einer Isotherme ermittelt. Zum Übertrag der Monoschicht wird der zuvor in die Subphase abgesenkte Träger langsam durch die Grenzfläche

Wasser/Luft herausgezogen. Es kommt zum Übertrag der vororientierten Moleküle auf die präparierten Substrate.

7.3.3.4 Trocknung/ Anregung der photoreaktiven Verbindung zur kovalenten Anbindung des Monolayers

Nach dem Aufbringen der Monoschicht werden die Träger entweder ungetrocknet oder getrocknet (Trockenschrank 39°C 20h unter Vakuum) und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgt in senkrechter Anordnung zur Lampe. Die anzubindenden Schichten zeigen dabei in Richtung der UV-Lampe. Als Zeitrahmen wurde eine Dauer von 15min gewählt.

Die zur Bestrahlung der Substrate verwendete Lampe war eine Quecksilber-Hochdruck UV-Lampe (500W, Oriol).

7.3.4 Herstellung der Polymerlösungen Ho5900/ Ho9000

Die verwendeten Polymerlösungen werden in einer Konzentration von 1-2 mg/ml verwendet. Das feste pulverförmige Polymer wird in ein Meßkölbchen mit 1ml Inhalt eingewogen, als Lösungsmittel dienen zunächst wenige Tropfen Methanol, anschließend wird das Meßkölbchen langsam mit CHCl_3 unter ständigem vorsichtigem Umschütteln aufgefüllt. Ein leichtes Erwärmen der Lösungen kann notwendig werden, wenn sich einzelne Polymerpartikel nicht auflösen. Das Erwärmen wurde jedoch weitestgehend vermieden, um eine Zersetzung der Moleküle ausschließen zu können. Nach der Herstellung wird die Lösung umgeschüttelt und einige Zeit stehen gelassen, danach wird erneut homogenisiert.

7.4 Übertrag von Mischungen Polymer Ho9000/Lipid

Für den Übertrag von gemischten Monoschichten auf die bereits bekannten goldbedampften Glassubstrate wurde der Unterbau der binären Mischung verwendet. Die Präparation erfolgte analog 7.3.1.1. Als photoreaktive Verbindung wurde wiederum das Azid benutzt. Präparation erfolgte wie unter beschrieben. Auf die so vorbehandelten Goldträger werden mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik die gemischten Schichten aus Polymer Ho9000 und Lipid übertragen. Die Mischungen

wurden in unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Zunächst wurde eine frische Lösung des Polymers analog 7.3.4 hergestellt. Anschließend wurden die verschiedenen Mischungskonzentrationen hergestellt

7.4.1 Mischung mit Diphytanoylglycerin

Die Mischung aus Homopolymer Ho9000 und Lipidkomponente wurde mit dem Lipid Diphytanoyl-Glycerin (DPG) [Schiller 2004] hergestellt. Mit Hilfe der Langmuir-Technik wurde ein Gemisch aus 0,2mg/ml Ho9000 und 4mg/ml DPG übertragen. Es erfolgte zunächst ein Vorversuch der reinen physisorbierten Schicht, d.h. es erfolgte keine Bestrahlung der Träger mit UV-Licht. Die folgenden SPR Untersuchungen zeigten Schichtdicken- Werte der binären Mischung. Auch die Ergebnisse der durchgeführten IS Messungen lieferten Hinweise darauf, dass die Vesikelspreitung und Komplettierung der vermeintlichen Monoschicht zur Doppelschicht direkt auf der Mischung der Alkanthiole stattfanden. In einem weiteren Schritt sollten daher Anbindung und Eigenschaften gemischter angebundener Schichten untersucht werden.

7.4.2 Mischung mit 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin

Mischungen aus dem Homopolymer Ho9000 und 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DiphytPC) als Lipidkomponente wurden in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und ihre Eigenschaften durch SPR bzw. IS untersucht. Mit folgenden Mischungen erfolgte ein Übertrag als Monoschichten anschließende Untersuchungen .

Ho9000 80mol% DiphytPC 20mol%	Ho9000 50mol% DiphytPC 50mol%	Ho9000 20mol% DiphytPC 80mol%
1mg Polymer 0,0235mg Lipid	1mg Polymer 0,094mg Lipid	1mg Polymer 0,376mg Lipid

Tabelle 7-1: Einwaagen für die gemischten Lösungen aus Homopolymer Ho9000 und dem Lipid 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin

Stammlösung: DiphytPC 0,5876mg/ 500µl Chloroform bzw. 0,94mg DiphytPC/ 1000µl Chloroform. Zur Herstellung der Gemische werden jeweils 1 mg Ho9000 in ein 1ml Meßkölbchen eingewogen, mit wenigen Tropfen Methanol versetzt, anschließend wenige µl Chloroform zugegeben und abschließend die jeweils benötigten Mengen Lipidlösung eingewogen. Um den optimalen Übertragungsdruck für die Mischungen zu ermitteln wurden für jedes Gemisch vor jedem Übertrag Druck-Flächen Isothermen gemessen. Die gemessenen Druck-Flächen Isothermen dienen gleichzeitig als Kontrolle der Stabilität der verwendeten Lösungen.

7.4.3 Herstellung der 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin-Vesikel

1mg des verwendeten Lipids 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (lyophilized powder; M=846,27 Avanti Polar Lipids, Alabaster USA; 850356) wurden in ein gereinigtes Glasgefäß eingewogen und 1000µl ATPase Puffer zugesetzt. Die Lipidlösung wurde für mindestens 1h bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Vesikelherstellung erfolgt durch Extrusion durch 50nm Polycarbonat Filter der Firma Avanti Polar Lipids. Die fertige Vesikellösung bleibt etwa 7 Tage stabil; bei den meisten Versuchen wurde allerdings jeweils eine frische Lösung angesetzt.

