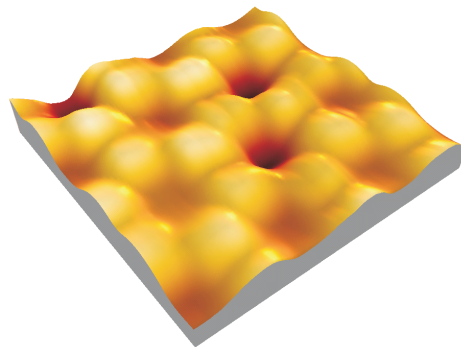


Mechanische Eigenschaften von freitragenden artifiziellen und nativen Membranen

Rasterkraftmikroskopische Studien der mechanischen Eigenschaften
verschiedener Lipidsysteme
im Vergleich mit nativen Membranstrukturen

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

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



vorgelegt von
Siegfried Steltenkamp,
geboren in Lüdinghausen
Mainz, den 24. April 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

Abstract	v
1 Einleitung	1
2 Biologische Membranen und Modellsysteme	3
2.1 Native Membransysteme: Zellen	5
2.1.1 Zytosol und Zellkern	7
2.1.2 Extrazelluläre Matrix	10
2.2 Modellsysteme	11
2.2.1 Aufbau und Eigenschaften von Lipiden	11
2.2.2 Schwarze Membranen	13
2.2.3 Vesikel	14
2.2.4 Festkörperunterstützte Membranen	15
2.2.5 Porenüberspannende Membranen	18
2.3 Mechanik von Biomembranen	22
3 Methoden	27
3.1 Konfokale Laser-Rastermikroskopie	28
3.1.1 Bildaufbau	28
3.2 Rasterkraftmikroskopie	31
3.2.1 Grundlagen	31
3.2.2 Regelkreise	35
3.2.3 Abbildungsfehler	36
3.2.4 <i>Pulsed Force</i> Modus	37
3.2.5 Indentationskurven	39
3.2.6 Kontaktmodelle	42

4	Präparation	49
4.1	Präparation der Trägersubstanzen	49
4.1.1	Herstellung von nanoporösem Aluminat	50
4.1.2	Herstellung von atomar flachem Gold	57
4.2	Herstellung artifizierter Membranen	58
4.2.1	Präparation von Vesikeln	58
4.2.2	Präparation von Lipiddoppelschichten aus thiolipidhaltigen Vesikeln	59
4.2.3	Präparation von Lipiddoppelschichten auf negativ gelade- nen Oberflächen	60
4.3	Präparation von nativen Membranen	61
4.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	61
4.3.2	Decaptierung von Zellen	61
4.3.3	Fixierung und Anfärbung	64
5	Ergebnisse und Diskussion	67
5.1	Charakterisierung der Substrate	69
5.1.1	Atomar flaches Gold	69
5.1.2	Poröse Aluminate	71
5.2	Theoretisches Modell für die Indentation von porenüberspannen- den Membranen	76
5.3	Artifizielle Systeme	90
5.3.1	Charakterisierung von Lipidmembranen auf atomar fla- chem Gold	91
5.3.2	Indentation von porenüberspannenden Membranen: Kraft- indentationskurven	98
5.3.3	Indentation von porenüberspannenden Membranen: Die Rastermethode	111
5.3.4	Der Vergleich der Methode der Kraftindentationskurven mit der Rastermethode	118
5.4	Native Membransysteme	122
5.4.1	Herstellung von nativen Monoschicht-Membranen auf po- rösen Substraten	123
5.4.2	Native porenüberspannende Membranen	129
5.5	Elastisches Verhalten von MDCK-II Zellen unter osmotischem Stress	133

6 Zusammenfassung und Ausblick	145
Abkürzungen	167
Geräte	169
Materialien	171
Lebenslauf	175

Abstract

This thesis presents a new method to explore the local mechanical properties such as bending modulus or surface tension of artificial and native pore-spanning membranes. Therefore the elastic response of a free-standing membrane to a local indentation by the means of atomic force microscopy is measured.

Starting point are highly hexagonal ordered pores in alumina produced by electrochemical anodization of planar aluminium. The homogeneous pore radius can be tailored in the range of 10 nm up to 200 nm, but radius of 33 nm, 90 nm and 200 nm turned out to be best suited for investigation of the mechanical properties of pore-spanning native or artificial membranes.

In this work artificial membrane systems consisting of N,N,-dimethyl-N,N,-dioctadecylammonium bromide as a bilayer in gel phase or 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride as a fluidic membrane are spreaded by vesicle absorption on hexagonal structured pores after chemisorption of a 3-mercaptopropionic acid monolayer. Centrally indenting these *nanodrums* with an atomic force microscope tip yields force-indentation curves, which are quantitatively analyzed by solving the corresponding shape equations of continuum curvature elasticity. Since the measured response depends in a known way on the system geometry (pore size, tip radius) and on material parameters (bending modulus, lateral tension, adhesion), this opens the possibility to monitor local elastic properties of lipid membranes in a well-controlled setting.

Additionally the locally distributed mechanical properties of pore-spanning artificial membranes are compared to those of native pore-spanning membranes. Therefore the basal membrane of MDCK II cells was prepared on porous alumina assays and their mechanical properties were analyzed by means of atomic force microscopy.

Finally the elastic behavior such as the *Young* modulus of living MDCK II cells

under various osmotic pressures is investigated. By changing the osmolarity in the extracellular region of MDCK II cells a volume change is induced according to hydration and dehydration of the cells, respectively. This volume change induces also a change in the elastic behavior of the cell, which is quantified by the means of force spectroscopy.

Kapitel 1

Einleitung

Bei der Erforschung der Natur haben Gewebestrukturen von biologischen Materialien einen hohen Stellenwert. So grenzen biologische Membranen Zellen von ihrer Umgebung ab. Bei Exo- und Endozytose sowie der Weiterleitung von extra- und interzellulären Signalen, Zelladhäsion, Zellteilung und anderen biologischen Prozessen ist die biologische Membran diversen mechanischen Kräften ausgesetzt. Diese Mikromechanik kontrolliert die wichtigsten Lebensprozesse auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene einer Zelle [Sac04]. Stabilisiert wird die Membran lebender Zellen vom Zytoskelett, das aus Aktinfilamenten besteht und direkt an der Membran verankert ist [Str99]. Da native Membranen Proteine, Peptide, Cholesterol, etc. enthalten und somit sehr komplex sind, werden zu Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften häufig Modellsysteme eingesetzt, die eine Kontrolle der Zusammensetzung und des physiologischen Zustandes zulassen.

Membranen sind ultradünne, hoch flexible, zweidimensionale Flüssigkeiten, die aus Lipiden bestehen. Auf mikroskopischer Ebene haben die Membranen unterschiedliche Eigenschaften, wie zum Beispiel die geschlossene Oberflächen zu formen, ohne dabei scharfe Kanten zu bilden und sie können sich leicht einer Oberfläche anpassen. Dennoch besitzen sie eine große strukturelle Integrität gegenüber äußeren Kräften. Diese Kombination von Stabilität und Flexibilität resultiert aus der molekularen Struktur des *Bilayers*, der sich aus Lipiden zusammensetzt. Die Zusammensetzung dieser Lipidmoleküle in einer Membran bestimmt zugleich auch ihre Funktion. Bisher werden in der Wissenschaft als Modellsysteme Vesikel und festkörpergestützte Membranen sowie Schwarze Membranen zur Untersuchung biologischer Prozesse verwendet

[Mül62B, Mül62A, Ste96, Sac96, Bou98, Kno00, Sac00, Eva03]. Das im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Membranen verwendete, neuartige Modellsystem der porenüberspannenden Membranen kombiniert die Vorteile der etablierten Modellsysteme und minimiert gleichzeitig die Nachteile. Die poröse Matrix ersetzt dabei das Zytoskelett der Zelle. Die Verankerung auf den Porenstegen verleiht dem System mechanische Stabilität, während die freitragenden Membrankompartimente für Flexibilität und Fluidität sorgen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen als Funktion von Porenmatrix und Lipideigenschaften mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops zu bestimmen. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang ein theoretisches Modell zur Beschreibung der Indentation einer freitragenden Membran entwickelt werden.

Ultimativ sollten die Erkenntnisse der mechanischen Eigenschaften, die aus den artifiziellen Systemen gewonnen worden sind, auf native Systeme übertragen werden. Um diesen Transfer auf komplexe biologische Systeme zu leisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit neben artifiziellen auch biologische Membranen auf porösen Substraten untersucht. Dazu wurden *basale* MDCK-II Membranen auf einer porösen Matrix präpariert und diese mittels Rasterkraftmikroskopie charakterisiert.

Zellmembranen sind in hohem Maße sensitiv gegenüber osmotischen Veränderungen zwischen dem interzellulären und extrazellulären Bereich und fungieren als semipermeable Barriere für Ionen. Jedoch kann Wasser ungehindert durch die Zellmembran dringen. Aus diesem Grund steht im dritten Teil dieser Arbeit die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von MDCK-II Zellen unter osmotischen Veränderungen des Extrazellulärtraumes im Vordergrund. Durch die sprunghafte Erhöhung beziehungsweise Erniedrigung der Osmolarität erfahren die Zellen einen Wasserstrom, der durch De- beziehungsweise Hydratisierung eine Volumenänderung bewirkt. Diese Volumenänderung, im Rahmen dieser Arbeit durch konfokale Lichtmikroskopie quantifiziert, führt zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften, die mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht wurden.

Kapitel 2

Biologische Membranen und Modellsysteme

In der Natur grenzen biologische Membranen Zellen und andere Organellen von ihrer Umgebung ab. Neben dem kontrollierten Austausch von Stoffen und der Weiterleitung von extrazellulären Signalen sind biologische Membranen vor allem auch für die mechanische Stabilität und Formgebung verantwortlich. Bei nativen Systemen ist ein Zytoskelett bestehend aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten direkt mit der Membran verankert und trägt zusätzlich zur Stabilität bei [Alb02, Boa02].

Biologische Membranen setzen sich aus Lipiden¹, Proteinen und Polysacchariden zusammen und bilden komplexe Systeme, die Untersuchungen von mechanischen Eigenschaften und den Einflüssen einzelner Komponenten auf die Stabilität erheblich erschweren. Nach dem 1972 aufgestellten *fluid mosaic model* von Singer und Nicolson bilden die Lipide dabei eine zweidimensionale flüssigkristalline Matrix, in der sich Proteine frei bewegen können [Sin72].

Die einzelnen Lipide aggregieren aufgrund ihrer hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften zu einer Doppelschicht, bei der die hydrophoben Fettsäureketten nebeneinander liegen und die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide nach außen zeigen. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften werden durch die unterschiedlichen Kopfgruppen und Ketten charakterisiert und können nach Zell- und Membrantyp große Unterschiede aufweisen. Biologische Eigenschaften wer-

¹Die Phospholipide bilden dabei die wichtigste Gruppe der Membranlipide.

den dabei hauptsächlich durch die Proteine vorgegeben, die in Zusammensetzung und Anzahl stark variieren können. Bei Zellen ist zum Beispiel das Zytoskelett über integrale Membranproteine mit der Membran verbunden [Alb02]. Das von Singer und Nicolson vorgestellte Modell einer homogenen flüssigen Membran (Abbildung 2.1) ist in der Literatur als nicht mehr gültig angesehen [Sin72, Fan02]. Membranlipide formen keine homogene aus Sphingo- und Glycerophospholipiden bestehende Phase, sondern ein vielfältiges Mosaik aus Domänen mit spezieller biologischer Zusammensetzung. Diese Domänenstruktur wird als *Raft*-Anordnung bezeichnet und ist zum Fokus vieler Untersuchungen in den letzten Jahren geworden [Sim97, Bro98, Bro00, Fan02]. Die *Raft*-Anordnung übernimmt spezielle physiochemische Aufgaben, die durch das „Treiben“ von Sphingolipiden mit Cholesterin als flüssig-geordnete Phasen in der flüssigen Phase der Glycerophospholipiden ermöglicht wird.

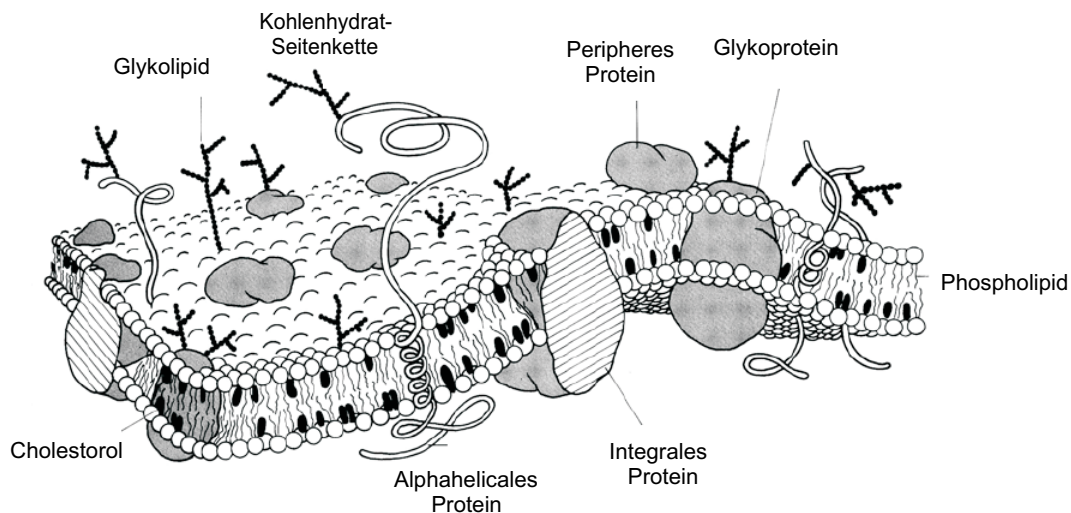


Abbildung 2.1: *Fluid mosaic model* der Zellmembran nach Singer und Nicolson [Sin72]. In der flüssigkristallinen Zellmembran befinden sich unter anderem Proteine und Cholesterin.

2.1 Native Membransysteme: Zellen

Zellen sind die Grundeinheit für alles biologische Leben. Es wird zwischen zwei Zelltypen unterschieden, den prokaryontischen und der eukaryontischen Zellen. Zu den Prokaryonten zählen die Bakterien, während eukaryontische Zellen in Pilzen, Pflanzen und Tieren zu finden sind. Viele Eukaryonten bestehen aus ver-

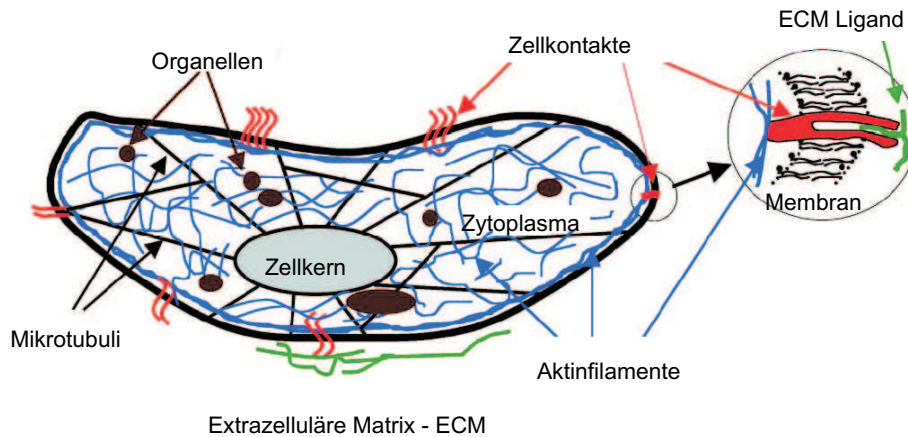


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Eukaryonten [Ver03].

schiedenen Zelltypen, die sich jeweils auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert haben. Eukaryonten sind generell größer und flexibler als Prokaryonten. Weitere wesentliche Unterschiede sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Eukaryonten (Abbildung 2.2) besitzen im Gegensatz zu Prokaryonten einen Zellkern, der räumlich die Erbinformation (*DNA*) vom Zytoplasma trennt. Im Zellinneren sind Organellen und das Zytoskelett sowie strukturbildende Proteine im Zytosol eingebettet.

Ein spezialisierter Typus der eukaryontischen Zellen sind Epithelzellen, die bei Organen das Deckgewebe bilden. Epithelzellen sind immer an äußeren und inneren Oberflächen zu finden, zum Beispiel als Hautzellen an der Grenzfläche zwischen Körper und Luft, im Körper als Wände von Blutadern oder der Darmwand. Es herrschen an der einen Seite der Zelle andere Bedingungen als an der anderen. Der dem Lumen zugewandte Abschnitt der Zellmembran wird *apikale* Zellmembran genannt, der abgewandte Teil *basale* Membran. Die unterschiedlichen Membranabschnitte besitzen auch unterschiedliche Aufgaben. So muss z.B. im Darm verhindert werden, dass bestimmte Stoffe aus dem Darm-

	Prokaryonten	Eukaryonten
Volumenverhältnis	1	2000
Zytoskelett	nicht existent	multifunktional
Organellen	nicht existent	diverse vorhanden
DNA	10 ⁶ Basenpaare ringförmig Plasmide	10 ⁷⁻¹⁰ Basenpaare im Zellkern Introns
RNA Synthese, Reifung	einfach Zytoplasma	kompliziert Zellkern
Stoffwechsel	anaerob, aerob	überwiegend aerob
Endo- und Exozytose	keine	verschiedene Formen

Tabelle 2.1: Einige Merkmale von Eukaryonten und Prokaryonten im Vergleich.

raum ins Gewebe gelangen. Dies geschieht durch spezielle Verbindungen der Zellen untereinander, sog. *tight junctions*. Dadurch, dass auf der *apikalen* Seite andere Proteine verankert sind als auf der *basalen* Seite, wird zum Beispiel dem Darmepithel ermöglicht, unterschiedliche Stoffe in den Körper zu transportieren. Es müssen zum Beispiel an der basolateralen Seite Proteine dafür sorgen, dass Nährstoffe aus der Zelle heraus in den Körper gelangen. Befänden sich diese funktionellen Proteine auch an der dem Darm zugewandten Seite (*apikalen* Seite), würden die gerade aufgenommenen Stoffe wieder an den Darm abgegeben werden und wären so für den Körper verloren.

Die Epithelzellen sind an der *basalen* Seite durch sog. Integrine befestigt. Sie sind transmembrane Ankerproteine, die in der *basalen* Zellmembran sitzen und die Zellen aus dem Zellinneren heraus in der *Basallamina* verankern. Die *Basallamina* besteht aus zwei Schichten, die man *Lamina densa* und *Lamina rara* nennt [Alb02].

2.1.1 Zytosol und Zellkern

In Abbildung 2.2 ist im Zentrum der Zelle der Zellkern (*Nucleus*) deutlich zu erkennen. Als Einheit betrachtet verhält sich der Zellkern mechanisch wie ein homogenes kompaktes Gebilde [Ver03]. Neben dem *Nucleus* befinden sich in den Zellen noch weitere Organellen, zum Beispiel Mitochondrien, Vesikel, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen und andere Strukturen. Biochemisch betrachtet spielen diese Organellen eine wichtige Rolle, können aber im Rahmen dieser Arbeit näherungsweise als viskoses Gel betrachtet werden [Ver03].

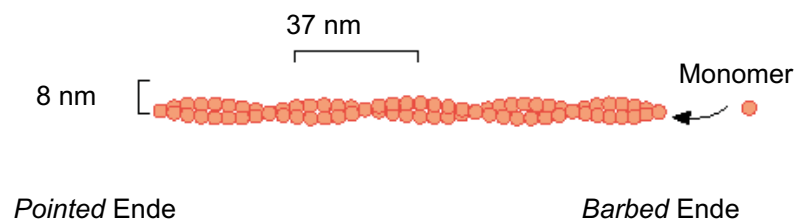
Das Zytosol von eukaryontischen Zellen wird von einem Proteinnetzwerk aufgespannt, dem Zytoskelett. Dieses Netzwerk enthält drei Typen von Filamenten: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Abbildung 2.3). Alle drei Typen bestehen aus helikalen Untereinheiten. Der molekulare Aufbau dieser drei Filamente führt zu unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften. Mikrotubuli sind auf Grund des hohlzylindrischen Aufbaus sehr steif, während die Mikrofilamente die kleinsten Strukturen sind und sich kaum strecken lassen, jedoch einfach zu zerbrechen sind. Intermediärfilamente können nur mit relativ hoher Kraft deformiert werden und widerstehen großem mechanischen Stress, ohne zu reißen. Die mechanische Deformierbarkeit dieser drei Typen ist in Abbildung 2.4 dargestellt. *In vivo* sind alle drei Typen des Zytoskeletts einer konstanten Remodellierung der Untereinheiten unterworfen. Dabei wird bei den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten nur an den jeweiligen Enden der bipolaren Strukturen remodelliert. Es wird Tubulin und Aktin² gebunden.

Die Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen, die von zwei 50 kDa Proteinen mit 450 Aminosäuren, den α und β Tubulinen, gebildet werden. Sie bilden ein Dimer mit einem polarisierten Ende. Die Mikrotubuli setzen sich aus 13 Proteinfilamenten zusammen. Im Zytoskelett sind die Mikrotubuli einer ständigen De- und Polymerisation an den einzelnen Enden unterworfen. Die Stränge verlaufen radial von dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum, dem sogenannten *MTOC* (häufig der Zellkern), zu den Rändern der Zelle (vergleiche Abbildung 2.3).

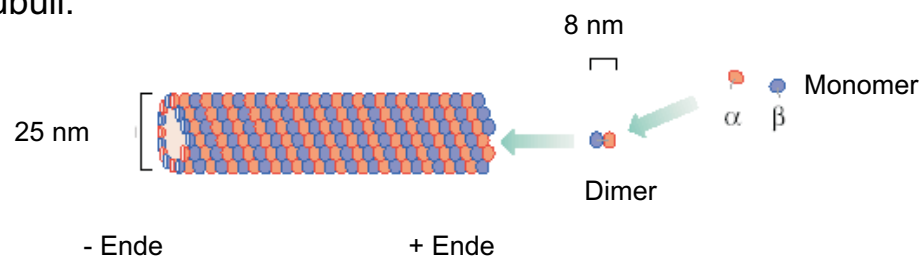
Die chemisch polaren Mikrofilamente sind einem sogenannten *Treadmilling* unterworfen: es werden an dem + Ende Dimere gebunden, während an dem - Ende sich das Filament auflöst. Die Dimere sind mit einem Durchmesser von 8 - 25 nm die kleinsten Bestandteile des Zytoskeletts. Bei der Aneinanderlagerung von

²Aktin und Tubulin sind die Untereinheiten von jeweils den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli.

Mikrofilamente:



Mikrotubuli:



Intermediärfilamente:

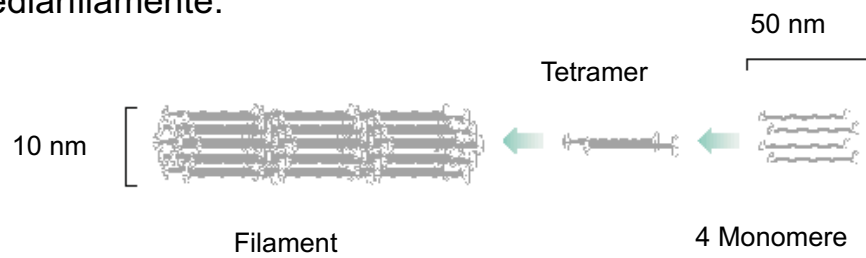


Abbildung 2.3: Die drei Hauptbestandteile des Zytoskeletts bestehend aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Keratin).[Ins01]

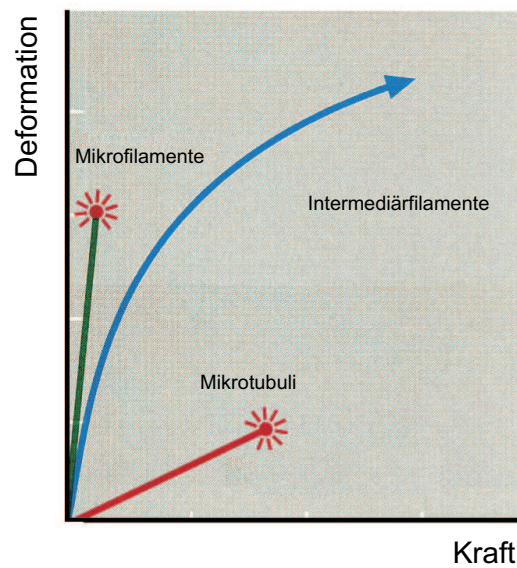


Abbildung 2.4: Mechanische Eigenschaften von Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten [Jan91]. Es wurde mittels eines Torsionspendels die Scherdeformation gemessen [Jan90]

G-Aktin (globuläres Aktin) zu F-Aktin (filamentöses Aktin), werden zwei Ketten kugelförmiger Bauart umeinander verschlungen. Jedes Aktin-Monomer besitzt eine Größe von 42 kDa und besteht aus 375 Aminosäuren.

Die Intermediärfilamente sind im Gegensatz zu den obengenannten Filamenten weder zellspezifisch noch homogen. Es existieren verschiedene zellspezifische Formen von Intermediärfilamenten, inklusive Keratin in Epithelzellen, Neurofilamenten in Nervenzellen und Desmin-Filamenten in Muskelzellen. Eine Zusammenstellung einiger Familien von Intermediärfilamenten ist in Tabelle 2.1.1 gegeben. Dabei ist das Keratin das verschiedenartigste Intermediärfilament, wovon 20 Typen allein in menschlichen Epithelzellen zu finden sind. Auch eine einzelne Zelle ist in der Lage verschieden Arten von Keratin zu bilden. Jedes Keratinfilament ist eine Zusammensetzung von basischem und saurem Keratin. Keratinfilamente sind zum Beispiel in Haaren, Nägeln, Haut und Krallen zu finden, da sie nach dem Absterben der Zellen weiter bestehen bleiben können. Ihre Grundeinheiten sind zwei umeinander geschwungene α -helikale Proteine mit einer Größe von 40 kDa bis 100 kDa. Die Zellspezifität der Intermediärfilamente besitzt in der Diagnostik eine große Bedeutung. Durch die Identifizierung bestimmter gewebe-

Art	Zusammensetzung	Lokalisierung
Kernspezifisch	Lamin A, B und C	Lamina des <i>Nucleus</i>
Vimentin artig	Vimentin Desmin Gliales, fribrelles Protein (sauer) Peripherin	Verschiedene Zellen: Muskelzellen Glia Zellen diverse Neuronen
Epithel	Typ I Keratin (sauer) Typ II Keratin (basisch)	Epithelzellen und deren Derivate (Haare, Nägel etc.)
Axonal	Neurofilamentöse Proteine	Neuronen

Tabelle 2.2: Die Hauptarten von Intermediärfilament-Proteine in Zellen [Bio94].

typischer Filamente in einer Krebszelle kann das Ausgangsgewebe eines Tumors bestimmt werden [Bio94].

Eine weitere Familie der Intermediärfilamente sind die sogenannten Neurofilamente. Diese werden vor allem in hoher Konzentration in Neuronen gefunden. Das dritte Mitglied der Intermediärfilamentfamilie ist das vimentin-artige Filament, das sich in Muskel-, Herz- und Skelettzellen befinden.

Weiterführende Informationen zum Zytosol und Zellkern finden sich unter [Bio94, Ins01, Ver03, Sac04].

2.1.2 Extrazelluläre Matrix

Extrazelluläre Komponenten sind generell wichtig für die Bindung der Zellen an ihre Umgebung. Hauptsächlich spielen dabei Kollagen, Fibronectin, Polysaccharide und Laminin eine Rolle. Diese Komponenten ermöglichen es der Zelle, auf einem Substrat zu adhäreren, zu wandern oder sich mit anderen Zellen zu verbinden. MDCK-II Zellen sind in der Lage, eine solche extrazelluläre Matrix (ECM) zu produzieren und somit auf reinem Untergrund zu adhäreren.

2.2 Modellsysteme

2.2.1 Aufbau und Eigenschaften von Lipiden

Lipide sind amphiphile Moleküle, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil besitzen. Diese Eigenschaft lässt sie eine selbstorganisierende zweidimensionale, flüssigkristalline Matrix bilden, die so genannte Lipiddoppelschicht (englisch *Bilayer*). Diese Matrix ermöglicht es den Proteinen und anderen Membranbestandteilen, sich frei in und auf ihr zu bewegen. Das hydrophobe Ende der Lipide setzt sich aus gesättigten, beziehungsweise ungesättigten Fettsäureketten mit einer Länge von zum Beispiel 14, 16 oder 18 C-Atomen zusammen. Kürzere oder längere Ketten sind möglich, aber selten. Die Fettsäureketten sind mit den Hydroxygruppen des C₁ und C₂ des Glycerins verestert (Abbildung 2.5 A).

Gemeinsamer charakteristischer Bestandteil der Phospholipide ist ein Phosphorsäurerest, der mit der verbleibenden Hydroxygruppe am C₃ des Glycerins verestert ist. Zusammen mit den Kopfgruppen bildet der Rest den hydrophilen Teil des Lipids. Einige native Vertreter mit solchen Kopfgruppen der Phospholipide sind in Abbildung 2.5 gezeigt. Die Kopfgruppen bestehen aus einem Alkohol und können verschiedene Polaritäten haben. Die Polarität der Kopfgruppen hat wiederum Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften. In der Arbeit von S. Schuy wurden zum Beispiel die Durchbruchkräfte von festkörpergestützten Membranen in Abhängigkeit der Polarität der Kopfgruppen und der Salzkonzentration mittels des Rasterkraftmikroskops untersucht [Sch03]. Er fand heraus, dass die Durchbruchkraft mit steigender NaCl Konzentration bei DOTAP steigt und bei POPS abnimmt.

Neben den Phospholipiden enthalten native Membranen auch Steroide, hauptsächlich Cholesterin und Sphingolipide. Der Einfluss von Cholesterin auf die Membraneigenschaften ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass der Gehalt von Cholesterin die Fluidität der Membran modulieren kann [Dem77, Tie05]. Zum Beispiel beeinflusst Cholesterin den Phasenübergang von der flüssigen Phase in die Gelphase, so dass bei steigendem Cholesterin-Gehalt kein scharfer Übergang mehr existiert.

Biologische Membranen sind äußerst komplex: um Aussagen über diese Systeme treffen zu können, ist sowohl die Kenntnis der unterschiedlichen Funktionen der beteiligten Komponenten als auch die der mechanischen und chemischen

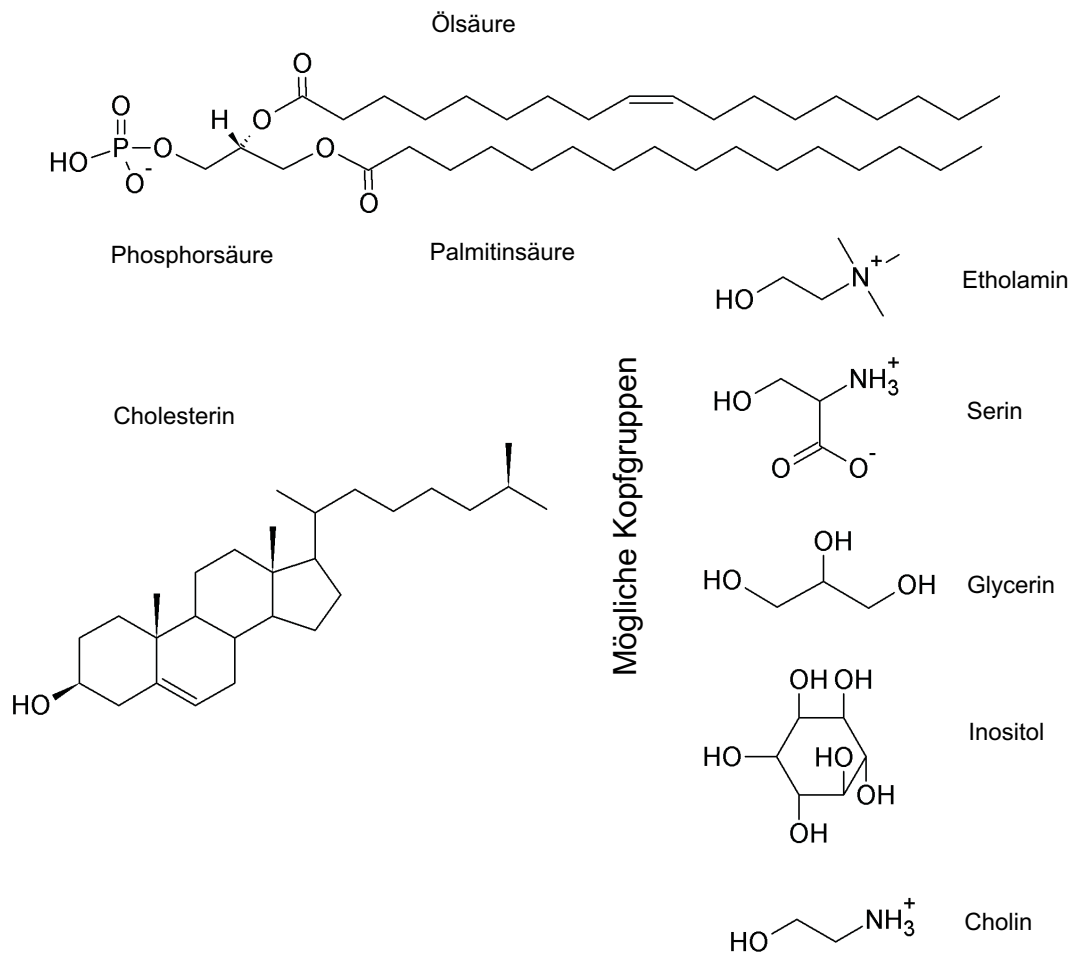


Abbildung 2.5: Strukturformeln von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidsäure, Cholesterin und mögliche Kopfgruppen.

Eigenschaften notwendig. Bei solchen Untersuchungen ist es sinnvoll, die Zahl der Komponenten einer Membran zu reduzieren. So werden zum Beispiel Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften zunächst anhand von Modellsystemen durchgeführt, um später auf komplexere Systeme übertragen werden zu können. Um diesen Transfer gewährleisten zu können, müssen bei den Modellsystemen die physikalischen und chemischen Eigenschaften frei einstellbar sein. Je nach Fragestellung und Anwendung haben sich verschiedene Modellsysteme etabliert, die zusammen mit den mechanischen Eigenschaften solcher Biomembranen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.2.2 Schwarze Membranen

Schwarze Membranen (*Black Lipid Membranes*, BLM) waren das erste Modellsystem, an dem Transportprozesse untersucht werden konnten [Mül63, Mül62A]. Bis heute sind die Schwarzen Membranen ein etabliertes System zur Einzelkanalmessung. Die Herstellung der Membranen erfolgt, indem eine geringe Menge eines Lipid-Lösungsmittel-Gemisches mit einem feinen Haarpinsel über ein circa 0,1 mm großes Loch in einer Polyethylenfolie aufgetragen wird. Die Polyethylenfolie ist in einer Teflonwand eingebaut, die als Trennwand zwischen zwei Kompartimenten fungiert. Beide Kompartimente sind mit einer Pufferlösung gefüllt (vergleiche Abbildung 2.6). Ähnlich einer Seifenblase an Luft bildet sich durch das an

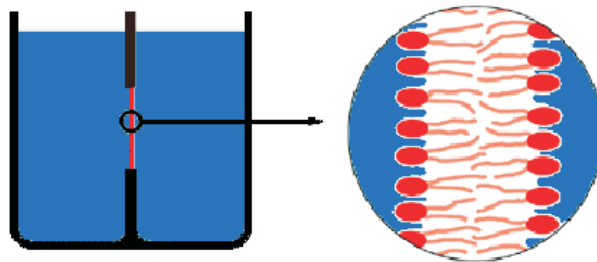


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung einer Schwarzen Membran. Der Ausschnitt zeigt die freistehende Lipiddoppelschicht, die sich über dem Loch in der Polyethylenfolie ausgebildet hat [Hen03B].

den Rand diffundierende Lösungsmittel ein immer dünner werdender Film. Während das aufgetragene Lipid-Lösungsmittel-Gemisch bei Beleuchtung mit weißem

Licht in sämtlichen Spektralfarben schimmert, erscheint die nach wenigen Minuten entstehende Lipiddoppelschicht schwarz, da der 4 bis 6 nm dicke *Bilayer* für Licht mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich destruktive Interferenz verursacht. Ein Vorzug dieses Modellsystems liegt in der guten Zugänglichkeit beider Kompartimente, die eine Untersuchung von Transportmechanismen durch die Membran erlaubt. Zudem ist der Einbau von Transmembranproteinen und Peptiden leicht realisierbar (vergleiche dazu Abschnitt 2.2.4). Der Einsatz des Lösungsmittels wirkt sich dagegen nachteilig aus. Obwohl das Lösungsmittel größtenteils in die Randbereiche diffundiert, ist eine Beeinflussung der Membraneigenschaften nicht vollständig auszuschließen. Ein weiterer Nachteil der Schwarzen Membranen liegt in der geringen Langzeitstabilität, die typischerweise im Bereich von einigen Stunden liegt.

2.2.3 Vesikel

Auf Grund der amphiphilen Eigenschaften können Lipide in wässriger Lösung Überstrukturen bilden. Die einfachste Überstruktur ist eine kugelförmige Mizelle, in deren Inneren andere unlösliche oder hydrophobe Substanzen eingeschlossen werden können. Bei geeigneten Bedingungen können sphärische Vesikel entstehen (vergleiche Kapitel 2.3). Ein Vesikel besteht aus einer Lipiddoppelschicht in dessen Innenraum dieselbe wässrige Lösung wie außen sein kann. Vesikel können aus einer Lipiddoppelschicht (unilamellar, Abbildung 2.7) oder aus mehreren Doppelschichten (multilamellar) bestehen. Dabei werden Vesikel bis zu einem Durchmesser von etwa 50 nm als *small unilamellar vesicles* (SUV), bis zu einem Durchmesser von wenigen Mikrometern als *large unilamellar vesicles* (LUV) und größere Vesikel als *giant vesicles* (GUV) bezeichnet.

Die Herstellung von unilamellaren Vesikeln (SUV und LUV) ähnlicher Größe wird über die Extrusionsmethode oder durch einen Ultraschallhomogenisator realisiert. Bei der Extrusionsmethode wird die wässrige Lipidsuspension mehrmals durch eine poröse Polycarbonatmembran gedrückt. Die entstehenden Vesikel sind unilamellar und besitzen in etwa die Größe der Poren der verwendeten Polycarbonatmembran (vergleiche 4.2.1)[Rev00].

Vesikel eignen sich nicht nur zur Beobachtung von Diffusionsprozessen und Transportphänomenen durch Ionenkanäle, sondern erlauben auch Untersuchungen an aktiven Membranproteinen sowie mechanische Untersuchungen. Evans et al. führ-

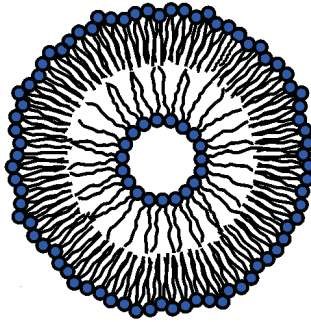


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels.

ten zum Beispiel an Vesikeln Experimente zur Bestimmung der lateralen Spannung von Lipiden durch, indem sie die Vesikel mit einer Pipette ansaugten [Eva87, Eva97]. Desweiteren wird das Modellsystem der Vesikel zu Untersuchung der Adsorption an Oberflächen verwendet. Sapper et al. untersuchten zum Beispiel die Adsorption von *Giant* Vesikeln an funktionalisierten Oberflächen und bestimmten zusätzlich die Adsorptionsraten mit Unterstützung von *Monte Carlo* Simulationen [Sap06], während Zhdanov et al. die Adsorption und das Aufplatzen von Vesikeln mittels dynamischer *Monte Carlo* Simulationen bestimmten [Zhd00].

2.2.4 Festkörperunterstützte Membranen

Das Modellsystem der festkörperunterstützten Membranen bedient sich eines Substrates, welches mit einer Lipidschicht (Mono- oder *Bilayer*) überzogen wird. Die hohe Stabilität der festkörperunterstützten Membranen und die Möglichkeit, verschiedene oberflächensensitive Methoden einzusetzen sind die wichtigsten Vorteile dieser Modellsysteme. Zu den möglichen einzusetzenden Verfahren gehören zum Beispiel die Rasterkraftmikroskopie (AFM), die Massenspektroskopie, die Quarzmikrowaagentechnik, die *ATR*-Infrarotspektroskopie und die Impedanzspektroskopie. Die Präparation der festkörperunterstützten Membranen kann unter anderem über folgende zwei Methoden erfolgen: Filmwaagetechnik und Vesikelfusion.

Unabhängig von der Präparationsmethode ist beim Einbau von Proteinen und Peptiden in festkörperunterstützte Membranen zu beachten, dass diese durch das Substrat sterisch behindert wird. Dieses Problem kann durch eine

dünne Polyelektrolytschicht zwischen Substrat und Membran behoben werden [Sac96, Kno00, Sac00, The00]. Einen weiteren Ansatz zur Vergrößerung des Abstandes zwischen Lipiden und Substratoberfläche liefern die sogenannten *packing*-Moleküle oder *Spacer*-Lipide [Lan94, Che00].

Festkörperunterstützte Membranen mittels Filmwaagetchnik

Die Technik der Filmwaage gibt es seit Ende des 19. Jahrhunderts [Poc91, Bei91]. Dabei werden die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften amphiphiler Moleküle genutzt. Hierbei wird eine geringe Menge an Lipiden in einen mit Wasser gefüllten Trog gegeben. Auf der Wasseroberfläche bildet sich eine monomolekulare Lipidschicht aus, deren Oberflächenspannung über eine bewegliche Barriere frei einstellbar ist. Durch die bewegliche Barriere kann die dem Monolayer zur Verfügung stehende Oberfläche variiert werden; bei der Kompression durchläuft der Monolayer seine Aggregatzustände von gasanalog über flüssiganalog, flüssig/fest in Koexistenz zu festanalogem Zustand. Der dabei auftretende Lateraldruck Π kann direkt aus der Kraft, die auf die Barriere wirkt, berechnet werden. Technisch ist die Bestimmung des Lateraldrucks aus der Reduktion der Oberflächenspannung gemäß $\Pi = \|\gamma_{\text{Lipid}} - \gamma_{\text{H}_2\text{O}}\|$ als Differenz zwischen Oberflächenspannung des Wassers ohne $\gamma_{\text{H}_2\text{O}}$ beziehungsweise mit γ_{Lipid} Lipidfilm definiert. Π wird unter anderem über die an einem Filterpapierblättchen angreifenden Kräfte durch ein Wilhelmy-System indirekt gemessen (siehe Abbildung 2.8). Eine Möglichkeit, mit

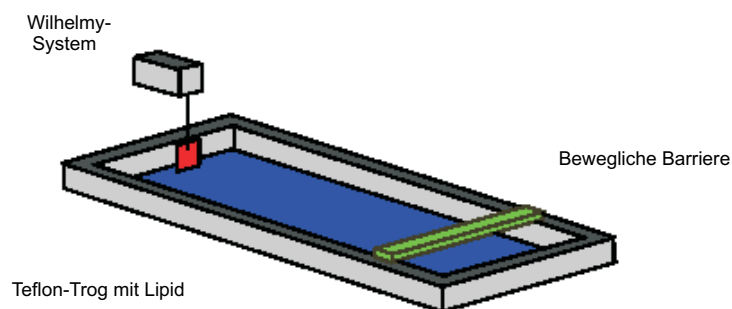


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer Filmwaage.[Hen03B].

Hilfe der Filmwaage festkörperunterstützte Membranen herzustellen, ist die sogenannte *Langmuir-Blodgett*-Technik, kurz LB-Technik. Bei der LB-Technik wird

ein Substrat hydrophilisiert und in die Filmwaage eingetaucht. Anschließend werden Lipide auf der Wasseroberfläche gespreitet. Bei einem konstanten Filmdruck wird das Substrat wieder herausgezogen. Dabei adsorbiert eine Lipidmonoschicht auf dem Substrat, wobei die hydrophoben Fettsäureketten nach außen weisen. Mit dieser Technik können abhängig vom Lipid bis zu 200 Monoschichten auf ein Substrat aufgebracht werden. Während das Substrat bei der *Langmuir-Blodgett*-Technik senkrecht zur Oberfläche eingetaucht wird, wird es bei der *Langmuir-Schäfer*-Technik horizontal zur Wasseroberfläche eingetaucht. Dabei zeigt Ab-

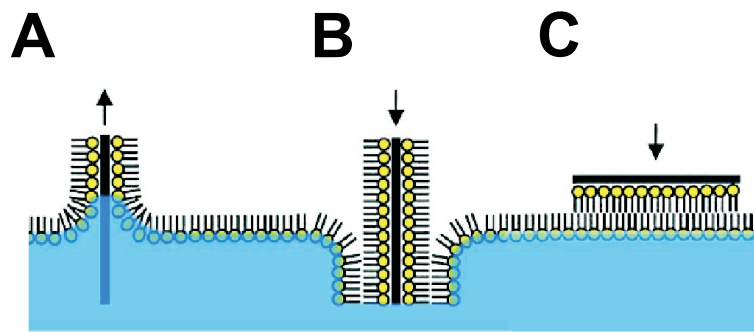


Abbildung 2.9: Schematische Skizze eines Filmübertrags mittels der Filmwaage: Bei der *Langmuir-Blodgett*-Technik wird das hydrophile Substrat senkrecht aus dem Trog herausgezogen (A und B), während es bei der *Langmuir-Schäfer*-Technik parallel zur Wasseroberfläche eingetaucht wird (C).

bildung 2.9 (A) die Präparation eines Monolayers beziehungsweise *Bilayers* (B) mittels der *Langmuir-Blodgett*-Technik und C die *Langmuir-Schäfer*-Technik. Es lassen sich jedoch nicht alle Lipide und Substrate verwenden. Bei der Verwendung von Phosphadisäure hängt der Erfolg des Übertrags beispielsweise vom Kalziumgehalt ab. Als Substrate eignen sich hauptsächlich planare Oberflächen, die sich leicht hydrophilisieren, beziehungsweise hydrophobisieren lassen. Die LB Technik bildet nicht nur eine Grundlage zur Herstellung von festkörperunterstützten Membranen, sondern wird auch in Kombination mit anderen Messtechniken verwendet, zum Beispiel der Brewster-Winkel-Mikroskopie oder der Fluoreszenzmikroskopie. Diese Kombinationen ermöglichen es, die Bildung und Strukturierung einzelner Phasengebiete zu messen [Hön91, Wei96, Ros01, Fre04].

Herstellung festkörperunterstützter Membranen mittels Vesikelfusion

Bei der Präparation von festkörperunterstützten Membranen über Vesikelfusion wird das Substrat für einige Zeit in einer Vesikelsuspension inkubiert. Die Vesikelsuspension wird dabei über die in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Verfahren hergestellt. Zur Bildung eines einzelnen *Bilayers* auf dem Substrat müssen die Vesikel unilamellar sein, dies kann über die Extrusions- oder *Sonify*-Methode realisiert werden [Rev00]. Bei der Adsorption auf die Oberfläche wird der Vesikel stark an diese gezogen, so dass große Spannungen und starke Krümmungen den Vesikel zum Platzen bringen und so einen *Bilayer* ausbilden (vergleiche Abbildung 2.10 und [Sei91, Sei90]). Nähert sich ein Vesikel einer Oberfläche, so kann in einfachster Form die Adhäsionsenergie U durch das Potential Φ und der Kontaktfläche von Vesikel und Substrat A_{contact} beschrieben werden: $U_{\text{Vesi}} = -\Phi A_{\text{contact}}$. Die gesamte freie Energie eines adhärenen Vesikels setzt sich aus der Summe der Adhäsionsenergie U_{Vesi} und der elastischen Energie E_{Membran} zusammen. Dabei können bei der Adhäsion eines Vesikel grundlegend drei Fälle unterschieden werden³:

$$\begin{aligned}
 \text{schwache Adhaesion : } & U_{\text{Vesi}} < E_{\text{Membran}} && \text{Abbildung 2.10(a),} \\
 \text{mittlere Adhaesion : } & U_{\text{Vesi}} \sim E_{\text{Membran}} && \text{Abbildung 2.10(b),} \\
 \text{hohe Adhaesion : } & U_{\text{Vesi}} > E_{\text{Membran}} && \text{Platzen des Vesikels.}
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

Die große Adhäsion des adsorbierten Vesikels an das Substrat kann einerseits über Physisorption erfolgen, das heißt über einen elektrostatischen oder entropischen Prozess, andererseits können die Moleküle an der Oberfläche chemisorbieren. Die Chemisorption besitzt überwiegend den Charakter einer kovalenten chemischen Bindung, wie zum Beispiel die von Thiolen an Gold.

2.2.5 Porenüberspannende Membranen

Die oben vorgestellten Modellsysteme bieten ein großes Spektrum an Einsatzmöglichkeiten zur Untersuchung von Membranen und der daran gekoppelten Prozesse. Jedoch ist bei diesen Modellsystemen die Langzeitstabilität beziehungsweise

³Zur Vereinfachung wird die Druckdifferenz bei dieser Betrachtung vernachlässigt.

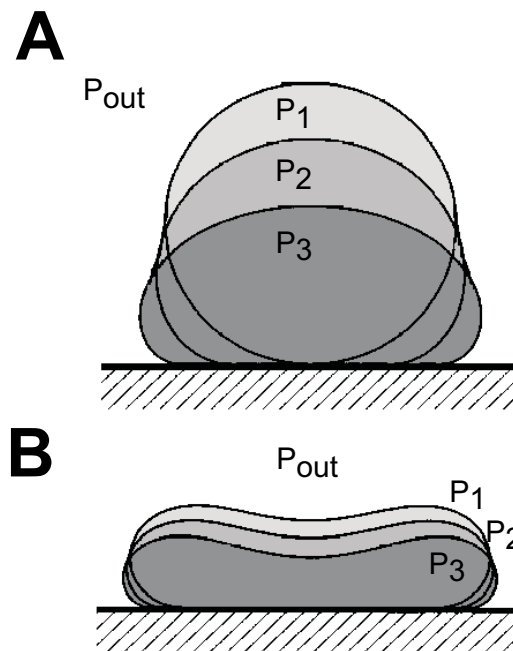


Abbildung 2.10: Adsorptionsverhalten eines Vesikels bei unterschiedlicher Adhäsion und Druckdifferenz zwischen äußerem Druck p_{out} und innerem $p_{1,2,3}$, berechnet nach den Simulationen von Seifert [Sei90]. (a) zeigt das Adsorptionsverhalten bei einem Druck von $p_{out} = p_{1,2,3}$ und verschiedener Adhäsion, in (b) ist ein Druck von $p_{out} > p_{1,2,3}$ und verschiedene Adhäsionsenergien dargestellt.

se die Zugänglichkeit für mechanische Untersuchungen eingeschränkt. Um dennoch die Vorteile dieser Systeme zu nutzen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Ansatz der porenüberspannenden Membranen gewählt. Er verbindet die Vorteile der BLMs und der festkörperunterstützten Membranen ohne deren Nachteile. Die porenüberspannenden Membranen bieten durch das poröse Substrat die Möglichkeit der Insertion von transmembranen Proteinen und Peptiden, ohne die Zugänglichkeit für mechanische Untersuchungen einzuschränken. Das Modellsystem erlaubt sowohl die Durchführung von Ionenkanalmessungen, wie sie bei den BLMs vorgenommen werden [Röm04], als auch die mechanischen Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit geplant sind. Ferner schränken porenüberspannende Membranen die Mobilität der Lipide und Proteine nur geringfügig ein. Die porenüberspannenden Membranen sind ein sehr junges Modellsystem, so dass es noch keine etablierte Präparationsmethode gibt. Bei den Substraten, auf denen die Membran präpariert wird, wird zwischen zwei Substratgruppen unterschieden.

Sie teilen sich in die Gruppe der makroskopischen Aperturen und die der nanoporösen Substrate auf. Im Folgenden wird kurz auf die Herstellung der Substrate und die Präparation sowie deren Einsatz eingegangen.

Die makroskopischen Aperturen werden mit unterschiedlichen Techniken hergestellt. Diese Aperturen haben dabei eine Größe von mehreren Mikrometern, entsprechend den Löchern, die bei BLMs zum Einsatz kommen. Diese makroskopischen Löcher werden unter anderem durch ein Photoresistverfahren erzeugt und für elektrische Untersuchungen mit Gold beschichtet [Che01, Ogi00]. Eine Silber-Silberchlorid-Elektrode am Boden eines Elektrolytreservoirs ermöglicht die stromsensitive Messung durch eine aufgezoogene Lipidmembran. Die Präparation der über die Poren gestrichenen Membran wird wie bei den BLMs über Interferenz überprüft. Auch Silane oder mit Poly-L-Lysin funktionalisierte Siliziumoberflächen eignen sich als Substrate der makrofabrizierten porenüberspannenden Membranen. Neben der BLM-Technik können Poren mit einer Kantenlänge von bis zu 100 μm auch mittels der *Langmuir-Blodgett*-Technik überspannt sowie mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden [Os95]. In einem weiteren Ansatz versahen Fertig et al. poröses Glas mit einer Lipidmembran, indem sie zuvor die Poren durch gezielten Goldionenbeschuss von Glasträgern erzeugten [Fer01]. Dadurch erzielten sie einen Durchmesser der Poren von ca. 1 μm . Der Nachweis der Membran erfolgte durch den Einbau von Gramicidin A und die anschließende Messung von Ionenströmen.

Um den recht langwierigen Herstellungsprozess der mikrofabrizierten Aperturen zu umgehen, nutzten Favero et al. eine kommerzielle poröse Polycarbonatmembran [Fav02]. Für die Präparation einer Lipidmembran auf der Polycarbonatmembran wurde zunächst das Substrat mit Gold bedampft und im Folgenden mit einem Thiol funktionalisiert. Die eigentliche Lipidmembran wurde dann mit einer leicht abgewandelten BLM-Technik aufgetragen und mittels Ionenleitfähigkeit nachgewiesen. Lieser et al. verwendeten feine Netze aus Kohlenstoff, auf der mit der *Langmuir-Blodgett*-Technik die Membran aufgezoogen wurde [Lie94].

Neben den Polycarbonat- und Kohlenstoff-Poren wurden von Römer et al., Drexler et al. und Hennesthal et al. Poren aus Aluminaten hergestellt [Röm04, Röm03, Hen03B, Dre03A, Dre03B]. Die porösen Substrate wurden mittels eines selbstordnenden, zweistufigen Anodisierungsprozesses in Aluminium geätzt. Römer et al. verwendeten geöffnete Poren, während Drexler et al. und Hennesthal et al. geschlossene Systeme verwendeten. Die Membranen wurden dabei entweder mittels der BLM-Technik [Röm04] oder mittels der Vesikel-Spreit-Technik präpariert

und sowohl kraftspektroskopisch [Hen03B] als auch durch die elektrischen Eigenschaften [Dre03A, Dre03B] nachgewiesen. Die porösen Substrate eignen sich zudem hervorragend zum Aufbau eines elektrischen Gradienten.

Für die Kraftmikroskopie eignet sich dieses System besonders, da es neben der Langzeitstabilität und der Zugänglichkeit für die Kraftspektroskopie den Vesikeln vorzuziehen ist. Bei kraftspektroskopischen Untersuchungen an (*Giant*-) Vesikeln bezieht man sich auf etwa 10^6 bis 10^8 Lipide, während Poren nur von ungefähr 8000 Lipiden bedeckt werden. Aufgrund der Nachteile der zuvor beschriebenen Modellsysteme wird das System der porenüberspannenden Membranen den anderen vorgezogen.

2.3 Mechanik von Biomembranen

Auf makroskopischen und mikroskopischen Skalen kontrollieren mechanische Kräfte die unterschiedlichsten Lebensprozesse. Das komplexe Zusammenspiel von Grenzflächen mit elastischen Kräften bestimmt zum Beispiel die Bildung eines *Bilayers* oder Vesikels aus einzelnen Lipiden oder die Adhäsion von Zellen auf Gewebeoberflächen. Die Membranen einer Zelle basieren auf der Struktur von *Bilayern* mit einer Dicke d_{db} von etwa 4-6 nm [Isr03, Boa02, Hen03B]. Zunächst wird in diesem Abschnitt auf die Bildung einer Membran aus einzelnen Lipiden eingegangen. Im zweiten Schritt werden die mechanischen Eigenschaften einer Membran unter kontinuumsmechanischen Aspekten quantifiziert.

Anordnung von Lipiden:

Entsprechend der Klasse der amphiphilen Moleküle besitzen die Lipide eine kleine lokal begrenzte polare Region, die Kopfgruppe, während die hydrophobe Schwanzgruppe keine Ladung trägt. In wässriger Lösung können diese Moleküle in Aggregate kondensieren, wenn die Konzentration einen kritische Wert (kurz CMC: *Critical Micelle Concentration*) erreicht. In den einfachsten Modellen ist die CMC proportional zum Produkt des Volumenterms und dem Faktor $\exp[-\frac{E_{Bind}}{k_B T}]$ mit k_B als Boltzmann Konstante, T Temperatur und E_{Bind} als Energie, die benötigt wird, um ein Lipid aus der Mizelle zu entfernen [Isr03]. Die Größenordnung der CMC liegt für ein Lipid mit zwei Kohlenwasserstoffketten etwa bei 10^{-10} mol [Boa02], die für ein Lipid mit einer Kohlenwasserstoffkette liegt wegen der geringeren Hydrophilität hingegen bei $10^{-2} - 10^{-5}$ mol. Dabei ist die Form des sich bildenden Aggregats von der eingenommenen Fläche a_0 der Kopfgruppe, der Länge l und dem Volumen ν der Kohlenwasserstoffkette abhängig (Abbildung 2.12). Es ergibt sich folgende Einteilung:

$$\begin{aligned}
 \text{Sphaerische Mizellen : } & \frac{\nu}{a_0 l} \leq \frac{1}{3}, \\
 \text{Zylindrische Mizellen : } & \frac{1}{3} < \frac{\nu}{a_0 l} \leq \frac{1}{2}, \\
 \text{Bilayer : } & \frac{1}{2} < \frac{\nu}{a_0 l} \leq 1, \\
 \text{Invertierte Mizellen : } & 1 < \frac{\nu}{a_0 l}.
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

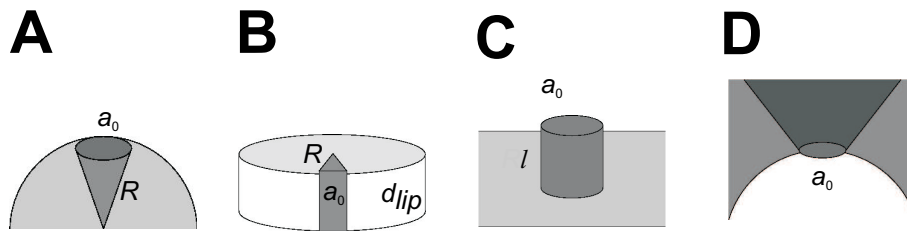


Abbildung 2.11: Packungseigenschaften von (a) sphärischen Mizellen, (b) zylindrischen Mizellen, (c) *Bilayern* und (d) invertierten Mizellen [Boa02].

Eigenschaften einer Membran in der Kontinuumsmechanik:

Die mechanischen Eigenschaften nach Bildung eines *Bilayers* werden häufig über die Dünne-Platten-Theorie betrachtet [Hel73, Eva74]. Die Membran wird dabei als ein isotropes homogenes Medium angenommen. Eine nicht verformte Membran befindet sich in einem Gleichgewichtszustand, der einer minimalen Energie $E = E_{\min}$ des Systems entspricht. Um eine Verformung der Membran durchzuführen, ist zusätzliche Energie erforderlich. Es wird zwischen drei grundlegenden Arten der elastischen Verformung einer dünnen Platte unterschieden: die Verformung in der Ebene, die Verformung durch Biegung und die Scherverformung⁴. Es ist zu beachten, dass die Scherverformung bei fluiden Membranen aufgrund der Fluidität zu vernachlässigen ist und die Membranen in der fluiden Phasen kein von null verschiedenes Schermodul besitzen, so dass fluide Membranen nur die Verformung in der Ebene und Verformung durch Verbiegung erfahren können [Can74, Hel73, Eva74]. In Abbildung 2.12 sind die einzelnen möglichen resultieren elastischen Verformungen und deren Kräfte dargestellt. Zum Beispiel ist die Energie die benötigt wird, um eine Membran in der Ebene zu strecken, $E = \frac{K_A (A - A_0)^2}{2 A_0}$, mit der Grundfläche A_0 , der gedehnten Fläche A und dem Flächen-Kompressionsmodul K_A , welches proportional zum Produkt von Dicke d_{db} und Volumen-Kompressionsmodul K_V ist [Arn00, Boa02]. Experimentell ergibt sich jedoch für Lipide mit Kohlenwasserstoffketten von 13 bis 22 C-Atomen ein relativ konstantes Flächen-Kompressionsmodul von $K_A = 0,2 \frac{\text{J}}{\text{m}^2}$ [Boa02]. Diese experimentell bestimmten Werte können auch mit Rechnungen über den Ansatz der Oberflächenspannung $\sigma \sim \frac{K_A}{\alpha}$ mit $\alpha \in \{4, \dots, 6\}$ bestätigt werden, wobei

⁴Im Folgenden werden Membranen betrachtet, die sich in einem weichen (fluiden) Stadium befinden und somit keine Scherdeformation aufweisen.

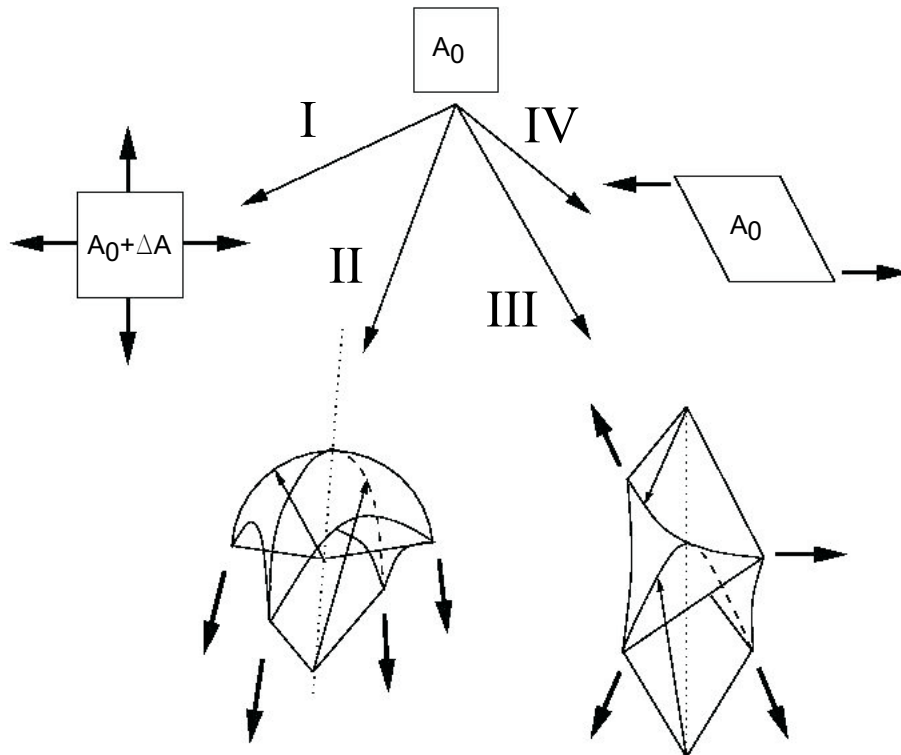


Abbildung 2.12: Darstellung der drei möglichen Verformungen. In (I) wird das Flächenelement gestreckt oder gestaucht. In (II) und (III) sind die Verformungen einer Membran dargestellt die durch Kräfte entlang der Flächennormale entstehen können und eine Verbiegung bewirken. In (IV) ist das Einwirken der lateralen entgegengesetzten Tangentialkräfte dargestellt (Scherverformung).

jedoch der Nenner abhängig vom benutzen Modell ist [Boa02].

Bei der Betrachtung der Energie E eines *Bilayers* bei Verbiegung spielen zwei mechanische Parameter eine wesentliche Rolle: das Biegemodul κ und das Gaußsche Biegemodul κ_G . Um die elastische Verbiegung einer Membran zu quantifizieren, wird diese als eine dünne, homogene Platte angenommen. Dies bedeutet, dass die Stärke der Membran/Platte d_{db} klein im Vergleich zu den übrigen Dimensionen ist und die Membran nur wenig verbiegt (*small gradient case*). Deshalb kann im Wesentlichen ausgeschlossen werden, dass im Inneren der Membran eine vertikale Spannung existiert und so kann von einer real neutralen Fläche ausgegangen werden. Mit diesen Voraussetzungen ist es möglich, die Energie E einer Membran zu berechnen. Die Energie einer Membran pro Fläche ist gegeben durch

[Lan, Mer00, Boa02]:

$$\begin{aligned}\mathcal{H} &:= \frac{1}{2}\kappa(K - K_0)^2 + \kappa K_G + \sigma \\ &= \frac{1}{2}\kappa K^2 + \sigma,\end{aligned}\tag{2.3}$$

wobei $K = \frac{1}{R_{\text{Innen}}} + \frac{1}{R_{\text{Aussen}}}$ die zweifache Hauptkrümmung der Membran und K_0 die spontane Krümmung der Lipidmembran, meist vernachlässigbar klein, ist. Die Gaussische Krümmung K_G ist eine topologische Konstante und kann nach dem Gauss-Bonnet-Theorem vernachlässigt werden⁵. Typische experimentell bestimmte Werte für das Biegemodul κ liegen im Bereich von $0,2 \cdot 10^{-18}$ J bis $1,0 \cdot 10^{-18}$ J [Boa02]. Die Oberflächenspannung σ in Gleichung 2.3 wird dabei über die Randbedingung der konstanten Fläche eingeführt, die wegen der verschwindenden inneren Spannungen als konstant anzunehmen ist. Aus verschiedenen Modellrechnungen ergibt sich ein Zusammenhang zwischen dem Biegemodul κ und dem Flächen-Kompressionsmodul K_A von $\kappa = \frac{d_{\text{db}}^\beta K_A}{\alpha}$ mit dem modellabhängigen Parameter $\alpha \in \{12, 24, 48\}$ und $2 \leq \beta \leq 3$ und einer Dicke des *Bilayers* von etwa 4-6 nm [Boa02, Hen03B, Isr03].

Canham und Helfrich entwickelten als eine der Ersten einen Ausdruck für die Energie, die gegeben ist durch [Can74, Hel73, Bou98, Sac04]:

$$E_{\text{Membran}} := \int_A d\tilde{A} \mathcal{H}.\tag{2.4}$$

Dabei nahmen sie zunächst an, dass sich die Membran in einem flüssigkristallinen Zustand befindet, um eine sogenannte *shape memory* auszuschließen. Desweiteren wird vorausgesetzt, dass keine spontane Krümmung der Membran existiert ($K_0 = 0$) und die Energie eine skalare, positiv definite Größe ist. In Gegensatz zum *Worm-Like-Chain*-Modell [Yam97] ist die Energie einer Membran invariant gegenüber skalaren Verschiebungen λ (vergleiche Gleichung 2.5). Dies bedeutet, dass die Energie eines Flächenstücks $d\tilde{A}$ nicht von der vollständigen Größe abhängt, sondern nur von der Oberflächenkrümmung. Mathematisch formuliert ergibt sich für die Invarianz bei Reskalierung folgender Ausdruck:

$$\int_A d\tilde{A} \frac{1}{2}\kappa K^2 + \sigma = \underbrace{\int_A \lambda^2 d\tilde{A} \frac{1}{2}\kappa \left(\frac{K}{\lambda}\right)^2 + \frac{\sigma}{\lambda^2}}_{\text{Reskalierung : } X \rightarrow \lambda \cdot X} = \int_A d\tilde{A} \frac{1}{2}\kappa K^2 + \sigma\tag{2.5}$$

⁵Das Gauss-Bonnet-Theorem besagt für geschlossenen Oberflächen, dass $\int_\Sigma K_G dA = 2\pi - \int_{\partial\Sigma} K_g dS$ gilt [Car76, Müll04]. In dem hier vorliegenden Fall ist K_g mit $\frac{1}{R_{\text{Pore}}}$ gleichzusetzen. Solange keine topologische Veränderung vorliegt, ist K_G gleich Null zu setzen.

Überschreitet die durch die Deformation verursachte Dehnung der Membran einen Wert von etwa zwei bis vier Prozent, führt dies zum wahrscheinlichen Zerreißen aller Phospholipidmembranen [Boa02, Hei04]. Das Zerreißen einer Membran beginnt mit einem kleinen Loch, das in einfachster Näherung mit einer Randspannung σ_{boundary} charakterisiert werden kann. Der Rand wird mit den Kopfgruppen „U“-ähnlich überdeckt werden, so dass die Randspannung im Bereich von $\sigma_{\text{boundary}} \approx \frac{\kappa}{d_{\text{db}}} \approx 10^{-11} \frac{\text{J}}{\text{m}}$ liegt. Der experimentell bestimmte Wert liegt bei $1 - 4 \cdot 10^{-11} \frac{\text{J}}{\text{m}}$ [Boa02]. Diese Randspannung kann bewirken, dass sich der Bilayer mit freien Rändern wiederum zu einer sphärischen Mizelle formt.

Kapitel 3

Methoden

Die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen werden in dieser Arbeit mittels optischer und rasterkraftmikroskopischer Methoden untersucht. Fluoreszenzintensitäten werden mittels eines konfokalen Lichtmikroskops aufgenommen (Leica DM IRE2, Leica Microsystems, Bensheim Deutschland) und dienen im wesentlichen zur Ergänzung der rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen. Für die rasterkraftmikroskopischen Messungen werden die Mikroskope von *Digital Instruments* (Dimension 3100, Nanoscope IIIa+A/D Controller, Veeco, USA) und *Asylum* (Asylum Research MFP-3D AFM, Atomic Force F&E GmbH, Deutschland) verwendet. Das konfokale Lichtmikroskop bietet die Möglichkeit, die Probe zerstörungsfrei unter Einsatz von eingebauten Fluorophoren zu messen. Das Rasterkraftmikroskop kann die Proben-Spitze-Wechselwirkung im Bereich von Pico-Newton messen, hat jedoch dabei mechanischen Kontakt mit der Probe.

Beide Systeme haben somit unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten: das konfokale Lichtmikroskop bietet sich zur Untersuchung von Zellen an, deren Größe im Bereich von mehreren Mikrometern liegt, während sich das Rasterkraftmikroskop zum Abbilden von Membranen mit einer Auflösung von wenigen Nanometern besser eignet. Mechanische Eigenschaften können mit dem Rasterkraftmikroskop lokal aufgelöst werden. Aus diesem Grund steht die Rasterkraftmikroskopie in dieser Arbeit im Vordergrund, während die konfokale Lichtmikroskopie nur unterstützend eingesetzt wird.

3.1 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Die konfokale Laser-Rastermikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) ist eine relativ neue lichtmikroskopische Methode, die sich gegenüber der konventionellen Mikroskopie durch ihre erhöhte optische Auflösung auszeichnet. Ferner ist es möglich, optische Ebenen mit definierten Abständen durch ein transparentes, zu untersuchendes Objekt zu legen. Die Aufnahme solcher optischer Schnitte gelingt durch die Kombination des Prinzips der konfokalen Abbildung aus der konventionellen Lichtmikroskopie mit dem sequentiellen Beleuchten einzelner Objektpunkte, dem sogenannten Rasterverfahren. Optische Schnitte eines transparenten Objektes können sowohl parallel als auch senkrecht zur optischen Achse angefertigt werden. Das Objekt wird dabei nicht zerstört, wie es die sonst zu diesem Zweck notwendige Dünnschichtpräparation erfordert. Somit erlaubt der Einsatz eines CLSMs unabhängig von der Lage zur Brennpachse, Objekte real-dimensional in Längen- und Flächenbestimmungen zu rekonstruieren [Eng93, Ste91, Weg98]. Das konfokale Laser-Rastermikroskop bedient sich der Fluorophore aus der Fluoreszenzmikroskopie. Diese Fluoreszenzmarker absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren wiederum Licht barthochromer Wellenlänge. Da die Wellenlängen des absorbierten und emittierten Lichts verschieden sind, ist es möglich, das Streulicht vom eingestrahnten Licht zu separieren.

Als Lichtquelle diente bei dem im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gerät eine Xenon- beziehungsweise eine Quecksilberlampe, die weißes Licht emittiert. Die entsprechenden Filtersysteme reduzieren das Spektrum so, dass der verwendete Fluorophor in seinem Absorptionsbereich angeregt wird. Dabei wird das Licht durch einen dichroischen Spiegel auf die Probe reflektiert. Das langwellige Fluoreszenzlicht wird von dem dichroischen Spiegel transmittiert und nach Durchlaufen des Emissionsfilters detektiert.

3.1.1 Bildaufbau

Bei der konventionellen Mikroskopie wird das Licht nicht nur aus der Brennebene detektiert, sondern auch aus den unfokussierten Bereichen. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht dagegen auf der Tatsache, dass lediglich ein spezieller Punkt des Objektes beleuchtet und somit registriert wird. Dies wird

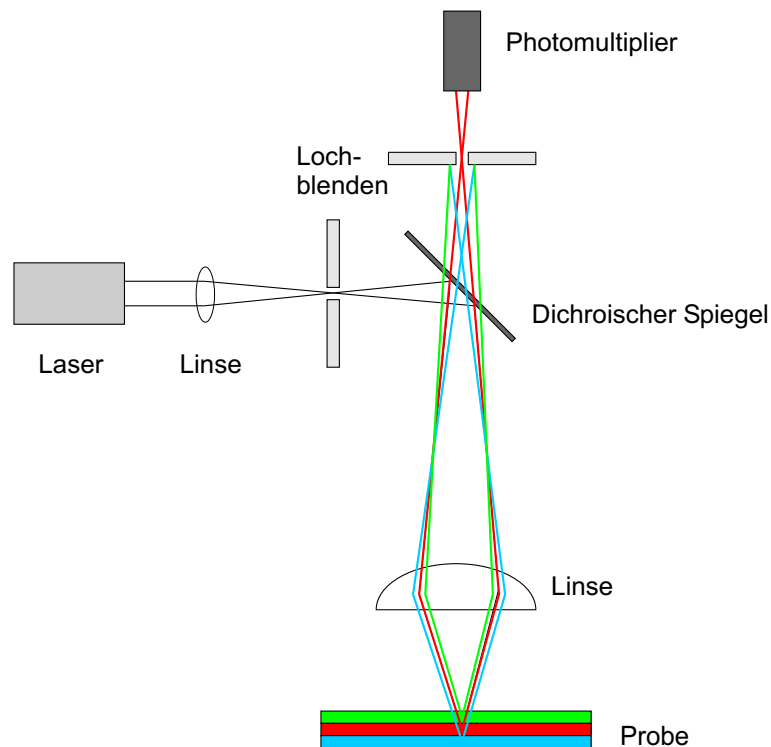


Abbildung 3.1: Vereinfachter Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes [Fai03].

durch die Kombination einer Beleuchtungs- und einer Detektionsblende realisiert. Abbildung 3.1 zeigt schematisch den Aufbau des CLSM. Das von einem Laser generierte Licht wird mit einer Linse und einer Lochblende auf das Objekt fokussiert. Die resultierende Lichtpunktquelle wird über einen halbdurchlässigen Spiegel durch eine weitere Lochblende auf den Photomultiplier gelenkt. Der Photomultiplier wandelt das auftreffende Licht in ein der Lichtintensität proportionales elektrisches Signal um, das als Helligkeitswert des betrachteten Objektpunktes registriert wird. Obwohl die Beleuchtung lediglich punktförmig ist, können durch den einfallenden Primärstrahl und seine endliche Ausdehnung auch Fluorophore außerhalb des Fokus-Bereichs zur Emission angeregt werden. Dieses außerhalb der Fokusebene emittierte Licht wird jedoch ausgeblendet.

Da das beschriebene Verfahren immer nur einzelne Punkte abbildet, muss die Probe abgerastert werden, um ein vollständiges Bild zu erzeugen. Das lässt sich auf zwei verschiedene Weisen realisieren. Bei dem so genannten Objekt-Scan-Verfahren wird das abzubildende Objekt durch einen statischen Strahlengang

bewegt. Im Strahl-Scan-Verfahren dagegen ruht das Objekt und der Primärstrahl wird durch Bewegen der im Strahlengang befindlichen Spiegel und des Objektivs über die Probe geführt. Aus den x, y -Bildpunkten und der zugehörigen z -Information lässt sich mit geeigneter Software ein dreidimensionales Bild generieren, in dem die einzelnen x, y -Schnitte zu einem einzigen dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Bildinformationen mit der firmeneigenen Software bearbeitet und ausgewertet (TCS-LS; Leica Microsystems, Version 2.5, Build 1347).

3.2 Rasterkraftmikroskopie

Bei der Untersuchung von biologischen Objekten stellt die konfokale Laser-Rastermikroskopie eine häufig benutzte Methode dar. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet, wenn eine Auflösung von wenigen Nanometern erforderlich ist. Um Details untersuchen zu können, beispielsweise einzelne Aktinstränge oder Membranfragmente auf einer porösen Struktur, benötigt man eine Auflösung, die weit unter der von optischen Mikroskopen liegt¹. Bei klassischen Lichtmikroskopen liegt die physikalische, laterale Auflösung nach Abbe etwa bei der halben Wellenlänge des verwendeten Lichts [Vog95]. Die Rasterkraft- und Elektronenmikroskopie ermöglichen dagegen laterale Auflösungen von unter 1 nm. Bei der Elektronenmikroskopie gestaltet sich die Probenpräparation jedoch recht aufwendig, häufig müssen die Proben eine leitende Oberfläche besitzen und im Vakuum untersucht werden, so dass eine *in vivo* und *in vitro* Messung nicht möglich ist. Durch die Entwicklung der Rasterkraftmikroskopie können Oberflächen unter fast allen Bedingungen untersucht werden.

3.2.1 Grundlagen

Das Rasterkraftmikroskop (engl. *Atomic Force Microscope* AFM) wurde erstmals 1986 von Binnig und Quate vorgestellt [Bin86]. Bei der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops entdeckten sie bis dahin ungeklärte Kräfte mit relativ kurzer Reichweite, die die Grundlage für die Idee eines Rasterkraftmikroskops liefern. Das Rasterkraftmikroskop gehört zu den Rastersondenmikroskopen und beruht auf der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze während des Rastervorgangs. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 3.2 dargestellt und erinnert an die Funktionsweise eines Plattenspielers. Eine sehr feine Spitze rastert dabei die Oberfläche der Probe ab. Die Federbalken (engl. *Cantilever*) bestehen aus Silizium oder Siliziumnitrid und besitzen typischerweise eine Federkonstante zwischen $0,001 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und $50 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die Spitzenradien variieren zwischen 2 nm und 100 nm.

Das Messprinzip beruht auf der Detektion der Verbiegung des Federbalkens, die aufgrund der Spitze-Probe-Wechselwirkung auftritt. Dabei hat sich das von Alexander et al. beschriebene Lichtzeiger-Prinzip durchgesetzt [Ale89], bei der

¹Dabei werden SNOM, STEM und 4-PI außer acht gelassen.

die Verbiegung mit Hilfe eines reflektierten Laserstrahls in einer Vierquadrant-Photodiode detektiert wird. Dabei wird ein monochromatischer kohärenter Laserstrahl auf den Federbalken fokussiert. Der große Abstand von Photodiode und Cantilever ermöglicht, selbst kleine Auslenkungen zu detektieren.

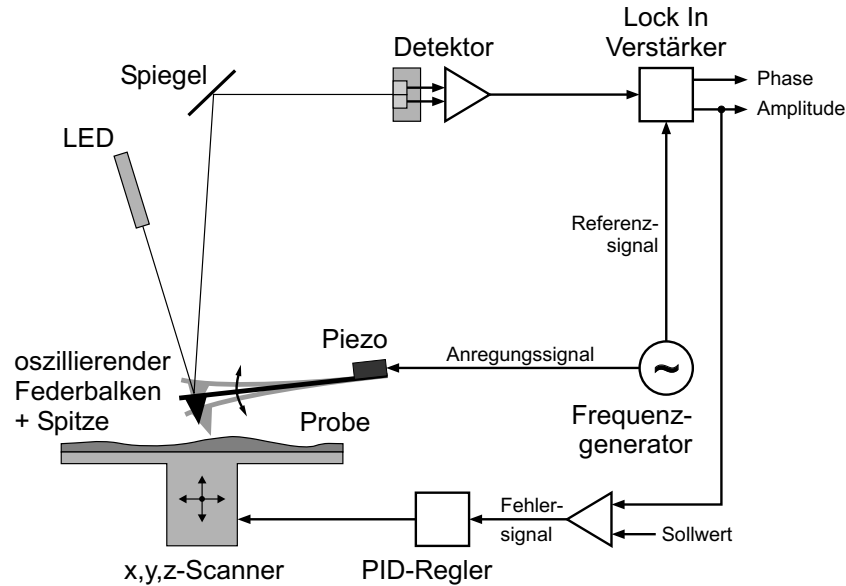


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops betrieben im *Intermittent-Contact* Modus [Kün00].

Ein Rückkopplungsmechanismus (Elektronik) hält bei den einzelnen Betriebsmodi die jeweiligen Regelparameter konstant. Der vielfältige Einsatz des Rasterkraftmikroskops spiegelt sich auch in der großen Bandbreite der Messmodi wieder. Hierzu zählen nicht nur der häufig verwendete *Contact* Modus und der *Intermittent-Contact* Modus, sondern auch der *Non-Contact* Modus sowie der magnetische Modus und der *Pulsed Force* Modus. Abbildung 3.3 veranschaulicht einzeln ausgewählte Betriebsmodi in Abhängigkeit des Abstandes von Messspitze und Probe. Zusätzlich ist der Verlauf des Potentials $V(z)$ und der Kraft $F = -\frac{dV}{dz}$ in Abhängigkeit zum Abstand skizziert. Im Folgenden werden die wesentlichen Eigenschaften der verschiedenen Messmodi kurz erläutert.

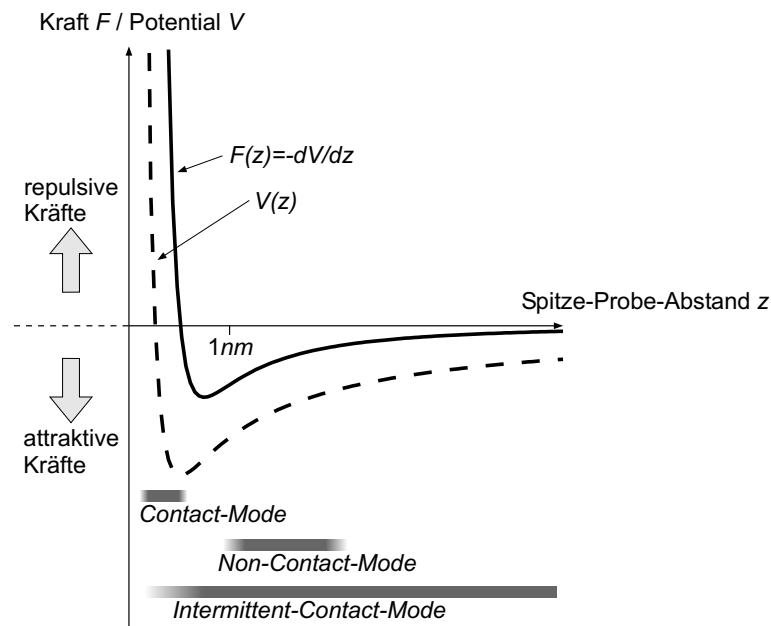


Abbildung 3.3: Das Wechselwirkungspotential und die daraus abgeleitete Kraft als Funktion des Abstandes zwischen Messspitze und Probe. Zusätzlich sind die Arbeitsbereiche der gängigsten Betriebsmodi skizziert [Kün00].

Der *Contact* Modus

Im so genannten *Contact* Modus steht die Spitze im ständigen repulsiven Kontakt mit der Probe und wird mit konstanter Kraft auf die Probe gedrückt. Die Regelung des Rasterkraftmikroskops hält die dabei entstehende Verbiegung des Federbalkens konstant. Die Topographie der Oberfläche wird über die dafür notwendigen Höhenänderungen der Spitze ermittelt. Ferner wird das Fehlersignal aus der resultierenden Verbiegung erfasst. Dieses Signal ist aufgrund der endlichen Antwortzeit der Regelkreise nicht konstant². Dabei ist dieses Fehlersignal, auch *Deflection*-Signal genannt, ein Maß für die Qualität der Aufnahme. Hierbei wird nicht die Topographie, sondern der Prozess der Differenzierung der Oberfläche dargestellt. So werden besonders die Kanten und Stufen im Bild deutlich, allerdings verlieren sich die Informationen der eigentlichen Topographie.

Im *Contact* Modus lässt sich im Vergleich zum *Tapping* Modus bei gleichen

²Die einzelnen Regelkreise, Differential-, Proportional- und Integralregler werden in Kapitel 3.2.2 näher erläutert.

Spitzenradien die höchste Auflösung erzielen. Allerdings ist zu beachten, dass die Probe in ständigem Kontakt mit der Spitze ist und somit beschädigt werden kann. Weiche Bereiche auf der Probe erscheinen auf Grund der hohen Elastizität tiefer als gleich hohe harte Bereiche. Jedoch ist es mit eben diesen Nachteilen möglich, Nanolithographie mit dem Rasterkraftmikroskop durchzuführen. Bei biologischen Proben ist es wichtig, sofern sie im *Contact* Modus gemessen werden können, auf die Normalkraft zu achten. Bei zu hoher Kraft und zu niedriger Scangeschwindigkeit kann es zu einem „Durchpflügen“ der Probe kommen, da die laterale Kraft bis zu einer Größenordnung höher als die Normalkraft sein kann [Ben97]. Dann wird die Probe nicht abgebildet, sondern zerstört. Insbesondere kann es bei der Abbildung von Lipiden zu einem von Gaub et al. beschriebenen „Wasserski-Effekt“ kommen [Rad94]. Der Grad der Zerstörung bei Aufnahmen im *Contact* Modus kann durch die geeignete Wahl der Federkonstante des *Cantilevers* vermindert werden. Es sollten *Cantilever* mit einer ähnlichen Federkonstante wie die des Probensystems benutzt werden, um eine maximale Auflösung bei geringer Zerstörung zu erzielen.