7.4.4 Glasreinigung

Sowohl die verwendeten Glassubstrate aus LaSFN9-Glas der Firma Hellma (n=1,845) sowie die BK7-Gläser wurden vor der thermischen Bedampfung mit Gold nach folgendem Verfahren gereinigt [Wieder 1998]:

- Bei Raumtemperatur 15 min im Ultraschallbad (Fa. Sonorex, Modell Super RK 510H) in einer 2%igen Helmanex-Lösung, einer alkalischen Detergenzlösung (Fa. Helma)
- Mehrfaches Spülen mit Milli-Q Reinstwasser (Milli-Q-Anlage, Fa. Millipore, R=18,2 MΩ/cm)
- 15min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur in Milli-Q Wasser
- mehrfaches Spülen mit Milli-Q Reinstwasser
- 15min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur in Ethanol, Chromasolv Qualität (Fa. Riedel de Haen)

Die auf diese Art und Weise gereinigten Glassubstrate wurden im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in die Aufdampfanlage zur thermischen Bedampfung mit Gold eingebaut.

7.4.5 Gold auf LaSFN9-Glassubstraten

Die thermische Bedampfung von 50nm Gold auf die gereinigten Substrate wurde bei einem Druck von $p=1 \times 10^{-6}$ mbar in einer Aufdampfanlage der Firma Edwards (Modell FL400 mit Auto 306) durchgeführt. Die Aufdampftrate für die ersten 10nm der Goldschicht betrug 0,1nm/s; anschließend wurde die Rate auf 0,2-0,3nm/min erhöht. Das Anwachsen der Goldschicht wurde mit Hilfe eines Schwingquarzes verfolgt. Nach Erreichen der gewünschten Enddicke und einer Abkühlzeit von etwa 15min wurden die frisch bedampften Träger sofort in die entsprechenden Assemblierungslösungen getaucht.

7.5 Untersuchungsmethoden

7.5.1 Oberflächenplasmonen-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Monochromatisches Licht eines HeNe-Lasers der Firma Uniphase, Modell 1105P ($\lambda=632,8\text{nm}$) wird mit Hilfe eines mechanischen Choppers (Fa. EG&G, Modell 197) rechteckmoduliert. Ein Polarisator wird zur Einstellung der Laserintensität verwendet. Mit einem zweiten Polarisator (Fa. Halle) wird das Licht p-polarisiert.

In der Abbildung ist eine schematische Darstellung des kombinierten Messaufbaus der Oberflächenplasmonen- sowie Impedanz-Spektroskopie wiedergegeben. Der Laserstrahl trifft auf ein Prisma (Fa. Spindler & Hoyer, $n=1,845$). Das Prisma ist mit Immersionsöl (Fa. Cargille Laboratories, $n=1,9$) an einen Glasträger optisch gekoppelt. Prisma, Immersionsöl sowie der Objektträger besitzen denselben Brechungsindex. Auf der dem Prisma abgewandten Seite des Glasträgers befindet sich eine thermisch aufgedampfte Goldschicht der Dicke $d=50\text{nm}$ sowie eine gekoppelte Probenschicht, die als Dielektrikum wirkt. Das von der Probe reflektierte Licht wird durch eine Linse der Brennweite $f=50\text{mm}$ auf eine Photodiode fokussiert. Das Signal wird mit Hilfe eines Lock-In Verstärkers (Fa. EG&G, Modell 5210) gemessen und mit Hilfe eines Rechners aufgezeichnet. Probe und Photodiode sind auf einem Zweikreisgoniometer (Fa. Huber) montiert und werden mit 5-Phasen-

Schrittmotoren (Fa. Huber, $\Delta\theta = 1/1000^\circ$ im $\theta/2\theta$ -Modus bewegt, deren Steuerung über einen zweiten Rechner erfolgt.

7.5.2 Impedanz-Spektroskopie (IS)

Die Impedanzmessungen wurden mit Hilfe einer Kombination eines Potentiostaten (Fa. EG&G, Typ 273 A) mit einem Frequenz-Generator-Analysator (Fa. Solatron, SI 1269) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte mit Hilfe des Programms Zplot (Fa. Scribner Associates, Inc., Charlottesville, USA, Version 2.1b), die Auswertung der gemessenen Daten mit dem Auswerteprogramm Zview (Fa. Scribner Associates, Inc., Charlottesville, USA, Version 2.1b). Alle Impedanzmessungen fanden in einer Drei-Elektroden-Anordnung bestehend aus einer Arbeitselektrode WE (aufgedampfte Goldschicht), einer Gegenelektrode (Pt-Draht) sowie einer Referenzelektrode (Ag/AgCl/3M NaCl; Fa. Bioanalytical Systems, Modell Re-5) statt. Die Amplitude der E_0 der Wechselspannung wurde so gewählt, dass eine Störung des Systems weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Bei allen durchgeführten Messungen betrug die Wechselspannung $E_0 = 10\text{mV}$; der Frequenzbereich lag zwischen 50kHz und 1MHz. Jede Frequenz wurde während zweier Zyklen gemessen.