Die dynamischen Modi

Im oben beschriebenen *Contact* Modus befindet sich die Spitze in ständigem Kontakt mit der Probe. Um die Kontaktzeit, die verantwortlich für die Zerstörung der Probe ist, zu minimieren, werden bei besonders weichen Proben die dynamischen Modi bevorzugt, da die Kontaktzeit von der Elastizität der Probe abhängt und mit zunehmendem *Youngsches* Modul der Probe abnimmt [Pau00]. Durch die geringere Kontaktzeit werden die lateralen Kräfte minimiert und es ist eine zerstörungsfreie Abbildung möglich. Zu den dynamischen Modi zählen der *Non-Contact* Modus und der *Intermittend-Contact* Modus, der je nach Hersteller auch als *Tapping* Modus bezeichnet wird. Beim *Tapping* Modus wird der *Cantilever* mit seiner Resonanzfrequenz zu einer konstanten Schwingung angeregt. Die Probenoberfläche wird bei konstanter Amplitude abgerastert. Neben der Höheninformation und der Amplitudeninformation ist es möglich, aus der Phasendifferenz der angeregten und resultierenden Schwingung des *Cantilevers* Informationen über die Energiedissipation des *Cantilevers* auf die Probe zu gewinnen. Wird die Schwingung des *Cantilevers* gedämpft, so ändert

sich nicht nur die Schwingungsamplitude, sondern auch die Phasendifferenz. Liegt die gewählte Resonanzfrequenz f ausreichend unterhalb der realen Resonanzfrequenz f_0 , so steigt das Phasensignal an. Bei der Verstimmung von $\frac{f}{f_0} > 1$ fällt das Phasensignal bei steigender Dämpfung. Im Bereich von $\frac{f}{f_0} \approx 1$ ist die Änderung der Phase besonders ausgeprägt, so dass die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Aufnahmen in einem Bereich von $\frac{f}{f_0} \approx 0,9$ gemessen wurden. Mit solchen Parametern sind kontrastreiche Bilder in der Phasendifferenz möglich, die vor allem die Energiedissipation auf die Probe widerspiegeln. Bei der Interpretation solcher Bilder ist zu beachten, dass bei der Annäherung der Spitze an die Probe ein Bereich von repulsiven und attraktiven Kräften existiert und somit die Schwingung gedämpft oder verstärkt wird. Eine genaue Beschreibung solcher Kontaktmechanismen und der involvierten Kräfte finden sich unter anderem in [Got02, Got00, Kru97].

3.2.2 Regelkreise

Zur Aufnahme von Bildinformationen wird beim AFM auf einen konstanten Wert (Soll-Wert) geregelt³. Im Folgenden wird ein grober Überblick über die Regelung eines AFMs gegeben.

Der geforderte Soll-Wert wird durch eine Regelkreiselektronik konstant gehalten. Weicht der Ist-Wert vom Soll-Wert ab, kommt es zu einer Regelung, in der die Regelabweichung mit einer entsprechenden Stellgröße korrigiert wird. Ein Regelkreis lässt sich durch ein Übertragungsglied charakterisieren. Als Standard-Eingangssignal wird eine Sprungfunktion (Gleichung 3.1) definiert:

$$e(t) := \begin{cases} 0, & t < 0 \\ e_0, & t > 0. \end{cases} \quad (3.1)$$

Aus dieser Sprungfunktion wird die kontinuierlich arbeitende Übertragungsfunktion bestimmt. Diese Bestimmung der Antwort übernimmt der **P**roportional-, **I**ntegral- und **D**ifferential- Regler, kurz PID-Regler. Bei diesem Regler wird die Stellgröße $x(t)$ aus der Regelabweichung $e(t)$ durch eine Summation über drei

³Beim *Contact* Modus wird auf eine konstante Verbiegung des *Cantilevers*, die einer konstanten Kraft entspricht, geregelt und beim *Tapping* Modus in der Regel auf eine konstante Amplitude.

Terme erfasst:

$$x(t) = g \left(K_p e(t) + \frac{1}{T_I} \int_{-\infty}^0 e(\tau) d\tau + T_D \frac{\partial e(t)}{\partial t} \right) \quad (3.2)$$

$x(t)$ hängt neben der Regelabweichung $e(t)$ von drei Konstanten ab: g als Verstärkungsfaktor, T_I als Nachstellzeit und T_D als Vorhaltezeit. Diese drei Werte werden so eingestellt, dass der Regelkreis schnell und genau genug arbeitet, um eine konstante Amplitude beziehungsweise konstante Verbiegung zu realisieren.

3.2.3 Abbildungsfehler

Das Auflösungsvermögen eines Rasterkraftmikroskops ist unter anderem durch die Spitzengeometrie begrenzt. Mathematisch betrachtet ist die Abbildung eine Legendré-Transformation zwischen der Spitzengeometrie und der eigentlichen Topographie der Probe. Eine stumpfe oder breite Spitze verringert die Auflösung erheblich. Dies ist in Abbildung 3.4 skizziert. Je kleiner der Öffnungswinkel und Radius der Spitze, desto besser wird die Auflösung. Ferner ist zu beachten, dass die Spitze während des Scanvorgangs verschmutzen kann, wodurch weitere Artefakte entstehen können. Dabei können sowohl die Höheninformationen als auch laterale Informationen der Probe verfälscht werden. Falls die Abbildungsfehler nicht durch eine geeignete Wahl der Spitze minimiert werden können, ist es zusätzlich möglich, die Faltung der Spitze nach der Aufnahme wieder zu entkoppeln. Diese Spitzengeometrie kann durch die Aufnahme eines bekannten, regelmäßigen Gitters und mittels geeigneter Software aus der Topographie entfaltet werden. Störende Artefakte kommen nicht nur durch die Faltung von Spitze und Probe zustande, sondern auch durch die verwendeten Piezoscanner. *Creeping*, Hysterese und nicht lineare Antworten sind häufige Quellen für Abbildungsfehler. Speziell bei Röhrencannern tritt zusätzlich der Effekt auf, dass die Scanbewegung nicht in der Ebene erfolgt, sondern der Scanner eine Kugelkappe (engl. *bow*) beschreibt. Dies macht sich sowohl bei großen Scanfenstern als auch bei kleinen Höhenunterschieden bemerkbar.

Dabei konnte im Rahmen dieser Arbeit auf eine neue Technik zurückgegriffen werden. Das MFP-3D besitzt statt eines Röhrencannerns ein System von Piezos, ein sogenanntes NPS-System[©] (*Nanoposition System*). Jede Raumrichtung wird bei diesem Gerät über einen Sensor, einen sogenannten Aktuatorpiezo, getrennt angesteuert, so dass durch den Einsatz dieser separaten Piezoelemente einen große

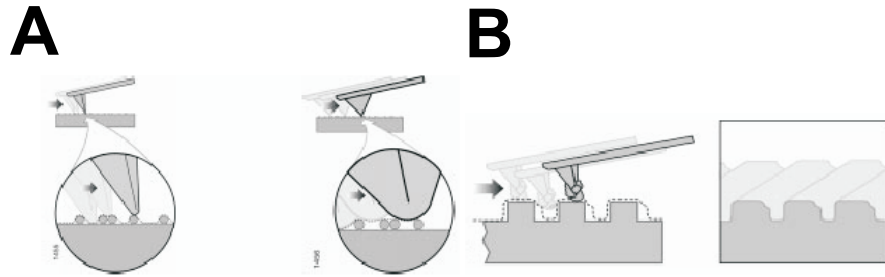


Abbildung 3.4: (A) Die Faltung der Spitze mit der Oberfläche der Probe ist einer der Gründe für die Entstehung von Abbildungsartefakten. (B) Entstehung von Artefakten durch Verunreinigungen der Spitze [Hen03B].

Genauigkeit erzielt wird. Die Voraussetzung zur hochauflösenden, störungsfreien Positionierung des *Cantilevers* wird weitgehend durch die Unterdrückung des Übersprechens zwischen den Achsen gewährleistet. Bei Röhrencannern ist es aufgrund der extrem hohen Übersprechung zwischen den Achsen nahezu unmöglich, eine wie bei dem MFP-3D verwendete Sensortechnik zu installieren und zu positionieren, da Bewegungen senkrecht zu der Messachse des Piezos von Röhrencannern zu erheblichen Fehlern in der Positionierung führen können.

Durch die von Asylum Research entwickelte *Closed Loop*-Technik des NPS Systems ist es nicht nur möglich die exakte Position zu ermitteln, sondern es ist auch möglich, damit *Creep* und Hysterese typische Störeffekte eines Piezos zu korrigieren. Dabei wird in allen drei Raumrichtungen die Positionierung zusätzlich überwacht und bei Abweichungen mittels der *Closed Loop* korrigiert, indem die exakte Position jeder Raumrichtung bestimmt und eingestellt wird.

3.2.4 Pulsed Force Modus

Der *Pulsed Force* Modus ist eine Methode der Kraftspektroskopie und der *Force Volume* Technik. Der *Pulsed Force* Modus erlaubt es, simultan die Oberfläche abzurastern und die intrinsischen Eigenschaften wie Adhäsion und Steifigkeit lokal aufzulösen [Ros97]. Das Verfahren ähnelt der *Force Volume* Technik und profitiert von der kurzen Kontaktzeit von ca. $10 \mu\text{s}$ und der Minimierung der lateral wirkenden Kräfte⁴. Die Verbindung der Vorteile des *Contact* Modus und des *Tapping*

⁴Die Kontaktzeit der Kraftspektroskopie beträgt etwa 10 ms [Mar00].

Modus mit der Kraftspektroskopie ermöglicht eine simultane, topographische Abbildung mit mechanischen Eigenschaften von biologischen Oberflächen.

Anders als beim *Force Volume* wird beim *Pulsed Force* eine sinusförmige Modulation des z-Piezos im Frequenzbereich von 0,1 - 2 kHz angelegt. Dabei ist die angelegte Frequenz weit von der Resonanzfrequenz des *Cantilevers* entfernt. Die Amplitude des *Cantilevers* bei dem *Pulsed Force* Modus liegt im Bereich von 10 - 500 nm. Dabei tritt die Messspitze während eines Oszillationszyklus in und aus dem Kontaktbereich der Probe und führt somit in jedem Punkt eine Kraftindentationskurve durch. In Abbildung 3.5 ist exemplarisch ein vollständi-

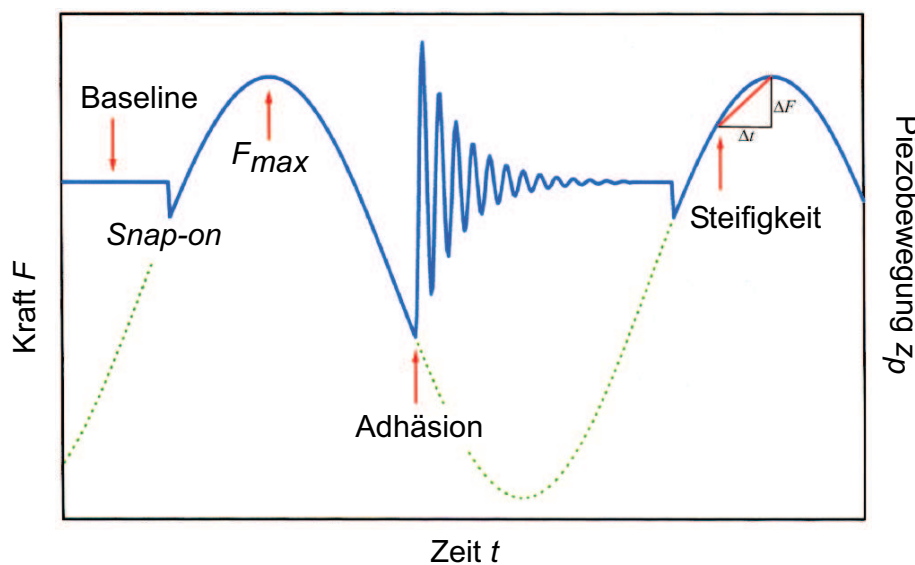


Abbildung 3.5: Schematischer Verlauf einer *Pulsed Force* Kurve als durchgezogene Linie. Die gepunktete Linie zeigt die Piezobewegung [Kün00].

ger *Pulsed Force*-Zyklus an Luft dargestellt, zusätzlich zeigt die gepunktete Linie den Verlauf des Piezos durch die angelegte Sinusmodulation. Solange während der Annäherung keine Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe zur Auslenkung des *Cantilevers* führt und die Dämpfung zu vernachlässigen ist, zeigt die Kurve einen horizontalen Verlauf, der in Abbildung 3.5 als Basislinie gekennzeichnet ist. Nach dem *Snap-on*, der eintritt, wenn der Kraftgradient größer als die Federkonstante ist, erfährt die Spitze bei der weiteren Annäherung eine zur Sinusmodulation lineare Kraft. Die Kraft, die auf die Probe wirkt, steigt bis zu einem festgelegten Maximum an, bis der Piezo wieder zurückgezogen wird. Geht die Spitze vom repulsiven in den attraktiven Wechselwirkungsbereich, hält

die Adhäsionskraft die Spitze weiterhin auf der Probe. Erst wenn die rücktreibende Kraft die Adhäsionskraft übersteigt und die Spitze den Kontakt mit der Probe verliert, oszilliert der *Cantilever* frei. Diese Oszillation ist jedoch in Flüssigkeiten stark bis kritisch gedämpft. Durch geeignete Wahl der Triggerpositionen können aus der gemessenen *Pulsed Force* Kurve an jedem Punkt der zu untersuchenden Oberfläche materialspezifische Eigenschaften extrahiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Frequenz von circa 200 Hz und eine Amplitude von etwa 400 nm benutzt. Dabei wird die Amplitude von der Adhäsion der Probe bestimmt, da ein Abriss von der Probenoberfläche gewährleistet werden muss. Die Frequenz wird in diesem Bereich so gewählt, da sie einerseits niedrig genug sein muss, um hydrodynamische Effekte zu minimieren, jedoch andererseits hoch genug sein sollte, um mindestens an jedem topographischen Punkt einen vollen Oszillationszyklus zu durchlaufen.

3.2.5 Indentationskurven

Neben der topographischen Analyse von Oberflächen eignet sich das Rasterkraftmikroskop zusätzlich zur Analyse molekularer Kräfte an Grenzflächen. Eine gute Übersicht zur molekularen Kräften findet sich in der Arbeit von Janshoff et al. [Jan00]. Bei einer Kraftkurve wird die Messspitze mit einer definierten Geschwindigkeit an die Probe heran- und wieder zurückgefahren, so dass die Spitze den gesamten Bereich des Wechselwirkungspotentials durchläuft. Die auftretenden Wechselwirkungen sind dabei abhängig von der verwendeten Spitze sowie der Probe und von dem „Messmedium“. An Luft dominieren die Kapillarkräfte, hervorgerufen durch Kondensation, gegenüber den Van-der-Waals Kräften. In Flüssigkeiten sind die Kapillarkräfte verschwunden, während Kraftkurven von Van-der-Waals Wechselwirkung dominiert werden.

Beim Durchlaufen des gesamten Wechselwirkungspotentials verbiegen die Kräfte den *Cantilever* in Abhängigkeit des Abstands zur Probe. Die wirksame Kraft zwischen einer harten Oberfläche und dem *Cantilever* lässt sich mittels des Hook'schen Gesetzes $F = -k \cdot z_F$ beschreiben, wobei die Kraft F von der Federkonstanten k und der Auslenkung des Piezos z_F abhängig ist⁵. Da jedoch eine Funktion der Kraft F in Abhängigkeit des Spitze-Probe-Abstands z für ei-

⁵In diesem Kapitel wird zunächst auf die abstandsabhängigen Kräfte eingegangen ohne Berücksichtigung der Kontaktmechanik, die in Kapitel 3.2.6 beschrieben ist.

ne quantitative Auswertung wünschenswert ist, wird diese Kraftkurve in eine Kraftindentationskurve umgewandelt⁶. Im Folgenden wird erläutert, wie diese Umwandlung der Kraftkurven in Kraftindentationskurven durchgeführt wird.

Im statischen Gleichgewicht ist die Federkonstante k mit der aus dem Wechselwirkungspotential resultierenden Ableitung der Kraft gleich. Variiert jedoch die Kraft, führt dies direkt zu einer Änderung der Federauslenkung:

$$\begin{aligned} k \cdot \Delta z_F &= \Delta F(z) \\ &\approx \frac{\partial}{\partial z} F(z) \cdot \Delta z . \end{aligned} \quad (3.3)$$

Dabei wird davon ausgegangen, dass nur die Probe verschoben wird. Desweiteren verlangt eine Umrechnung einer Kraftkurve in eine Kraftindentationskurve neben der Federkonstanten k die Kenntnis der Steigung der Kontaktgeraden. Aus einfachen geometrischen Überlegungen ergibt sich für die Auslenkung des Piezos z_{Piezo} die in Gleichung 3.4 dargestellte Abhängigkeit von der Länge der *Cantilever*-Spitze l , dem Probe-Spitze-Abstand z und der Auslenkung z_F :

$$\begin{aligned} z_{\text{Piezo}} &= l + z - z_F \\ \Rightarrow \Delta z_{\text{Piezo}} &= \Delta z + \Delta z_F \end{aligned} \quad (3.4)$$

Auflösen von Gleichung 3.4 und Einsetzen in Gleichung 3.3 ergibt für die Steigung der Kraftkurve folgenden Ausdruck:

$$\frac{\Delta z_F}{\Delta z_{\text{Piezo}}} = \frac{1}{\frac{k}{\frac{\partial}{\partial d} F(d)} - 1} \quad (3.5)$$

Hierbei ist zu beachten, dass Gleichung 3.5 eine Singularität beinhaltet, bei der der Kraftgradient und die Federkonstante gleich groß sind. Physikalisch gerät die Tastfeder spontan in Kontakt mit der Probe. Diese Singularität wird *Snap-on* genannt (Abbildung 3.6). Im Bereich des *Snap-ons* werden Teile des Wechselwirkungsbereiches übersprungen. Dies kann jedoch durch Verwendung härterer *Cantilever* vermieden werden. Bei Messungen in Flüssigkeiten können dagegen Adhäsionskräfte, die für den *Snap-on* verantwortlich sind, vollständig verschwinden. Auf das Verhalten dieser Singularität wird am Ende des Kapitels 3.2.6 nochmals eingegangen.

⁶Im Folgenden gilt: bei Kraftkurven wird die *Cantilever*-Verbiegung gegen die Piezoauslenkung aufgetragen. Entsprechend wird bei einer Kraftindentationskurve die Kraft gegen den realen Spitze-Probe-Abstand aufgetragen.

Nach dem Kontakt von Spitze und Probe steigt bei einer sehr harten Oberfläche, das heißt die Federkonstante des *Cantilevers* ist sehr viel kleiner als die der Oberfläche ($k \gg k_{Surface}$), die Verbiegung linear an, während der Abstand zwischen Probe und Spitze null ist. Diese Gerade führt zu der Umformung einer Kraftkurve in eine Kraftindentationskurve. Dabei muss lediglich die Kontaktgerade - eine lineare Parameteranpassung an den Bereich der Kurve, in dem der *Cantilever* Kontakt zur Oberfläche hat - von der Auslenkung subtrahiert, der Kontaktpunkt bestimmt und entsprechend umgerechnet werden:

$$\begin{aligned}
 z &= \text{Kraftkurve} - \text{Kontaktgerade} \\
 &= z_F(z_P) - a_{\text{Kontaktgerade}} \\
 &= z_F(z_P) + z_P - \delta_{\text{const}} .
 \end{aligned} \tag{3.6}$$

Zur Veranschaulichung dieses Vorgangs ist in Abbildung 3.6 eine Kraftkurve exemplarisch dargestellt. In Abbildung 3.6 befindet sich der *Cantilever* zunächst bei einem großem Abstand zur Probe im Ruhezustand. Bei Annäherung an die Probe treten attraktive Wechselwirkungen auf, die entgegen der Rückstellkraft des *Cantilevers* wirken. Ist der Punkt erreicht, bei dem der Kraftgradient $\frac{\partial}{\partial d}F(d)$ gleich der Federkonstante k ist, liegt das Kriterium für die Instabilität vor und es erfolgt der *Snap-on* (vergleiche Formel 3.5 und Abbildung 3.6). Beim *Snap-on* tritt der *Cantilever* in direkten Kontakt mit der Probe. Eine weitere Verschiebung des Piezos resultiert in einer Auslenkung des *Cantilevers*, die entsprechend dem Hook'schen Gesetz unter der Voraussetzung von $k \ll k_{Surface}$ linear ist. Wird der Piezo von der Probe wieder zurückgezogen, so verringert sich die Auslenkung zur Piezoverschiebung wiederum proportional. Aus dem proportionalen Bereich des Hin- und Rückweges ist eine Bestimmung der Kontaktgeraden möglich, skizziert in Abbildung 3.6 (vergleiche Formel 3.6).

Die Adhäsionskraft ist der Grund dafür, dass die Spitze weiterhin im Kontakt mit der Oberfläche bleibt und eine Hysterese zwischen den Kurven von Annäherung und Retraktion entstehen lässt. Übersteigt die Rückstellkraft die attraktiven Wechselwirkungen, tritt wieder das Instabilitätskriterium auf und der *Cantilever* verliert den Kontakt mit der Probe (*Snap-off*). Mittels der Federkonstanten k und der Kontaktgeraden lässt sich eine Kraftkurve (Abbildung 3.6 a) in eine Kraftindentationskurve (Abbildung 3.6 b) umwandeln. Die bei einer Kraftindentationskurve entstehende Fläche zwischen dem Minimum der Retraktionskurve

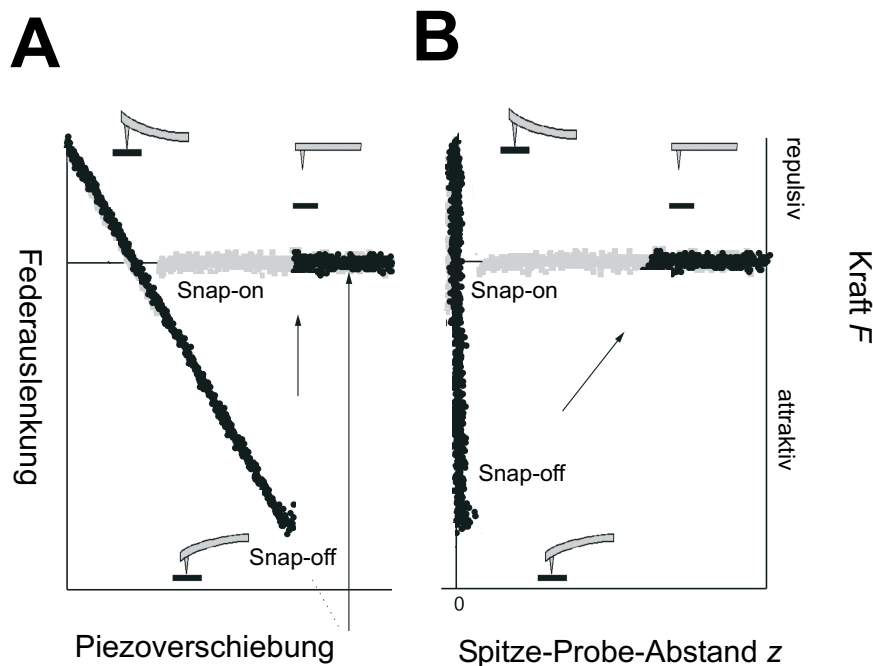


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung einer Kraftkurve und deren Kontaktgeraden (A) und einer daraus umgewandelten Kraftindentationskurve (B) [Jan00].

und dem Gleichgewichtszustand entspricht der Adhäsionsenergie. Die so erhaltene Kraftindentationskurve ermöglicht es nun, gemessene Wechselwirkungen zwischen *Cantilever* und Probe zu quantifizieren.

3.2.6 Kontaktmodelle

Bei der Rasterkraftmikroskopie spielen die Kräfte zwischen Probe und Spitze vor dem Kontakt mit der Probe eine große Rolle. Befindet sich die Spitze im Kontakt mit der Probe, treten elastische Deformationen und Formänderungen der Materialien auf. Ferner sind diese Kräfte auch von der Spitzengeometrie abhängig, so dass man von einem Ansatz der Kontinuumsmechanik ausgeht. In diesem Abschnitt werden einige gängige Modelle kurz vorgestellt. Alle Modelle berücksichtigen weder tangentiale Kräfte (Reibungseffekte) noch laterale Deformationen. Als gemeinsame Randbedingung wird angenommen, dass die Kräfte im Unendlichen verschwinden und die Verformungen klein im Gegensatz zur Indentation sind.

Entsprechende große Indentationen würden eine Abweichung liefern (Vergleiche Abschnitt 5.2).

„Im folgenden wollen wir einen hierher gehörigen Fall behandeln, der praktisches Interesse hat, den Fall nämlich, dass zwei elastische isotrope Körper sich in einem kleinen Theil ihrer Oberfläche berühren, und durch diesen Theil einen endlichen Druck der eine auf den anderen ausüben.“⁷

Bereits 1888 entwickelte H. Hertz ein Modell zur Beschreibung der Kontaktmechanik zweier inkompressibler Kugeln mit den Radien R_1 und R_2 [Her96, Isr03]. Hertz konnte dabei Aussagen über den Kontaktradius c , die Kraft F und die Druckverteilung $P(\varrho)$ in Abhängigkeit von der radialen Komponente ϱ , Indenter (bezeichnet mit Index 1) und Probe (Index 2) machen. Ferner gehen in die Berechnung des Druckes der *Youngschen* Module $E_{1,2}$, das Poissonverhältnis $\nu_{1,2}$ und die Eindringtiefe h ein. Dabei vernachlässigte Hertz die Adhäsionskräfte und ging von einer harten Wand aus, das heißt, dass zwischen den Körpern eine unendlich große repulsive Kraft wirkt. Hertz fand folgende Zusammenhänge:

$$\begin{aligned}
 \text{reduziertes Youngsches Modul : } K^{-1} &:= \frac{3}{4} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right), \\
 \text{reduzierter Radius : } R &:= \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}, \\
 \text{Eindringtiefe : } h &= \frac{c^2}{R} = \sqrt[3]{\frac{F^2}{K^2 R}}, \\
 \text{Kontaktradius : } c^3 &= \frac{RF}{K}, \\
 \text{Druckverteilung : } P(\varrho) &= \frac{\sqrt{3F(1 - \varrho^2)}}{2\pi c^2}. \tag{3.7}
 \end{aligned}$$

Für die Verwendung beim Rasterkraftmikroskop wird in diesem Modell $R_1 = R_{\text{Tip}}$ und $R_2 \rightarrow \infty$, entsprechend der Probenoberfläche, gesetzt. Typische Werte für einen AFM-*Cantilever* sind ein Spitzenradius $R_{\text{Tip}} = 12$ nm, ein Elastizitätsmodul von $E_1 = 255$ GPa (Si_3N_4) und ein Poissonverhältnis von $\nu_1 = 0.23$ [Edw04]. In der Literatur weichen diese Werte stark voneinander ab, je nachdem, welche Methode zur Bestimmung des *Youngschen* Moduls benutzt wurde.

Sneddon entwickelte in seinen Arbeiten dieses Modell für verschiedene Geometrien weiter [Sne65], indem die Eindringtiefe in Abhängigkeit der Kraft für verschiedene Stempelformen berechnet wurde. Er entwickelte den in Gleichung 3.8 angegebenen allgemeinen Ausdruck für die Kraft F in Abhängigkeit von der Ein-

⁷Zitat: H. Hertz 1896, [Her96].

dringtiefe h ; dabei bezeichnet $\mu = \frac{E}{2(1+\nu)}$ den 2-ten Lamé Koeffizienten, c den Kontaktradius und R_{Tip} den Radius des Stempels. f ist dabei durch das Profil des harten Stempels bestimmt.

$$F(h) = \frac{4\mu R_{\text{Tip}}}{1-\nu} \int dx \frac{x^2 \frac{d}{dx} f}{\sqrt{1-x^2}} \quad (3.8)$$

Entsprechend ergibt sich mit Gleichung 3.8 für einen flach-endenden zylindrischen, paraboloiden, sphärischen und konischen Stempel:

1. Flach-endender zylindrischer Stempel:

$$F(h) = \frac{4\mu R_{\text{Tip}}}{1-\nu} \cdot h. \quad (3.9)$$

2. Paraboloider Stempel:

$$F(h) = \frac{8\mu c}{3(1-\nu)} \cdot h. \quad (3.10)$$

3. Konischer Stempel:

$$F(h) = \frac{4\mu}{\pi(1-\nu) \tan \alpha} \cdot h^2, \quad (3.11)$$

wobei α den halben Öffnungswinkel des Stempels bezeichnet.

4. Sphärischer Stempel:

$$F(h) = \frac{\mu}{1-\nu} \left(-R_{\text{Tip}} c + (c^2 + R_{\text{Tip}}^2) \log \frac{R_{\text{Tip}} + c}{R_{\text{Tip}} - c} \right). \quad (3.12)$$

5. Sphärischer Stempel nach dem Hertz Modell⁸:

$$F(h) = \frac{4E}{3(1-\nu)} \sqrt{R_{\text{Tip}}} \cdot \sqrt{h^3}. \quad (3.13)$$

Da Messungen des Kontaktradius die von Hertz vorhergesagten Radien übertrafen, führten Johnson, Kendall und Roberts in den frühen Siebzigern adhäsive Effekte ein [Joh71, Isr03]. Die Kraft ermittelten sie über die Bestimmung einer *Pull-off-Force*. Diese *Pull-off-Force*, im Folgenden Adhäsionskraft genannt, muss

⁸Durch eine Reihenentwicklung des Logarithmus und Abbruch nach dem linearen Glied lässt sich die Gleichung 3.13 in Gleichung 3.12 überführen.

aufgewandt werden, um zwei in Kontakt stehende Körper zu trennen. Ähnlich wie bei den Modellrechnungen von Hertz wurde auch bei denen von Johnson, Kendall und Roberts (JKR Modell) angenommen, dass keine gleichzeitige Deformation der Körper und Adhäsionsanziehung möglich ist. Das JKR Modell beruht auf dem Ansatz, dass die Adhäsionskraft ausschließlich über die Oberflächenenergie eingeht und keine Reichweite besitzt. Es ergeben sich daraus folgende Abhängigkeiten für den Kontaktradius c , die Eindringtiefe h und die Druckverteilung $P(\varrho)$ unter Berücksichtigung der in Gleichung 3.7 gemachten Definitionen:

$$\begin{aligned} h &= \frac{c^2}{R_{\text{Tip}}} - \sqrt[3]{\frac{8\pi U c}{3K}} \\ c^3 &= \frac{R_{\text{Tip}}}{K} \left(F + 3\pi R_{\text{Tip}} U + \sqrt{6\pi R_{\text{Tip}} U F + (3\pi R_{\text{Tip}} U)^2} \right) \\ P(\varrho) &= \frac{\frac{3Kc}{2\pi R_{\text{Tip}}} \sqrt{1 - \varrho^2} - \sqrt{\frac{3KU}{2\pi c}}}{\sqrt{1 - \varrho^2}}, \end{aligned} \quad (3.14)$$

mit U als Adhäsionsenergie pro Fläche. Für $U = 0$ ergibt sich direkt Gleichung 3.7 des Hertzschen Modells. Für $F = 0$ ergibt sich ein Kontaktradius von $c = \sqrt[3]{\frac{6\pi R_{\text{Tip}}^2 W}{K}}$, dabei zeigt Gleichung 3.14, dass sogar bei negativen Kräften die beiden Körper im Kontakt bleiben. Die Kraft, die benötigt wird, um die Körper zu trennen, liegt im JKR Modell bei $F_{\text{Pull}} = \frac{3}{2}\pi R_{\text{Tip}} U$. Es ist zu beachten, dass die elastischen Eigenschaften des reduzierten *Youngschen* Moduls K zwar einen Einfluss auf den Kontaktradius haben, nicht jedoch auf die *Pull-off-Force*. Während der JKR Ansatz die Ausbildung eines Halses in der Kontaktzone bei kleinen Deformationen fordert, ist seine genaue Form und die auftretende Druckverteilung unphysikalisch, denn der Druck in der Randzone wird unendlich. Derjaguin, Muller und Toporov entwickelten ein Modell (DMT Modell), dass die *Pull-off-Force* von dem aus dem JKR Modell berechneten Wert von $F_{\text{Pull}} = \frac{3}{2}\pi R_{\text{Tip}} U$ auf $F_{\text{Pull}} = 2\pi R_{\text{Tip}} U$ erhöht [Der75, Isr03]. Dem DMT-Modell liegt wiederum das Hertz-Modell zu Grunde. Es ergibt sich kein *Snap-on* Kontakt und es folgt trivialerweise für den Kontaktradius im Abrisspunkt: $c = 0$. Das JKR-Modell eignet sich für weiche Proben, die eine große Oberflächenenergie besitzen, während das DMT-Modell bei harten Proben und bei schwacher Adhäsion angewandt werden sollte [Hei99].

Die oben genannten Modelle sind in ihren Rechnungen nur Grenzfälle für starke und schwache Adhäsion. Der Übergang zwischen diesen Modellen beinhaltet das von Muller, Yushchenko und Derjaguin entwickelte Modell (MYD-Modell)

[Mul80, Mul83]. Sie entwickelten vollständige Lösungen für das Kontaktproblem zweier ideal elastischer, adhäsiver und glatter Kugeln, welche zudem den Übergang von Nichtkontakt zum Kontakt der beiden Körper konsistent angeben. Die Lösung bedient sich dabei elliptischer Funktionen und der Abstand $z(x)$ der beiden Körper voneinander ist in folgender Gleichung ohne Herleitung angegeben:

$$z(\varrho) = \frac{\varrho^2}{2R_{\text{Tip}}} - \frac{16}{3\pi K} \int_0^\infty d\tilde{\varrho} p(z(\tilde{\varrho})) \frac{\tilde{\varrho}}{\tilde{\varrho} + \varrho} \mathfrak{K}\left(\frac{\sqrt{2\varrho\tilde{\varrho}}}{\varrho + \tilde{\varrho}}\right), \quad (3.15)$$

dabei wird \mathfrak{K} als das vollständig elliptische Integral erster Ordnung bezeichnet und $p(z(\varrho))$ als eine vom Abstand und Radius abhängige Druckfunktion, die die Oberflächenkräfte beschreibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Druckfunktion aus dem vereinfachten Lennard-Jones-Potential hergeleitet:

$$p(z(\tilde{\varrho})) = \frac{8W}{3\epsilon} \left[\left(\frac{\epsilon}{z(\tilde{\varrho})} \right)^8 - \left(\frac{\epsilon}{z(\tilde{\varrho})} \right)^3 \right]. \quad (3.16)$$

Auf Grund der elliptischen Funktionen kann die Lösung nur noch numerisch erhalten werden. Entscheidend ist, dass $z(\varrho)$ als Funktion von $P(z(\varrho))$ eine implizite Funktion ist und somit nur iterativ berechnet werden kann. In den achtziger Jahren war die Rechnerkapazität nicht ausreichend, so dass die Autoren nur Spezialfälle berechnen konnten. Es zeigt sich, dass die *Pull-Off-Force* nicht unabhängig von den Materialeigenschaften der Kontaktkörper ist und zwischen den vom DMT-Modell und JKR-Modell vorausgesagten Werten liegt:

$$\begin{aligned} F_{\text{Pull}}^{\text{DMT}} &\geq F_{\text{Pull}}^{\text{MYD}} \geq F_{\text{Pull}}^{\text{JKR}}, \\ 2\pi W R_{\text{Tip}} &\geq F_{\text{max}}^{\text{MYD}} \geq \frac{3}{2}\pi R_{\text{Tip}} W. \end{aligned}$$

Desweiteren ergibt das MYD-Modell einen stabilen Übergang, wie es das DMT-Modell voraussagt, als auch ein *Jump-On*-Verhalten, wie es das JKR-Modell fordert. Im Falle starker Adhäsion und endlicher Körper zeigt sich eine Hysterese zwischen dem Annäherungs- und Rückweg.

Mit dem MYD-Modell ist es erstmals gelungen, eine Kraftindentationskurve in Abhängigkeit der Materialeigenschaften zu simulieren. Um jedoch die genauen kraftspektroskopischen Messwerte zu berechnen, muss die Instabilität des *Cantilevers* beim *Snap-On* berücksichtigt werden (vergleiche Abbildung 3.6).

Erreicht die Spitze bei Annähern an die Proben den Punkt, in dem der Kraftgradient $\frac{\partial F(d)}{\partial d}$ gleich der Federkonstanten k des *Cantilevers* ist, liegt eine Unstetigkeit im Punkt d vor. Diese mathematische Unstetigkeit bedeutet in der Realität, dass

der Position des *Cantilevers* instabil wird und dieser auf die Probe schnell. Es entsteht ein *Snap-On*, wie in Abbildung 3.6 im Punkt 2 dargestellt. Die Kräfte müssen sich in diesem Punkt wieder zu Null addieren, weshalb der *Cantilever* sich verbiegt nach unten. Die neue Position bestimmt sich aus der Tangente mit der Steigung k an die Kurve. In Abbildung 3.7 ist eine Kraftindentationskurve schematisch dargestellt, wie sie aus den Rechnungen des MYD-Modells simuliert werden kann. Die Pfeile veranschaulichen die Auswirkung der Instabilitäten bei der Unstetigkeitsstelle d und die somit resultieren Kraftindentationskurven, wie es das Rasterkraftmikroskop messen würde. Entsprechendes gilt auch für den Rückweg und den *Pull-Off*-Punkt, vergleiche Abbildung 3.6. Bei den kleinen Federkonstanten, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wird immer eine solche Instabilität auftreten. Die Verwendung von *Cantilevern* mit größeren Federkonstanten würde das Problem zwar beheben, jedoch eine unzureichende Sensitivität bei den Messungen bedeuten.

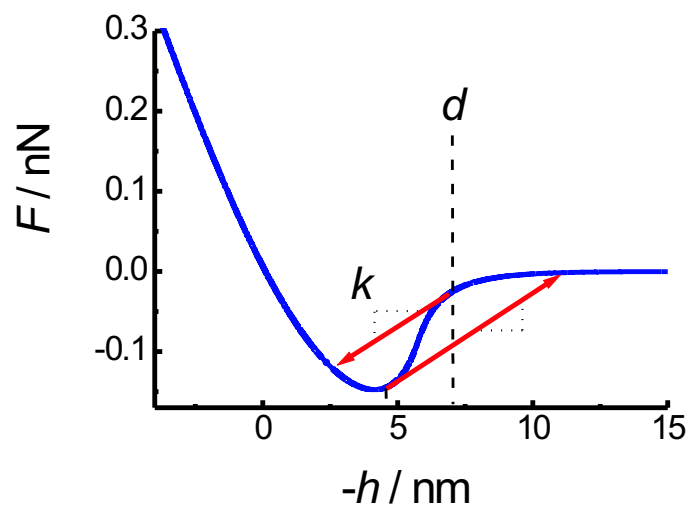


Abbildung 3.7: Eine mittels des MYD-Modells simulierte Kraftkurve mit den *Cantilever* Instabilitäten (Pfeile).

Kapitel 4

Präparation

4.1 Präparation der Trägersubstanzen

Um die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von freistehenden Lipidmembranen zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit goldbedampftes, poröses Aluminiumoxid anderen Substraten vorgezogen. Ein gängiges Substrat bei Arbeiten über mechanische Eigenschaften von festkörperunterstützten Membranen ist Glimmer [Aug99, Höp97]. Durch Ionenbeschuss entstehen kleine atomare Störungen an der Substratoberfläche, die durch den Einsatz von Flusssäure auf den gewünschten Durchmesser aufgeweitet werden können. Dabei ist die Herstellung solcher Poren durch den Einsatz von Ionen-Beschleunigern aufwendig und teuer. In der Chiptechnologie hingegen wird Silizium verwendet, dessen Mikrostrukturierung ein verbreitetes Verfahren ist [Jan98]. Silizium ist elektrochemischen und oberflächenanalytischen Verfahren zugänglich und wird in hochgeordneten hexagonalen Strukturen auf großen Flächen hergestellt. Die Porengröße kann über den Dotierungsgrad, die eingesetzte Säure und die Anodisierungsspannung variiert werden. Jedoch ist Silizium in wässriger Lösung nicht stabil und weist ohne Oxidation oder Oberflächenfunktionalisierung keine ausreichende Stabilität im chemischen Sinne auf [Ste00].

Gösele und Arbeitsgruppe untersuchten in ihren Arbeiten die Herstellung von hexagonal geordneten porösen Aluminaten [Nie00, Li99, Jes98, Jes97]. Sie zeigten, dass Porentiefe und -durchmesser abhängig von Anodenspannung, Säureart, Temperatur und gewählter Anodisierungsdauer sind. Auf Grund der Passivierung

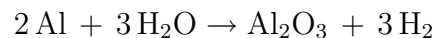
durch die Oxidschicht in wässrigen Lösungen weisen diese Poren eine hohe chemische Stabilität auf. Die Porenform ist hierbei als zylindrisch anzunehmen [Jes97]. Mit dem im Folgenden beschriebenen Verfahren sind Porendurchmesser von 10 nm bis 400 nm einstellbar.

Wegen der Beschaffenheit und der Herstellungweise erfüllen poröse Aluminate im Wesentlichen alle in Kapitel 2.2.5 genannten Anforderungen als Substrat bei der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von artifiziellen und nativen Membranen. Darüber hinaus erlauben sie einen Vergleich mit elektrochemischen Untersuchungen, die unter anderem in der Arbeitsgruppe Steinem durchgeführt werden [Röm03, Röm04, Dre03A, Dre03B].

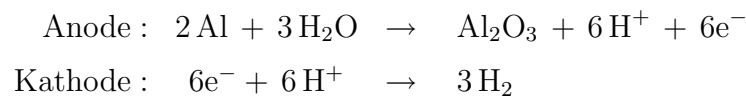
4.1.1 Herstellung von nanoporösem Aluminat

Grundlagen

Aluminium wird an Luft und in wässriger Lösung durch eine Oxidschicht passiviert. Diese native Schicht entsteht durch die Reaktion:



mit einer freien Reaktionsenthalpie von $-864,6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ [Jes97]. Durch die Passivierung werden die Reaktionspartner voneinander getrennt und die Reaktion kommt zum Erliegen. Durch das Anlegen einer äußeren Spannung ist es jedoch möglich, den Ionentransport aufrecht zu erhalten und somit die Dicke der Schicht zu erhöhen. An der Anode und Kathode finden jeweils folgende Reaktionen statt:



Durch Variation der einzelnen Parameter, wie zum Beispiel Temperatur, Elektrolyt oder Stromstärke, kann sich eine massive Oxidschicht bilden oder es können poröse Strukturen entstehen. In Elektrolytlösungen, die das Oxid nicht angreifen, entstehen massive Barrierschichten, während bei der Entstehung von porösen Strukturen die Elektrolytlösungen die Oxidschicht angreifen. Die Bildung des Oxids findet fast ausschließlich an der Metall/Oxid-Grenzfläche statt, während die durch das Oxid wandernden Al^{3+} -Ionen an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche meist direkt in Lösung gehen. Die so bedingte

Stromeffizienz der real zur Oxidbildung beitragenden Ionen beträgt nur etwa 60% [Dre03A, Röm04]. An der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche werden die Protonen reduziert, während an der Metall/Oxid-Grenzfläche die Al-Atome zu Al^{3+} -Ionen oxidiert werden. Das entstandene Al^{3+} führt entweder zur Oxidbildung mit den an die Metall/Oxid-Grenzfläche gedrifteten OH^- beziehungsweise O^{2-} -Ionen oder driftet auf Grund der angelegten Spannung zur Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche und geht dort in Lösung. Falls die Parameter

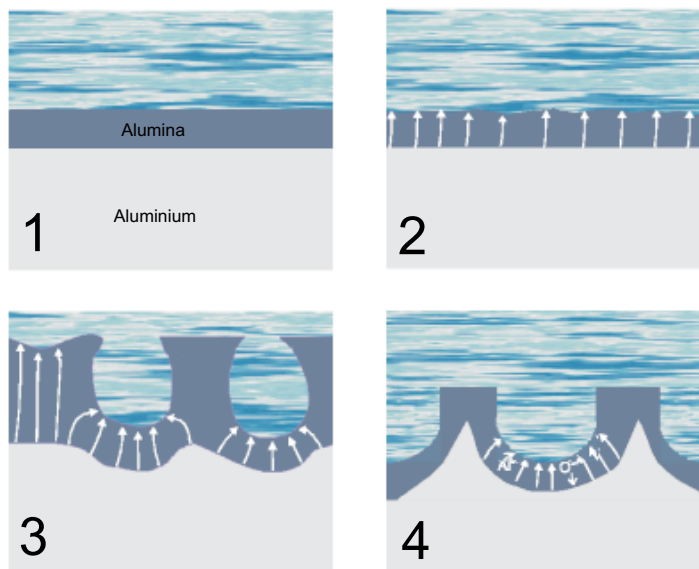


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Porenwachstums: 1. Phase: Ausbildung eines Barriereoxids; 2. Phase: Entstehung von signifikanten Vertiefungen; 3. Phase: Ausbildung erster, in alle Richtungen wachsender Poren; 4. Phase: vertikales Porenwachstum [Dre03B].

geeignet gewählt werden, entsteht eine poröse Struktur. Die Bildung des Barriereoxids und das Auflösen des Oxids an der Elektrolyt/Oxid-Grenzfläche sind dabei equilibrierte Prozesse, die eine Porenstruktur erlauben. Diese sich ausbildenden Poren wachsen nach einiger Zeit senkrecht zur Oberfläche. Die Abläufe des Porenwachstums sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Zunächst bildet sich wie bei der Entstehung von massivem Barriereoxid eine solche Schicht aus (Phase 1 in Abbildung 4.1). In Abbildung 4.2 ist der den einzelnen Phasen entsprechende Stromverlauf eines Anodisierungsprozesses von Aluminium in 0,3 M Oxalsäure dargestellt. Hier verdeutlichen der anfängliche Kurzschluss und

die folgende Abnahme des Stroms die Entstehung eines massiven Barriereoxids. Im weiteren Verlauf steigt der Strom langsam wieder an. Da sich zunächst signifikante Vertiefungen bilden (Phase 2 in Abbildung 4.1) und die allmähliche Bildung von Poren zu einer Verringerung der Oxidschicht führen, sinkt der Widerstand. Wegen der höheren lokalen Feldstärke an den Vertiefungen, die durch die Polarisierung der Al-OH Bindungen hervorgerufen wird, löst sich hierbei das Oxid schneller auf. Andererseits bewirkt die höhere Feldstärke auch einen größeren Ionenfluss, so dass neben einer schnelleren Auflösung des Oxids auch eine schnellere Bildung auftritt. Die entstehenden Vertiefungen werden nicht ausgeglichen, sondern verstärkt und können somit die Porenbildung begünstigen. Durch die in Phase drei ansteigende Ionendrift erhöht sich der Strom wieder. Die Poren wachsen in dieser Phase größtenteils in vertikaler Richtung, da sie sich in horizontaler Richtung durch das Prinzip des minimalen Widerstandes gegenseitig einschränken. Das Gleichgewicht von Dissoziation und Entstehung des Aluminiumoxids in den Porenböden ist durch den konstanten Stromverlauf erkennbar und bewirkt, dass Poren nur noch in vertikaler Richtung wachsen können (Phase 4 in Abbildung 4.1). Durch dieses Gleichgewicht lässt sich die Tiefe der Poren über die Ätzdauer einstellen. Die leichte Abnahme des Stroms in Phase 4 wird durch die chemische Veränderung der Elektrolytlösung, den Einbau von Sauerstoff oder die Freisetzung von Al^{3+} in den Poren hervorgerufen und kann durch Rühren der Elektrolytlösung vermindert werden [Jes97]. Das entstehende Aluminat besteht aus amorphem oder polykristallinem γ -Aluminiumoxid. Es ist hinlänglich bekannt, dass die Oxide während der Anodisierung Ionen aus der Elektrolytlösung inkorporieren, im vorliegenden Fall wurden für Oxalsäure Werte von 3 – 8% gefunden. Über den Wassergehalt finden sich bislang noch keine einheitlichen Werte in der Literatur. Sie variieren zwischen 0% und äquimolaren Größen. Detaillierte Informationen finden sich unter [Nie00, Li99, Jes98, Dre03A, Röm03].

Herstellung poröser Aluminate

Die Herstellung von porösen Aluminaten beinhaltet das Elektropolieren als Vorbehandlung, den Anodisierungsprozess, das Ablösen der anodisierten Strukturen und das weitere Anodisieren von vorstrukturiertem Aluminium. Eine schemati-

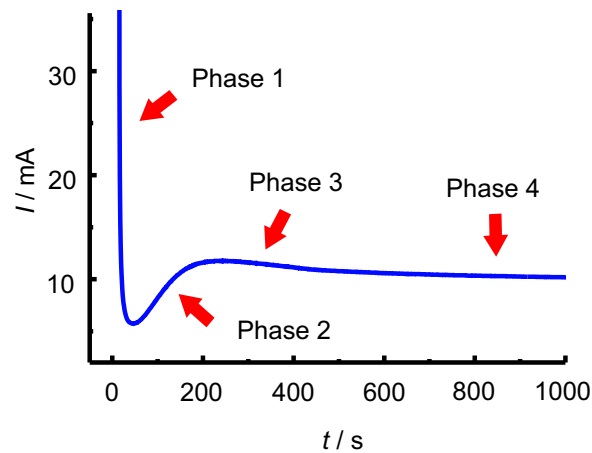


Abbildung 4.2: Resultierender Stromverlauf beim Anodisierungsprozess von Aluminium in 0,3 M Oxalsäure; gekennzeichnet sind die aus Abbildung 4.1 entsprechenden Phasen.

sche Darstellung der Apparatur zur Herstellung von porösen Aluminaten ist in Abbildung 4.3 dargestellt. In dieser Apparatur wird Aluminium als Anode in eine Kammer gespannt. Die Kammer wird mit Elektrolytlösung, zum Beispiel Phosphorsäure oder Oxalsäure, gefüllt. Als Kathode dient ein Platindraht, welcher in äquidistanten Abständen über der Anode gespannt ist. Die notwendige Temperatur wird über eine Kupferplatte, angeschlossen an eine Wasserkühlung, erreicht. Die Styroporummantelung senkt den Temperaturgradienten zwischen Elektrolytlösung und dem externen Wasserbad auf etwa $1,5^\circ\text{C}$. Der Rührer vermindert die Ionenverarmung in den Poren und wird mit einer externen Stromquelle betrieben.

Anodisierungsparameter:

Die hohe Attraktivität der porösen Aluminate begründet sich unter anderem mit der Wahl der Anodisierungsparameter, durch die es möglich ist, die Dicke der Oxidschicht, die Tiefe der Poren sowie ihren Durchmesser zu variieren. Im vorliegenden Fall ist beispielhaft die Dicke der Oxidschicht in Abhängigkeit der Spannung mit $1,3 \frac{\mu\text{m}}{\text{V}}$ angegeben. Die gesamte Dicke der porösen Schicht und somit auch die Tiefe der einzelnen Poren unterliegt bei Oxalsäure als Elektrolyt und einer Anodisierungsspannung von 40 V einer

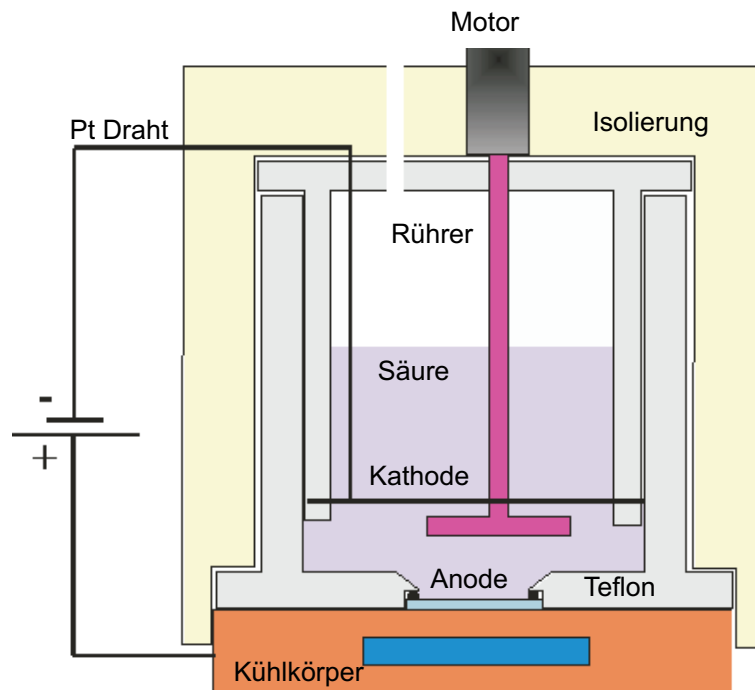


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der Apparatur, die zur Herstellung von porösen Aluminaten verwendet wird [Dre03B].

linearen Abhängigkeit zur Anodisierungszeit und ist mit $2\ \mu\text{m}$ pro Stunde anzunehmen. Der Durchmesser der Poren bei diesen Anodisierungsparametern wächst wiederum linear mit der angelegten Spannung und beträgt $2,6\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$. Li et al. gelang es, den Abstand der Poren zwischen 50 nm und 400 nm zu variieren. Detaillierte Informationen finden sich unter [Nie00, Li99, Jes98, Dre03B, Röm03].

Elektrochemisches Polieren:

Als Vorbereitung zur Herstellung der porösen Aluminate wird die Oberfläche der hochreinen Aluminiumträger (*Goodfellow*, 99,999%, Dicke 0,5 mm, $2 \times 2\ \text{cm}^2$) zunächst durch elektrochemisches Polieren geglättet. Dazu werden die Substrate drei- bis fünfmal bei einer Temperatur von $70\ ^\circ\text{C}$ und einer Spannung von 20 V solange elektropoliert, bis der Strom jeweils auf einen Wert von etwa 0,2 A abfällt. Dabei greift der Elektrolyt das durch die Standardpassivierung

gebildete Oxid mit einer sehr hohen Auflösungsrage an. Die Unebenheiten werden hierbei nicht verstärkt, sondern ausgeglichen. Der genaue Vorgang ist bislang noch nicht aufgeklärt worden. Um das Angreifen des Elektrolyten zu garantieren, wird eine Schwefelsäure/Phosphorsäure/Wasser Mischung verwendet, die im Massenverhältnis von 2 : 2 : 1 angesetzt ist. Das elektrochemische Polieren wird dann abschließend schlagartig zum Erliegen gebracht, indem die Probe mit Wasser gründlich gespült wird, wodurch ein weiteres Angreifen der Oberfläche durch den Elektrolyten vermieden wird.

Herstellung ungeordneter Poren:

Im zweiten Schritt zur Herstellung von Poren werden die polierten Aluminate in einem Anodisierungsprozess bei 2° C und 40 V geätzt. Durch diesen einstufigen Prozess entsteht eine ungeordnete Porenstruktur. Die elektropolierten Aluminiumträger werden hierzu in die in Abbildung 4.3 dargestellte Apparatur als Anode eingespannt und mit 0,3 M wässriger Oxalsäure (Acros, Deutschland) als Elektrolyt bedeckt. Nach etwa 6-8 h werden die Aluminiumträger aus der Apparatur genommen und mit Reinstwasser gespült, um alle Säurereste zu entfernen. Während des ganzen Prozesses erfolgt eine kontinuierliche Aufzeichnung des Stromverlaufs (siehe Abbildung 4.2). Die mit diesen Anodisierungsparametern hergestellten Poren haben einen Durchmesser von etwa 67 nm. Für die Herstellung größerer Poren wird die Oxalsäure durch 2,1 M Phosphorsäure als Elektrolyt ersetzt. Die bei 0 °C und einer Spannung von 160 V entstehenden Poren haben einen mittleren Durchmesser von 180 nm und weisen eine höhere Ordnung nach dem ersten Ätzprozess auf als die mit Oxalsäure geätzten Poren nach dem ersten Ätzprozess. Zur Herstellung von Poren eines mittleren Durchmessers von 30 nm wird Schwefelsäure (20 %_{gew}), eine Temperatur von 0 °C und eine Spannung von 18,7 V verwendet.

Herstellung geordneter Strukturen:

Um hoch geordnete Strukturen zu erhalten, werden die ungeordneten Aluminiumporen zunächst in einem Zwischenschritt vom Aluminium abgelöst. Da sich

die Poren bei dem ersten Anodisierungsschritt, in dem die ungeordneten Poren entstehen, nach unten hin ordnen, gewinnt man durch das Ablösen des Oxids eine hexagonal vorstrukturierte Oberfläche auf dem Aluminium. Dazu werden die ungeordneten Aluminiumträger bei 65°C in einer Chromoxid/Phosphorsäure-Lösung (1,8 %_{gew} CrO₃, 7,06 %_{gew} H₃PO₄ in H₂O) für 5 Stunden inkubiert. Dieser Schritt erlaubt es auch, bei bereits verwendeten porösen Aluminaten das Oxid zu entfernen und diese ein weiteres Mal zu verwenden.

Der zweite Anodisierungsprozess, der eine hexagonal geordnete Struktur der Poren bewirkt, wird mit den gleichen Parametern wie bei der Herstellung ungeordneter Poren durchgeführt. Bei diesem zweiten Anodisierungsprozess können die durch die Vorstrukturierung erhaltenen Vertiefungen über 3 bis 5 Stunden zu einer hexagonal angeordneten Porenstruktur aufbereitet werden.

Beschichtung der porösen Aluminate mit Gold:

Um eine Anbindung von Thiolipiden oder MPA auf der porösen Oberfläche zu ermöglichen, werden die porösen Oberflächen mit Chrom und Gold bedampft. Dazu wird der poröse Aluminiumträger zunächst für 10 Minuten im Argonplasma gereinigt. Die Beschichtung mit Chrom und Gold wird anschließend mit einer Aufdampfanlage der Firma *Balzars Coating System* durchgeführt. Die Aluminiumträger werden sofort nach der Plasmareinigung in die Aufdampfanlage eingebaut. Das Hochvakuum in der Aufdampfanlage, das einen Wert von circa $4 \cdot 10^{-6}$ bar erreichen sollte, wird über eine Öldiffusionspumpe und eine Turbomolekularpumpe erzeugt. Zu beachten ist, dass der Einbau und das Erzeugen des Vakuums direkt nach der Reinigung im Argonplasma erfolgt, um neue Verunreinigungen zu vermeiden. Durch thermisches Verdampfen werden zunächst 6 nm Chrom mit einer Rate von $0,5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ und danach 30 nm Gold mit gleicher Rate aufgedampft. Die Dicke der Schichten ist über die Änderung der Resonanzfrequenz eines in der Aufdampfanlage befindlichen Schwingquarzes, wie bei der Quarz-Mikrowaage, kontinuierlich bestimmbar.

4.1.2 Herstellung von atomar flachem Gold

Um einen Vergleich der porenüberspannenden mit den festkörpergestützten Membranen und die Berechnung der Adhäsionsenergie sowie die Untersuchung der Domänenstruktur des Mischsystems zu ermöglichen, wird zudem atomar glattes Gold als Trägersubstrat verwendet. Der Vorteil dieser Oberfläche liegt neben der glimmer-ähnlichen, planaren Beschaffenheit in der Möglichkeit, dass es mit den nanoporösen Substraten in den Eigenschaften der Oberflächenanbindung vergleichbar ist. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete atomar flache Gold besitzt eine vergleichbare Oberflächenrauigkeit wie Glimmer, so dass Membranstrukturen auf dieser Oberfläche leicht zu untersuchen sind.

Die Herstellung von atomar flachem Gold wurde zum Beispiel in der Arbeit von Hegner et al. beschrieben und erfolgte in der vorliegenden Arbeit in leicht abgewandelter Form [Heg93]. Frisch gespaltener Glimmer wird zunächst mit 100 bis 200 nm Gold bei einem Druck von ca. $4 \cdot 10^{-6}$ bar, wie bei den porösen Substraten, bedampft. Der mit Gold bedampfte Glimmer wird anschließend in kleine ca. 1 cm^2 große Stücke geschnitten und mittels Zwei-Komponenten-Kleber der Firma *Uhu* mit der Gold beschichteten Seite nach unten auf gereinigte Objektträger geklebt. Danach wird der Kleber für 24 Stunden bei 60° C gehärtet. Das so entstandene, in Abbildung 4.4 dargestellte Glimmer/Gold/Glas-„Sandwich“ kann mehrere Monate ohne Qualitätsverluste gelagert werden [Heg93]. Von diesem „Sandwich“ wird sukzessive der Glimmer mit einem Skalpell oder mit Tesafilm abgetrennt, bis nur noch das Gold auf der Oberfläche vorhanden ist. Die entstandene atomar flache Goldoberfläche wird für 7 min im Ultraschallbad in Isopropanol bei 60° C von den eventuell verbliebenen Kleberückständen befreit und für 1 h unter Vakuum getrocknet.

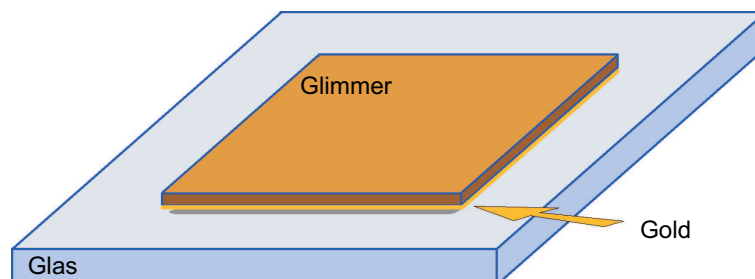


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung eines Gold-Glimmer-Sandwiches.

4.2 Herstellung artifizierlicher Membranen

In dieser Arbeit werden N,N-Dimethyl-N,N-dioctadecylammoniumbromid (DODAB) mit einem molaren Gewicht von $630,96 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol/1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/Cholesterin (DPPTE/DPhPC/Chol)¹ in verschiedenen Mischungen, sowie das flüssig-kristalline 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan Chlorid (DOTAP) mit einer molaren Masse von $697,58 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ benutzt (vergleiche Abbildung 4.5). Von den Lipidsystemen werden Stammlösungen mit einer Konzentration von $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in Chloroform hergestellt, entsprechende Mengen der Stammlösungen in zuvor mit Chloroform gespülte Reagenzgläser gegeben und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen. Dabei gilt es zu beachten, dass die Temperatur über den Hauptphasenumwandlungstemperaturen der verwendeten Lipide liegt. Dies wird mittels eines temperierten Wasserbades realisiert. Verbliebene Lösungsmittel werden durch anschließendes vierstündiges Trocknen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur unter Vakuum entfernt. Der so erhaltene Lipidfilm ist mehrere Wochen im Kühlschrank lagerbar.

4.2.1 Präparation von Vesikeln

Zur Vesikelpräparation wird der Lipidfilm in der entsprechenden Pufferlösung und der benötigten Konzentration gelöst. Dazu wird der Film mittels eines Wasserbades über seine Phasenumwandlungstemperatur erhitzt und für 15 Minuten inkubiert. Die Suspension wird anschließend für 30 s geschüttelt. Diese beiden Schritte werden bis zu viermal wiederholt, bis der Lipidfilm vollständig gelöst ist. Die so entstandene Suspension von multilamellaren Vesikeln wird danach oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur 31 mal durch eine Polycarbonatmembran mit entsprechendem Porendurchmesser gedrückt. Die so gewonnenen unilamellaren Vesikel können bis zu 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für Membranpräparationen auf porösen Aluminaten mit einem Porendurchmesser unterhalb von 67 nm sowie auf planarem Gold werden Polycarbonatmembranen mit einem nominellen Porendurchmesser von 400 nm benutzt. Der mittlere

¹DPPTE hat ein molares Gewicht von $731,0 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$; DPhPC von $846,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ und Cholesterin von $386,7 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$.

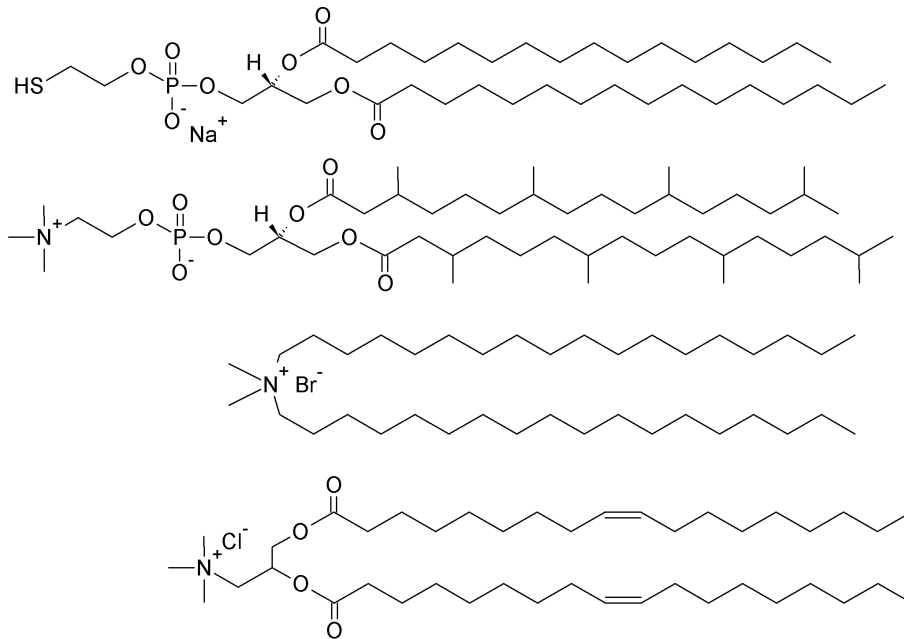


Abbildung 4.5: Strukturformeln von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol, 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, N,N-Dioctadecyl-N,N-dimethylammoniumbromid und 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan Chloride (von oben nach unten).

Durchmesser der unilamellaren Vesikel beträgt hierbei etwa $200 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}^2$. Bei Präparationen auf porösen Aluminaten mit einem Porendurchmesser von 180 nm werden Polycarbonatmembranen mit einem nominellen Durchmesser von 1000 nm verwendet. Hier beträgt die mittlere Vesikelgröße, wiederum bestimmt durch dynamische Lichtstreuexperimente, etwa $300 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$.

4.2.2 Präparation von Lipiddoppelschichten aus thiolipidhaltigen Vesikeln

Zur Präparation von thiolipidhaltigen Membranen auf porösen Oberflächen werden zwei verschiedene Lipidmischungen, die sich in ihrem Cholesterolgehalt unterscheiden, verwendet. Die erste Mischung besteht aus 60 %_{gew} 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol, 20 %_{gew} 1,2-Diphytanoyl-*sn*-

²Der Durchmesser der Vesikel wurde mehrmals mittels dynamischer Lichtstreuung überprüft.

glycero-3-phosphocholine und 20 %_{gew} Cholesterol, während das Mischungsverhältnis der zweiten Mischung 40/30/30 %_{gew} beträgt. Die Strukturformeln der verwendeten Lipide sind in Abbildung 4.5 gezeigt.

Die unilamellaren Vesikel werden mittels der Extrusionsmethode erzeugt, bei der ein LiposoFast[®]-Miniextruder der Firma Avestin mit Polycarbonatmembranen der Firma Avestin mit oben genannten nominellen Durchmessern von 400 nm beziehungsweise 1000 nm verwendet wird. Zuvor wird der Lipidfilm in 10 mM Bis-Tris Puffer mit 10 mM Na₂SO₄, pH 5,5 mit einer entsprechenden Konzentration gelöst. Dazu wird der Lipidfilm in dem Puffer auf 55 °C erhitzt und für 30 Sekunden mit einem Vortexer der Firma Heidolph geschüttelt. Die 31 mal extrudierten unilamellaren Vesikel werden direkt auf die für fünf Minuten im Argonplasma gereinigten entsprechenden Oberflächen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden werden die Proben mehrmals bei Raumtemperatur mit Puffer gespült, um nicht adsorbierte Vesikel zu entfernen.

4.2.3 Präparation von Lipiddoppelschichten auf negativ geladenen Oberflächen

Für die Herstellung von DODAB-Membranen, beziehungsweise der DOTAP Membran, werden die Substrate zunächst mit einer Monoschicht bedeckt. Dazu werden die mit Gold bedampften Substrate für 5 Minuten im Argonplasma gereinigt. Die Funktionalisierung der gereinigten Oberfläche erfolgt bei Raumtemperatur mit 3-Mercaptopropionsäure (3-Mercaptopropionic acid, MPA, HS-CH₂-CH₂-COOH) in einer 1 mM wässrigen MPA-Lösung mit einer Inkubationszeit von 60 min. Die nicht gebundenen Moleküle werden mit Reinstwasser und zusätzlich 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 8,6 entfernt. Die so vorbehandelte Oberfläche ist schnellstmöglich mit der aus unilamellaren DODAB-Vesikeln, repektive DOTAB Vesikel, bestehenden Lösung zu bedecken. Bei der Vesikelpräparation und Spreiten der Vesikel wird auf eine Temperatur von 55 °C geachtet, um sicher zu stellen, dass die Phasenumwandlungstemperatur von DODAB überschritten wird.

4.3 Präparation von nativen Membranen

4.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die *Mardine-Darby Canine* II Zellen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. H.-J. Galla in der Gruppe von Priv.-Doz. Dr. J. Wegener in Münster gezogen. Die MDCK-II Zellen werden aus einer Stammzucht aus der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) in Braunschweig bezogen und in Münster weiter kultiviert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Polystyrolflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² kultiviert.

Alle Zellpräparationen sowie die Herstellung der verwendeten Lösungen und Medien sind unter einer Sterilbank der Firma *Galire* durchgeführt worden. Das für die Zellzucht verwendete Medium besteht aus MEM Earle (1×), 2,2 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ NaHCO₃, 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ D-Glucose, 10 % (v/v) fötales Kälberserum, 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Penicillin, 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Streptomycin und 2 mM Glutamin. Zur Passage der Zellen, die einmal pro Woche durchgeführt worden ist, werden die Zellen mit PBS⁻⁻ (*phosphate buffered saline*³) gewaschen und 10 min mit einer EDTA-Lösung (5 mM in PBS⁻⁻) behandelt. Um die Zellen vom Substrat abzulösen, werden die von den Zellen gebildeten Haftproteine in einer 37 °C warmen 0,25 %-igen (w/v) Trypsinlösung verdaut, so dass sich der Zelloberbelag ablösen lässt. Nach dem Ablösen der Zellen wird dieser Prozess durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Mittels der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation kann der Überstand abgenommen werden und das erhaltene Pellet wiederum in Kulturmedium resuspendiert werden. Anschließend werden die Zellen im Verhältnis von 1:10⁴ auf die Substrate ausgesät. Bei Bedarf wird alle zwei Tage das Medium ausgewechselt.

4.3.2 Decaptierung von Zellen

Die MDCK-II Zellen besitzen als Epithelzellen eine *basal* und eine apikale Seite. Für die Untersuchung der Innenseite der *basalen* Membran, beziehungsweise der apikalen Membran einer Epithelzelle ist es erforderlich die Zelle in der Weise zu zerteilen, dass nur die *basale* Membran und das Zytoskelett auf dem Substrat

³Die Zusammensetzung von PBS⁻⁻ beziehungsweise PBS⁺⁺ ist 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ und 1,5 mM KH₂PO₄ in Milli-Q Wasser.

⁴Das Verhältnis bezieht sich auf die Zelldichte pro cm² Wachstumsfläche.

verbleibt. Diesen Vorgang wird als Decaptierung bezeichnet. Hierbei werden die Zellen so entfernt, dass lediglich die untere, beziehungsweise die obere Membran, die *basale* (*apikale*) Membran, zusammen mit ihrem Aktinskelett auf dem Substrat zurückbleibt.⁵ Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei verschiedene Varianten zur Decaptierung der Zellen durchgeführt und miteinander verglichen. Ein Vergleich der Methoden findet sich unter Kapitel 5.4.1.

Das *Sandwich-Cleaving*-Protokoll

Das *Sandwich-Cleaving* Verfahren wurde zum Beispiel in den Arbeiten von Le Grimellec et al. verwendet und ist in Abbildung 4.6 skizziert [LeG95]. Hierbei werden im Rahmen dieser Arbeit die Zellen entsprechend der oben beschriebenen Vorschrift auf den Substraten gezüchtet. Der präparierte Zelllayer (Abbildung 4.6 A) wird von oben mit einem Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas bedeckt, welches kräftig anpresst wird. Im dritten Schritt wird jegliches Wasser zwischen Deckglas und Substrat entfernt (Abbildung 4.6 B). Auf Grund der Poly-L-Lysin-Beschichtung binden die Zellen nach relativ kurzer Zeit an das Deckglas. Nach etwa einer Minute wird das „Substrat/Zellen/Deckglas“-Sandwich wieder getrennt, ohne laterale Scherkräfte zu applizieren (Abbildung 4.6 C). Durch die Anbindung der Zellen sowohl an das Poly-L-Lysin als auch an das Substrat reißen die Zellen dabei auseinander und es entsteht eine native Membranschicht, dargestellt in Abbildung 4.6 D.

Das *Squirting-Lysing*-Protokoll

Als eine Variante zur Decaptierung der Zellen wurde zunächst die Methode von Ziegler et al. in einer abgewandelten Form verwendet [Zie98]. Dabei werden die Zellen zunächst auf dem gewünschten Substrat ausgesät. Nachdem diese die entsprechende Wachstumsdichte erreicht haben, wird das Nährmedium gegen PBS⁺⁺ ausgetauscht. Nach dem Austausch werden die Zellen für 3 bis 10 min in *domain lysis buffer* (DLB-Puffer)⁶ inkubiert. Durch den osmotischen Druck, der durch die

⁵Eine Zielsetzung im Rahmen dieser Arbeit ist die Untersuchung der *basalen* Membran, so dass im Folgenden sich lediglich auf die *basale* Seite der Zelle bezogen wird.

⁶Der Puffer besteht aus 2,5 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), 0,5 mM MgCl₂ und 0,9 mM CaCl₂.

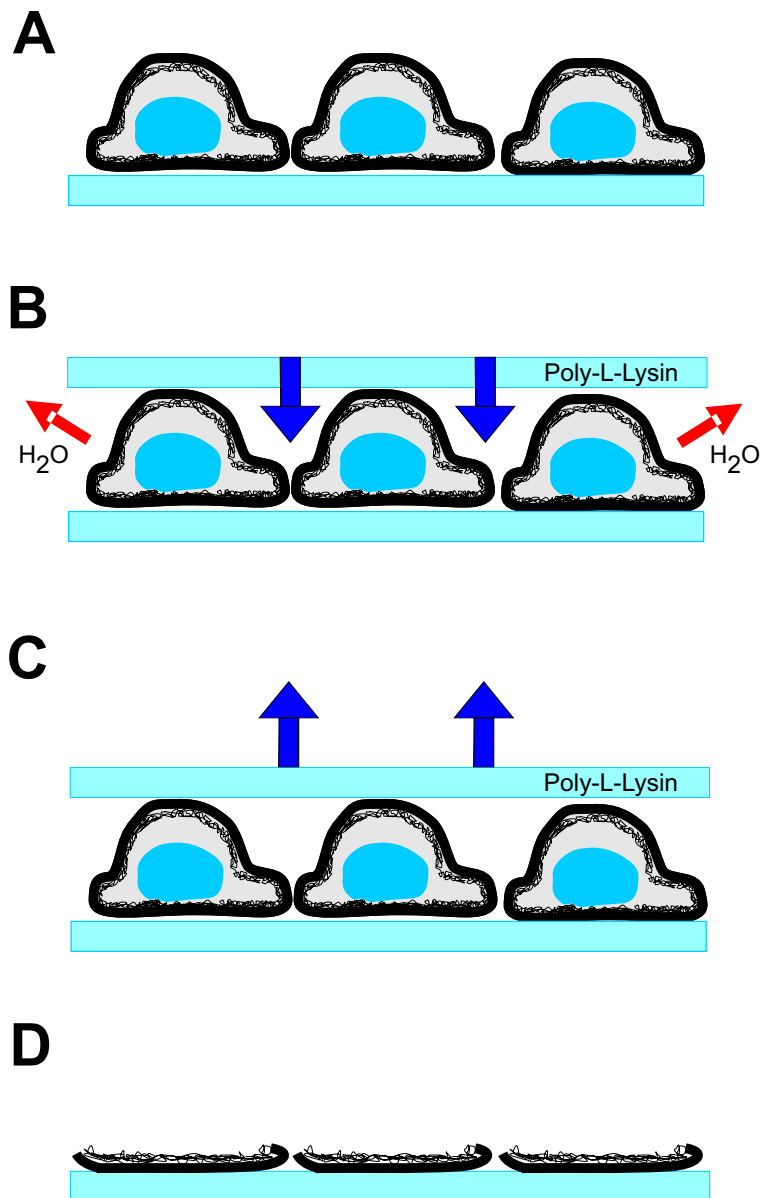


Abbildung 4.6: Schema zur Decaptierung der MDCK-II Zellen durchgeführt mittels *Sandwich-Cleaving*-Protokoll.

höhere Ionenkonzentration im Zellinneren und der geringeren Ionenkonzentration im DLB Puffer hervorgerufen wird, schwellen die Zellen an. Hierbei ist es wichtig, auf die Inkubationszeit zu achten (siehe Kapitel 5.4.1). Die Höhe der Zellen ist ausschlaggebend für das Gelingen der im Folgenden beschriebenen Decaptierung. Sobald die Zellen das geeignete Volumen erreicht haben, werden sie mit PBS^{++} gespült. Dabei werden laterale Scherkräfte appliziert, so dass die Zellen aufplatzen und nur die untere *basale* Membran zurückbleibt. Die decaptierten Zellen können ein bis zwei Tage bei 4 °C im Kühlschrank in PBS^{++} gelagert werden. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 4.7 gezeigt.

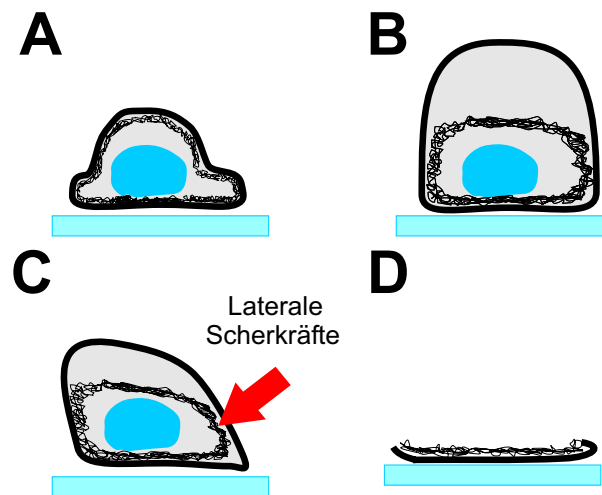


Abbildung 4.7: Schema zur Decaptierung der MDCK-II Zellen durchgeführt mittels *Squirting-Lysing*-Protokoll. A: Präparationsschritt eins zeigt eine Zelle im isotonen. B: Schritt zwei im hypotonen Zustand. C: Darstellung der lateralen Scherkräfte zum Decaptieren. D: Die native Membran.

4.3.3 Fixierung und Anfärbung

Nach der Präparation der Zellen, beziehungsweise der Membranfragmente ist es möglich diese zu fixieren. Dazu wird die Probe mittels Glutardialdehyd (GA) oder Paraformaldehyd (PFA) fixiert, indem die Proteine in der Membran miteinander vernetzt werden. Durch die Vernetzung mit der Zelle wird ein größeres *Youngsches* Modul erzielt (vergleiche Kapitel 5.5).

Die Proben werden mit 2,5 % Glutardialdehyd Lösung in PBS⁺⁺ Puffer 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Puffer ausgetauscht, um Wechselwirkungen mit dem Cantilever des AFM's zu vermeiden. Im Falle der Fixierung mittels Paraformaldehyd wurden diese für 5 Minuten inkubiert und danach der Puffer ausgetauscht. Für die Untersuchungen der Zellen mittels der CLSM-Technik müssen diese fluoreszenzmarkiert werden. Dazu wird der Farbstoff FITC-Dextran (0,5 mM, 4 kDa) im Puffer gelöst und zu den Zellen gegeben. Um bei den Experimenten in Kapitel 5.5 den unkontrollierten Fluss des Farbstoffes zu vermeiden, werden die Zellen zunächst dem osmotischen Stress ausgesetzt und später der Puffer mit einem Farbstoff enthaltendem Äquivalent ausgetauscht.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

Das Kapitel der Ergebnisse und Diskussion unterteilt sich in drei grundlegende Bereiche. Der erste Teil bezieht sich auf Untersuchungen an porenüberspannende, artifiziellen Membranen, während im zweiten Teil native Membransysteme untersucht werden. Der dritte Teil befasst sich mit den mechanischen Eigenschaften von lebenden Zellen unter osmotischem Stress.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lokal definierte Indentationsexperimente an artifiziellen Systemen durchgeführt. Dabei wurde eine porenüberspannende Lipidmembran mit einem parabolischen Indenter (*Cantilever* des AFMs) in die Poren gedrückt. Um diese artifiziellen, porenüberspannenden Systeme zu untersuchen, wurden zunächst geeignete Substrate (atomar flaches Gold und poröse Aluminate) hergestellt und charakterisiert. Nach der Charakterisierung der Substrate wurde ein theoretisches Modell für die Beschreibung der durchgeführten Indentationsexperimente entwickelt, um die elastischen Eigenschaften, wie zum Beispiel das Biegemodul κ und die Oberflächenspannung σ , einer porenüberspannenden Lipidmembran zu quantifizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die mechanischen Eigenschaften von nativen Membransysteme unter verschiedenen Aspekten untersucht. Zunächst wurde ein Protokoll entwickelt, welches es erlaubt native *basale* Membranen von Säugerzellen auf porösen Substraten zu präparieren. Im Folgenden wurden dann erste Indentationsexperimente an nativen Membransystemen vorgestellt und deren Problematik diskutiert. Des Weiteren wurden die mechanischen Eigenschaften an lebenden Zellen unter verschiedenen osmotischen Bedingungen untersucht. Dabei werden die *Youngschen* Module der MDCK-II Zellen unter hypertonischen, hy-

potonischen und isotonischen Bedingungen mit isoton-fixierten Zellen verglichen.

5.1 Charakterisierung der Substrate

5.1.1 Atomar flaches Gold

Atomar flache Oberflächen sind wichtige Voraussetzungen für hochaufgelöste Abbildungen mit dem Rasterkraftmikroskop. Aus diesem Grund ist es erforderlich, solche Oberflächen herzustellen, um festkörperunterstützte Membranen mit Höhen von wenigen Nanometern abbilden zu können. Goldoberflächen sind dabei im Rahmen dieser Arbeit besonders wünschenswert, da sie neben der atomar flachen Struktur auch eine Anbindung von Thiollipiden in gleicher Weise wie bei den hier verwendeten porösen Substraten erlauben. Atomar flaches Gold wurde mit dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Verfahren hergestellt. Des Weiteren wurde Gold auf herkömmliche Weise mit einer Rate von $0,2 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bei einem Druck von ca. $4 \cdot 10^{-6}$ bar auf Glimmer aufgedampft, um dieses mit dem atomar flachen Substrat zu vergleichen.

Zur Charakterisierung des atomar flachen Goldes wurden jeweils rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von beiden Proben im *contact mode* erstellt (Abbildung 5.1). Das topographische Bild ist links neben der histogrammischen Analyse dargestellt. Eine planare Struktur ist deutlich sichtbar. Die histogrammische Analyse zeigt deutlich ein Gauß-förmiges Verhalten für beide Proben aus der sich eine Standardabweichung von 0,27 nm für atomar flaches Gold ergibt. Die erzielte planare Fläche von atomar flachem Gold entspricht den Resultaten von [Heg93, Wag95, Per04]. Vereinzelt Vertiefungen (Abbildung 5.1 A, Pfeil) sind auf Defektstellen zurückzuführen, die durch das Abziehen mit *Tesa Film* entstehen können. Stellenweise kann das Gold mit dem Glimmer zusammen von der Probe entfernt werden. Die erhaltene atomar flache Struktur über mehrere Quadratmikrometer eignet sich trotz einiger Fehlstellen hervorragend für die Abbildung eines wenige Nanometer hohen *Bilayers*. Im Vergleich zu dem atomar flachen Gold ist zusätzlich die histogrammische Analyse von herkömmlich mit Gold bedampfte Proben mit einer Standardabweichung von 8,9 nm dargestellt (siehe Abbildung 5.1 rechts, rote Linie). Die Standardabweichung von 0,27 nm des atomar flachen Substrates verglichen mit der Standardabweichung von 8,9 nm bei herkömmlich aufgedampften Gold liefert eine Verbesserung der Oberflächenrauigkeit um den Faktor 35 und eine Höhenverteilung im Subnanometerbereich. In Arbeiten von Wagner et al. gelang es, atomar flaches Gold im Subnanometer-

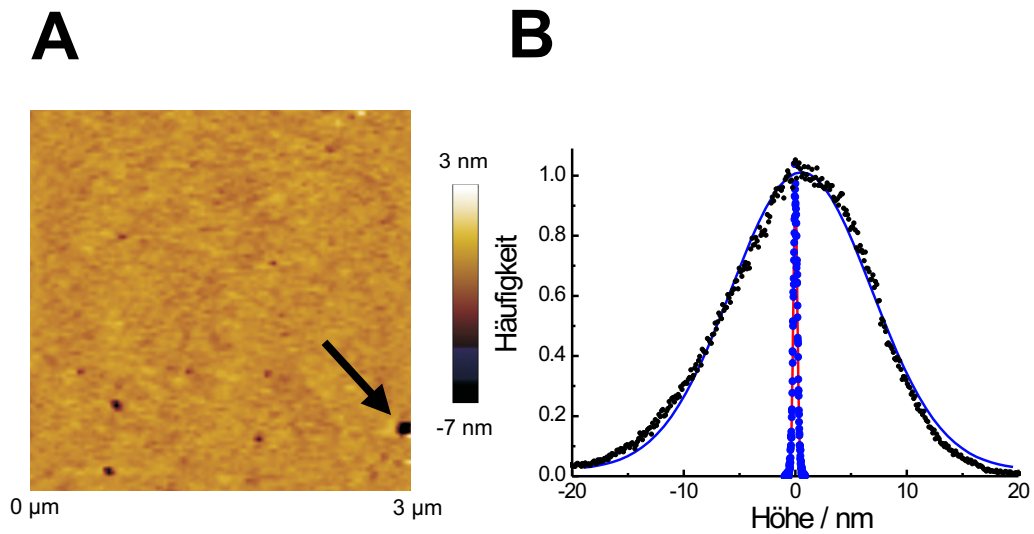


Abbildung 5.1: A: Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahme von atomar flachem Gold auf einem Objektträger. Der Pfeil markiert einen Defekt in der Goldschicht, der durch das Spalten des Glimmers hervorgerufen werden kann. B: Histogrammische Analyse der topographischen Aufnahme sowie ein Vergleich mit herkömmlich aufgedampftem Gold. Die Histogramme wurden zum Vergleich miteinander auf eins normiert. Das atomar flache Gold zeigt eine Standardabweichung von 0,27 nm (blau, Gaußfit rot), während das herkömmlich aufgedampfte Gold eine Standardabweichung von 8,9 nm aufweist (schwarz, Gaußfit blau).