7.5.3 Fluoreszenzerholung nach Photobleichung

Die für die Fluoreszenzerholung nach Photobleichung (FRAP)-Messungen präparierten Schichten wurden mittels Langmuir-Schäfer-Transfer zur Doppelschicht komplettiert. Die jeweils verwendeten Lipide wurden mit 1 mol% 1-Myristoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] Dodecanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin (NBD-PE) gemischt. Die Lipidmischung wurde auf dem Langmuir-Blodgett Trog gespreitet und bis zu einem Zieldruck von 25mN/m komprimiert. Die Träger wurden anschließend vorsichtig mit einer Pinzette bis dicht über die Oberfläche gebracht und anschließend durch die Lipidschicht getaucht. In der Subphase angekommen wurden sie in spezielle Glasschälchen überführt, die einen Transport unter wässrigen Bedingungen ermöglichten und anschließend so rasch wie möglich gemessen. Die Messungen wurden in einer selbstgebauten

Messanordnung durchgeführt. Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde ein optisches Mikroskop der Fa. Olympus (Olympus IX 70) verwendet. Die Probe wurde mit einer Hochdruckquecksilberlampe (Olympus HBO 100) in Kombination mit einem Filter (470-490 nm) bestrahlt. Das emittierte Licht wurde durch einen Filter (BA 515 nm) auf eine Kamera gelenkt (Photonic Sciences) und durch eine frame grabber card (Scion) digitalisiert. Für die Messungen wurde mit Hilfe der 488 nm Linie eines Argon Lasers (Innova, Coherent) ein spot von 4,2µm Durchmesser gebleicht. Das emittierte Licht wurde mit einem Photomultiplier gemessen (Thorn EMI). Um zusätzliche bleichende Anteile während der Messungen auszuschließen wird die Laser Intensität durch eine Reihe von Pockel Zellen und linearen Polarisatoren (Gsänger) reduziert. Das Ausbleichen wird durch einen kurzen Puls (ca 60 ms) der nicht-modulierten Laserintensität (typischerweise 1 Watt) durchgeführt.

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Modell von Axelrod [Axelrod et al Biophysical Journal, 16, 1976, p.1055-1069] analysiert. Die lateralen Diffusionskoeffizienten sowie die Erholung (relative recovery) wurden durch die Simulation durch einen Marquart-Levenberg Algorithmus ermittelt.

8 Literaturverzeichnis

- [Abramovich 1972] Abramovich R.A., Challand S.R., Scriven E.F.V.. 1972. Mechanism of intermolecular aromatic substitution by aryl nitrenes. *Journal of American Chemical Society*. 94. 1374-1376
- [Adam 1997] Adam A.W. Gast A.P. 1997 *Physical chemistry of surfaces* John Wiley & Sons Inc.
- [Albertson 1986] Albertson P.A.. 1986. Partition of cell particles and macromolecules. John Wiley & Sons Inc.. .
- [Alcantar 2000] Alcantar N.A., Erady S.A., Israelachvili J.N.. 2000. PEG -coated biocompatible surfaces. *J. of Biomed. Mat. Res.* . 51. 343-351
- [Andrade 1996] Andrade J.D, Hlady V., Jeon S.I.. 1996. PEG and protein resistance: principles, problems, possibilities. *Adv. Chem. Ser.*. 248. 51-59
- [Arnold 1990] Arnold K et al.. 1990. Exclusion of PEG from liposome surfaces. *Biochim. Biophys. Acta*. 1022. 303-310
- [Baekmark 1995] Baekmark T.R. et al.. 1999. A systematic infrared reflection-absorption spectroscopy and film balance study of the phase behaviour of lipopolymer monolayers at the air water interface. *Langmuir*. 15. 3616
- [Bai 1989] Bain C.D., Whitesides G.M.. 1989. Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Adv. Materials*. 4. 110
- [Banks 1972] Banks R.E., Sparkes G.R.. 1972. Studies in azide chemistry. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans.1*. 1972. 2964-2970
- [Bartlett 2001] Bartlett M.A., Yan M.D.. 2001. Fabrication of polymer thin films and arrays with spatial and topographical controls. *Advanced materials*. 13 no. 19. 1449-1451
- [Bayley 1983] Bayley H.. 1983. *Photogenerated reagents in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Elsevier. .

- [Beyer 1996] Beyer D. et al.. 1996. Influence of anchor lipids on the homogeneity and mobility of lipid bilayers on thin polymer films. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35. 1682-1685
- [Blume 1990] Blume G., Cevc G.. 1990. Liposomes for the sustained drug release for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *Biochim.Biophys.Acta.* 1029. 91-97
- [Bora 2002] Bora U., Kannan K., Nahar P.. 2002. Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *J. of immunological methods.* 268 (2). 171-177
- [Breslow 1980] Breslow R.. 1980. Biomimetic control of chemical sensitivity. *Acc. Chem. Res.* 13. 170-177
- [Breslow 1986] Breslow R.. 1986. Artificial enzymes and enzyme models. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Bio.* 58. 1-60
- [Brunner 1983] Brunner J.. 1993. New photolabeling and crosslinking methods. *Annu. Rev. Biochem.* 62. 483-514
- [Chung 2002] Chung TW et.al. 2002. Growth of endothelial cells on photochemically grafted GRGD chitosans. *Biomaterials.* 23 (24). 4803-4809
- [Coffman 2002] Coffman J.P., Naumann C.A.. 2002. Molecular weight dependence of viscoelastic properties in two-dimensional physical polymer networks: amphiphilic lipopolymer monolayers at the air-water interface. *Macromolecules.* 35. 1835-1839
- [Cornell 1997] Cornell B.A. et al. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature.* 387. 580-583
- [Defife 1999] DeFife KM. et al.. 1999. Effects of photchemically immobilized polymer coatings on protein adsorption. *J. of Biomedical Materials Research.* 44. 298-307
- [deGennes 1980] deGennes P.G.. 1980. Conformation of polymers attached to an interface. *Macromolecules.* 13. 1069-1075