Bereich herzustellen, indem das Gold mit verschiedenen Techniken aufgedampft und dann unter anderem mit Tetrahydrofuran (THF) vom Glimmer abgelöst wurde [Wag95]. So lassen sich eventuelle Kleberückstände ausschließen und der Glimmer ist einfacher vom Gold abzulösen. Dieses Verfahren ist jedoch wesentlich umständlicher als das Spalten mit Tesafilm und einem Skalpell. In dieser Arbeit wurde auf das Ablösen des Glimmers durch Tetrahydrofuran verzichtet, da bereits unter Zuhilfenahme eines Skalpells eine ausreichend geringe Rauigkeit erzielt wurde (siehe auch Kapitel 5.3.1).

5.1.2 Poröse Aluminate

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der porösen Aluminate werden im Rahmen dieser Arbeit rasterkraftmikroskopische und elektronenmikroskopische Methoden eingesetzt. Als wesentliche Charakterisierungsmerkmale dienen dabei die Oberflächenporosität, der Durchmesser der Poren sowie ihre Ordnung.

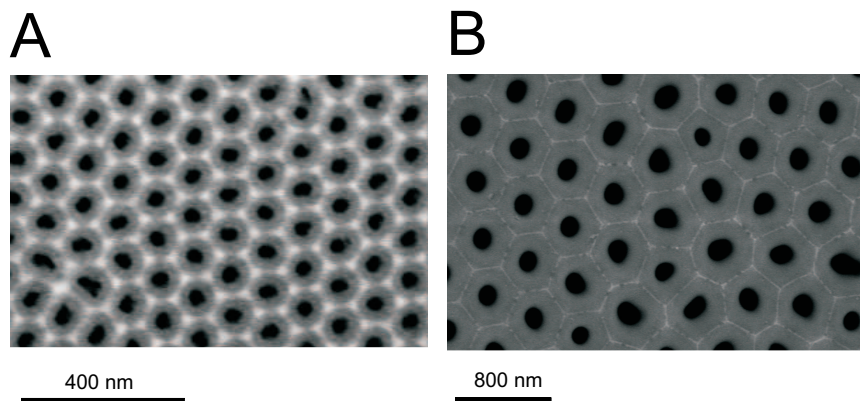


Abbildung 5.2: A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines in 0,3 M Oxalsäure geätzten Aluminiumträgers, der nach zweistufigem Ätz-Prozess erhalten wurde. Die hexagonale Porenstruktur ist deutlich zu erkennen. B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines in 2,1 M Phosphorsäure geätzten Aluminiumträgers, der nach zweistufigem Ätz-Prozess erhalten wurde.

Abbildung 5.2 zeigt zwei rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von porösen Aluminaten. In Abbildung 5.2 A sind die Poren, die mittels Anodisierung in 0,3 M Oxalsäure hergestellt wurden, dargestellt, rechts die in 2,1 M Phosphorsäure anodisierten. Zur Bestimmung der Porosität der in Abbildung 5.2 dargestellten Probe wurde eine Porenanalyse mittels *SPiP* durchgeführt. Es ergibt sich eine Porosität von $(34 \pm 4) \%$ und ein mittlerer Porendurchmesser von $(67 \pm 7) \text{ nm}$ für die mit Oxalsäure geätzten Poren. Die Porenanalyse für die in Phosphorsäure geätzten Poren (Abbildung 5.2 B) ergibt eine Porosität von $(14 \pm 4) \%$ und einen mittleren Durchmesser von $(180 \pm 10) \text{ nm}$. Die Befunde sind in sehr guter Übereinstimmung zu [Dre03A, Hen03B].

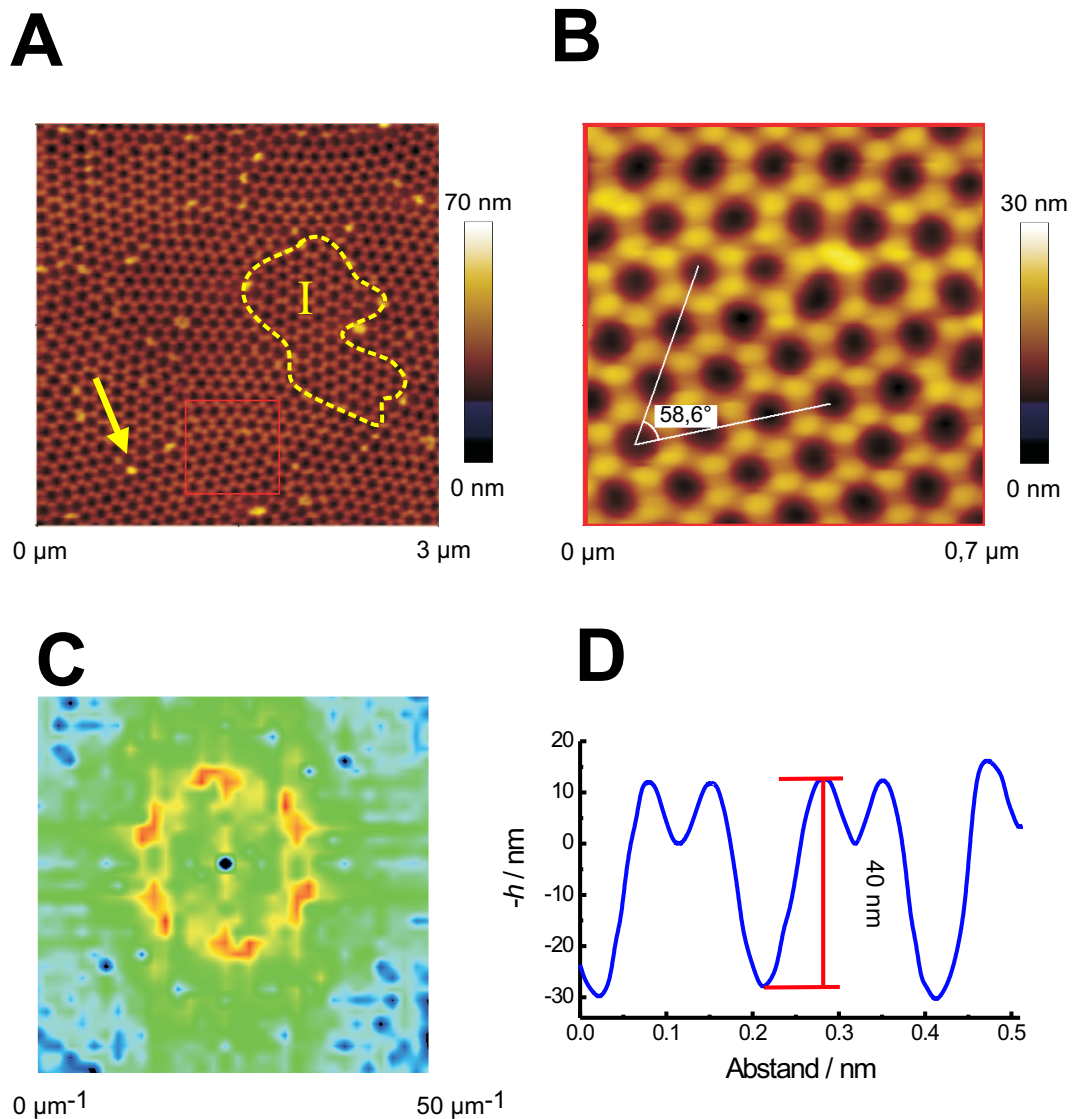


Abbildung 5.3: A: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines in Oxalsäure geätzten, porösen Aluminats. Der mittlere Porendurchmesser beträgt etwa 67 nm. Deutlich zeigt sich die hexagonale Anordnung der Poren bis zu den Korngrenzen des Aluminiums (Markierung I). Die mittels des gelben Pfeils markierten Inhomogenitäten befinden sich an den Rändern der Korngrenzen. B: Vergrößerung von A zusammen mit der Winkelbestimmung zwischen zwei Poren. C: Fourieranalyse des in B dargestellten Ausschnitts. D: Höhenanalyse entlang der in Abbildung B gezeigten Linie. Die maximale Eindringtiefe liegt bei etwa 40 nm.

Abbildung 5.3 A zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme von in Oxalsäure hergestellten, geordneten Poren. Deutlich zeichnet sich das hexagonale Muster bis zu den Korngrenzen des Aluminats ab. An diesen Korngrenzen bilden sich während des Anodisierungsprozesses immer wieder Inhomogenitäten (vergleiche Abbildung 5.3 A, Markierung I und Pfeil), die die geordnete Struktur der Oberfläche zwar unterbrechen, jedoch bei der Identifizierung einzelner Poren als Hilfsmittel dienen. Aus diesem Grund wurde bei der Herstellung der porösen Substrate auf die Minimierung dieser Inhomogenitäten verzichtet.

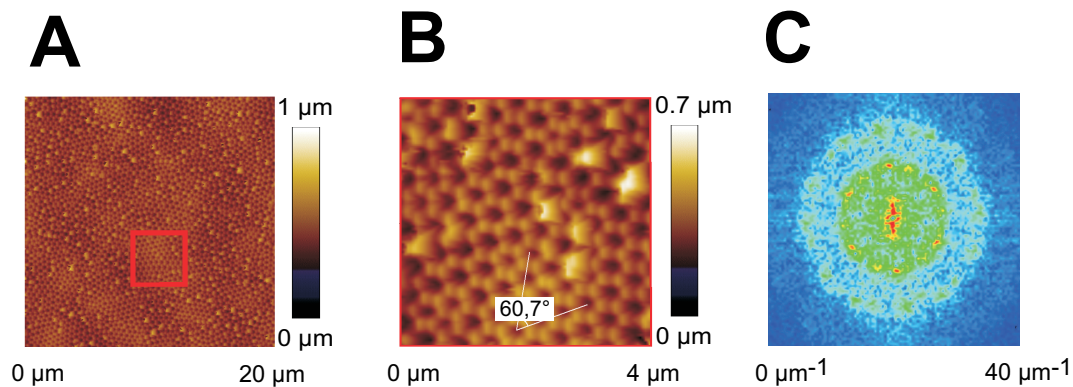


Abbildung 5.4: A: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines in 2,1 M Phosphorsäure geätzten, porösen Aluminats. Der Porendurchmesser beträgt 180 nm. B: Vergrößerung von A. C: Fourieranalyse des in B dargestellten Ausschnitts. Deutlich zeigt sich die hexagonale Anordnung der Poren.

In Abbildung 5.3 B ist die Vergrößerung aus Abbildung 5.3 A, die zur Fourieranalyse in Abbildung 5.3 C verwendet wurde, dargestellt. Die Abbildung 5.3 C zeigt deutlich sechs im Kreis angeordnete Häufungspunkte, die die hexagonale Anordnung der Poren wieder geben. Aus Abbildung 5.3 B ist der Winkel zwischen zwei benachbarten Poren innerhalb einer Korngrenze von $58,6^\circ \pm 5^\circ$ ermittelbar. Dieser Winkel ist charakteristisch für eine hexagonale Anordnung, die auch durch die sechs im Kreis angeordneten Häufungspunkte der Fourieranalyse in Abbildung 5.3 C und den Arbeiten von Drexler und Hennesthal bestätigt werden [Dre03A, Hen03B].

Durch Höhenanalysen, wie exemplarisch in Abbildung 5.3 D entlang der in Abbildung 5.3 B dargestellten blauen Linie gezeigt, lässt sich zusätzlich die maximale Eindringtiefe der Rastersonde in die Poren zu $40 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ bestimmen.

Zusätzlich zu den Poren mit einem Durchmesser von 67 nm wurden im Rahmen

dieser Arbeit auch Poren mit einem Durchmesser von 180 nm verwendet. Diese in 2,1 M Phosphorsäure hergestellten Poren sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Abbildung 5.4 A zeigt das poröse Aluminium als rasterkraftmikroskopische Abbildung eines $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. Zur Bestätigung der hexagonalen Struktur wurde zum einen der Winkel zwischen zwei benachbarten Poren zu $60,7^\circ$ in der Vergrößerung 5.4 B bestimmt und zum anderen Abbildung 5.4 A fouriertransformiert. Deutlich zeigen sich sechs Häufungspunkte in Abbildung 5.4 C, die wiederum die hexagonal Anordnung der Poren mit einem Durchmesser von $R_{\text{Pore}} = 90 \text{ nm}$ und einem Winkel von 60° bestätigen. Ferner kann eine maximale Eindringtiefe von 280 nm bis 400 nm bestimmt werden, die je nach verwendeten *Cantilever* stark variiert. Die Eindringtiefe des *Cantilevers* in eine Pore während des Scanvorgangs ist unabhängig von der Aufdruckkraft und dem Betriebsmodus (nicht gezeigt). Die maximale Eindringtiefe h_E hängt nur von dem Radius der Pore R_{Pore} und der Spitzengeometrie des *Cantilevers* $t(\rho)$ ab. In einer ersten Näherung zur Berechnung der maximalen Eindringtiefe der Spitze in eine Pore wird der *Cantilever* als parabelförmig angenommen. Unter Berücksichtigung der Porenstegstruktur aus Abbildung 5.3 B und D, die Erhebungen von $(11 \pm 2) \text{ nm}$ aufweisen, ergibt sich folgender Ausdruck für die maximale Eindringtiefe h_E in Abhängigkeit der Radien von Pore und *Cantilever*:

$$h_E = \frac{1}{2R_{\text{Tip}}} R_{\text{Pore}}^2 - H_{\text{Erhebung}}. \quad (5.1)$$

Der Radius der Spitze R_{Tip} ist aus Abbildung 5.5 A, beziehungsweise B zu entnehmen, und ist mit einer mittleren Größe von $(20 \pm 7) \text{ nm}$ aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestimmt worden¹. In Abbildung 5.5 ist die theoretisch bestimmte maximale Eindringtiefe dargestellt. Bei den Poren mit einem Radius von 33,5 nm wird eine Eindringtiefe von etwa 30 nm erwartet, bei einem Radius von 180 nm beträgt sie etwa 330 nm. Dies entspricht den Werten, die aus den Messungen bestimmt wurden.

¹Für die weiteren Messungen wurde jeweils der Radius des *Cantilevers* im Einzelfall mit Hilfe von TEM Aufnahmen bestimmt. Auftretende Variationen des Spitzenradius in der Auswertung beruhen auf diesem Grund.

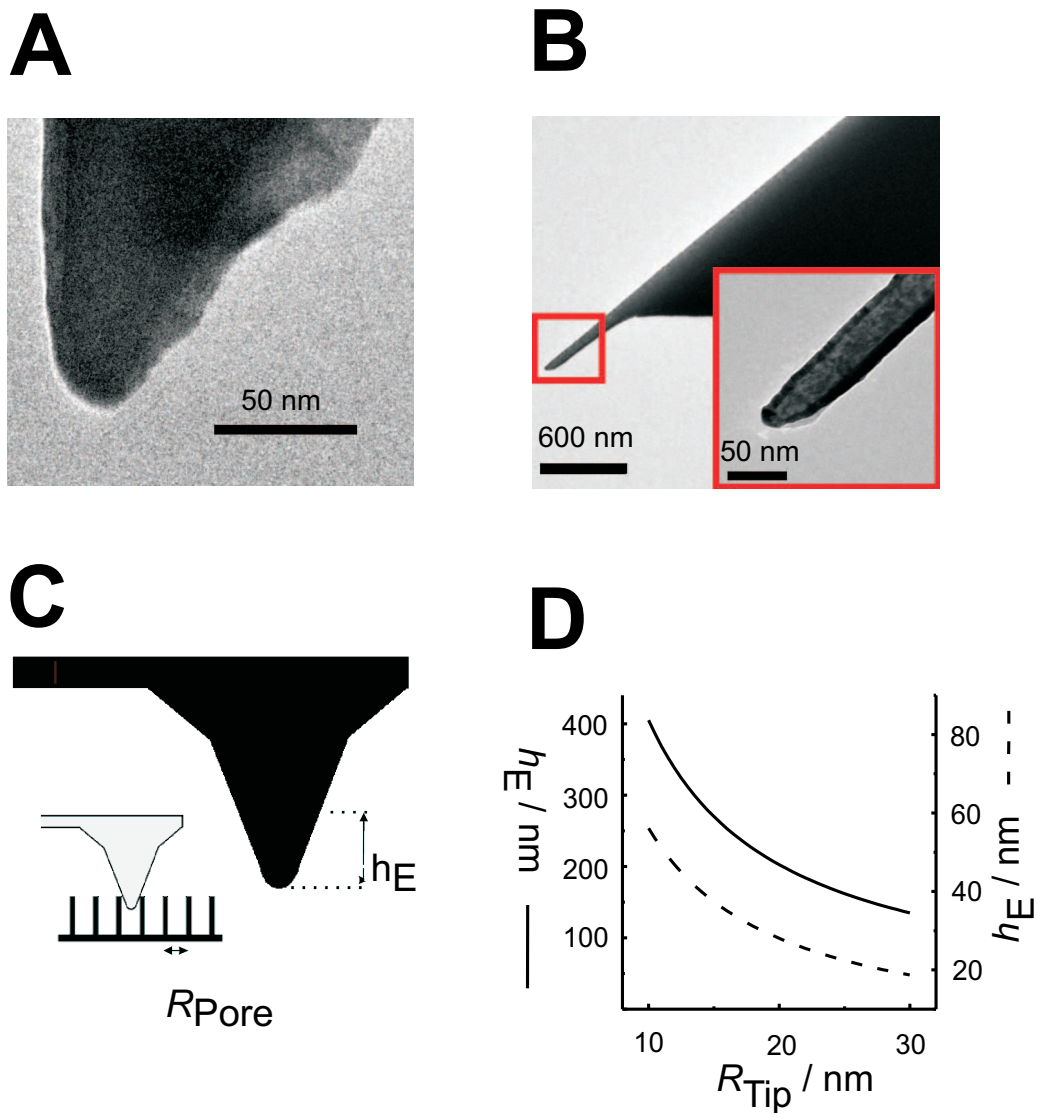


Abbildung 5.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verwendeten Spitzen. A zeigt den hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Typ Olympus TR PSA 400, während in B das Fabrikat Olympus BL-RC150VB-C1 dargestellt ist. In C ist schematisch die Eindringtiefe des *Cantilever* in die Poren mit den relevanten Variablen skizziert. Abbildung D zeigt die theoretisch bestimmte maximale Eindringtiefe für die verwendeten Porenradien, wobei die durchgezogene Linie die maximale Eindringtiefe aus Berechnungen mit einem mit Radius von 90 nm beziehungsweise die gestrichelte Linie von 33,5 nm darstellt.

5.2 Theoretisches Modell für die Indentation von porenüberspannenden Membranen

Zur Entwicklung eines theoretischen Modells zur Beschreibung der kraftabhängigen Indentation bedient man sich im Allgemeinen und auch hier der Elastizitätslehre. Die Elastizitätstheorie ist die Lehre von der Mechanik der Körper, die als Kontinuum anzusehen sind. Steht ein Körper unter der Einwirkung äußerer Kräfte, wird er bis zu einem gewissen Grad deformiert oder ändert seine Form. In der Elastizitätstheorie wird zwischen Deformation und Änderung der Form unterschieden. Bei Änderung der Form wird die molekulare Anordnung nicht deformiert, sie entspricht dem thermodynamischen Gleichgewicht. Während der Deformation ändern Körper dagegen ihr Volumen und im Inneren kommt es zu Spannungen. Diese bei der Deformation auftretenden Kräfte werden innere Spannungen: σ_{int} genannt.

Im Folgenden werden solche inneren Spannungen vernachlässigt, es wird nur von äußeren Spannungen ausgegangen, das heißt $\sigma_{\text{int}} = 0$. Des Weiteren werden die in Kapitel 2.3 angesprochenen Bedingungen der „Dünnen Platten-Theorie“ angenommen [Lan]. Dies bedeutet neben der Vernachlässigung der Schwerkraft ($\sigma_{\text{int}} = 0$), dass die dünne Platte als homogenes isotropes Medium angenommen werden kann. Es wird zusätzlich eine gewisse Weichheit der dünnen Platte vorausgesetzt, so dass diese keine so genannte *shape memory* besitzt und somit nur elastische Verformungen erfährt. Mit den oben genannten Voraussetzungen und mit der Annahme, dass die Platte sich nur wenig im Vergleich zu ihrer Ausdehnung verbiegt, soll im Folgenden ein Ausdruck für die Eindringtiefe h in Abhängigkeit der Kraft F , verursacht durch einen parabolischen Indenter $t(\varrho)$, entwickelt werden.

Die Entwicklung eines theoretischen Modells wird in diesem Kapitel in drei Abschnitte unterteilt: Zunächst wird die Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ der dünnen Platte in Abhängigkeit des Radius ϱ bei einer festen Eindringtiefe bestimmt. Dazu wird die *Euler-Lagrange-Gleichung* über den Ansatz der minimalen Energie hergeleitet und mit speziellen, dem Problem angepassten Randbedingungen, gelöst. Als zweiter Schritt wird die Kraft F als Funktion der Krümmung der Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ ermittelt, dabei wird die dünne Platte an einer beliebigen Stelle zerteilt und die entstehenden freien Kräfte in die von dem tangentialen Vektor \hat{t} und dem longitudinalen Vektor \hat{l} in der Ebene der Membran, sowie den normalen Vektor \hat{n}

auf der Ebene, transformiert. Die differentialgeometrischen Bedingungen, die im Rahmen dieser Arbeit als gegeben betrachtet werden, ergeben zusammen mit der Oberflächenfunktion einen Ausdruck für die Eindringtiefe in Abhängigkeit von der Kraft. Im dritten Teil dieses Abschnitts werden erste Ergebnisse der semi-analytischen Rechnungen diskutiert.

Die Ergebnisse dieser mathematischen Beschreibung der Indentation einer dünnen Platte durch einen parabolischen Indenter lassen sich leicht auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente übertragen. Dabei ist die dünne Platte zusammen mit den Voraussetzungen das geeignete Analogon der porenüberspannenden Lipidmembran. Die Lipidmembran kann als isotropes homogenes Medium ohne *shape memory* behandelt werden (vergleiche zum Beispiel Kapitel 5.3.1). Der *Cantilever* ist dabei der paraboloidförmige Indenter.

I. Berechnung der Oberflächenfunktion (lineare Approximation)

Zur Berechnung der Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ für die Membran wird eine dünne Platte angenommen, wobei keine Scherkräfte und keine Streckung existieren sollen. Des Weiteren ist der äußere Druck auf die Platte null ($\Delta p = 0$) [Bou98]. Als erste Näherung wird der Ausdruck für die Energie einer Platte, Gleichung 2.4, linearisiert, wobei angenommen wird, dass sich die Platte nur gering verbiegt. Durch die geringe Verbiegung der Platte ist es möglich eine sogenannte *small gradient case* anzunehmen. Der besagt, dass durch die kleinen Eindringtiefen und Verbiegungen die Näherung $\sqrt{1 + (\nabla h)^2} \approx 1$ und somit gilt:

$$\begin{aligned}
 E_{\text{Membran}} &= \int_A d\tilde{A} \left(\frac{1}{2} \kappa K^2 + \sigma \right) \\
 d\tilde{A} &= dx dy \sqrt{1 + (\nabla h)^2} \approx dx dy \left(1 + \frac{1}{2} (\nabla h)^2 \right) \\
 K &= -\nabla \frac{\nabla h}{\sqrt{1 + (\nabla h)^2}} \approx -\Delta h \\
 \Rightarrow E &\approx \int_A dx dy \left(\frac{1}{2} \kappa (\Delta h)^2 + \sigma \left(1 + \frac{1}{2} (\nabla h)^2 \right) \right) \\
 \Rightarrow E &\approx \frac{1}{2} \int_A dx dy \left(\kappa (\Delta h)^2 + \sigma (\nabla h)^2 \right) + \delta_{\text{const}}. \quad (5.2)
 \end{aligned}$$

Des Weiteren muss die Energie der porenüberspannenden Membran aus Formel 2.4 im Gleichgewichtszustand minimal sein (Prinzip der minimalen Energie). Da-

zu wird mittels des Variationsansatzes, bei dem kleine Variationen der Energie von $h \rightarrow h + \delta h$ betrachtet werden, variiert:

$$\begin{aligned}
 E(h + \delta h) - E(h) &= \underbrace{\frac{1}{2} \int_A dx dy \left(\kappa (\Delta(h + \delta h))^2 + \sigma (\nabla(h + \delta h))^2 \right)}_{\text{Variation von } h} \\
 &\quad - \underbrace{\frac{1}{2} \int_A dx dy \left(\kappa (\Delta h)^2 + \sigma (\nabla h)^2 \right)}_{\text{Normale von } h}
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Durch folgende Rechenregeln der Vektoranalysis,

$$\begin{aligned}
 \text{a) } \quad \nabla \cdot (\Delta h \nabla \delta h) &= \nabla(\Delta h) \nabla \delta h + \Delta h \Delta \delta h, \\
 \text{b) } \quad \nabla \cdot (\nabla h \delta h) &= \Delta h \cdot \delta h + \nabla h \nabla \delta h, \\
 \text{c) } \quad \nabla \cdot (\nabla(\Delta h \delta h)) &= \Delta \Delta h \delta h + \nabla \Delta h \cdot \nabla \delta h,
 \end{aligned} \tag{5.4}$$

ergibt sich die Gleichung:

$$\begin{aligned}
 \delta E &= \int_A dx dy \left[\kappa (\Delta h) (\Delta \delta h) + \sigma (\nabla h) (\nabla \delta h) \right] \\
 &= \int_A dx dy \left[-\kappa \nabla \Delta h \cdot \nabla \delta h - \sigma \Delta h \delta h + \nabla \left(\kappa \Delta h \nabla \delta h + \sigma \nabla h \delta h \right) \right] \\
 &= \int_A dx dy \left[\underbrace{(\kappa \Delta \Delta h - \sigma \Delta h) \delta h}_{\text{bulk term}} + \underbrace{\nabla \left(\kappa \Delta h \nabla \delta h - \kappa \nabla \Delta h \delta h + \sigma \nabla h \delta h \right)}_{\text{boundary term}} \right].
 \end{aligned} \tag{5.5}$$

Bei kleinen Indentationen wird der Randterm (*boundary term*) auf Grund kleiner Änderungen von $\delta h \rightarrow 0$ verschwinden, da bei $h \rightarrow 0$ $(\nabla \delta h) \rightarrow 0$ viel stärker konvergiert. Somit können die Terme mit $\nabla \delta h$ vernachlässigt werden. Der *bulk term* hingegen liefert die entscheidende *Euler-Lagrange-Gleichung* 5.7 und muss für $\delta E = 0$ verschwinden, da δh gegen null geht. Zusammenfassend ergibt sich für die Energie einer dünnen Platte aus Gleichung 2.4 nach Transformation in Zylinderkoordinaten und Ausnutzen der Zylindersymmetrie folgender Ausdruck:

$$\begin{aligned}
 E_{\text{Membran}} &= \int_A d\tilde{A} \mathcal{H} \\
 &= \frac{1}{2} \int_A dx dy \left(\kappa (\Delta h)^2 + \sigma (\nabla h)^2 \right) \\
 &= \pi \int_0^{R_{\text{Pore}}} d\rho \rho \left[\kappa (\Delta h(\rho))^2 + \sigma (\nabla h(\rho))^2 \right].
 \end{aligned} \tag{5.6}$$

Aus Gleichung 5.3, 5.5 und 5.6 ergibt sich unter Verwendung des Gauß'schen Satzes die *Euler-Lagrange-Gleichung*:

$$\begin{aligned} \Delta\left(\Delta - \frac{1}{\lambda^2}\right)h(\varrho) &= 0, \\ \text{Eigenwertgleichung : } \Delta h(\varrho) = 0 &\vee \left(\Delta - \frac{1}{\lambda^2}\right)h(\varrho) = 0 \quad (5.7) \\ \text{mit } \lambda = \sqrt{\frac{\sigma}{\kappa}} &\text{ und } \kappa = \frac{E h^3}{12(1 - \sigma^2)}. \end{aligned}$$

Hierbei bezeichnet $h(\varrho)$ die Oberfläche der porenüberspannenden Membran in Abhängigkeit des Radius ϱ , des Biegemoduls κ und der Oberflächenspannung σ . Im Folgenden ist $\varrho = 0$ als Mittelpunkt der Pore definiert. Als allgemeine Lösung des aus der Differentialgleichung resultierenden Eigenwertproblems 5.7 ergibt sich folgende Lösung:

$$h(\varrho) = h_1 \cdot \mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + h_2 \cdot \mathbf{K}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + h_3 \cdot \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + h_4, \quad (5.8)$$

in der \mathbf{I}_0 und \mathbf{K}_0 die modifizierten Besselfunktionen erster und zweiter Art nullter Ordnung beschreiben. Die einzelnen Integrationskonstanten $h_{1..4}$ werden im Folgenden durch geeignete Randbedingungen (Rb. 1 bis 5) bestimmt, die sich aus einfachen geometrischen Überlegungen mittels Abbildung 5.6 ergeben:

1. Durch die Anbindung des Bilayers an das Substrat muss die Membran am Rand der Pore flach aufliegen:

$$h(\varrho) |_{\varrho=R} = 0, \quad (5.9)$$

2. Durch das flache Aufliegen der Membran ergibt sich ein Kontaktwinkel von null Grad:

$$\frac{d}{d\varrho}h(\varrho) |_{\varrho=R} = 0, \quad (5.10)$$

3. Die Eindringtiefe der Membran $h(c)$ am Kontaktpunkt c ist gleich dem Profil der *Cantilever-Spitze* $t(c)$

$$h(\varrho) |_{\varrho=c} = t(\varrho) |_{\varrho=c}, \quad (5.11)$$

4. Die Steigung der Membran am Kontaktpunkt c muss gleich der Ableitung der Eindringtiefe der Spitzenfunktion $t(c)$ sein, das bedeutet, dass die Mem-

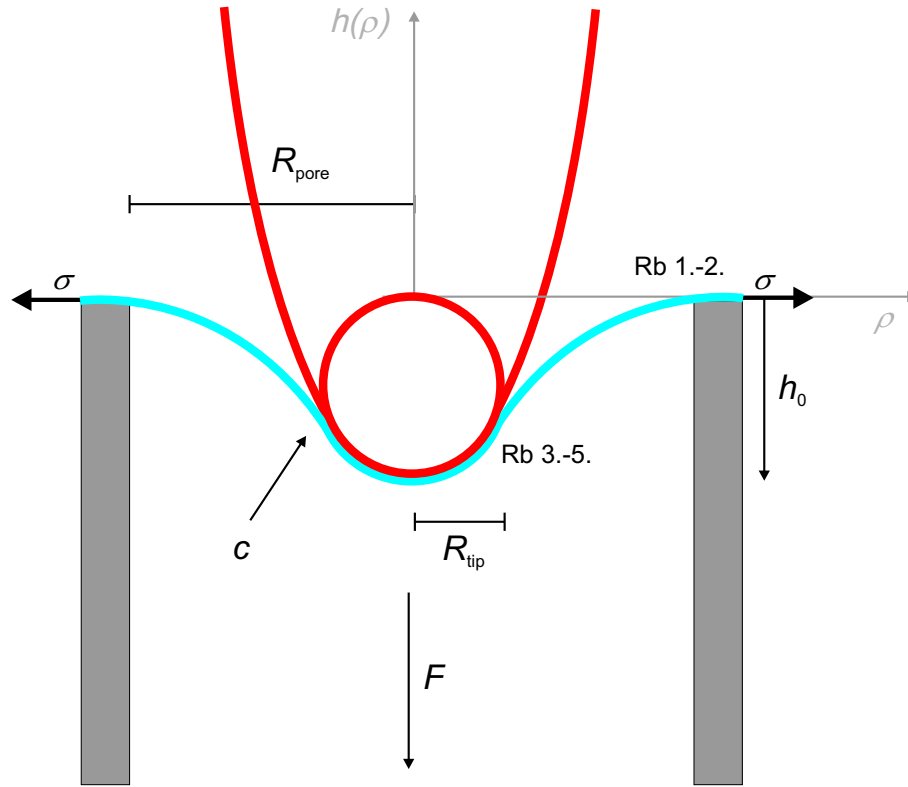


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der Eindringtiefe für die Modellrechnungen inklusive der Randbedingungen und verwendeten Variablen.

bran sich ohne Knick und Loch von der Spitze im Kontaktpunkt löst (Argument der Differenzierbarkeit):

$$\frac{d}{d\rho}h(\rho) \Big|_{\rho=c} = \frac{d}{d\rho}t(\rho) \Big|_{\rho=c}, \quad (5.12)$$

5. Die Krümmung der Membran am Kontaktpunkt c muss gleich der Krümmung der Spitze unter Berücksichtigung der Adhäsion sein. Im Falle der *small gradient* Approximation gilt:

$$\frac{d^2}{d\rho^2}h(\rho) \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{d}{d\rho}h(\rho)\right)^3}} \Big|_{\rho=c} \approx \quad (5.13)$$

$$\frac{d^2}{d\rho^2}h(\rho) \Big|_{\rho=c} = \frac{d^2}{d\rho^2}t(\rho) \Big|_{\rho=c} - \sqrt{\frac{2 \cdot U}{\sigma}}.$$

Dabei wird in Gleichung 5.13 angenommen, dass die Spitze des *Cantilevers* ein parabelförmiges Profil $t(\rho) = \frac{\rho^2}{2R_{\text{Pore}}}$ besitzt (vergleiche Formel 5.1) und die Adhäsion

sionsenergie pro Fläche durch U beschrieben wird. Es ergibt sich für die Lösung der Differentialgleichung 5.7 bei fester Eindringtiefe h_0 folgende Oberflächenfunktion $h(\varrho)$:

$$\begin{aligned}
 h(\varrho) = & \left[2c^2\lambda^3\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) + 2c^2\lambda^3\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) - 4c^2\lambda^3\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) - c^3\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \right. \\
 & + 2h_0R_{\text{Tip}}c\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) + c^2R\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) - 2h_0R_{\text{Tip}}\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) + c\lambda\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \\
 & \cdot \left[-2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) + 2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + \left(c^2 - 2h_0R_{\text{Tip}}\right) \left(c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) - R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right) \right] \mathbf{K}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) \\
 & + 2c^3\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \cdot \ln\left(\frac{c}{\lambda}\right) - 2c^2R\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \ln\left(\frac{c}{\lambda}\right) - 2c^2R\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) \\
 & + \lambda\mathbf{K}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) \cdot \left[c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) - R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right] \cdot \left[2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) - 2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) \right. \\
 & \left. - \left(c^3 - 2h_0R_{\text{Tip}}c\right)\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) + R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \left(c^2 - 2h_0R_{\text{Tip}} + 2c^2 \left[\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{c}{\lambda}\right)\right]\right) \right] \\
 & + R\mathbf{K}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \cdot \left(2c^2\lambda^2\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right)\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + [c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) - R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)][\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) \right. \\
 & \cdot \left. \left(c^2 - 2h_0R_{\text{Tip}} + 2c^2 \left[\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{c}{\lambda}\right)\right]\right) + (c^3 - 2h_0R_{\text{Tip}}c) \cdot \left[\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right)\right] \mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \right) \\
 & + 2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) \left[-\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \left(-c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) + R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right) \left(\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right)\right) \right] \\
 & + 2c^2R\lambda\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\mathbf{K}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) \left(-\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \left[\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right)\right]\right) \\
 & - 2c^3\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + 4c^2R\lambda^2\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + c \left[-2c^2\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) + (c^2 - 2h_0R_{\text{Tip}}) \right. \\
 & \cdot \left. \left. \left(c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) - R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right) \right] \mathbf{K}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \left(\lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \lambda\mathbf{I}_0\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right) + R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \left[-\ln\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \ln\left(\frac{\varrho}{\lambda}\right)\right]\right) \right] \\
 & \bullet \left[2R_{\text{Tip}} \left(c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) - R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right) \cdot \left(\lambda \left(-2\lambda + c\mathbf{I}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right)\mathbf{K}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) + R\mathbf{I}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right)\mathbf{K}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right) \right. \right. \\
 & + R\mathbf{I}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \left(\lambda\mathbf{K}_0\left(\frac{c}{\lambda}\right) + c\mathbf{K}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \left[\ln\left(\frac{c}{\lambda}\right) - \ln\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right]\right) \\
 & \left. \left. + c\mathbf{I}_1\left(\frac{c}{\lambda}\right) \left(\lambda\mathbf{K}_0\left(\frac{R}{\lambda}\right) + R\mathbf{K}_1\left(\frac{R}{\lambda}\right) \left[-\ln\left(\frac{c}{\lambda}\right) + \ln\left(\frac{R}{\lambda}\right)\right]\right) \right]^{-1}. \tag{5.14}
 \end{aligned}$$

Mit der Oberflächenfunktion lässt sich die Energie der Membran bestimmen. Es ist zu beachten, dass die Randbedingung 5.13 nicht konstant ist und mit der Änderung der Eindringtiefe h_0 variiert. Daraus folgt eine immer wieder durchzuführende, numerische Bestimmung des Kontaktradius c für jede einzelne Eindringtiefe

h_0 . Dies wird in *Mathematica* über die Bestimmung der Nullstelle aus Gleichung 5.13 mit der Routine *findroot* durchgeführt und kann bei geringer Eindringtiefe und daraus resultierende kleine Werte für den Kontaktradius c zu Ungenauigkeiten führen. Dabei arbeitet die Routine *findroot* mittels verschiedener numerischer Algorithmen und erfordert eine Eingrenzung der Nullstelle auf einen vorzugebenden Bereich, der im Rahmen dieser Arbeit graphisch vorbestimmt wurde. Wird keine Nullstelle mit ausreichender Genauigkeit gefunden, so wird die bestmögliche Approximation verwendet.

II. Bestimmung der Kraft

Zur Bestimmung der Kraft F aus der Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ in Abhängigkeit der Eindringtiefe im Zentrum einer Pore $\varrho = 0$ wird zunächst ein Gedankenexperiment vorangestellt: dabei sei Σ_0 eine beliebige, nicht planare Oberfläche mit der lokalen Basis \vec{e}_a, \hat{n} mit $a \in x, y$ und mit \hat{n} als orthogonalem Vektor auf der Oberfläche Σ_0 . Sei F die Kraft, die auf eine Membran wirkt, die um h_0 ausgelenkt wird. Dabei entstehen äußere Spannungen, die durch den Spannungstensor $(\sigma_{ik})_{ik}$ mit $i, k \in \{1, 2, 3\}$ ausgedrückt werden. Wird diese Membran an einer beliebigen Stelle entlang der Einheitsvektoren \hat{e}_x, \hat{e}_y geteilt, so wird sich diese entsprechend der Spannungen „aufrollen“. Diese in Richtung der Einheitsvektoren wirkenden Kräfte resultieren aus dem Spannungstensor² \vec{f}^a . Zu beachten ist, da zunächst ein zwei dimensionales Problem vorliegt, dass die Kraft \vec{F} auch eine von null verschiedene dritte Komponente haben kann, die entlang des Einheitsvektors \hat{e}_z wirkt (vergleiche Abbildung 5.7). Es sei

$$\vec{f}^a = \sum_{b=x,y} \left(f^{ab} \vec{e}_b + \frac{1}{2} f^a \hat{e}_z \right) \quad (5.15)$$

der aus $h(\varrho)$ berechnete Spannungstensor. Mittels dieses Spannungstensors und der Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ ergibt sich für die resultierende Kraft der Ausdruck in Gleichung 5.16. Dabei wird zunächst \vec{f}^a in einer Basis von e_a dargestellt. Zur weiteren Berechnung ist jedoch \vec{f}^a in der Basis von l, t, n , insbesondere die Projektion auf l , relevant, um geeignete Vereinfachungen und Aussagen treffen zu können. Dazu werden die Vektoren in diese Basis transformiert und die Projektionen auf l in die Berechnung der Kraft mit einbezogen. Unter Berücksichtigung

²Im Folgenden steht a immer für die entsprechenden zwei Schnitte entlang von e_x, e_y .

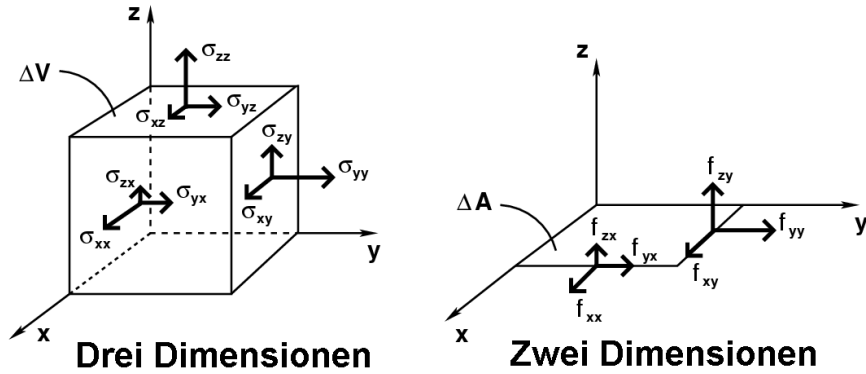


Abbildung 5.7: Die Reduzierung des Spannungstensors von drei Dimensionen in die Ebene. Die Variablen wurden entsprechend transformiert.

der Zylindersymmetrie lässt sich diese Projektion noch weiter vereinfachen. Es ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 F &= \oint_{\delta\Sigma_0} dS \left(\sum_{a=1}^2 l_a \vec{f}^a \right) \\
 &= \left(\sum_{a=1}^2 l_a \vec{f}^a \right) \oint_{\delta\Sigma_0} dS \\
 &= 2\pi \varrho \left(\sum_{a=1}^2 l_a \vec{f}^a \right).
 \end{aligned} \tag{5.16}$$

Dabei wurde $l = l^a \vec{e}_a$ als der orthogonale nach außen zeigende Einheitsvektor der Länge l^a zum Weg $\delta\Sigma_0$ angenommen. In der Differentialgeometrie³ ist \vec{f}^a definiert als:

$$\vec{f}^a := \sum_{b=1}^2 \left[\kappa (K^{ab} - \frac{1}{2} K l^{ab}) K - \sigma g^{ab} \right] \vec{e}_b - \kappa (\nabla^a K) \hat{n}, \tag{5.17}$$

wobei die Summe die Komponenten der y, x -Ebene enthält und der Subtrahend aus der Ebene der Membran zeigt. Ferner ist g^{ab} die aus der gewählten Metrik

³Um im Folgenden nicht genauer auf die Differentialgeometrie eingehen zu müssen, werden einige Gleichungen als Definitionen vorausgesetzt und die entsprechenden Aussagen ohne Beweis angenommen. Detailliertere Informationen finden sich hierzu in [Car76, Kre91, Mül04, Des04Web].

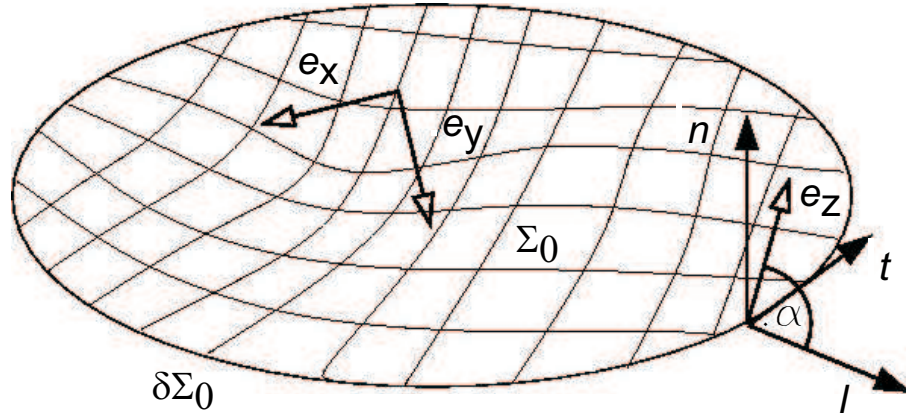


Abbildung 5.8: Eine gekrümmte Membran mit einer orthogonalen Basis e_x, e_y in einem beliebigen Punkt auf der Oberfläche.

resultierende Transformationsmatrix. Es ergibt sich für die Kraft F folgender Ausdruck:

$$F = 2\pi\varrho \sum_{b=1}^2 \left(\left[\kappa(l_a K^{ab} - \frac{1}{2} K l^b) K - \sigma g^{ab} \right] \vec{e}_b - \kappa(l_a \nabla^a K) \hat{n} \right). \quad (5.18)$$

Dieser Ausdruck kann durch Ausnutzen der Orthogonalitätsrelationen (Vollständigkeitsrelation: $g_b^c = l_b l^c + t_b t^c$) vereinfacht werden:

$$\begin{aligned} \sum_{b=1}^2 l_a K^{ab} \hat{e}_b &= \sum_{c,b=1}^2 l_a K^{ab} (l_b l^c + t_b t^c) \hat{e}_c \\ &= \sum_{b=1}^2 l_a l_b K^{ab} \vec{l} + l_a t_b K^{ab} \vec{t} \\ &= K_{\perp} \vec{l}, \end{aligned} \quad (5.19)$$

wobei $l_a t_b K^{ab} = 0$, da die Vektoren entlang des Integrationsweges verlaufen. Ferner ist ∇_{\perp} definiert als $\nabla_{\perp} := l_a \nabla^a = \frac{\partial}{\partial l}$, so dass für die Kraft gilt:

$$\begin{aligned} F &= 2\pi\varrho \hat{z} \cdot \left(\left[\kappa(K_{\perp} - \frac{1}{2} K) K - \sigma \right] \hat{l} - \kappa(\nabla_{\perp} K) \hat{n} \right) \\ &= 2\pi\varrho \hat{z} \cdot \left(\left[\frac{1}{2} \kappa(K_{\perp}^2 - K_{\parallel}^2) - \sigma \right] \hat{l} - \kappa(\nabla(K_{\perp} + K_{\parallel})) \hat{n} \right) \\ &= 2\pi\varrho \left(\left[\frac{1}{2} \kappa(K_{\perp}^2 - K_{\parallel}^2) - \sigma \right] \cos \alpha - \kappa(\nabla(K_{\perp} + K_{\parallel})) \sin \alpha \right), \end{aligned} \quad (5.20)$$

wobei ausgenutzt worden ist, dass die Spur des Krümmungstensors $\text{Spur}(K)$ als $\text{Spur}(K) = K_{\perp} + K_{\parallel}$ geschrieben werden kann. Dabei entsprechen die paral-

lalen und orthogonalen Komponenten von K Gleichung 5.21, die aus der *Monge*-Darstellung unter Berücksichtigung der Zylindersymmetrie hergeleitet werden können. Ferner wird der Winkel α von \hat{z} und \hat{l} aufgespannt, aus dem Skalarprodukt ergibt sich $\cos \alpha$, beziehungsweise auf Grund der gewählten Basis $\sin \alpha = \cos(90 - \alpha)$. Aus der Differentialgeometrie ergibt sich folgender Zusammenhang [Car76, Kre91, Mül04, Des04Web]:

$$\begin{aligned}
 K_{\perp} &:= -\frac{\frac{\partial^2}{\partial \varrho^2} h(\varrho)}{\left(1 + \left(\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)\right)^2\right)^{\frac{3}{2}}} \\
 K_{\parallel} &:= -\frac{\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)}{\sqrt{1 + \left(\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)\right)^2}} \\
 \cos \alpha &:= \frac{\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)}{\sqrt{1 + \left(\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)\right)^2}} \\
 \sin \alpha &:= \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\partial}{\partial \varrho} h(\varrho)\right)^2}} \tag{5.21}
 \end{aligned}$$

Mit dem Ausdruck 5.20 ist die Kraft F bei fest vorgegebenem h_0 in Abhängigkeit von der Oberflächenfunktion $h(\varrho)$, dem Biegemodul κ , der lateralen Spannung σ , des Porendurchmessers R_{Pore} , des Spitzenradius R_{Tip} und der Adhäsion U gegeben durch:

$$\begin{aligned}
 F &:= \left[F(h(\varrho)) \right]_{h_0} \\
 &= \left[F(\kappa, \sigma, R_{\text{Pore}}, R_{\text{Tip}}, U) \right]_{h_0} \tag{5.22}
 \end{aligned}$$

III. Diskussion der Berechnungen

In Abbildung 5.9 A ist die Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ für verschiedene Eindringtiefen h_0 dargestellt. Mit wachsender Eindringtiefe h_0 erhöht sich der Kontaktradius c . Für die Berechnung wurden typische Werte für laterale Spannung σ und das Biegemodul κ aus der Literatur verwendet [Eva87, Eva97, Lee01, Boa02, Isr03]. Die Bestimmung der Poren- und Spitzenradien wurden in Abschnitt 5.1.2 ausführlich diskutiert. Die Adhäsion zwischen Spitze und Membran wird zunächst, um den Vergleich mit der numerisch exakten Theorie von Norouzi et al zu ermög-

lichen, vernachlässigt [Nor06], beziehungsweise wie in Kapitel 5.3.1 abgeschätzt:

$$\begin{aligned}
 \kappa_{\text{Gelphase}} &= 1 \cdot 10^{-18} \text{ J}, & \text{siehe [Mer00, Lee01]} \\
 \kappa_{\text{fluide}} &= 1 \cdot 10^{-19} \text{ J}, & \text{siehe [Boa02]} \\
 \sigma_{\text{Gelphase}} &= 5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}, & \text{vergleiche Kapitel 5.3.2} \\
 \sigma_{\text{fluide}} &= 1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}, & \text{vergleiche Kapitel 5.3.2} \\
 R_{\text{Pore}} &= 90 \text{ nm}, & \text{vergleiche Kapitel 5.1.2} \\
 R_{\text{Tip}} &= 20 \text{ nm}, & \text{vergleiche Abbildung 5.5} \\
 U &= 0 \frac{\text{N}}{\text{m}}, \text{ bzw. } U = 10^{-4} \frac{\text{N}}{\text{m}}, & \text{vergleiche Tabelle 5.1.} \quad (5.23)
 \end{aligned}$$

In Abbildung 5.9 B ist der Einfluss des Porenradius R_{Pore} auf die Kraft $\left[F(h(\varrho))\right]_{h_0}$ bei konstanter Eindringtiefe $h_0 = 3 \text{ nm}$ dargestellt. Dabei unterscheiden sich die fluiden (gestrichelte Linie) Membranen deutlich von denen in der Gelphase (durchgezogene Linie). Die der Abbildung 5.9 zu Grunde liegenden Rechnungen wurden mit Hilfe von Gleichung 5.20 erstellt. Wie zu erwarten war, sinkt die Kraft, die benötigt wird, um das Lipid um h_0 einzudrücken, mit steigendem Porenradius R_{Pore} . Des Weiteren ist aus Abbildung 5.9 zu erkennen, dass eine Vergrößerung des Porenradius ab etwa 70 nm bis 90 nm nur noch sehr geringen Einfluss auf die Kraft $\left[F(h(\varrho))\right]_{h_0}$ hat, die aufgewendet werden muss, um die Membran um h_0 in die Poren zu drücken. Der Einfluss des Porendurchmessers auf die benötigte Kraft bei konstanter Eindringtiefe ist in Abbildung 5.10 in einer detaillierten Darstellung gezeigt. Dort ist die Ableitung der Abbildung 5.9 B für Poren mit Radien von bis zu 800 nm sowohl für fluide als auch für Membranen in der Gelphase berechnet ($R_{\text{Tip}} = 20 \text{ nm}$, $\sigma = 5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$, $\kappa = 10^{-18} \text{ J}$ und $U = 0 \frac{\text{N}}{\text{m}^2}$ beziehungsweise $\sigma = 1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$, $\kappa = 10^{-19} \text{ J}$ und $U = 0 \frac{\text{N}}{\text{m}}$). Bei beiden Systemen ist ab einem Porendurchmesser von etwa 80 nm eine nahezu verschwindende die Abhängigkeit der Kraft vom Porendurchmesser zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass ab einem Porenradius von 100 nm die verursachte Krümmung an den Porenrändern zu vernachlässigen ist und die Rückstellkraft sich im Wesentlichen aus der lateralen Spannung und der Krümmung an der Spitze zusammensetzt. Bei sehr großen Porenradien ist die lokale Krümmung im Bereich des Kontaktes unabhängig von der Größe der Poren⁴, während die Krümmung an den Porenstegen nur bei kleinen Radien

⁴Erste Pilotmessungen auf Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 200 \text{ nm}$, die mit einem *Bilayer* des Gemisches DPPTE/DPhPC/Chol in einem Mischungsverhältnis von 60/20/20 gew.

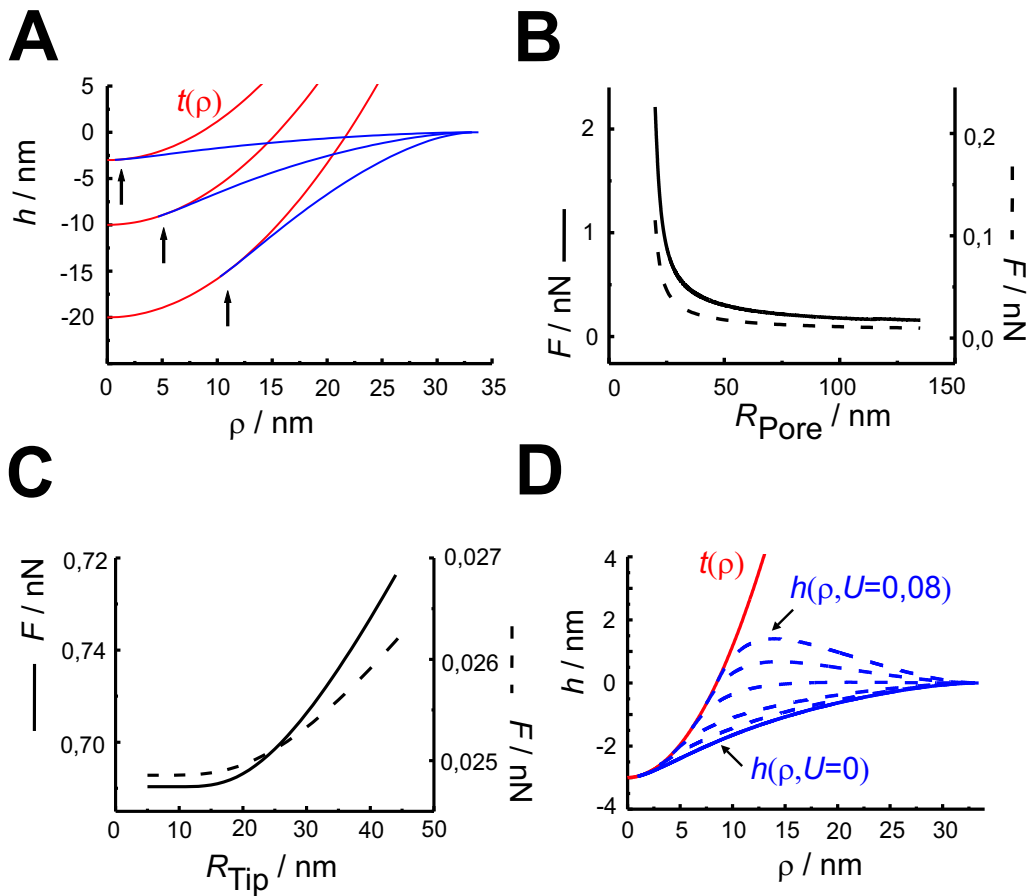


Abbildung 5.9: A: Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ der Membran (blau) und der Spitzenfunktion $t(\varrho)$ (rot) in Abhängigkeit der Eindringtiefe h_0 (3 nm, 10 nm und 20 nm, Bild A). Die Pfeile zeigen den mit der Eindringtiefe wachsenden Kontaktradius c . B: Abhängigkeit der Kraft F als Funktion, die benötigt wird, um die Membran um 3 nm einzudrücken, vom Porenradius R_{Pore} . Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis von Rechnungen für ein Lipid in der Gelphase, während die gestrichelte Linie Rechnungen für ein Lipid in der fluiden Phase entspricht. C: Der Einfluss des Spitzenradius R_{Tip} auf die Kraft F bei konstanter Eindringtiefe ($h_0 = 3$ nm). Die durchgezogene Kurve basiert auf Rechnungen für ein Gelphasenlipid, die gestrichelte Linie auf Rechnungen für ein fluides Lipid. D: Die Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ des überspannenden Lipids in Abhängigkeit der Adhäsionsenergie bei konstanter Eindringtiefe in Schritten von $U \in \{0; 0,001; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 \frac{\text{N}}{\text{m}}\}$. Die Farben der Funktionen entsprechen denen in A.

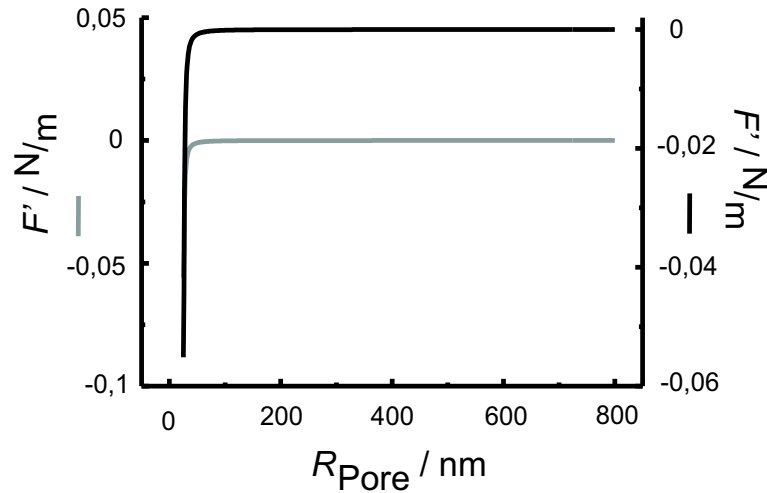


Abbildung 5.10: Ableitung der Kraft in Abhängigkeit des Porenradius.

einen Betrag liefert.

In Abbildung 5.9 C ist der Einfluss des Spitzenradius R_{Tip} auf die Kraft $\left[F(h(\varrho))\right]_{h_0}$ skizziert. Die Vergrößerung des Spitzenradius hat erstaunlicherweise kaum Einfluss auf die aufzuwendende Kraft. Generell lässt sich sagen, dass bei größeren Spitzenradien eine höhere Kraft aufzuwenden ist, um die Membran um die gleiche Tiefe einzudrücken.

Fluide Membranen, in den Abbildungen als gestrichelte Linie dargestellt, zeigen sowohl in Abbildung 5.9 B als auch in Abbildung 5.9 C das gleiche Verhalten wie Membranen in Gelphase. Fluide Membranen besitzen ein kleineres Biegemodul in der Größenordnung von $(1 - 4) \cdot 10^{-19}$ J, während Membranen in der Gelphase ein deutlich größeres von etwa zu $5 \cdot 10^{-18}$ besitzen [Mer00, Lee01, Boa02, Isr03]. Das Biegemodul kann dabei über das Flächenkompressionsmodul abgeschätzt werden (vergleiche Kapitel 5.3.2 und Gleichung 5.23). Wird dieser Wert des Biegemoduls zusammen mit einer lateralen Oberflächenspannung von $10 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ in den theoretischen Berechnungen angenommen, so wird eine apparente Federkonstante der fluiden Membran von circa $k_{\text{fluide}} = 0,003 - 0,01 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine $k_{\text{Gel}} = 0,03 - 0,05 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ erhalten. Dieser Bereich ist mit dem Rasterkraftmikroskop noch messbar, da herkömmliche Federkonstanten von *Cantilevern* im Bereich

% überspannt wurden, ergaben eine apparente Federkonstante von etwa $k_{\text{app}} = 0,01 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und bestätigt somit diese Aussage der Theorie (vergleiche Tabelle 5.3.2.)

von $0,001 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ bis $0,1 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ liegen.

In Abbildung 5.9 D ist die Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ (rot) mit Werten einer Membran im Gelphasen-Zustand bei konstanter Eindringtiefe h_0 und unterschiedlichen Adhäsionsenergien U zusammen mit der Spitzenfunktion $t(\varrho)$ (blau) dargestellt. Die Adhäsionsenergie wurde von $0 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ bis $0,08 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ in den Schritten $U \in \{0; 0,001; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 \frac{\text{N}}{\text{m}}\}$ variiert. Deutlich zu erkennen ist die Vergrößerung des Kontaktradius in Abhängigkeit der Adhäsionsenergie U . Ähnlich wie es bei den Rechnungen des MYD-Modells und des JKR-Modells gefordert wird, kann die Membran einen Torus aus der Pore heraus um die Spitze bilden (siehe hierzu Kapitel 3.2.6). Dies zeigt auch der hier verwendete Ansatz deutlich: die Oberflächenfunktion $h(\varrho)$ wird bei steigender Adhäsionsenergie U aus der Pore herausgezogen. Dabei können bei genügend hoher Adhäsionsenergie auch negative Kräfte entstehen, um eine Membran um h_0 einzudrücken. Physikalisch würde dieser Vorgang einem Entgegenkommen der Membran entsprechen, das heißt die Membran gewinnt mehr Energie, wenn sie an die Spitze „springt“, als sie durch ihre Krümmung verliert. Im welchem Bereich die Adhäsionsenergie liegt, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Für einen weiteren Vergleich zwischen den Ergebnissen aus Theorie und Messung sowie der einzelnen Lipidgemische auf unterschiedlichen Porenradien wird eine spezielle Größe definiert: die apparente Federkonstante der Membran k_{app} . Sie wird durch den Quotienten $\frac{F(h_1(0)) - F(h_2(0))}{h_1(0) - h_2(0)}$ im Bereich von kleinen Eindringtiefen bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die lineare Approximation aus Gleichung 5.13 nur bei geringen Eindringtiefen gilt, jedoch *Mathematica* bei den Rechnungen in diesem Bereich die größten Ungenauigkeiten liefert.

Abschließend ist zu sagen, dass es die vorgestellte Theorie ermöglicht, das Verhalten der Oberflächenfunktion von porenüberspannenden Membranen relativ gut zu beschreiben und zu besseren Ergebnissen gelangt als die gängige „Dünne-Platte-Theorie“ oder die Kontaktmodelle [Lan, Isr03, Her96, Mul80, Mul83, Joh71]. Die vorgelegte Theorie liefert ein Werkzeug, um Kraft-Indenter-Beziehungen als Funktionen von dem Porenradius, der Indenterform und den physikalischen Zustand der Membranen abzuschätzen.

5.3 Artificielle Systeme

Membranen grenzen biologische Systeme wie zum Beispiel Zellen, Zellkern und weitere Organellen von ihrer Umgebung ab. Um die Mechanik von Membranen zu untersuchen werden artificielle Modellmembranen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde DODAB als artificielle Membran, das bei Raumtemperatur in Gelphase ist, gewählt, da es eine einfache Struktur besitzt und mittels elektrostatischer Kräfte an eine mit MPA beschichtete Oberfläche adsorbiert. Als Vertreter der Membranen in der fluiden Phase wurde das DOTAP verwendet, das wie DODAB als einer der wenigen Lipide eine positive Ladung besitzt und somit in gleicher Weise wie DODAB, mittels elektrostatischer Kräfte, an negativ geladene Oberflächen binden kann. Mit der Wahl dieser beiden Lipide ist ein Vergleich der mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Lipidmembranen in fluiden und Gelphase, die durch elektrostatische Wechselwirkung adsorbieren, möglich.

Zusätzlich wird eine Lipidmischung von DPPTE/DPhPC/Chol in diversen Mischungsverhältnissen im Rahmen dieser Arbeit verwendet. In dem Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Steinem wurden bereits einige Untersuchungen an diesem System und ähnlichen Zusammensetzungen durchgeführt, wie zum Beispiel Einzelkanalmessungen [Röm03, Röm04] und Impedanzuntersuchungen von Lipidmembranen auf porösen Substraten [Dre03A, Dre03B]. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die mechanischen Untersuchungen auf diese Lipidmischungen ausgebreitet, um zusammen mit den Ergebnissen aus den obigen Messungen den Einfluss der Verzahnung der Methylgruppen des DPhPC und den des Cholesterins auf mechanischen Eigenschaften zu untersuchen. Ferner bindet das DPPTE nicht wie die obengenannten Lipide mittels elektrostatischer Wechselwirkung an die Oberfläche, sondern chemisorbiert direkt an die Goldoberfläche, so dass auch die Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen unter dem Aspekt des Bindungsverhaltens untersucht werden können.

5.3.1 Charakterisierung von Lipidmembranen auf atomar flachem Gold

Domänenbildung und Bestimmung der Adhäsionsenergie

Zur Charakterisierung der Membranen werden festkörpergestützte Lipiddoppelschichten der verwendeten Lipidmischungen zunächst auf atomar flachem Gold mittels der Rasterkraftmikroskopie untersucht. Zum einen sollte bei der DPPTE/DPhPC/Chol Membran untersucht werden, ob eine Domänenbildung vorliegt. Dabei wird darauf geachtet, dass die Art der Anbindung des Lipids auf dem planaren Gold der auf den porösen Substraten entspricht, das heißt, dass die Mischungen über Chemisorption der Thiolbindungen und die DODAB Membran über die elektrostatische Anbindung an das Substrat binden.

Zum anderen soll die Adhäsionsenergie pro Fläche U für die verwendeten Systeme bestimmt werden. Dazu werden zunächst Kraftindentsationskurven auf atomar flachem Gold aufgenommen und die Adhäsionsenergie bestimmt. Des Weiteren werden mit Hilfe des MYD Modell berechnete Kurven an diese angepasst, um den Kontaktradius und letztendlich die Kontaktfläche zu bestimmen.

In Abbildung 5.11 ist exemplarisch eine rasterkraftmikroskopische Abbildung im *Tapping* Modus von DPPTE/DPhPC/Chol mit dem Mischungsverhältnis 60/20/20_{gew%} dargestellt. Die topographische Aufnahme in Abbildung 5.11 A lässt deutlich zwei Bereiche unterschiedlicher Höhe erkennen. Zusammen mit dem in Abbildung 5.11 C gezeigten Höhenprofil (*Linescan*) und einer 5 nm höher liegenden Schicht ist eine Belegung mit einer Lipid-*Bilayer* zu erkennen. Eine Lipiddoppelschicht weist je nach Zusammensetzung eine Höhe von 4-6 nm auf [Gal88, Boa02]. Eine Schwellwertanalyse liefert einen Belegungsgrad von ca. 85 %. Da die Zielsetzung der Arbeit nicht im Erreichen eines Belegungsgrads von 100 % liegt, sind keine Schritte zur Erhöhung des Belegungsgrads unternommen worden. Drexler et al. und Römer et al. erreichten auf Poren einen Belegungsgrad von ca. 90 % [Dre03A, Röm03].

In Abbildung 5.11 B ist die Phaseninformation gezeigt. Die Phaseninformation gibt Aufschluss über die Energiedissipation auf die Probe [Got00, Got02]. Deutlich sind die von Lipid bedeckten Bereiche von den nicht bedeckten Bereichen zu unterscheiden. Die Phase ist um 90° gedreht, so dass in diesem Fall die dunklen Bereiche den weichen und die hellen den harten Bereichen der Probe entsprechen. In den dunklen Bereichen, die dem *Bilayer* entsprechen, sind keine weiteren Kon-

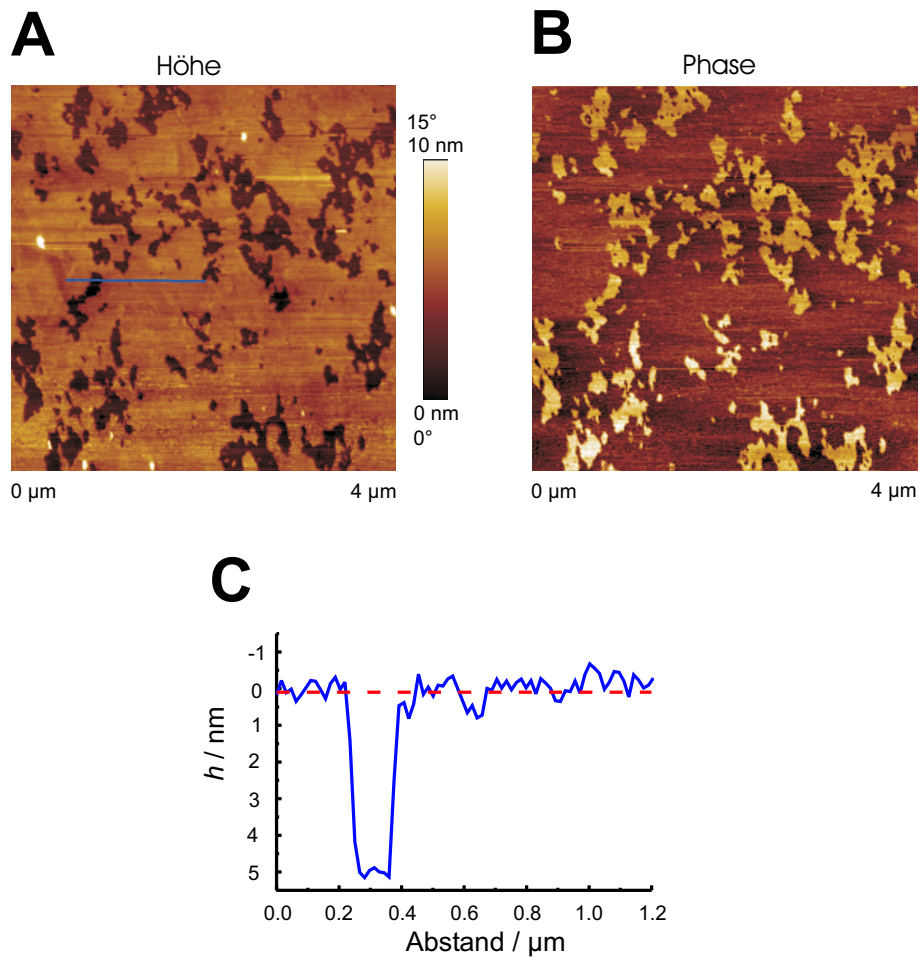


Abbildung 5.11: In Bild A ist eine topographische Aufnahme des Mischsystems DPP-TE/DPhPC/Chol mit dem Mischungsverhältnis 60/20/20_{gew%} auf planarem Gold, aufgenommen im *Tapping* Modus, dargestellt. Abbildung B zeigt den zugehörigen Phasenkontrast (90° gedreht) und Abbildung C visualisiert das Höhenprofil entlang der in A dargestellten Linie.

traste zu erkennen. Der Phasenkontrast für eine Domänenstruktur liegt etwa im Bereich von 10° und ist aber auch abhängig von den Einstellungen der Messung und der jeweiligen Probe [Sch03]. Dies lässt des Weiteren die Annahme zu, dass kein domänenbildendes Mischsystem vorliegt. Würden Domänen entstehen, gäbe es weitere deutliche Kontrastbereiche in der Phaseninformation. Entsprechende ähnliche Ergebnisse wurden auch für das Mischsystem DPPTE/DPhPC/Chol mit dem Mischungsverhältnis 40/30/30_{gew%} und das Monosystem DODAB als Referenzsystem erhalten (nicht gezeigt), so dass bei keinem der Systeme eine Domänenbildung vorliegt.

Ausserdem wurden kraftspektroskopische Untersuchungen an verschiedenen Lipidsystemen auf atomar flachem Gold durchgeführt. Abbildung 5.12 zeigt beispielhaft die Rückrichtung einer Kraftindentationskurve vom Mischsystem DPPTE/DPhPC/Chol mit dem Mischungsverhältnis 60/20/20_{gew%} auf atomar flachem Gold. Die Kraftindentationskurve zeigt deutlich einen charakteristischen

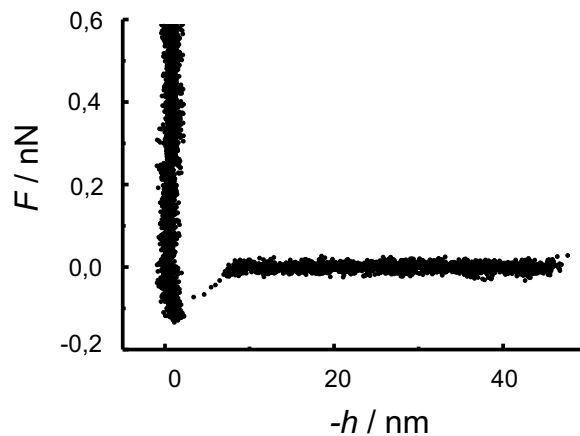


Abbildung 5.12: Rückrichtung einer Kraftindentationskurve von dem Mischsystem DPPTE/DPhPC/Chol mit dem Mischungsverhältnis 60/20/20_{gew%} auf atomar flachem Gold.

Adhäsions-Peak. Wird diese Fläche integriert, so ergibt sich eine Adhäsionsenergie von $0,69 \text{ Nm} \pm 0,28 \text{ Nm}$. Der Fehler dieses Wertes beruht auf der Standardabweichung des Mittelwerts von 120 Kraftindentationskurven. Bei den Kraftkurven der anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lipidsysteme ist keine verlässliche Angabe der Adhäsionsenergie möglich. Dort verhindert der lange Kontakt und die *Tether*-Bildung, kurz beschrieben in Kapitel 5.3.2, Berechnung der Adhäsionsenergie.

sion. Diese Kurven zeigen ein uneinheitliches Abreißen des Lipids von der Spitze, so dass eine systematische Auswertung nicht möglich ist.

Um die Adhäsionsenergie pro Fläche U aus den obigen Messungen zu quantifizieren, muss der Kontaktradius c bekannt sein, um die Kontaktfläche zu bestimmen. Zur Berechnung der Kontaktfläche, die zunächst in den Gleichungen 5.23 vernachlässigt worden ist, sind Kraftindentationskurven mittels des in Kapitel 3.2.6 beschriebenen MYD-Modells simuliert worden und die Flächen der berechnete Kurve der gemessenen angepasst. Dazu wurde in den Simulationen die Ladungsdichte des Lipids und das *Youngsche*-Modul variiert. Abbildung 5.13 A zeigt links Kraftkurven, bei denen das *Youngsche*-Modul schrittweise erhöht wurde (1 kPa \rightarrow 2 kPa \rightarrow 4,2 kPa \rightarrow 10 kPa \rightarrow 15 kPa) und rechts den zugehörigen Kontaktradius c in Abhängigkeit der Eindringtiefe h . Deutlich ist der Einfluss des *Youngschen*-Moduls zu erkennen, das bei Erhöhung ein Ansteigen der Kraftkurve und eine Verringerung des Kontaktradiuses bei vergleichbarer Eindringtiefe zur Folge hat. In Abbildung 5.13 B ist die Variation der Oberflächenladungsdichte (0,05 $\frac{\text{C}}{\text{m}^2}$ \rightarrow 0,1 $\frac{\text{C}}{\text{m}^2}$ \rightarrow 0,2 $\frac{\text{C}}{\text{m}^2}$ \rightarrow 0,3 $\frac{\text{C}}{\text{m}^2}$) in gleicher Darstellungsart wie in A gezeigt. Dabei bedingt eine Erhöhung der Oberflächenladungsdichte ein Verschieben der Kraftkurve zu negativeren Werten, das heißt, dass die *Cantilever*-Spitze bei höherer Oberflächenladungsdichte eher auf die Probe trifft und sich so der Kontaktradius für vergleichbare Höhen erhöht.

Die Simulation mittels der MYD-Modellrechnung wurde mit den Werten aus der Arbeit von Künneke in leicht veränderter Form durchgeführt [Kün00]. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Rechnungen in einer Pufferlösung von 10 mM Tris ein Elastizitätsmodul der Spitze von $E_1 = 255$ GPa, ein Poisson Verhältnis von $\nu_1 = 0,23$ und ein Spitzenradius von 12 nm angenommen [Edw04]. Für das Lipid wurde ein Poisson Verhältnis von $\nu_2 = 0,33$ angenommen [Kün00].

Für die Berechnung der Adhäsion wird im Folgenden eine paraboloidale *Cantilever*-Spitze angenommen, die in eine festkörperunterstützte Membran eindringt. Die Eindringtiefe des *Cantilevers* wird dabei in der Simulation mit maximal 5 nm festgelegt. In Gleichung 5.24 ist die Berechnung der Kontaktfläche A_0 in Abhängigkeit der Umkehrfunktion $c(h) := \sqrt{2R_{\text{Tip}}h}$ und der Eindringtiefe $h(c) := \frac{c^2}{2R_{\text{Tip}}}$ in Abhängigkeit des Kontaktradius c entsprechend der Skizze in Abbildung 5.14

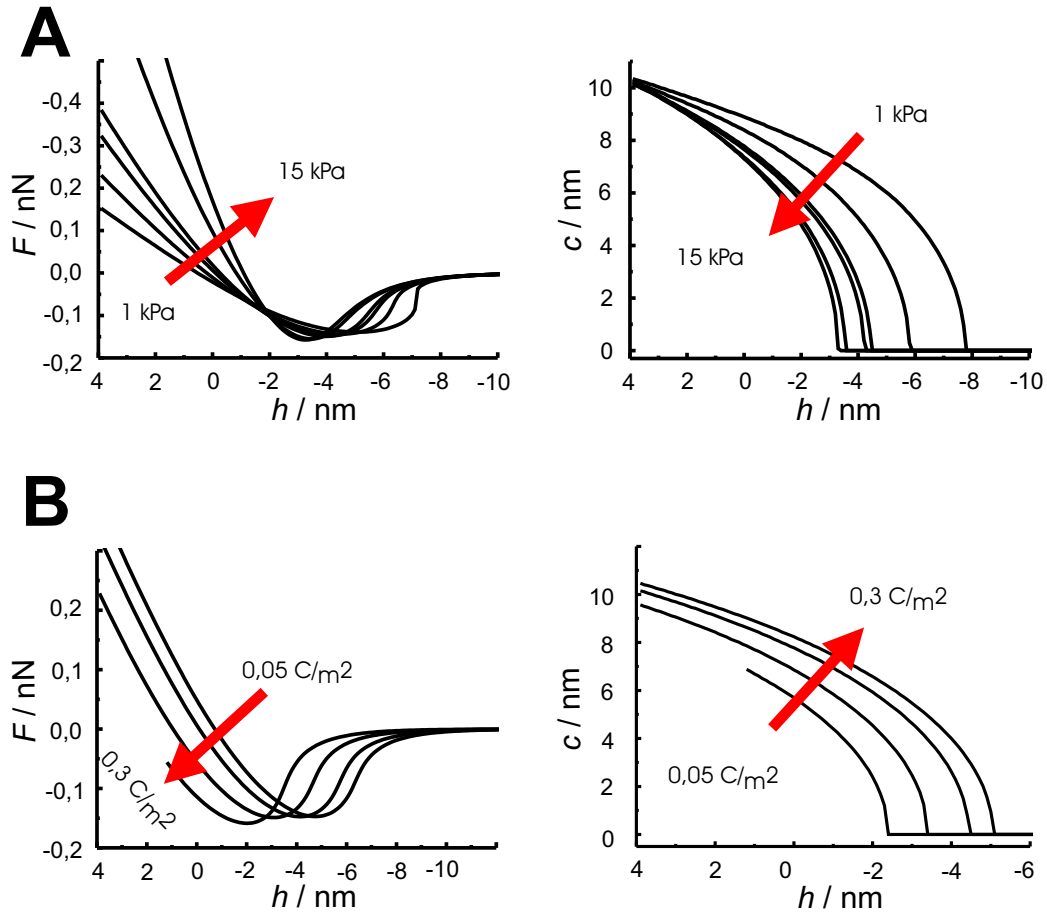


Abbildung 5.13: Modellrechnungen zur Bestimmung der Adhäsion. Links ist jeweils die Kraft F und rechts der dazu korrespondierende Kontaktradius c in Abhängigkeit der Eindringtiefe h für verschiedene *Youngsche-Module* (A) und *Oberflächenladungsdichten* σ_{Lad} dargestellt. Die Pfeile entsprechen der schrittweisen Erhöhung des *Youngschen-Moduls* beziehungsweise der der *Ladungsdichte*, wie in Tabelle 5.1 aufgelistet.

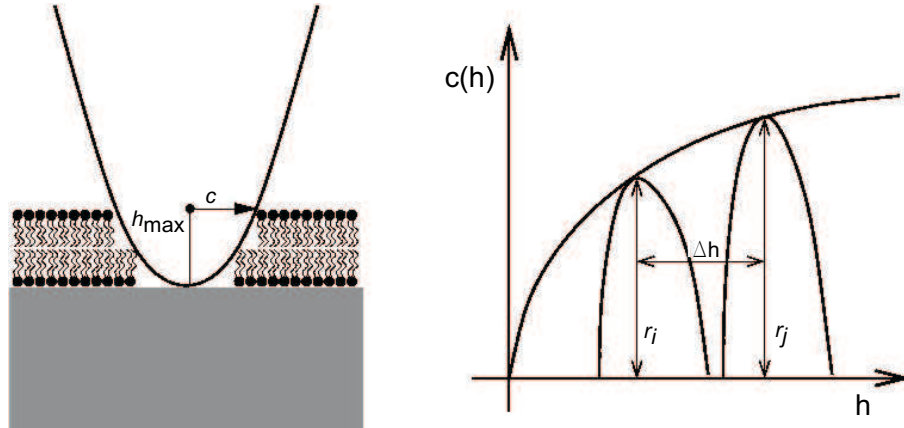


Abbildung 5.14: Skizze zur Berechnung der Adhäsionsfläche in Gleichung 5.24.

hergeleitet:

$$\begin{aligned}
 \text{Rotationsflaeche :} \quad & 2\pi \sum_i \frac{r_i - r_j}{2} \cdot \Delta h \quad \rightarrow \quad 2\pi \int_0^{h_{\max}} r(h) dh \\
 \Rightarrow & 2\pi \int_0^{h_{\max}} \sqrt{2R_{\text{Tip}} \cdot h} dh = \frac{4\pi}{3} \sqrt{2R_{\text{Tip}}} h^{\frac{3}{2}} \Big|_0^{\frac{c^2}{2R_{\text{Tip}}}}
 \end{aligned} \tag{5.24}$$

In Tabelle 5.1 ist die Adhäsion für die einzelnen simulierten Parameter dargestellt. Es wurde bei der Berechnung eine Ladungsdichte von $\sigma_{\text{Lipid}}^{\text{DODAB}} = 0,2 \frac{\text{C}}{\text{m}^2}$ für DODAB und eine Ladungsdichte von $\sigma_{\text{Lipid}}^{\text{DPPTE}} = 0,09 \frac{\text{C}}{\text{m}^2}$ beziehungsweise von $\sigma_{\text{Lipid}}^{\text{DPPTE}} = 0,013 \frac{\text{C}}{\text{m}^2}$, für die DPPTE/DPhPC/Chol Gemische der Mischung 60/20/20_{gew}% und 40/30/30_{gew}% gefunden. Dabei ist angenommen, dass ein Lipidkopf etwa eine Größe von $0,7 \text{ nm}^2$ hat. Somit gilt für die Ladungsdichte eines einfach geladenem Lipid: $\sigma_{\text{Lipid}}^{\text{DODAB}} = \frac{1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}}{7 \cdot 10^{-19} \text{ nm}^2} = 0,2 \frac{\text{C}}{\text{m}^2}$. Bei den Mischsystemen wurde beachtet, dass eine geringere Ladungsdichte auf Grund des Cholesterins und des DPhPC vorliegt. Das Elastizitätsmodul des Lipids E_2 kann über die Beziehung des Biegemoduls $\kappa = \frac{E_2 \cdot d_{\text{ab}}^2}{12(1-\nu_2)}$ = 4,2 GPa berechnet werden und stimmt mit den Annahmen in der Arbeit Künnecke von 4,2 GPa überein [Kün00].

Es ergibt sich eine Adhäsionsenergie von $10 \cdot 10^{-4} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ für die Mischsysteme und eine von etwa $20 \cdot 10^{-4} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ für DODAB und DOTAP. Ein Vergleich der Größenordnung von der bestimmten Adhäsion pro Fläche U mit den in Abbildung 5.9 D dargestellten adhäsionsabhängigen Kurven liefert keinen nennenswerten Beitrag in der Berechnung der Oberflächenfunktion $h(\rho)$ und begründet somit die

E in [kPa]	σ_{Lad} in [$\frac{\text{N}}{\text{m}}$]	\tilde{U} in [Nm]	c in [nm]	U in [$\text{m}\frac{\text{N}}{\text{m}}$]
1	0,2	0,78	9,4	0,5
2	0,2	0,72	8,8	0,6
4,2	0,2	0,69	7,8	0,8
10	0,2	0,59	7,4	0,8
15	0,2	0,56	7,3	0,8
4,2	0,05	$\approx 0,69$	5,7	2
4,2	0,1	0,69	6,8	1
4,2	0,2	0,69	7,8	0,8
4,2	0,3	0,68	8,2	0,6

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 5.13 zur Berechnung der Adhäsion U aus den MYD Simulationen nach Korrektur der simulierten Kurven.

Vernachlässigung der Adhäsionsenergie in der theoretischen Rechnungen. In der Literatur finden sich kaum vergleichbare Werte für die Adhäsion der verwendeten Lipiden an die AFM-Spitze. Benz et al., die unter anderem in ihren Arbeiten die Adhäsion von DPPE und DLPE untersuchten, fanden eine Adhäsionsenergie ihrem verwendeten Lipidgemisch auf Glimmer von $15 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ [Ben04]. Der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Wert von ca. $1 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ für DODAB, beziehungsweise DOTAP und $1 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ für die DPPTE/DPhPC/Chol Mischung im Verhältnis von 60/20/20_{gew}% liegt weit unter der Adhäsion von Benz et al. und begründet sich durch die viel schwächere Anbindung des Lipids an die AFM-Spitze als die von Benz et al. untersuchte Adhäsion an Glimmer.

Für die MYD Rechnungen wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Hamakerkonstante $H = 10^{-21}$ J, ein *Youngsches* Modul der Spitze von $E = 255$ GPa, ein Indenterradius von $R_{\text{Tip}} = 12$ nm und ein Poissonverhältnis der Spitze von $\nu_{\text{Spitze}} = 0,24$, verwendet. Die Simulationen wurde für eine Temperatur von 298 K, einem Gleichgewichtszustand von $r_0 = 0,3$ mm und eine Elektrolytkonzentration von $c(\text{Puffer}) = 10$ mM durchgeführt.