- [Demaille 1999] Demaille C., Moiroux J.. 1999. Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly (ethylene glycol). *J. Phys. Chem. B.* 103. 9903-9909
- [IDE 1999] IDE M., Yoshikawa D., Maeda Y. . 1998. State of water inside and at the surface of poly(ethylene glycol) films examined by FT-IR. *Langmuir*. 15. 926-929
- [Dietrich 1995] Dietrich C., Tampé R.. 1995. Charge determination of membrane molecules in polymer-supported lipid layers. *Biochim. Biophys. Acta*. 1238. 183-191
- [Dormán 1994] Dormán G., Prestwich G.D.. 1994. Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry*. 33. 5661-5673
- [Draeger 2001] Draeger C.. 2001. Mesoskopische Micellen aus amphiphilen Bipyridylkomplexen von Ruthenium(II), Osmium(II) und Palladium(II). FU Berlin: Dissertation . .
- [Du 1997] Du H.Chandaroy, P. Hui S.W.. 1997. Grafted PEG on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta*. 1326. 236-248
- [Dunkin 1982] Dunkin I.R., Thomson P.C.P.. 1982. Pentafluorophenyl nitrene: a matrix isolated aryl nitrene that does not undergo ring expansion. *Journal of Chemical Society, Chem. Commun.* 1982. 1192-1193
- [Elender 1996] Elender G., Kühner M., Sackmann E.. 1996. Functionalization of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosens.Bioelectron.* . 11. 565-577
- [Elender 1996] Elender G.. 1996. Präparation und Charakterisierung ultradünner Polymerfilme an der Wasser-Luft Grenzfläche und auf Festkörperoberflächen. Universität München: Dissertation . .
- [Erdtmann 1994] Erdtmann M., Keller R., Baumann H.. 1994. Photochemical immobilization of heparin, dermatan sulphate, Dextran sulphate and endothelial cell surface heparan sulphate onto cellulose membranes for the preparation of athrombogenic and antithrombogenic polymers. *Biomaterials*. 15. 1043-1048

- [Finklea 1996] Finklea H.O.. 1996. Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes. *Electroanalytical Chemistry* NY. 19. 191-368
- [Flores 2003] Flores A. et al. 2003. The dioctadecyl monolayer: textures, phase transitions, and dendritic growth. *Journal of chemical physics*. 119. 5644-5653
- [Foreman 2003] Foreman M.B. et al. 2003. Gelation of amphiphilic lipopolymers at the air-water interface: 2D analogue to 3D gelation of colloidal systems with grafted polymer chains. *Langmuir* . 19. 326-332
- [Frank 1774] Franklin B.. 1774. Of the Stilling of Waves by means of Oil. *Phil.Trans.R. Soc. London*. 64. 445-460
- [Gaines 1982] Gaines Jr. 1982. Langmuir–Blodgett films of long-chain amines. *Nature (London)*. 298. 544
- [Galardy 1974] Galardy R.E. et al. 1974. Photoaffinity labeling of peptide hormone binding sites. *J. Biolog. Chem.*. 249. 3510-3518
- [Ganguly 1997] Ganguly P., Paranjape D.V., Rondelez F.. 1997. Role of tail-tail interactions versus head-group-subphase interactions in pressure-area isotherms of fatty amines at the air water interface 1.influence of subphase acid counterions. *Langmuir*. 13. 5433-5439
- [Ganguly 1997] Ganguly P. et al. 1997. Role of tail-tail interactions versus head-group-subphase interactions in pressure-area isotherms of fatty amines at the air water interface 2.Time dependence. *Langmuir*. 13. 5440-5446
- [[Gritsan 2001] Gritsan N.P et al. 2001. A Laser flash photolysis and quantum chemical study of the fluorinated derivatives of singlet phenylnitrene. *J. Am. Chem. Soc.*. 123. 1951-1962
- [Guidelli 2001] Guidelli R.et al. 2001. Bioelectrochemistry at metal/water interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 504. Jan 28
- [Halperin 1999] Halperin A.. 1999. Polymer brushes that resist adsorption of model proteins: design parameters. *Langmuir*. 15. 2525-2533
- [Hamann 1985] Hamann C.H., Vielstich W.. 1985. *Elektrochemie I*. Weinheim: VCH-Verlag. .

- [Harkins 1952] Harkins W.D.. 1952. The physical chemistry of interfaces. Reihold 1952. .
- [Harris 1992] Harris J.M.. 1992. Poly(ethylene glycol) Chemistry. New York: Plenum Press. .
- [Hexter 1971] Hexter C.S., Westheimer F.H.. 1971. Intermolecular Reaction during Photolysis of Diazoacetyl alpha-Chymotrypsin . Journal of Biological Chemistry. 246. 3928-3933
- [Hongbo 2000] Hongbo B.L., Campbell C.T., Castner D.G.. 2000. Attachment of functionalized poly(ethylene glycol) films to gold surfaces. Langmuir . 16. 1711-1718
- [Hristova 1995] Hristova K., Needham D.. 1995. Phase behaviour of a lipid/polymer-lipid mixture in aqueous medium. Macromolecules. 1995. 991-1002
- [Israe 1991] Israelachvili J. . 1991. Intermolecular & Surface Forces, 2.Auflage. Academic Press New York. .
- [Jeon 1991] Jeon S.I., Andrade J.D. . 1991. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide : II. Effect of protein size. J. Colloid Interface Sci.. 142. 159-166
- [Jin 1995] Jin H.L., Hai B.L., Andrade J.D.. 1995. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. Prog. Polym. Sci.. 20. 1043-1079
- [Jung 1998] Jung C. et al. 1998. Self-Assembled Monolayers from Organosulfur Compounds: A Comparison between Sulfides, Disulfides, and Thiols. Langmuir. 14. 1103-1107
- [Jung 1998] Jung. 1998. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. Langmuir . 14. 5636-5648
- [Kaganer 1999] Kaganer V.M., Möhwald H., Dutta P.. 1999. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. Rev. Mod. Phys.. 71. 779-819
- [Karlson 1994] Karlson P., Doenecke D., Koolmann J.. 1994. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart: Thieme Verlag. 14.Auflage.