5.3.2 Indentation von porenüberspannenden Membranen: Kraftindentationskurven

In diesem Abschnitt soll eine neue Methode vorgestellt werden, um mechanische Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen zu untersuchen. Die Technik zum Überspannen der Poren mit einer Lipidmembran ist ausführlich in Kapitel 4.2 beschrieben und wurde erstmals in den Arbeiten von Hennesthal et al., Römer et al. und Drexler et al. verwendet [Hen03A, Hen03B, Röm03, Röm04, Dre03A, Dre03B]. Dabei wird auf die einzelnen Vor- und Nachteile der in Abschnitt 2.2 beschriebenen Modellsysteme eingegangen. Im Folgenden werden Messungen der elastischen Eigenschaften von DODAB- und DOTAP-*Bilayer* vorgestellt und ausführlich diskutiert und im späteren Verlauf werden die mechanischen Eigenschaften verschiedener Mischungen von DPPTE/DPhPC/Chol im Hinblick auf den Einfluss der Verzahnung des Lipids DPhPC und dem Einfluss des Cholesterin untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, die mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen mit nur wenigen Lipiden zu messen. Die Berechnung eines *Youngschen* Moduls von Membranen hängt empfindlich von den Parametern der einzelnen Systeme ab. Bei der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften mittels des Modellsystems der Liposomen (vergleiche Abschnitt 2.2.3) ist die Zusammensetzung und Geometrie der Vesikel von großer Bedeutung. Zum Beispiel werden Liposomen bei der Untersuchung von Pipetten Aspirationsexperimenten verwendet (Vergleiche Abbildung 5.17). Während sich Liposomen unter anderem für die Untersuchung von Diffusions- und Transportprozessen hervorragend eignen, weisen sie bei der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften im Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zu viele Probleme auf. Zum Beispiel sind die zu große Polydispersität der Vesikel und die unsichere Positionierung mit einer AFM-Spitze auf dem Vesikel im Bezug auf die hier durchgeführten Indentationsexperimente problematisch, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Zusätzlich ist das Modellsystem der Vesikel für die Untersuchung hier ungeeignet, da zum einen ihre Adhäsion auf Oberflächen nur bedingt möglich ist und zum anderen die Adhäsion ihre Krümmung verändert, so dass nur in den seltensten Fällen, jedoch in vielen Ansätzen angenommen, von einer sphärischen Oberfläche ausgegangen werden kann (vergleiche Abbildung 2.10). Krümmung und Polydispersität erschweren die kor-

rekte Charakterisierung mechanischer Eigenschaften und wirken sich nachteilig auf die exakte Beschreibung der mechanischen Eigenschaften aus.

Boulbitch entwickelte ein Modell zur Beschreibung von Experimenten mit Vesikeln, indem er die Verbiegung einer Zellmembran berechnete [Bou98] und Wan et al. entwickelten später eine Theorie zur Indentation von Vesikeln mit dem Rasterkraftmikroskop [Wan02]. Yao et al. stellten ferner ein Modell für die Berechnung des Elastizitätsmoduls vor, bei der sie den Einfluss des Biegemoduls vernachlässigten [Yao02]. Dabei ist zu beachten, dass die Vesikel nicht nur ein komplexes Modellsystem darstellen, sondern sich darüberhinaus auch aus einer hohen Anzahl von etwa 10^8 Lipiden bestehen. Das System der porenüberspannenden Membranen bedient sich hingegen einer relativ genau definierten Anzahl von nur 5000 – 30000 Lipiden, abhängig vom Porenradius.

Dabei wird eine unilamellare Vesikelsuspension mit einer Konzentration von $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ des Lipids DODAB auf die Poren gegeben. Nach dem Aufplatzen der Vesikel und dem Bilden eines *Bilayers* wird das System im *Contact* Modus bei fest eingestellten Kräften abgebildet. Dabei befindet sich die DODAB Membran in der Gelphase, da die Phasenumwandlungstemperatur von DODAB bei ungefähr $48 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt und die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden [Rei94, Fei00].

Abbildung 5.15 A zeigt die Topographie einer rasterkraftmikroskopischen Messung, abgebildet bei einer Kraft von $0,9 \text{ nN}$. Deutlich ist die hexagonale Porenstruktur zu sehen. Ferner sind drei Poren zu erkennen, die nicht mit einem *Bilayer* überspannt sind (Pfeile im Bild). In Abbildung 5.15 B ist die Aufnahme der selben Stelle bei einer Kraft von $2,7 \text{ nN}$ wiedergegeben. Bei einer derart hohen Kraft dringt die Spitze maximal in die Poren ein (vergleiche Abbildung 5.6 und Gleichung 5.1) und drückt dabei den *Bilayer* in die Poren. Das Höhenprofil in Abbildung 5.15 C entlang der in Abbildung 5.15 A dargestellten Linie zeigt den Einfluss der Kraft auf die Eindringtiefe. Bei niedriger Kraft ($0,9 \text{ nN}$) ist deutlich eine mit Membran überspannte Pore (gepunktete Linie) zu erkennen, während bei hoher Kraft die Membran in die Poren gedrückt (durchgezogene Linie) wird. Nach anschließender Reduzierung der Kraft entspannt sich die Membran wieder (gestrichelte Linie).

Eine Zielsetzung dieser Arbeit ist es, das Eindrückverhalten dieser, in Abbildung 5.15 A gezeigten, *Nanodrums* bei der Indentation einer paraboloiden Spitze zu quantifizieren. Dazu wird sich zunächst der Methodik der Kraftkurven bedient. Abbildung 5.16 zeigt Kraftkurven im Zentrum einer Pore mit einem Radius von

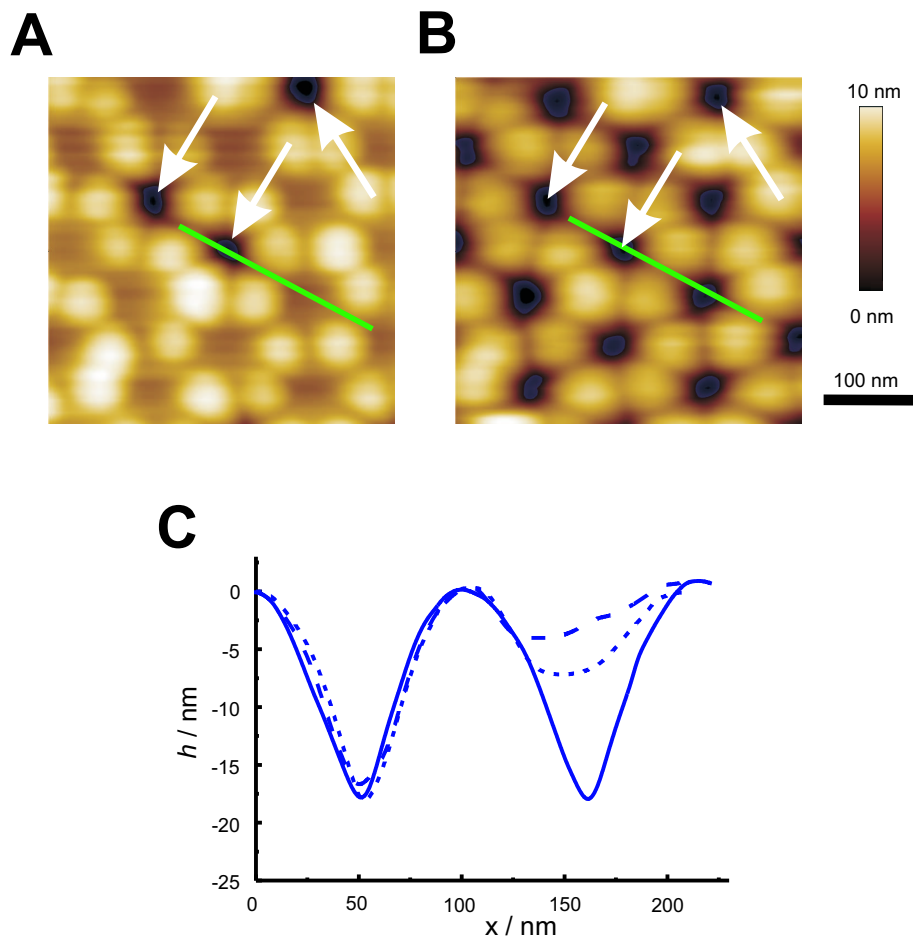


Abbildung 5.15: A: Porenüberspannender DODAB-Bilayer auf Poren mit einem Durchmesser von 67 nm bei einer Kraft von 0,9 nN. B: Porenüberspannender DODAB-Bilayer an der selben Stelle wie A bei einer Kraft von 2,7 nN. C: Höhenprofil entlang der in A gezeigten Linie bei verschiedenen Kräften (gepunktete Linie: 0,9 nN, durchgezogene Linie: 2,7 nN, gestrichelte Linie 1,7 nN).

$R_{\text{Pore}} = 90$ nm überspannt mit DODAB (I), beziehungsweise mit dem fluiden Lipid DOTAP (II). Typischerweise wurden jeweils 10-20 Kraftindentationsmessungen im Zentrum von 40 verschiedenen Poren bei 20° C durchgeführt, um eine ausreichende Statistik zu erhalten. Dabei wurde die thermische Drift in der $x - y$ -Ebene durch ausreichendes Equilibrieren der Probe und Kontrollmessungen minimiert. Deutlich ist ein lineares Verhalten der Rückstellkraft bei sowohl der Hinrichtung (schwarz) als auch der Rückrichtung aller Kurven zu erkennen. Ein wichtiger Aspekt ist, dass die Hin- und Rückrichtungen der Kraftkurven jeweils bis auf einen *Snap on* bei großen Eindringtiefen identisch sind. Dieser Aspekt lässt somit den Schluss zu, dass unter diesen Bedingungen das System einem statischen und elastischen Verhalten unterliegt. Die in Abschnitt 5.2 definierte apparente Federkonstante k_{app} hängt direkt mit dem Phasenverhalten der Lipidmembran zusammen und ist in Tabelle 5.3.2 für eine DODAB und eine DOTAP Membran dargestellt. Eine weitere Bestätigung der These des statischen elastischen

Monosystem	R_{Pore} in [nm]	κ in [J]	σ in [$\frac{\text{N}}{\text{m}}$]	Federkonstante in [$\frac{\text{N}}{\text{m}}$]
DODAB	33.5	—	—	$0,0210 \pm 0,0060$
DODAB	90	10^{-18}	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,0150 \pm 0,0040$
DOTAP	90	10^{-19}	$1 \cdot 10^{-3}$	$0,0039 \pm 0,0008$

Tabelle 5.2: Zusammenfassung aller apparenten Federkonstanten k_{app} der untersuchten porenüberspannenden Monolayer.

Systems ist in Abbildung 5.16 gezeigt. Dort ist die apparente Federkonstante k_{app} berechnet aus Kraftkurven im Zentrum von Poren mit einem Radius $R_{\text{Pore}} = 90$ nm in Abhängigkeit der vertikalen *Cantilever*-Geschwindigkeit gezeigt. Es ergibt sich eine mittlere Federkonstante von $\overline{k_{\text{app}}} = 15 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Deutlich ist das konstante Verhalten der Federkonstante bis zu einer vertikalen *Cantilever*-Geschwindigkeit von $60 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ erkennbar. Für alle nachfolgenden Messungen wurde deshalb eine *Cantilever*-Geschwindigkeit zwischen $0,5 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ bis $1,5 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ gewählt. Somit können hydrodynamische Effekte als zusätzliche Rückstellkräfte ausgeschlossen werden. Die unterschiedlichen Eindringtiefen in Abbildung 5.16 A bedingen sich durch die Benutzung unterschiedlicher *Cantilever*.

Die Adhäsionskräfte, die auf Grund der elektrostatischen Kräfte zwischen der negativ geladenen Spitze und den positiv geladenen Lipiden auftreten, sind an-

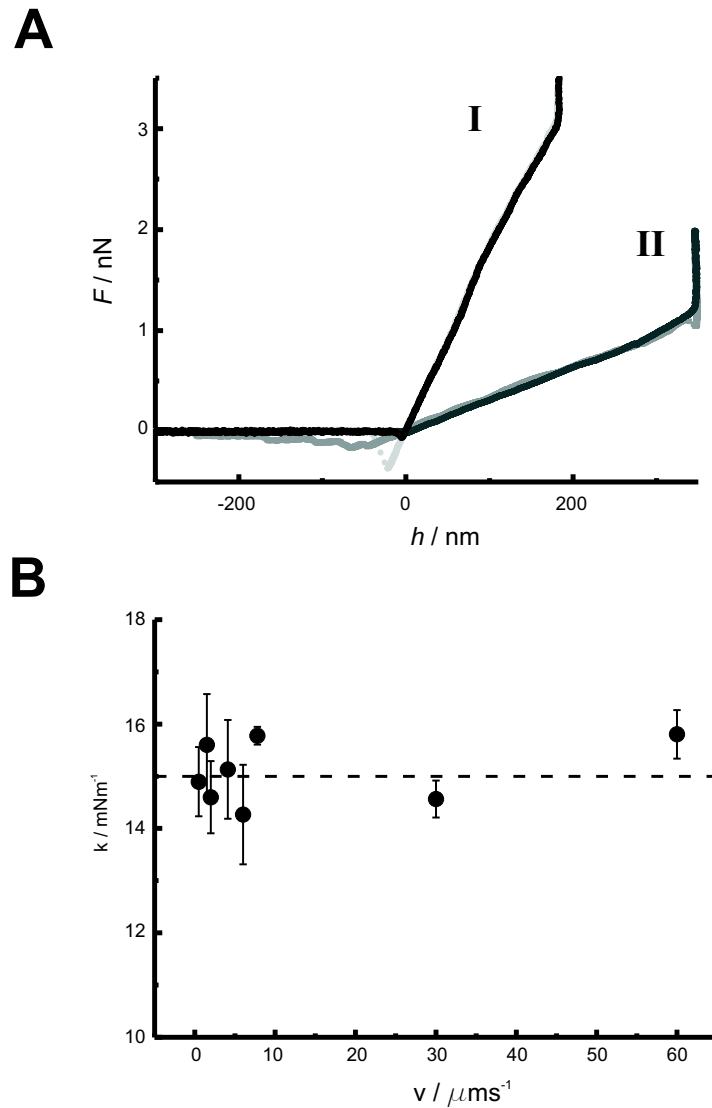


Abbildung 5.16: A: Kraftkurven im Zentrum einer Pore mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm. In schwarz ist die Annäherung und grau die Rückrichtung dargestellt. Dabei bezeichnet I die Kraftkurven auf *Nanodrums* bestehend aus DODAB und II die aus DOTAP. B: Apparente Federkonstante k_{app} eines porenüberspannenden DODAB-*Bilayers* in Abhängigkeit der vertikalen *Cantilever*-Geschwindigkeit, gemessen im Zentrum von Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm. Die gestrichelte Linie entspricht der Mittelwert $\overline{k_{\text{app}}}$.

hand der Rückrichtungskurve in einem *Snap off*-Peak deutlich in Abbildung 5.16 A sichtbar. Zusätzlich ist ein Adhäsionspeak bei Erreichen der Eindringtiefe zu erkennen (Abbildung 5.16 A). Eine Erklärung für die Adhäsion könnte die Anbindung der Membran an die Porenwand sein. Teilweise sind auch sogenannte *Tether*-Formationen zu sehen, wenn der *Cantilever* von der Probe zurückgezogen wird. *Tether* sind durch ein langes Plateau, abhängig von Biegemodul und Membranspannung, gekennzeichnet, bei dem die Membran aus der Pore herausgezogen wird (vergleiche Abbildung 5.17). Die *Tether*-Formation ist nicht Gegenstand dieser Arbeit und wird nur am Rande diskutiert. Bei Pipetten-Aspirationsexperimenten

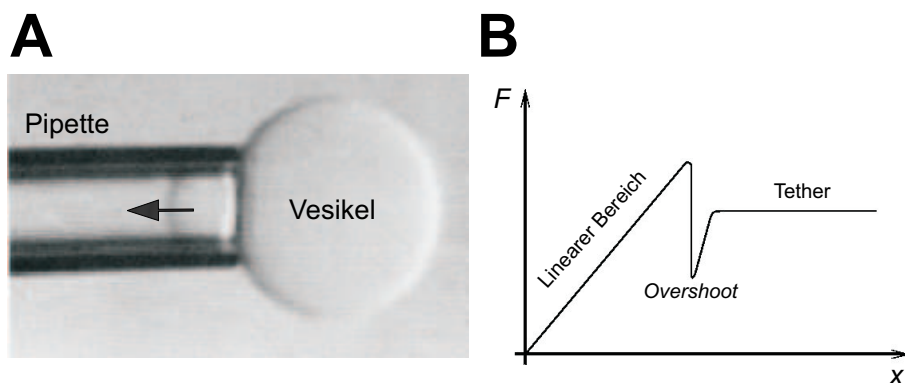


Abbildung 5.17: A.: Illustration zur Erzeugung eines isotropischen Drucks bei einem Vesikel durch Pipetten Aspiration. B.: Schematische Darstellung der Kraft F in Abhängigkeit des erzeugten Auslenkung x .

werden häufig solche Tether beobachtet, da beim Ansaugen des Liposoms zunächst eine lineare Kraftabhängigkeit zum Auslenkung entsteht und nach einem *Overshoot* sich ein *Tether* mit konstanter Kraft bildet (siehe Abbildung 5.17). Aus den Aspirationsexperimenten ist es unter anderem möglich das Biegemodul κ eines Vesikels zu bestimmen. Weiterführende Untersuchungen zu Tetherbildung finden sich zum Beispiel in [Pow02, Der02, Chu05, Kos05].

Wie in Abschnitt 5.2 bereits diskutiert, hat der Porendurchmesser einen Einfluss auf die Größe der Rückstellkraft. Abbildung 5.18 A zeigt beispielhaft jeweils eine Kraftkurve im Zentrum einer Pore mit Radius von $R_{\text{Pore}} = 33$ nm (I, grau) und einen von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm (II, schwarz). Die maximale Eindringtiefe in Poren mit einem Durchmesser von $R_{\text{Pore}} = 33$ nm entspricht den in Abbildung 5.5 C bestimmten Werten. Die apparente Federkonstante eines porenüberspannenden *Bilayers* mit einem Radius von 33 nm liegt bei $(0,021 \pm 0,006)$ nm, also einen

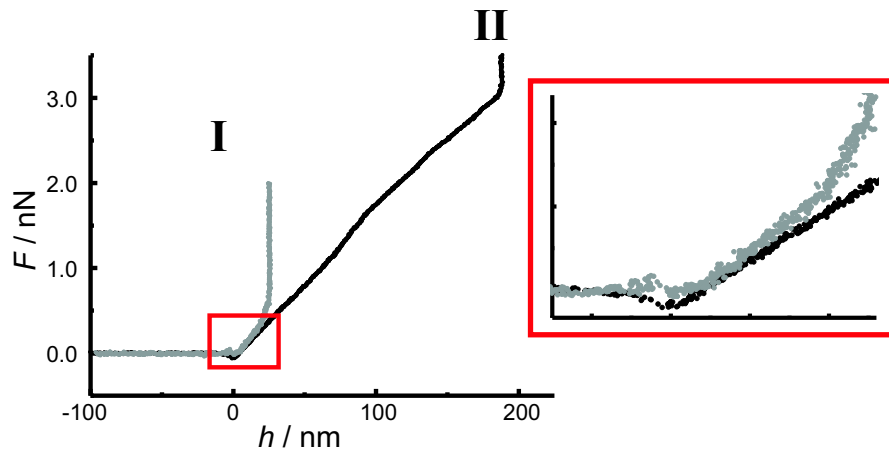


Abbildung 5.18: Kraftkurven auf Poren mit einem Radius von 33 nm im Vergleich zu Kraftkurven auf Poren mit einem Radius von 90 nm. Die Vergrößerung zeigt deutliche Unterschiede in der apparenten Federkonstante der beiden Kurven.

Faktor 1,4 kleiner als für Poren mit einem Radius von 90 nm (vergleiche Tabelle 5.3.2). Aus den theoretischen Rechnungen (Abbildung 5.9) bestimmt sich ein Faktor von 2 zwischen Poren mit Radius 33 nm und 90 nm. Mögliche Begründungen dieser Abweichung könnten in der Ungültigkeit der verwendeten Kontinuums-
 theorie oder in der fehlerhaften Positionierung (Mitte der Pore) der AFM-Spitze liegen.

Um den Einfluss der Positionierung des *Cantilevers* bei den Kraftindentsationskurven quantifizieren zu können, wurden Kraftkurven in Abhängigkeit des Abstandes zum Zentrum einer Pore mit einem Radius von 90 nm untersucht (Abbildung 5.18 B). Es ist deutlich zu erkennen, dass die apparente Federkonstante mit dem Abstand zum Zentrum der Pore zunimmt. Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da bei geringeren Abstand der Krümmung zunimmt und somit nach Gleichung 2.4 auch die Energie, beziehungsweise die Kraft (Gleichung 5.22).

Im diesem Abschnitt werden die Funktion 5.22 aus Kapitel 5.2 an die gemessenen Kraftkurven angepasst, indem die laterale Spannung σ und das Biegemodul κ variiert werden. Dabei wurde auf Grund der linearen Beziehung zwischen Eindringtiefe und Kraft ein festes Kappa gewählt und Simga angepasst. Abbildung 5.20 zeigt eine Kraftkurve auf einer mit DODAB überspannten Pore (grau), zusammen mit der für σ optimierten und in Abschnitt 5.2 beschriebenen Funktion (I), im Folgenden *small gradient* Theorie genannt sowie die numerisch exakte Lö-

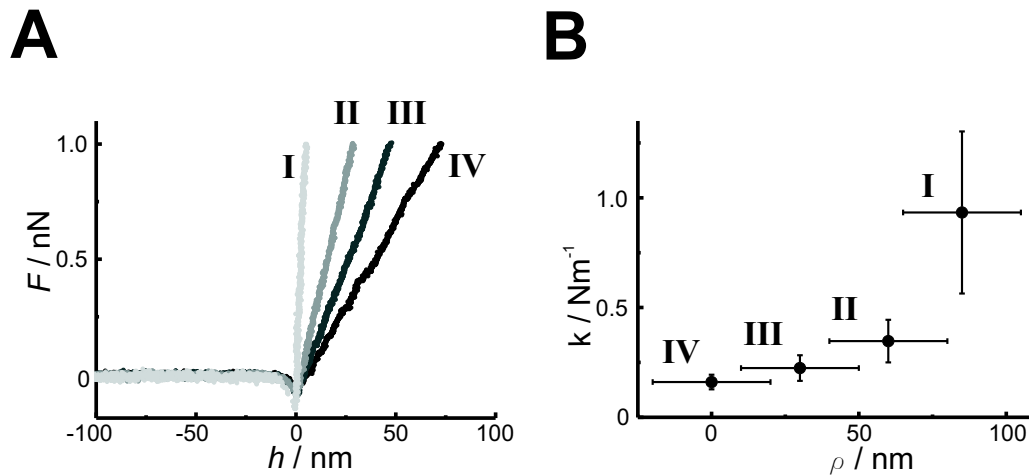


Abbildung 5.19: A: Kraftkurven auf mit DODAB überspannten Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm in Abhängigkeit des Ortes, beginnend vom Rand der Pore (I) bis zur Mitte der Pore (IV). B: Die mittlere apparente Federkonstante als Funktion des Ortes, entsprechend der Anordnung und Lipid Zusammensetzung von A.

sung (II) [Nor06]. Die mittels der von Norouzi et al. (exakte Theorie) entwickelten und angepassten Funktionen, wurden mit einer Adhäsion von $U = 0 \frac{N}{m}$ berechnet. Aus diesem Grunde wurde auch für die *small gradient* Theorie eine verschwindende Adhäsion angenommen um beide Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Die in Abschnitt 5.3.1 ermittelte Adhäsion würde nur geringe Verringerung der lateralen Spannung bewirken, um die berechneten Kurven an die Daten anzupassen⁵ und kann somit vernachlässigt werden. Beide Lösungen geben den Verlauf der gemessenen Kurve sehr gut wieder, wobei die *small gradient* Theorie nur bis Eindringtiefen von 50 nm die experimentellen Daten gut erfasst. Eine bessere Übereinstimmung erzielt die numerisch exakte Theorie, die den Verlauf der beiden Kraftkurven bis zu 150 nm beschreiben kann. Eine Erklärung für das frühere Versagen der *small gradient* Theorie liegt in der Annahme kleiner Auslenkungen der Membran daraus resultierende kleine Gradienten $\frac{\partial h(\rho)}{\partial \rho}$. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für das Problem des *colloidal wrapping* beschrieben [Des03, Des04]. Bis zu Eindringtiefen von 50 nm stimmen beide Varianten sehr gut überein und können die Daten sehr gut beschreiben. Korrekterweise müsste eine asymptotische Anpassung von Gleichung 5.22 an die experimentell gewon-

⁵Für eine DODAB-Membran auf Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm würde es eine Verringerung der lateralen Spannung von höchstens $1 \frac{N}{m}$ ergeben.

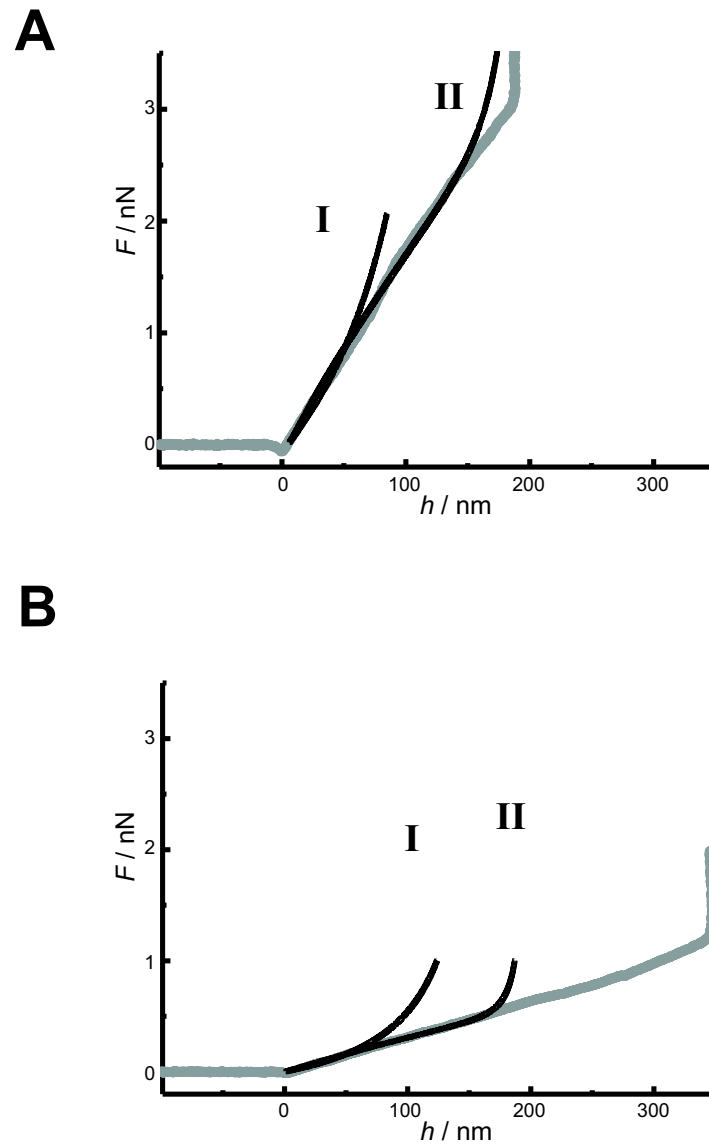


Abbildung 5.20: A: Kraftkurven auf einem porösen Substrat mit einem Radius von 90 nm, welches mit DODAB überspannt ist. (I) zeigt das Resultat der in Abschnitt 5.2 entwickelten Funktion für eine optimierte laterale Spannung σ und ein konstantes Biegemodul κ , während (II) die numerisch exakte Lösung aus der Arbeit von Norouzi et al. darstellt [Nor06]. Es wurden für beide Rechnungen folgende Parameter verwendet: $\sigma = 5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$, $\kappa = 10^{-18} \text{ J}$, $R_{\text{Pore}} = 90 \text{ nm}$ und $R_{\text{Tip}} = 20 \text{ nm}$. B: Gleiche Darstellung und Funktion für eine DOTAP Membran. Folgende zu A abweichende Parameter wurden benutzt: $\sigma = 1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und $\kappa = 10^{-19} \text{ J}$.

nenen Daten vorgenommen werden, da die Näherung nur für signifikant kleine Auslenkungen exakt stimmt. Um jedoch einen Vergleich der beiden Theorien untereinander und mit den experimentellen Daten zu gewährleisten wurde auf eine asymptotische Anpassung verzichtet. Des Weiteren könnte ein Grund in der Abweichung der *small gradient* Theorie, beziehungsweise der numerisch exakten Theorie bei sehr großen Eindringtiefen über die zunehmenden Unregelmäßigkeiten der Spitze erklärt werden, die von der idealen parabolischen Form abweicht (vergleiche Abbildung 5.5).

Betrachtet man die angenommenen Werte für die maximale laterale Spannung und das Biegemodul, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit in der Literatur bestimmten Werten [Boa02, Isr03]. Fluide Membranen reißen typischerweise bei einer maximalen lateralen Spannung von $(5 - 10) \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$, während Lipide in der Gelphase eine wesentlich höhere laterale Spannung erreichen können. Die laterale Spannung der Membranen kann folgendermaßen bestimmt werden (vergleiche hierzu die Aussagen in Kapitel 2.3): eine Membran reißt typischerweise bei circa 2-5% Flächendehnung. Das Flächenkompressionsmodul K_A ist in Abhängigkeit des Biegemoduls κ und der Membrandicke d_{db} wird mit $K_A = \frac{24\kappa}{d_{\text{db}}^2}$ angenommen. Die laterale Spannung ist entsprechend der Notation aus Kapitel 2.3 definiert als $\sigma = K_A \frac{A-A_0}{A_0}$. Somit ergibt sich eine maximale laterale Spannung für fluide Lipide von $(2-6) \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und in Gelphase eine von $(20-55) \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die bei der Anpassung der *small gradient* Theorie und der numerisch exakten Theorie gemachten Annahmen der laterale Spannung von $5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ beziehungsweise $1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ ergeben also physikalisch sehr sinnvolle Werte und liegen unterhalb der maximalen lateralen Spannung.

Diese Ergebnisse fügen sich gut in die Arbeiten von Powers et al., sowie die von Derényi et al. ein [Pow02, Der02]. Derényi et al. untersuchten die Tetherbildung von Membranen, indem sie an Membranen zogen. Sie fanden heraus, dass die Kraft, mit der gezogen wurde, ungefähr proportional zur Auslenkung der Membran ansteigt, bis es zu einem Plateau kommt; die *Tetherbildung*. Das weitere Strecken der Membran zu einem *Tether* erfolgt mit konstanter Kraft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Plateaubildung beobachtet.

Des Weiteren stimmen die Ergebnisse sehr gut mit zwei Arbeiten von Boulbitch überein. In der ersten Veröffentlichung untersuchte er das Einwirken einer lokalen Kraft auf die Verbiegung einer Membran und kam zu dem Schluss, dass fluide Membranen von Zellen sehr kleine apparente Federkonstanten besitzen ($k_{\text{app}}^{\text{Cell}} \approx 10^{-4} \frac{\text{N}}{\text{m}}$). Die apparente Federkonstante wäre somit schlecht mit dem

AFM messbar. Der Schluss, den er aus dieser Erkenntnis zog, war, dass die Rückstellkräfte der Membran von Bakterien durch den osmotischen Druck beziehungsweise durch die Elastizität des Zytoskeletts hervorgerufen werden [Bou98].

In seiner zweiten Arbeit entwickelte er ein Modell über das Adhärenieren eines Zylinders (*Bead* oder *Pellet*) an eine Biomembran, ähnlich zu dem in Kapitel 5.2 beschrieben.

Es existieren Experimente aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Steinem an DPTTE/DPhPC Gemischen. DPhPC wird häufig bei der Methodik der BLMs verwendet, da es eine zusätzliche Stabilität für die Überspannung von Poren liefert. Aus diesem Grunde und den zuvor genannten wurden zusätzlich zu Poren, die mit DODAB- und DOTAP-Membran überspannt sind, welche untersucht, die mit einer Lipidmischung bestehend aus DPPTE, DPhPC und Cholesterin in unterschiedlichen Zusammensetzungen überspannt sind. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf den Einfluss von DPhPC- und Cholesteringehalte auf die mechanischen Eigenschaften gelegt. Ziel war es durch Variation des DPhPC-Gehaltes eine Aussage über den Einfluss der Methylgruppen als stabilisierendes Lipid zu quantifizieren. Ferner sollte der Einfluss von Cholesterin bestimmt werden. Dazu werden im Folgenden die Ergebnisse diskutiert, die mittels Kraftkurven erhalten worden sind⁶. In Abbildung 5.21 sind exemplarisch drei Kraftindentionkurven einer porenüberspannenden Membran von unterschiedlichen Mischungen von DPPTE/DPhPC/Cholesterin bis zu einer Eindringtiefe von 100 nm dargestellt. Die rote Kurve zeigt die Indention einer porenüberspannenden Membran mit der Zusammensetzung von 60_{gew}% DPPTE und 40_{gew}% DPhPC mit einer apparenten Federkonstanten von $k=0,033 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, während die blaue Kurve einer der Zusammensetzung von 60_{gew}% DPPTE, 20_{gew}% DPhPC und 20_{gew}% Cholesterin (Federkonstanten von $k=0,011 \frac{\text{N}}{\text{m}}$) entspricht. Die Karftabstandskurve (grün) mit der geringsten Federkonstanten wurde auf porenüberspannenden Membranen mit der Zusammensetzung von 60_{gew}% DPPTE und 40_{gew}% Cholesterin aufgenommen und liefert eine Federkonstante von $k=0,003 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. In Tabelle 5.3.2 sind die apparenten Federkonstanten k der einzelnen Mischungen von DPPTE/DPhPC/Cholesterin zusammengefasst. Dabei wurde die Federkonstante wieder aus vielen gemessenen Kraftkurven gemittelt. Deutlich ist eine Erhöhung der Federkonstanten mit steigendem DPhPC-Gehalt zu erkennen. Bei

⁶Dabei werden zugunsten der Übersichtlichkeit nur exemplarisch drei Kraftindentionskurven von den Mischsystemen DPPTE/DPhPC/Chol präsentiert, da die weiteren Gemische einen ähnlichen Verlauf zeigen.

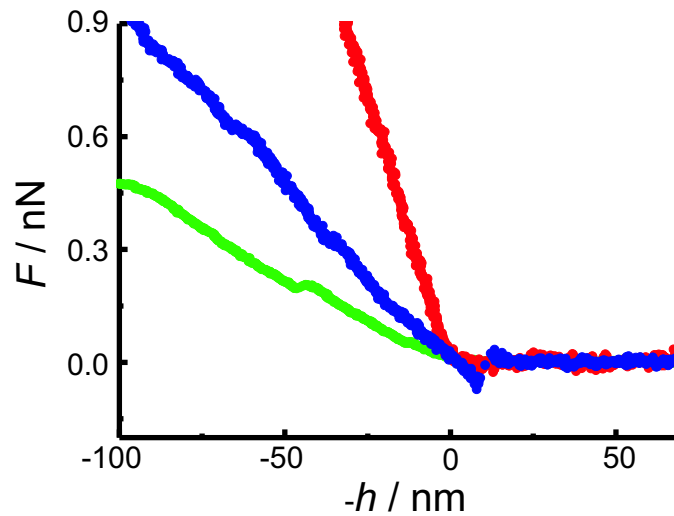


Abbildung 5.21: Exemplarische Darstellung von drei Kraft-indentationskurven auf porenüberspannenden Membranen der Mischung DPPTE/DPhPC/Cholesterin auf Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90 \text{ nm}$. Die rote Kurve wurde auf porenüberspannenden Membranen der Mischung 60_{gew%} DPPTE und 40_{gew%} DPhPC aufgenommen und ergibt eine apparente Federkonstante von $k=0,033 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die blaue Kraft-indentationskurve ergibt eine apparente Federkonstanten von $k=0,011 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ für eine Membran mit 60_{gew%} DPPTE, 20_{gew%} DPhPC und 20_{gew%} Cholesterin, während für die Zusammensetzung (grün) von 60_{gew%} DPPTE, 40_{gew%} Cholesterin eine Federkonstante von $k=0,003 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ ermittelt wurde.

einem DPPTE/DPhPC/Cholesterin Gemisch von 60/40/0 im Vergleich zu dem mit einer Mischung von 80/20/0 ergibt sich eine Erhöhung der apparenten Federkonstanten um einen Faktor zwei. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Erhöhung durch eine Verzahnung der Methylgruppen an den Fettsäureketten des DPhPC hervorgerufen wird. Ferner könnte DPhPC, welches als reine Membran eine spontane Krümmung ($K_0 \neq 0$) enthält, den DPPTE/DPhPC/Chol porenüberspannenden *Bilayer* krümmen und so eine zusätzliche Rückstellkraft liefern. Entgegen diesen Effekten nimmt jedoch die Anbindungsmöglichkeit an die Substratoberfläche durch einer Verringerung des Gehalts von DPPTE ab, welches zu einer Verringerung der lateralen Spannung und somit zur Abnahme der Federkonstante führt. Diese Tatsache ist jedoch im Vergleich zu den zuvor genannten als weniger signifikant einzuordnen.

DPPTTE in gew. %	DPhPC in gew. %	Chol in gew. %	k_{gemessen} in $[\frac{\text{N}}{\text{m}}]$
60	40	0	0,033
80	20	0	0,016
60	0	40	0,005
60	20	20	0,011
60	20	20	0,011
40	30	30	0,014

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der gemessenen apparenten Federkonstanten k der unterschiedlichen DPPTTE/DPhPC/Cholesterin Mischungen auf Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm. Alle bestimmten Werte enthalten eine statistische Ungenauigkeit von etwa 5 Prozent.

Das DPPTTE-Cholesterin Lipidgemisch hat eine apparente Federkonstanten von $0,005 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die ist im Vergleich zu der porenüberspannenden Membran mit einer Mischung von 60/20/20 gew% um den Faktor 2 kleiner, obwohl bei der Membran mit einer Mischung von 60/20/20 gew% die Anbindungsmöglichkeit durch den Zusatz von DPhPC verringert wurde. Dies liegt zum einem in der besonderen Eigenschaft von Cholesterin, Membranen die sich in der Gelphase befinden „fluider“ zu machen, während fluide Membranen in eine sogenannte *liquid-ordered* Phase überführt werden und somit versteifen [Tie05] und zum anderen fehlt die Verzahnung der Methygruppen. Bei dem zuletzt verwendeten Gemisch von DPPTTE/DPhPC/Chol 40/30/30 gew% ergibt sich nur eine geringfügige Erhöhung der Federkonstanten von $0,011 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ auf $0,014 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die ist wiederum mit den oben genannten Gründen zu erklären, da die Erhöhung der apparenten Federkonstante durch mehr DPhPC Lipide gegen die Verringerung der apparenten Federkonstanten bedingt durch Verringerung des DPPTTE- und Erhöhung der Cholesteringehaltes wirkt.

Eine Anpassung der in Kapitel 5.2 vorgestellten Theorie wurde aus verschiedenen Gründen nicht durchgeführt. Zum einen sind für die genannten Mischungen keine Biegemodule bekannt. Das Biegemodul muss zwischen dem Wert für fluide Membranen und dem für Membranen in Gelphase liegen und kann nicht, auf Grund der oben genannten Gründe (Phasenverhalten und Anbindungsmöglichkeit), als konstant angenommen werden. Zum anderen ist von DPhPC kein definiertes Phasen-

und spontanes Krümmungsverhalten bekannt. Somit wären nur grobe Einschätzungen des Biegemoduls zwischen den Werten für fluide Membranen und Membranen in der Gelphase möglich. Durch diese Unbestimmtheit beider Parameter, laterale Spannung und dem Biegemodul, ist es nahezu unmöglich eine sinnvolle Anpassung vorzunehmen.

5.3.3 Indentation von porenüberspannenden Membranen: Die Rastermethode

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus den Kraftkurven wurde eine zweite Methode zur Bestimmung der apparenten Federkonstanten durchgeführt: die Rastermethode. Bei der Rastermethode werden die Poren im *Contact* Modus mit einer definierten Aufdruckkraft abgerastert. Höhenprofile durch die einzelnen Poren liefern die Eindringtiefe des *Cantilevers* in die Poren. Diese Methode umgeht die Unsicherheit der Positionierung, bedingt durch den thermischen Drift des *Cantilevers* bei der Analyse der Kraftindentationskurven. Die Präparation der *Bilayer* erfolgt dabei in gleicher Weise, wie bei den Kraftkurven.

Abbildung 5.22 zeigt die experimentell bestimmte Kraft F in der Mitte einer mit Membran (DODAB) überspannten Pore bestehend aus DODAB als Funktion der Eindringtiefe h . Die Eindringtiefe wird über ein Höhenprofil entlang der Linie gezeigt, im Inset der Abbildung 5.22, bestimmt. Der Graph ist das Ergebnis aus Messungen von unterschiedlichen Proben-Präparationen untersucht mit verschiedenen *Cantilevern*⁷. Jeder Datenpunkt in Abbildung 5.22 ist der Mittelwert aus über 50 analysierten Poren. Der Fehler für $h(\varrho)|_{\varrho=0}$ ergibt sich aus der Standardabweichung der bestimmten Eindringtiefen, während der Fehler für die Kraft direkt aus den Messungen bestimmt werden kann, indem die Abweichung der *Deflection* vor und nach dem Messen bestimmt wird. Die gestrichelte rote Linie gibt die maximale geometrische Eindringtiefe von $h_{\max} = 33$ nm an, die aus der Spitzen- und Poren-Geometrie bestimmt werden kann. Für die verwendeten *Cantilever* ergibt sich für die Olympus PSA 400 eine Eindringtiefe von 30 bis 50 nm und für die Veeco DNP-S-10 eine Eindringtiefe von 20 bis 30 nm (vergleiche Abbildung 5.5).

Die rote durchgezogene Linie ist die lineare Regression, die Steigung dieser Funk-

⁷Die Abbildung 5.22 beinhaltet auch Datenpunkte aus der Arbeit von Hennehal et al. [Hen03B].