- [Ke 2001] Ke P.C., Naumann C.A.. 2001. Single molecule fluorescence imaging of phospholipid monolayers at the air-water interface. *Langmuir* . 17. 3727-3733
- [Ke 2001a] Ke P.C., Naumann C.A.. 2001. Hindered diffusion in polymer-tethered phospholipid monolayers at the air-water interface: a single molecule fluorescence study. *Langmuir* . 17. 5076-5081
- [Keana 1990] Keana J.F.W., Cai S.X.. 1990. New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides. *Journal of Organic Chemistry*. 55. 3640-3647
- [Keana 1990] Keana J., Cai S.X.. 1990. New Reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides. *J. Org. Chem*. 55. 3640-3647
- [Knoll 2000] Knoll W. et al.. 2000. Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 74. 137-158
- [Kotzyba-Hibert 1995] Kotzyba-Hibert F., Kapfer I., Goeldner M.. 1995. Neue Entwicklungen bei der Photoaffinitätsmarkierung. *Angewandte Chemie*. 107. 1391-1408
- [Kretschmann 1971] Kretschmann E.. 1971. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Z.Physik*. 241. 313-324
- [Kuhl 1994] Kuhl T.L. et al. 1994. Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained ethylene oxide headgroups. *Biophys. J.* 66. 1479-1488
- [Kuhl 1998] Kuhl T.L. et al. 1998. A neutron reflectivity study of polymer-modified phospholipid monolayers at the solid-solution interface: PEG-lipids on silane modified substrates. *Biophys. J.* 75. 2352-2362
- [Kühner 1994] Kühner M, Tampé R., Sackmann E.. 1994. Lipid mono- and bilayer supported on polymer films. *Biophys. J.* . 67. 217-226

- [Kühner 1994] Kühner M., Tampé R., Sackmann E.. 1994. Lipid mono- and bilayer supported on polymer films: composite polymer-lipid films on solid substrates. *Biophysical Journal*. 67. 217-226
- [Kym 1993] Kym. 1993. Progesterin 16,17- dioxalane ketals as molecular probes for the progesterone receptor. *Journal of medical chemistry*. 36. 1111-1119
- [Lang 1917] Langmuir I.. 1917. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. *J.Am.Chem.Soc.* . 39. 1848-1906
- [Lang 1920] Langmuir I.. 1920. The mechanism of the surface phenomena of flotation. *Trans.Faraday Soc.*. 15. 62-74
- [Lasic 1991] Lasic D.D. et al. 1991. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim.Biophys.Acta*. 1070. 187-192
- [Lauer 2001] Lauer H.. 2001. Die molekulare Architektur von Thiopeptid- und Thiolipopeptidmonoschichten auf Goldoberflächen und ihre Verwendung als Spacersysteme für festkörpergestützte Lipiddoppelschichten. Uni Mainz: Dissertation . .
- [Lingler 1997] Lingler S. et al. 1997. Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold. *Langmuir*. 13. 7085-7091
- [Löw 1998] Löw N. . . Polynukleare Metall(II)-Chelatkomplexe durch Spontane Selbstorganisation: metalla-Kronenether und ihre Einschluß-Komplexe, Tetranukleare und Octanukleare Metall-Chelate. Uni Erlangen: Dissertation. .
- [Macdonald 1987] Macdonald J.R.. 1987. Impedance Spectroscopy- Emphasizing Solid Materials and Systems. John Wiley & Sons Inc.. .
- [Majewski 1998] Majewski J. et al.. 1998. Structural studies of polymer-cushioned lipid bilayers. *Biophys. J.*. 75. 2363-2367
- [Markovic 1990] Markovic D.Z., Durand T., Patterson L.K.. 1990. Hydrogen abstraction from lipids by triplet states of derivatized benzophenone photosensitizers. *Photochem. Photobiol.*. 51. 389-394

- [Montecucco 1986] Montecucco C., Schiavo G.. 1986. 1-Palmitoyl-2-(p-benzoyl)benzoyl phosphatidylcholine, a photoactive phospholipid for the labelling of membrane components. *Biochem J.* 237. 309-312
- [Mortimer 1987] Mortimer C.E.. 1987. *Chemie*. Stuttgart: Thieme Verlag. 5.Auflage.
- [Müller 2003] Müller C.. 2003. Untersuchungen über zwei Enzyme der plastidären Isoprenoidbiosynthese: DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase. *Karls. Beitr. Pflanzenphysiol.* 39. 1-129
- [Munro 2003] Munro J.C., Frank C.W. . 2003. Adsorption of disulfide-modified polyacrylamides to gold and silver surfaces as cushions for polymer-supported lipid bilayers. *Polymer*. 44. 6335-6344
- [Mutschler 1996] Mutschler E., Schäfer-Korting M.. 1996. *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 7.Auflage.
- [Naumann 1999] Naumann C.A. et al. 1999. Viscoelastic properties of lipopolymers at the air-water interface: a combined interfacial stress rheometer and film balance study. *Langmuir*. 15. 7752
- [Naumann 2001] Naumann C.A.. 2001. Two dimensional physical networks of lipopolymers at the air/water interface: correlation of molecular structure and surface rheological behaviour. *Langmuir* . 17. 2801-2806
- [Naumann 2001] Naumann C.A., Knoll W., Frank C.W.. 2001. Hindered diffusion in polymer-tethered membranes: a monolayer study at the air-water interface. *Biomacromolecules*. 2. 1097-1103
- [Naumann 2002] Naumann C.A. et al. 2002. The polymer supported phospholipid bilayer: tethering as a new approach to substrate-membrane stabilization. *Biomacromolecules*. 3. 27-35
- [Nuzzo 1983] Nuzzo R.G., Allara D.L. . 1983. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J.Am.Chem.Soc.* . 105. 4481-4483
- [Page 1986] Page M.G., Rosenbusch J.P.. 1986. Topographic labelling of pore-forming proteins from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem J.* 235. 651-661

- [[Pertsin 2000] Pertsin A., M. Grunze. 2000. Computer simulation of water near the surface of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*. 16. 8829-8841
- [Pockrand 1978] Pockrand I. 1978. Surface plasma oscillations at silver surfaces with thin transparent and absorbing coatings. *Surface Science*. 72. 577-588
- [Pockrand 1978] Pockrand I. 1978. Surface plasma oscillations at silver surfaces with thin transparent and absorbing coatings. *Surface Science*. 72. 577-588
- [Prime 1991] Prime K.L., Whitesides G.M.. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*. 252. 1164-1167
- [Prucker 1999] Prucker O. et al. 1999. Photochemical attachment of polymer films to solid surfaces via monolayers of benzophenone derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 121. 8766-8770
- [Pschyrembel 1994] Hildebrandt H.. 1994. *Pschyrembel*. Berlin: Walter de Gruyter. 257. Auflage.
- [Raguse 1998] Raguse B. et al. 1998. Tethered lipid bilayer membranes: formation and ionic reservoir characterization. *Langmuir*. 14. 648-659
- [Rale 1899] Lord Raleigh. 1899. Investigations in Capillarity:-the size of drops.-the liberation of gas from supersaturated solutions.-Colliding Jets.-The tension of contaminated water surfaces. *Phil. Mag.* 48. 321-337
- [Raviv 2002] Raviv U. et al. 2002. Properties and interactions of physigrafted end-functionalized Poly(ethylene glycol) layers. *Langmuir*. 18. 7482-7495
- [Rex 1998] Rex S. et al. 1998. Experimental and monte carlo simulation studies of the thermodynamics of polyethyleneglycol chains grafted to lipid bilayers. *Biophys. J.* 75. 2900-2914
- [Sackmann 1996] Sackmann E.. 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*. 271. 43-48

- [Salafsky 1996] Salafsky J., Groves JT., Boxer SG.. 1996. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers. *Biochemistry*. 35. 14773-14781
- [Schmitt 1994] Schmitt L., Dietrich C., Tampé R.. 1994. Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. *J. Am. Chem. Soc.*. 116. 8485-8491
- [Schwuger 1996] Schwuger M.J.. 1996. *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*. Stuttgart: Thieme Verlag . .
- [Shen 2001] Shen W.W et al. 2001. Polymer-supported lipid bilayers on benzophenone-modified substrates. *Biomacromolecules*. 2. 70-79
- [Sin 1972] Singer S.J., Nicholson G.L. . 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175. 720-731
- [Singh 1962] Singh A., Thornton E., Westheimer F.. 1962. The photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.*. 237. 3006-3008
- [Skoog 1996] Skoog D.A., Leary J.J.. 1996. *Instrumentelle Analytik*. Berlin: Springer Verlag. 4. Auflage.
- [Sleifzer 1996] Sleifzer I. 1996. Polymers and proteins: interactions at interfaces. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*. 2. 337-344
- [Spinke1992] Spinke J. et al. 1992. Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study. *Biophys. J.* . 63. 1385-1392
- [Steinem 1996] Steinem C. et al. 1996. Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. *Biochim.Biophys.Acta*. 1279. 169-180
- [Stelzle 1993] Stelzle M., Weissmüller G., Sackmann E.. 1993. On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. *J. Phys. Chem.* . 97. 2974-2981
- [Stora 2000] Stora T. et al. 2000. Histidine-tagged amphiphiles for the reversible formation of lipid bilayer aggregates on chelator-functionalized gold surfaces. *Langmuir*. 16. 5471-5478

- [Stryer 1995] Stryer L.. 1995. Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 4.Auflage.
- [Tabo 1980] Tabor D.. 1980. Babylonian Lecanomanancy: An ancient text on the Spreading of oil on water. *J. Colloid Interface Sci.* 75. 240-245
- [Tanf 1973] Tanford C.. 1973. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. New York: Wiley-Interscience . .
- [Taunton 1988] Taunton H.J. et al. 1988. Forces between surfaces bearing terminally anchored polymer chains in good solvents. *Nature (London)*. 332. 712-714
- [Tsao 2003] Tsao M., Platz M.S.. 2003. Photochemistry of ortho, ortho-Dialkyl phenyl azides. *J. Am. Chem. Soc.* 125. 12014-12025
- [Turro 1991] Turro N.J.. 1991. Modern Molecular Photochemistry. Mill Valley: University Science Books. . 296-361
- [Ulm 1991] Ulman A.. 1991. An introduction to ultrathin organic films: From LB to self-assembly. San Diego: Academic Press . .
- [Ulman 1991] Ulman A.. 1991. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. San Diego: Academic Press . .
- [Veith 1995] Veith M.. 1995. Wechselwirkungen von Oberflächenpolaritionen mit periodisch modulierten Grenzflächen. Universität Mainz: Dissertation . .
- [Wagner 2000] Wagner M.L., Tamm L.K.. 2000. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins. *Biophys. J.* . 79. 1400-1414
- [Wang 1997] Wang R.L.C., Kreuzer H.J., Grunze M.. 1997. Molecular conformation and solvation of oligo (ethylene glycol)- terminated self-assembled monolayers and their resistance to protein adsorption. *J.Phys.Chem.B*. 101. 9767-9773
- [Webber 1990] Webber S.E. et al. 1990. Proton harvesting polymers. *Chem.Rev.* 90. 1469-1482
- [Webber 1990] Webber S.E.. 1990. Proton harvesting polymers. *Chemical Review*. 90. 1469-1482

- [Wiegand 2002] Wiegand G. et al. 2002. Electrical properties of supported lipid bilayer membranes. *J.Phys.Chem.B.* 106. 4245-4254
- [Wiesenthal 1999] Wiesenthal T., Baekmark T.R., Merkel R.. 1999. Direct evidence for a lipid alkyl chain ordering transition in Poly(ethylene oxide) lipopolymer monolayers at the air-water interface obtained from IR absorption spectroscopy. *Langmuir.* 15. 6837
- [Williams 1986] Williams N., Ackerman S.H., Coleman P.S.. 1986. Benzophenone-ATP: A photoaffinity label for the active site of ATPases. *Methods Enzymol.* 126. 667-682
- [Wong 1999] Wong et al.. 1999. Polymer-cushioned bilayers. I. Structural study of various preparation methods using neutron reflectometry. *Biophys. J.* 77. 1445-1457
- [Woodle 1992] Woodle M.C, Lasic D.D.. 1992. Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113. 171-199
- [Yamamoto 1993] Yamamoto M. et al. 1993. Selective Photolabeling near the Middle of Bilayers with a Photosensitive Transmembrane Probe. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32. 259-260
- [Zolk 2000] Zolk M. et al. 2000. Solvation of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers studied by vibrational sum frequency spectroscopy. *Langmuir.* 16. 5849-5852
- [Zwahlen 2003] Zwahlen M.. 2003. Conformational order in oligo(ethylene glycol)-terminated self assembled monolayers on gold determined by soft x-ray absorption. *Langmuir* . 19. 9305-9310
- [Zwahlen 2003] Zwahlen M. et al. 2003. Conformational order in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold determined by soft x-ray absorption. *Langmuir.* 19. 9305-9310

8.1 weitere verwendete Literatur

Gölander C.G. et al. 1992. Properties of immobilized PEG films and the interaction with proteins. *Polyethyleneglycol Chemistry.* .

Baszkin A., Norde W. (Editoren). 2000. Physical chemistry of biological interfaces. New York: Marcel Dekker. .

Sinner A., Offenhäusser A.. 1998. The electrical characterization of supported phospholipid bilayers using titanium/titanium oxide microelectrodes. Thin solid films. 327-329. 758-761

Schmitdt E.K.. 1998. Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen. Uni Hannover: Dissertation . .

Wieder H.. 2000. Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen auf Gold zur Rekonstitution von Membranproteinen. Universität Mainz: Dissertation . .

Lingler S.. 1998. Entwicklung und Charakterisierung von festkörperunterstützten Modellmembranen zur Rekonstitution von Valinomycin und F0F1-ATPase. Universität Mainz: Dissertation . .

Schmitdt E.K.. 1998. Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen. Uni Hannover: Dissertation . .

Wieder H.. 2000. Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen auf Gold zur Rekonstitution von Membranproteinen. Universität Mainz: Dissertation . .

Raether H.. 1988. Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings . Berlin: Springer Verlag. .

Macdonald J.R.. 1987. Impedance spectroscopy- emphasizing solid materials and systems. John Wiley & Sons, Inc.. .

9 Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeiner Teil	6
1.1	Biologische Lipidmembranen	6
1.2	Biomimetik der Lipidmembranen	7
1.3	Modellsysteme	8
1.3.1	Liposomen	8
1.3.2	Black lipid membranes (Schwarzfilmmembranen)	10
1.3.3	Festkörperunterstützte Membranen	10
1.3.4	Membransysteme mit Abstandhaltermolekülen	11
1.4	Polymerunterstützte Membranen	12
1.4.1	Polyethylenglycol	14
1.4.1.1	Anwendungsgebiete für Polyethylenglycol	14
1.4.1.2	Polyethylenglycol als Basis für Modellmembransysteme	16
1.4.2	Lipopolymere	16
1.4.2.1	Einsatz von Lipopolymeren als Liposomen	18
1.4.2.2	Nachahmung der Glykocalix durch Lipopolymere	18
1.4.2.3	Biofunktionalisierung von Oberflächen- Modellmembransysteme mit Lipopolymeren	19
1.4.2.4	Beispiele bisher untersuchter Lipopolymere als Abstandhaltersysteme	20
1.4.2.5	Glykolipopolymere	24
1.5	Photoreaktionen	25
1.5.1	Photoaffinitätsmarkierung	25
1.5.2	Verwendung von Benzophenon in der Photochemie	28
1.5.2.1	Photochemie des Benzophenons	29
1.5.2.2	Lebensdauer des angeregten Zustandes des Benzophenons	30
1.5.2.3	Molekülanbindung auf Oberflächen mittels Benzophenon	31
1.5.3	Verwendung von Arylaziden in der Photochemie	32

1.5.3.1	Photochemie des Phenylazids _____	33
1.5.3.2	Molekülanbindung auf Oberflächen mittels Azid _____	35
1.5.4	Förster Transfer _____	36
1.5.4.1	Bedeutung des Förster Transfers für die vorliegenden Untersuchungen _____	37
2	Methoden _____	39
2.1	Langmuir-Blodgett Monoschichten an der Wasser-Luft Grenzfläche _____	39
2.1.1	Herstellung von Monoschichten an der Wasser/Luft Grenzfläche _____	40
2.1.2	Kompression und Kompressionsverhalten von Monoschichten _____	41
2.1.2.1	Gasanaloger oder expandierter Bereich _____	43
2.1.2.2	Flüssiganaloger oder teilkomprimierter Bereich _____	43
2.1.2.3	Festanaloger Bereich _____	44
2.1.2.4	Kollapsbereich _____	44
2.1.3	Transfer des Films auf feste Substrate _____	45
2.2	Optik und Oberflächenplasmonenspektroskopie _____	46
2.2.1	Polarisationszustände von Licht _____	46
2.2.2	Totalreflexion _____	47
2.2.3	Oberflächenplasmonen _____	49
2.2.4	Anregungsgeometrie _____	50
2.2.5	Kretschmann Konfiguration _____	51
2.2.6	Messanordnung _____	52
2.2.7	Einfluß ultradünner Schichten auf die Dispersion von Plasmonen _____	53
2.2.8	Kinetik-Messungen _____	54
2.3	Impedanz-Spektroskopie _____	54
2.3.1	Die elektrische Doppelschicht _____	55
2.3.2	Impedanzspektroskopie _____	58
2.3.3	Darstellung der Impedanzspektren _____	58

2.3.3.1	Bode-Plot	58
2.3.3.2	Frequenzreduzierte Admittanz	60
2.3.3.3	Ortskurve (Nyquist-Graph)	61
3	Themenstellung/Zielsetzung	62
4	Übersicht über die untersuchten Systeme	65
4.1	Prinzip des Aufbaus der Schichten bis zur Vesikelfusion	65
4.1.1	Beschreibung der untersuchten Abstandhalter	66
4.1.1.1	Thio-Polyethylenglycol HO-Polyoxyethylen-NH-CO-C ₂ H ₄ -SH	67
4.1.1.2	Binäre Thiol-Mischung	68
4.1.2	Photoreaktive Verbindungen	68
4.1.2.1	4-Bezoylbenzoesäurechlorid	69
4.1.2.2	5-Azido-2-Nitro-Benzoesäurechlorid	70
4.1.3	Glykolipopolymere	71
4.1.3.1	Copolymer Co 20	72
4.1.3.2	Homopolymer Ho 5900/ Homopolymer Ho9000	73
4.1.3.3	Lipidanteil der untersuchten Glykolipopolymere: Dioctadecylamin	74
5	Ergebnisse und Diskussion	76
5.1	System Thio-Polyethylenglycol/Azid/Homopolymer Ho5900	76
5.1.1	SPR Messungen	77
5.1.2	Kontaktwinkelmessungen	82
5.1.3	Impedanzmessungen	86
5.1.4	Diskussion	88
5.2	System binäre Thiolmischung/Benzophenon/Copolymer C20	91
5.2.1	SPR Messungen	92
5.2.2	Impedanzspektroskopie Messungen	96
5.2.3	Diskussion	98
5.3	System binäre Thiol-Mischung/Azid/Homopolymer Ho5900	101
5.3.1	SPR Messungen	102
5.3.2	Impedanzmessungen	105

5.3.3	FRAP Messungen _____	108
5.3.4	Diskussion _____	111
5.3.5	Zusammenfassung Homopolymer Ho5900 _____	113
5.4	System binäre Thiol-Mischung/Azid/Homopolymer Ho9000 _____	115
5.4.1	Isotherme der Homopolymer Ho9000 Monoschicht- Vergleich mit dem reinen Lipid Dioctadecylamin _____	116
5.4.2	SPR Messungen _____	118
5.4.3	Impedanzmessungen _____	119
5.4.3.1	Einbau von Valinomycin _____	120
5.4.4	Diskussion _____	123
5.5	System binäre Thiolmischung/Azid/Mischungen Ho9000/freies Lipid _____	126
5.5.1	Referenz für Anbindungsversuch ohne Bestrahlung: Mischung Homopolymer Ho9000/Diphytanylglycerin _____	127
5.5.1.1	SPR Messungen _____	128
5.5.1.2	Impedanzmessungen _____	129
5.5.1.3	Diskussion _____	130
5.5.2	Mischungen Homopolymer Ho9000/1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin _____	131
5.5.2.1	SPR Messungen _____	132
5.5.2.2	Impedanzmessungen _____	135
5.5.2.3	Einbau von Valinomycin _____	136
5.5.3	FRAP Messungen _____	138
5.5.4	Diskussion _____	140
6	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick _____	142
7	Anhang _____	150
7.1	Materialien _____	150
7.1.1	Glykolipopolymere Co20/ Ho5900/ Ho9000 _____	150
7.1.2	Lipide _____	150
7.1.3	Salze _____	151
7.1.4	Lösungsmittel _____	151

7.1.5	Pufferlösungen _____	151
7.1.5.1	Vesikelpräparation _____	151
7.2	Reinigung der Glasträger und thermische Bedampfung _____	152
7.2.1	Reinigung neuer Glasträger _____	152
7.2.2	Reinigung bereits verwendeter Glasträger _____	152
7.2.3	Bedampfung _____	153
7.2.4	Gold auf BK7-Gläsern _____	153
7.2.5	Gold auf LaSFN9-Gläsern _____	153
7.3	Probenpräparation _____	153
7.3.1	Assemblierung der verwendeten Spacer-Systeme _____	153
7.3.1.1	Assemblierung ausgehend von binärer Thiol-Mischung _____	153
7.3.1.2	Assemblierung ausgehend von Polyethylenglykol 3000 _____	154
7.3.2	Assemblierung der photoreaktiven Verbindungen _____	154
7.3.2.1	5-Azido-2-Nitrobenzoesäurechlorid _____	155
7.3.2.2	4-Benzoylbenzoesäurechlorid _____	155
7.3.3	Monolayerpräparation mit Polymer Ho5900/Ho9000 _____	156
7.3.3.1	Reinigung des Langmuir-Blodgett-Troges _____	156
7.3.3.2	Spreitung _____	156
7.3.3.3	Übertrag _____	156
7.3.3.4	Trocknung/ Anregung der photoreaktiven Verbindung zur kovalenten Anbindung des Monolayers _____	157
7.3.4	Herstellung der Polymerlösungen Ho5900/ Ho9000 _____	157
7.4	Übertrag von Mischungen Polymer Ho9000/Lipid _____	157
7.4.1	Mischung mit Diphytanoylglycerin _____	158
7.4.2	Mischung mit 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin _____	158
7.4.3	Herstellung der 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin-Vesikel _____	159
7.4.4	Glasreinigung _____	159
7.4.5	Gold auf LaSFN9-Glassubstraten _____	161
7.5	Untersuchungsmethoden _____	161
7.5.1	Oberflächenplasmonen-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) _____	161

7.5.2	Impedanz-Spektroskopie (IS)	162
7.5.3	Fluoreszenzerholung nach Photobleichung	162
8	Literaturverzeichnis	164
8.1	weitere verwendete Literatur	175
9	Inhaltsverzeichnis	177
10	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11	Eidesstattliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.