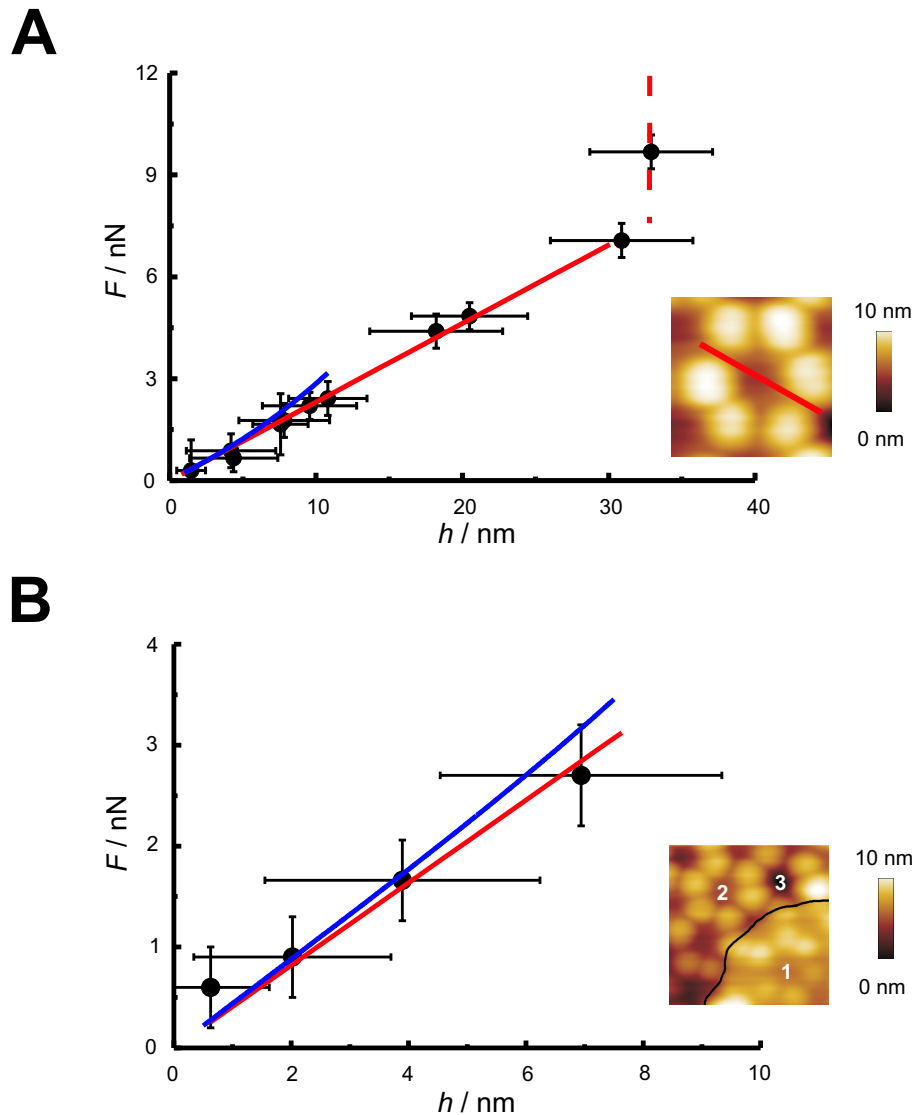


Abbildung 5.22: A: Experimentelle Bestimmung der Kraft $F(h(\varrho))|_{\varrho=0}$ in Abhängigkeit der Eindringtiefe $h(\varrho)|_{\varrho=0}$ von porenüberspannenden DODAB-Bilayern auf Poren mit einem Durchmesser von 67 nm. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe der Raster-Scannmethode aufgenommen. Die vertikale gestrichelte rote Linie entspricht der geometrisch berechneten maximalen Eindringtiefe, während die rote durchgezogene Linie der lineare Fit durch die Datenpunkte ist, die eine apparente Federkonstante von $k = 0,23 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ liefert. Die blaue Linie ist die asymptotische Anpassung des theoretischen Modells aus Kapitel 5.2. Das Inset veranschaulicht, wie die Eindringtiefe bei über 50 einzelnen Poren bestimmt wurde. B: Eindringtiefe eines doppelten DODAB-Bilayers zusammen mit dem in Abschnitt 5.2 berechneten asymptotischen Fit. Die apparente Federkonstante wurde hier zu $k = 0,44 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ bestimmt. Das Inset zeigt die unterschiedlichen Poren (1: doppelter Bilayer; 2: einzelner Bilayer; 3: nicht überspannte Pore).

tion entspricht der apparenten Federkonstante k der porenüberspannenden Membran und wird zu $k = (0,23 \pm 0,02) \frac{\text{N}}{\text{m}}$ bestimmt. Die blaue Linie ist ein asymptotischer Fit, berechnet durch die in Kapitel 5.2 vorgestellte Theorie; die hier, im Gegensatz zum in Abschnitt 5.3.2, einen asymptotischen Fit verwendet. Bei diesem asymptotischen Fit wird die Funktion den Messwerten bei geringen Eindringtiefen angepasst, indem die Ableitungen nahe null übereinstimmen müssen. Somit werden die bei linearen Näherungen gemachten Fehler nicht so stark gewichtet. Der asymptotische Fit für die in Gleichung 5.23 angegebenen Werte für ein Lipid in der Gelphase zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den Datenpunkten (5.22). Der Wert für das Biegemodul $\kappa = 10^{-18}$ J wurde der Arbeit von Lee et al. entnommen [Lee01] und die laterale Spannung σ variiert. Aus dem asymptotischen Fit ergibt sich eine theoretische apparente Federkonstante von $0,23 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, wenn die mittlere Steigung zwischen der Eindringtiefe von 0,5 nm und 1,5 nm berechnet wird.

Aus dem asymptotischen Fit resultiert eine laterale Spannung von $\sigma = 45 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Dieser Wert, der angenommen worden ist, um in den theoretischen Berechnungen eine apparente Federkonstante von $0,23 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ zu erreichen, liegt im oberen Bereich abgeschätzten der maximalen lateralen Spannung $\sigma_{\text{krit.}}$ zwischen $20 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und $55 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$.

In Abbildung 5.22 B sind zusätzlich Eindringtiefen von einem doppelten *Bilayer* untersucht worden. Normalerweise findet sich ein doppelter *Bilayer* nur sehr selten auf den Poren, so dass die Datenpunkte nur eine geringe Statistik aufweisen. Dennoch ist es möglich, die Eindringtiefen mit relativ großer Genauigkeit zu bestimmen. Abbildung 5.22 B zeigt die Ergebnisse zusammen mit der linearen Regression (rot) und dem theoretischen Fit (blau). Deutlich ist der lineare Zusammenhang erkennbar. Es ergibt sich eine apparente Federkonstante von $k_{\text{double}} = 0,44 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Für den asymptotischen Fit werden die selben Parameter wie in Abbildung 5.22 A angenommen. Da das Biegemodul mit der Dicke d_{db} der Membran skaliert, wird im theoretischen, asymptotischen Fit versucht, eine größtmögliche Übereinstimmung von experimentellen Daten und theoretischen Werten zu erreichen, indem das Biegemodul κ variiert wird und die für den einzelnen *Bilayer* gefundene laterale Spannung von $\sigma = 45 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ konstant gehalten wird. Die bestmögliche Übereinstimmung zwischen Theorie und experimentellen Daten ergibt sich so für ein Biegemodul von $\kappa = 5,3 \cdot 10^{-18}$ J. Das ist eine gute Übereinstimmung mit den bekannten Theorien, da das Biegemodul in den Arbeiten von Boal mit d^2 skaliert, welches zu einem Biegemodul für einen doppelten

Bilayer von $\kappa_{\text{Boal}} = \kappa = 4,4 \cdot 10^{-18}$ J führen würde [Boa02]. Zum anderen skaliert es nach der Dünne-Platten-Theorie mit d^3 , so dass ein Biegemodul von $\kappa_{\text{DP}} = \kappa = 8,8 \cdot 10^{-18}$ J resultieren würde [Lan]. Der im Rahmen dieser Arbeit gefundene Wert für das Biegemodul eines doppelten *Bilayers* $\kappa = 5,3 \cdot 10^{-18}$ J liegt zwischen den in der Literatur gefundenen Werten.

Zur weiteren Verifikation der theoretischen Ergebnisse ist der Porendurchmesser variiert worden. Zusätzlich zu den Poren mit einem Radius von 33,5 nm sind im Rahmen dieser Arbeit Poren mit einem Radius von 90 nm für die artifiziellen Membranen verwendet worden. Abbildung 5.23 zeigt die lineare Abhängigkeit der Kraft F von der Eindringtiefe h bis zu einer Eindringtiefe von 200 nm. Die Datenpunkte beruhen wiederum auf einer Statistik von mehr als 50 analysierten Poren. Die rote Linie mit einer apparenten Federkonstanten von $0,13 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ entspricht

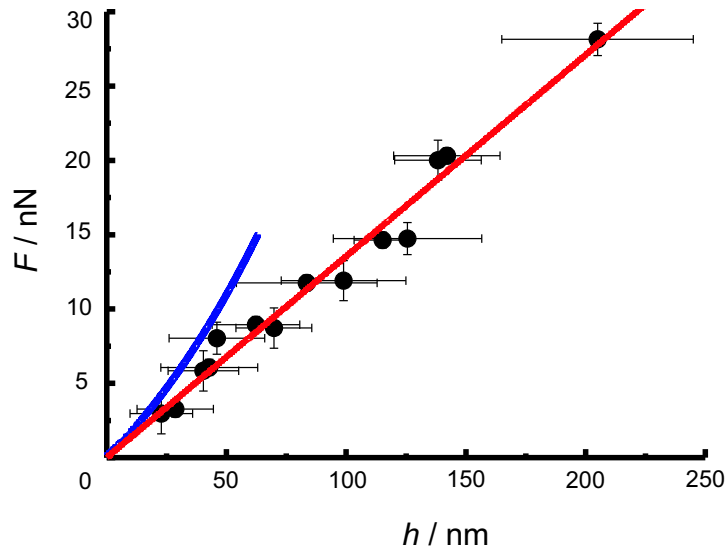


Abbildung 5.23: Experimentelle Ergebnisse der Kraft $F(h(\varrho))|_{\varrho=0}$ in Abhängigkeit der Eindringtiefe $h(\varrho)|_{\varrho=0}$ von DODAB-*Bilayern* auf Poren mit einem Durchmesser von 180 nm (Datenpunkte). Die rote Linie entspricht dem linearen Fit durch die Datenpunkte. Die blaue Linie ergibt sich aus der Lösung des theoretischen Modells in Kapitel 5.2 als asymptotische Fitfunktion.

der Fitfunktion durch die Datenpunkte, während die blaue Kurve mittels der *small gradient* Theorie als asymptotische Anpassung berechnet worden ist. Dabei wurden die aus Abbildung 5.22 A bekannten Werte für die laterale Spannung

$\sigma = 45 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und das Biegemodul $\kappa = 10^{-18} \text{ J}$ konstant gehalten und lediglich der Porenradius auf einen Wert von $R_{\text{Pore}} = 90 \text{ nm}$ angepasst. Die Theorie ist in der Lage, den Verlauf der Datenpunkte für geringe Eindringtiefen zu beschreiben. Des Weiteren gibt sie den Verlauf für unterschiedliche Porenradien sehr gut wieder. Die aus Abbildung 5.22 A und 5.23 bestimmten apparenten Federkonstanten unterscheiden sich um einen Faktor 1,8. Dies ist eine gute Übereinstimmung zu dem aus Abbildung 5.9 B bestimmten Faktor von 2. Dabei wurde die Berechnung wie Abbildung 5.9 B mit den in diesem Abschnitt gefundenen Werten der lateralen Spannung und dem Biegemodul durchgeführt und die apparenten Federkonstanten für von berechneten Karft-Indentationskurven auf Poren mit einem Radius von 33,5 nm und Poren mit einem Radius von 90 nm berechnet.

Die hier erhaltenen Ergebnisse wiederum stimmen qualitativ mit dem Studien von Powers et al. überein [Pow02]. Powers et al. beschreiben, wie oben bereits erwähnt, eine lineare Abhängigkeit der Kraft von der Eindringtiefe bis zu einer kraftunabhängigen *Tetherbildung*. Auf den ersten Blick scheint es sinnvoller zu sein, ein Modell zu entwickeln, welches nur von der lateralen Spannung σ dominiert wird und in dessen Rechnungen auf Grund des *small gradient case* das Biegemodul vernachlässigt werden könnte. Die Lösungen, wie bei Powers et al. berechnet, sind die eines Katenoids, welche nur stabile Lösungen für Kräfte kleiner als 1 - 2 nN erlauben [Pow02]. Die maximale Kraft ist hierbei definiert als $F_{\text{max}} = 2\pi\sigma c$. Da jedoch in dieser Arbeit stabile Lösungen für Kräfte von bis zu 30 nN erhalten werden, ist es sinnvoll, in dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten theoretischen Ansatz das Biegemodul im Gegensatz zu den Arbeiten von Powers zusätzlich zu berücksichtigen. Arnoldi et al. entwickelten eine Lösung für das Problem, indem sie die durch die AFM-Spitze induzierte Indentation berücksichtigten und fanden, dass die Rückstellkraft hauptsächlich durch den Turgordruck dominiert wird [Arn00]. Dabei wird jedoch die finite Größe der AFM-Spitze vernachlässigt, da diese als punktförmig angenommen wird. Die Arbeiten von Arnoldi und von Boulbitch (vergleiche oben) belegen, dass die mechanischen Eigenschaften einer lebenden Zelle (fluide Membranen) nur vom Zytoskelett und vom osmotischen Druck dominiert werden [Arn00, Bou98].

Desweiteren wurden wiederum verschiedene Mischungen der Lipide DPPTE, DPhPC und Cholesterin als porenüberspannende Membranen untersucht. Abbildung 5.24 A zeigt die drei Höhenprofile einer rasterkraftmikroskopischen Untersuchung eines DPPTE/DPhPC/Cholesterin Gemisches (60/20/20_{gew.}%) bei unterschiedlichen Aufdruckskräften auf 33 nm Poren. Dabei unterschieden sich

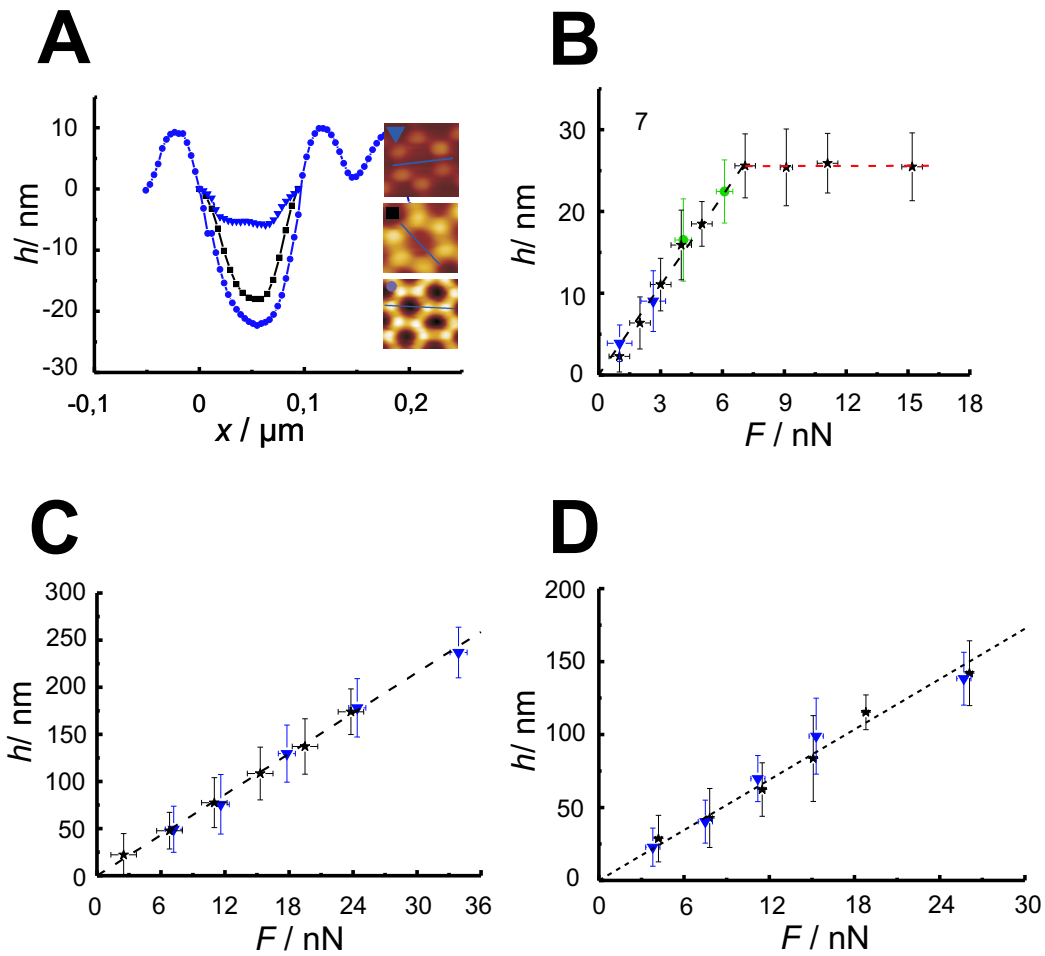


Abbildung 5.24: A: Höhenprofile der im Inset dargestellten rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen eines DPPTE/DPhPC/Cholesterin (60/20/20_{gew.%}) *Bilayers* auf Poren mit einem Radius von 33 nm in zeitlicher Reihenfolge von oben nach unten. Das Höhenprofil mit \blacktriangledown Symbolen wurde bei einer Kraft von 1 nN aufgenommen, das folgende mit einer höheren Kraft von 10 nN (Symbol \bullet) und zuletzt wurde die Probe mit einer Kraft von 4,7 nN (Symbol \blacksquare) abgerastert. B: Eindringtiefe-Kraftkurve ermittelt aus den in A gezeigten Höhenprofilen auf Poren mit einem Durchmesser von 33 nm des DPPTE/DPhPC/Cholesterin-Gemisches (60/20/20_{gew.%}). Es ergibt sich eine apparente Federkonstante von $k_{\text{app}} = 0,27 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. C und D: Eindringtiefe-Kraftkurve ermittelt aus den in A gezeigten Höhenprofilen auf Poren mit einem Durchmesser von 33 nm des DPPTE/DPhPC/Cholesterin-Gemisches (C: 60/20/20_{gew.%} und D: 40/30/30_{gew.%}). Es ergibt sich eine apparente Federkonstante von $k_{\text{app}} = 0,14 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, beziehungsweise eine $k_{\text{app}} = 0,17 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Bei B bis D geben Farben die Höhenprofile aus verschiedenen Messungen an. Jeder einzelne Datenpunkt ist der Mittelwert aus über 50 Höhenprofilen.

deutlich die Eindringtiefen voneinander. Bei einer Kraft von 1 nN (\blacktriangledown Symbol) dringt die Spitze 5,6 nm in die Poren ein, während bei einer Kraft von 10 nN (\bullet Symbol) die Eindringtiefe von etwa 25 nm erreicht wird. Nach der Erhöhung der Kraft wurde im Folgenden die Kraft auf 4,7 nN erniedrigt (\blacksquare Symbol) und die Membran relaxiert wieder bei einer Eindringtiefe von 17 nm.

Um die Abhängigkeit der Eindringtiefe von der Kraft zu untersuchen wurden, wie schon bei den DODAB *Bilayern*, Abbildungen von porenüberspannenden Lipidmembranen des DPPTE/DPhPC/Cholesterin Gemisches auf unterschiedlichen Porendurchmessern durchgeführt und jeweils die Eindringtiefe von über 50 Poren bestimmt. Abbildung 5.24 B bis D zeigt die Graphen der Eindringtiefe in Abhängigkeit der Kraft. In B wurde ein porenüberspannender *Bilayer* des DPPTE/DPhPC/Cholesterin Gemisches (60/20/20_{gew.%}) auf 33 nm Poren untersucht. Deutlich ist der lineare Zusammenhang sichtbar und die apparente Federkonstante ist für dieses *Setup* $k_{\text{app}} = 0,27 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Ferner ist ab einer Kraft von etwa 7 nN die maximale Eindringtiefe von 28,4 nm zu erkennen. Dieses maximale Eindringtiefe liegt in dem aus Abbildung 5.5 zu entnehmenden Bereich und war für die Spitzengeometrie zu erwarten.

In Abbildung 5.24 C und D ist die Eindringtiefe in Abhängigkeit der Kraft für das DPPTE/DPhPC/Cholesterin Gemisches (C: 60/20/20_{gew.%} und D: 40/30/30_{gew.%}) dargestellt. Der durchlaufende Bereich der Kraft erreicht nicht die maximale Eindringtiefe. Es ergibt sich eine apparative Federkonstante von $k_{\text{app}} = 0,14 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, beziehungsweise $k_{\text{app}} = 0,17 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Bei B bis C entsprechen Farben den Höhenprofilen aus verschiedenen Messungen. Hierbei wurde wiederum auf eine Anpassung der theoretisch berechneten Eindringtiefe verzichtet, da sowohl die laterale Spannung als auch das Biegemodul bei den einzelnen Mischungen variiert.

5.3.4 Der Vergleich der Methode der Kraftindentskurven mit der Rastermethode

Zusammenfassend sind in Tabelle 5.3.4 die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten apparenten Federkonstanten dargestellt. Im Folgenden soll eine Begründung gesucht werden, welche die Diskrepanz zwischen den mit Hilfe der Kraftindentskurven bestimmten Federkonstanten (Kapitel 5.3.2) und denen, die durch

DODAB gew. %	DOTAP gew. %	DPPTE/DPhPC/Chol gew. %	R_{Pore} in nm	k $\frac{\text{N}}{\text{m}}$
-	-	60/0/40	90	0,005
-	-	60/40/0	90	0,033
-	-	80/20/0	90	0,016
-	-	60/20/20	90	0,011
-	-	60/20/20	200	0,09-0,013
-	-	40/30/30	90	0,014
-	100	-	33,5	0,021
-	100	-	90	0,015
100	-	-	90	0,0039
-	-	40/30/30	33,5	0,017
-	-	60/20/20	90	0,14
-	-	60/20/20	33,5	0,27
-	-	40/30/30	33,5	0,014
-	100	-	33,5	0,24

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der apparenten Federkonstanten k die sowohl durch die Indentskurven (oberer Teil) als auch mit der Rastermethode (unterer Teil) bestimmt wurden.

die Scanmethode (Kapitel 5.3.3) bestimmt wurden, erklärt. Zur Untersuchung der Abweichung wurde zunächst die vertikale Geschwindigkeitsabhängigkeit bei der Methoden überprüft. Dazu wurden jeweils 20 Kraftkurven bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten des *Cantilevers* des DPPTE/DPhPC/Chol-Gemisches (40/30/30) auf Poren mit einem Durchmesser von 180 nm aufgenommen (vergleiche auch Abbildung 5.16). In Abbildung 5.25 ist deutlich zu erkennen, dass keine Abhängigkeit in dem Geschwindigkeitsbereich zwischen $0 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ bis $18 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ be-

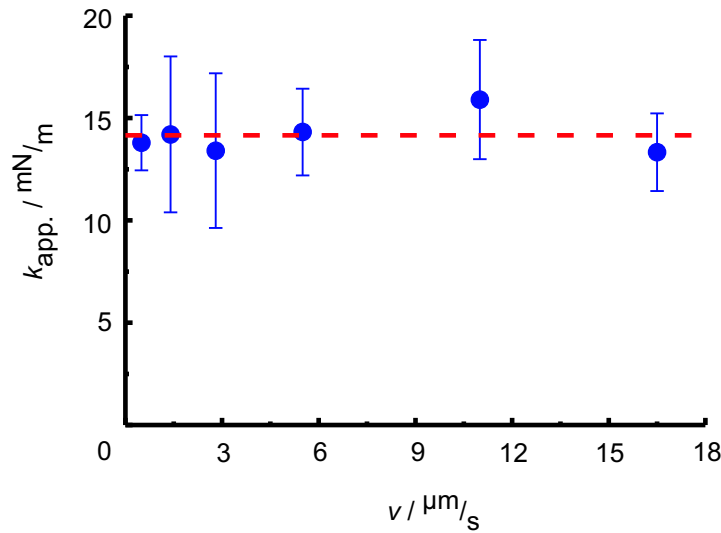


Abbildung 5.25: Steigung der einzelnen Kraftkurven eines DPPTE/DPhPC/Chol-Gemisches (40/30/30) in Abhängigkeit der Geschwindigkeit.

steht. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der in Abbildung 5.16 B in Abschnitt 5.3.2 gefundenen Unabhängigkeit der apparenten Federkonstanten von der vertikalen *Cantilever* Geschwindigkeit der Monosysteme (DODAB und DOTAP). Ferner ergibt sich eine mittlere apparente Federkonstante von $k = (0,014 \pm 0,009) \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Alle Kraftkurven, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, lagen in einem Geschwindigkeitsbereich von maximal $2 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$, so dass der Einfluss der Geschwindigkeit bei der Bestimmung der apparenten Federkonstanten durch Kraftindenterationskurven ausgeschlossen werden kann.

Zusätzlich ist die vertikale *Cantilever* Geschwindigkeit v_{ver} in Tabelle 5.3.4 während der Rastermethode mittels Gleichung 5.25 berechnet worden, um einen Vergleich zu der vertikalen Geschwindigkeit bei den Kraftindenterationsexperimenten zu ermöglichen. Diese ist aus der Scanrate f , der Größe des Bildes x sowie Porenradius R_{Pore} zu bestimmen:

$$v_{\text{ver}} = \frac{h_{\text{E}} \cdot \frac{x}{f}}{R_{\text{Pore}}} \quad (5.25)$$

Auch hier ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine Abhängigkeit der vertikalen Geschwindigkeit auszuschließen, da die Geschwindigkeiten der vertikalen Bewegung unter $16 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ liegen und damit im Bereich der verwendeten Geschwin-

digkeiten bei den Kraftkurven liegen. Bei einem $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ großen Scanfenster ($x = 4 \mu\text{m}$), einer verwendeten Scanrate von $f = (1 - 4)$ Hz und einem Porenradius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm beziehungsweise $R_{\text{Pore}} = 33,5$ nm ergeben sich die in Tabelle 5.3.4 angegebenen Werte. Obwohl dieser Effekt linear mit der Eindring-

f in [Hz]	R_{Pore} in [nm]	h_{E} in [nm]	v_{ver} in [$\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$]
1	33,5	30	3,5
1	90	180	8
2	33,5	30	7
2	90	180	16
3	33,5	30	10,7
3	90	180	24
4	33,5	30	14
4	90	180	32

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der Eindringgeschwindigkeiten des *Cantilevers* bei der Scanmethode.

tiefe und der Scangeschwindigkeit steigt, liegen die Geschwindigkeiten in Bereich von denen die sich aus Abbildung 5.25 und 5.16 B ergeben. Da laterale Kraft und vertikale Kraft während des Scanvorgangs mit dem AFM entkoppelt, sollte dieser Effekt nicht für die Diskrepanz der apparenten Federkonstanten der beiden verwendeten Methoden verantwortlich sein.

Bei genauer Betrachtung der Höhenprofile, in Abbildung 5.26 A und B sowie Abbildung 5.15 C, ist ein Symmetriebruch der Zylindersymmetrie deutlich zu erkennen. Das Höhenprofil entlang der *Fastscan-Axis* ist abhängig von *Trace* and *Retrace* (5.26 A und B, Pfeile). Aus diesem Grund wird vermutet, dass eine Dehnung/Stauchung der Membran vorliegen könnte und die Dehnung/Stauchung eine zusätzliche Rückstellkraft hervorruft (siehe Abbildung 5.26 C). Dieser zusätzliche Effekt liefert einen weiteren Summanden in Gleichung 2.3. Arnoldi et al. untersuchten den bakteriellen *Turgor* Druck und führten in ihren Rechnungen einen zusätzlichen Term der lateralen Dehnung ein: $\frac{K_{\text{A}}(A-A_0)^2}{2A_0}$ [Arn00]. Dieser zusätzliche Term entspricht der Notation der in Abschnitt 2.3 erwähnten Energie, die benötigt wird um eine Membran zu strecken.

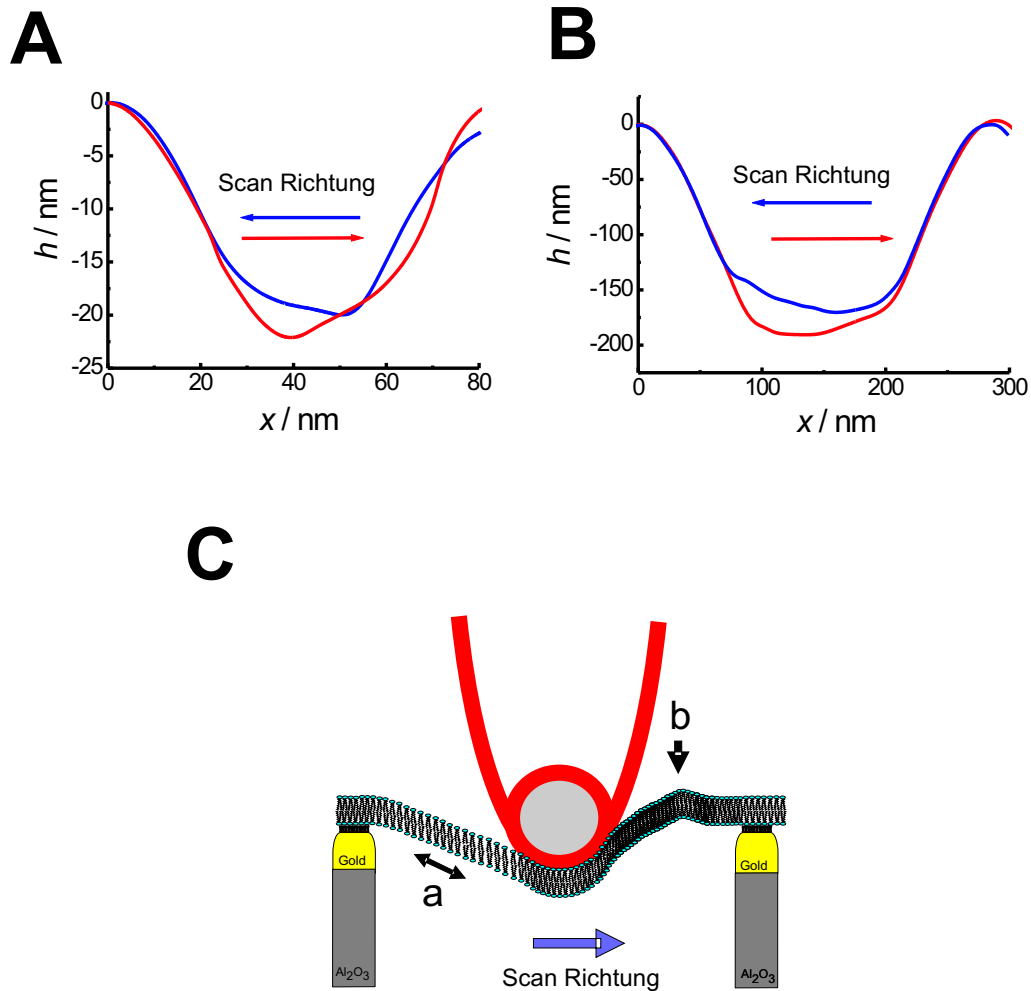


Abbildung 5.26: A: Darstellung der Höhenprofile von *Trace* und *Retrace* auf einer porenüberspannenden Membran auf Poren mit einem Radius von $R_{\text{Pore}} = 33$ nm. Die Pfeile markieren der Farbmarkierung entsprechend die Scanrichtung. B: Höhenprofil von einem porenüberspannenden *Bilayer* auf Poren mit einem mittleren Radius von $R_{\text{Pore}} = 90$ nm C: Schematische Darstellung vermuteten der Dehnung und Stauchung, die für die erhöhte apparente Federkonstante, bestimmt durch das Scanverfahren, verantwortlich sein könnte.

5.4 Native Membransysteme

Die Zellmembran spielt eine wesentliche Rolle bei der interzellulären und intrazellulären Wechselwirkung. Diese Aufgaben, die eine Zellmembran hat, erfordern innerhalb und außerhalb einen systematischen Aufbau der molekularen Struktur, wie zum Beispiel die Domänenbildung, Rezeptor- und Proteinanlagerung, Transportphänomene und Adhäsionsvorgänge. Darüber hinaus ist bei vielen biologischen Prozessen das mechanische Verhalten einer Zellmembran von großer Bedeutung. Bislang ist wenig über die laterale Organisation in einer Zellmembran und den Einfluss des Zytoskeletts auf die mechanischen Eigenschaften bekannt. Der Einsatz von Modellmembranen ermöglicht eine genau definierte Untersuchung unterschiedlicher Fragestellungen unter reduzierter Zahl der Komponenten einer Membran, jedoch ist ein direkter Transfer der Ergebnisse aus den Modellmembranen auf ein natives System mitunter schwierig bis unmöglich. Es können zum Beispiel Unstimmigkeiten im Bezug auf biologische Membranen bei dem Einbau von Proteinen (Faltung, Insertierung) oder das Fehlen von entscheidenden Komponenten (Lipide, Proteinen, etc.) bei der Modellierung von nativen Prozessen auftreten, die eine Beschreibung durch Modellmembranen unmöglich machen. Um diesen Transfer zu ermöglichen, können sogenannte Zellfragmente mittels verschiedener Verfahren auf planare Oberflächen präpariert werden [Zie98, Ner98, LeG95, DeP91]. Bislang existieren jedoch keine Untersuchungen zu porenüberspannenden *basalen* Membranen. Um solche freitragenden *basale* Membranfragmente zu untersuchen und zusätzlich die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse der mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden artifiziellen Membranen auf die *basalen* Zellmembranfragmente übertragen zu können, werden zunächst Zellfragmente auf Poren präpariert und im Folgenden auf den porösen Substraten die mechanischen Eigenschaften charakterisiert.

5.4.1 Herstellung von nativen Monoschicht-Membranen auf porösen Substraten

Vergleich der Decaptierungsmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wird versucht, eine mögliche Zugänglichkeit der Basalmembran, also der unteren Zellmembran, und deren Aktinkortex zu finden, um deren mechanischen Eigenschaften als freitragende Membran zu untersuchen. Dazu werden die Zellen direkt auf den porösen Substraten kultiviert. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, zum ersten Mal Zellmembranfragmente auf porösen Substraten zu untersuchen. Diese Zielsetzung wurde in Zusammenarbeit mit Christina Rommel und Priv.-Doz. Dr. J. Wegener aus dem Institut der Biochemie der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster durchgeführt worden. Die Zellpräparation erfolgte wie in Kapitel 4.3 beschrieben. Durch die Verwendung der isolierten Zellmembran auf porösen Substraten sind Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften wie Elastizität, Motilität und Reaktionen auf osmotische Änderung im Medium mittels oberflächensensitiven Verfahren möglich.

Zunächst werden in diesem Abschnitt zwei in der Literatur häufig verwendete Decaptierungsmethoden miteinander verglichen und im Folgenden erste Ergebnisse der mechanischen Eigenschaften von porenüberspannender nativer Membranen untersucht. Die Vor- und Nachteile der beiden Methoden sollen bezüglich der Indentationsexperimente diskutiert werden. Die in der Literatur diskutierten Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren beziehen sich bislang nur auf festkörpergestützte Membranen [Zie98, Ner98, LeG95, DeP91]. Zum Beispiel untersuchten Ziegler et al. festkörpergestützte basale Membran MDCK-II Zellen mittels konfokaler- und Rasterkraftmikroskopie und verwendeten das *Squirting-Lysing*-Protokoll. Sie waren sogar in der Lage einzelnen Aktinfilamente abzubilden, während Nermut et al. in ihrer Arbeit einen umfangreichen Überblick über bisherige Möglichkeiten, die Innenseite einer Basalmembran zu präparieren liefern. Le Grimellec et al. untersuchten ihrerseits die festkörper gestützte basale Membran der MDCK Zellen an Luft und *in vitro*.

Abbildung 5.27 A zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Topographie von decaptierten MDCK-II Zellen auf porösem Aluminat mit einem mittleren Porendurchmesser von 67 nm, die mittels des *Squirting-Lysing*-Protokolls in ungeeigneter Höhe (zu hoch) decaptiert worden sind (vergleiche Kapitel 4.3). Deutlich sind die Strukturen eines konfluenten Zelllayers zu sehen (gelber Pfeil).

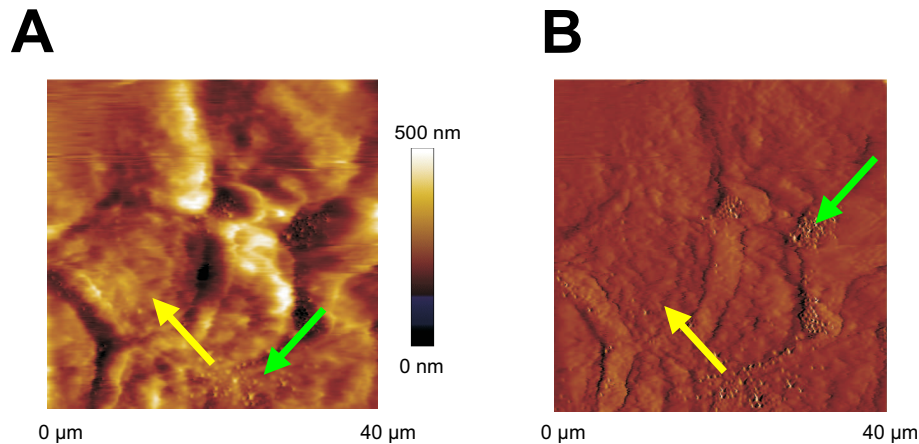


Abbildung 5.27: A: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Topographie von MDCK-II Zellen auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 67 nm. Die Zellen sind gemäß dem *Squirting-Lysing*-Protokolls decaptiert worden [Zie98]. B: Die *Deflection*-Information. Der gelbe Pfeil deutet den Bereich einer decaptierten Zellen an, während der grüne Pfeil auf die Poren deutet.

Der Pfeil deutet auf eine einzelne decaptierte Zelle mit verbleibendem Zytosol mit einer Größe von circa 20 mal 20 Mikrometern. In der unteren Bildhälfte ist die poröse Struktur durch kleine regelmäßige Punkte zu erkennen (grüner Pfeil). Vergleicht man die Höhenstruktur einer decaptierten Zelle von etwa zu 400 nm mit dem Wert aus der Literatur von circa 200 nm [Zie98], so ergibt sich, dass diese Zellen nicht in der richtigen Höhe decaptiert wurden und sich noch zu viel Zytosol auf der Basalmembran befindet. Es ist häufig der Fall, dass die Zellenfragmente die mittels des *Squirt-Lysing* Protokolls präpariert wurden, nicht in der richtigen Höhe decaptiert werden, da keine einheitliche Inkubationszeit für das Schwellen gefunden werden kann (Vergleiche Kapitel 4.3). Werden die Zellen zu lange inkubiert, so platzen diese auf, da der osmotische Druck so groß wird, dass die MDCK-II Zellen nicht mehr in der Lage sind den Druck auszugleichen. Bei bereits geplatzter Zellen kann keine Decaptierung erfolgen, da nur ein Riss oder ein „kleines Loch“ in der Zellmembran entsteht. Bei zu kurzer Inkubationszeit schwellen die MDCK-II Zellen nicht genug, so dass beim Applizieren lateraler Scherkräfte keine ausreichend große Angriffsfläche zum Decaptieren zur Verfügung steht.

Die Inkubationszeit variiert nicht nur zwischen den einzelnen Zelllinien und Zelltypen, sondern ist auch von Probe zu Probe und Zelle zu Zelle unterschiedlich.

Für die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Basalmembran ist jedoch sicherzustellen, dass nur die untere Membran auf dem porösen Substrat zurückbleibt und keine Bestandteile des Zytosols.

Zur weiteren Untersuchung werden mit dem CLSM Abbildungen zur Überprüfung der Decaptierungsergebnisse angefertigt. Abbildung 5.28 zeigt eine typische konfokale Aufnahme eines MDCK-II Zelllayers auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 67 nm. Die Zellen wurden in der Abbildung mittels des

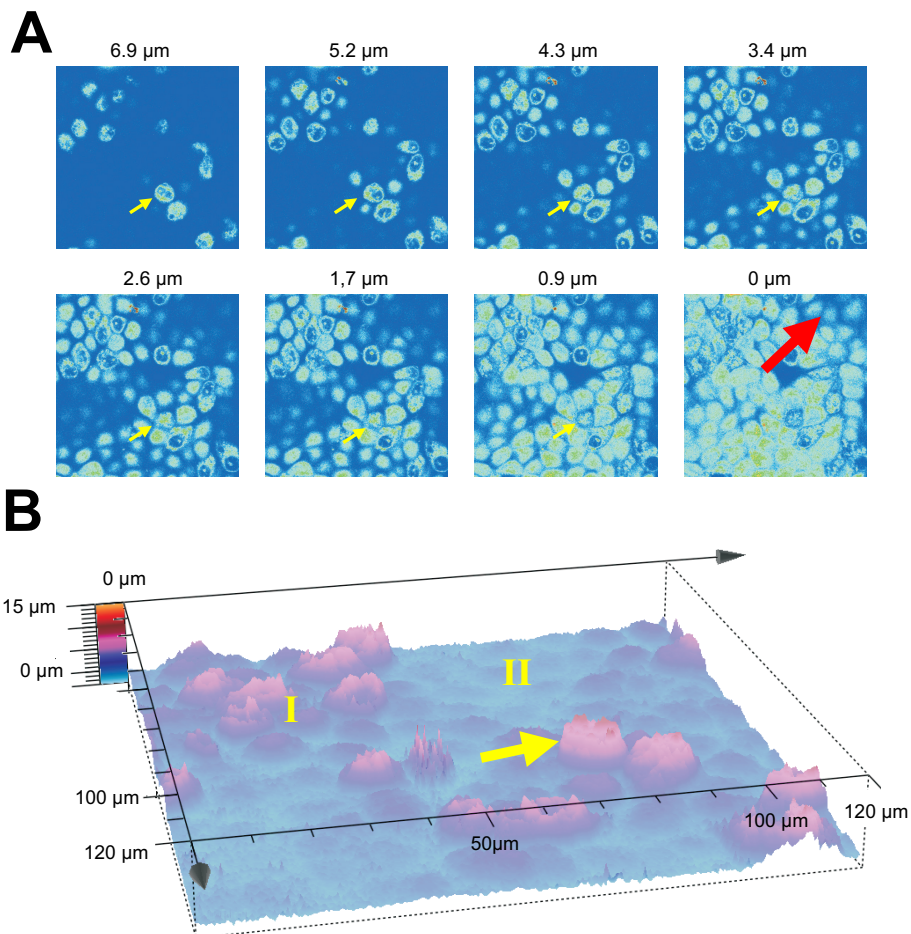


Abbildung 5.28: A: Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen eines mittels der *Squirting-Lysing* Protokolls decaptierter MDCK-II Zelllayers, der mit DiI angefärbt wurde. B: Dreidimensionale Zusammensetzung konfokaler Ebenenscans der in A abgebildeten MDCK-II Zellen. Der Pfeil markiert bei A und B dieselbe Zelle. Der rote Pfeil zeigt auf eine Stelle, bei der von einer optimalen Decaptierung ausgegangen werden kann.

Squirting-Lysing-Protokolls decaptiert und mit dem Farbstoff DiI angefärbt. In

Abbildung 5.28 A sind $x - y$ -Schnitte bei definierter Höhe dargestellt, während Abbildung 5.28 B die dreidimensionale Zusammensetzung aller Ebenenaufnahmen ist. Der gelbe Pfeil in der Abbildung dient zur Orientierung und markiert in den einzelnen Bildern immer dieselbe Zelle. Deutlich sind Bereiche mit intakten Zellen zu sehen, die eine Höhe von mehreren Mikrometern besitzen, bei denen die Decaptierung nicht erfolgreich war (beispielweise Bereich I in Abbildung 5.28 B). Es sind jedoch auch große homogene Bereiche mit Höhen im Bereich von weniger als einem Mikrometer erkennbar, bei denen die Zellen decaptiert wurden, zum Beispiel Bereich II in Abbildung 5.28 B. Trotz der relativ homogenen Präparation im Bereich von einigen Mikrometern sind die Höhen, die mittels der *Squirt-Lysing* Methode präparierten decaptierten Zellen fast immer zu hoch für Kraft-Indentationsexperimente.

Zusätzlich ist es wegen des großen Scanfensters möglich, mit Abbildung 5.28 eine Abschätzung des Decaptierungsgrads zu machen. Die sich ergebende Ausbeute der decaptierten Zellen, sofern die Decaptierung erfolgreich durchgeführt wurde, lag bei ungefähr 60 % bis 80 %. Das ist eine gute, im oberen Bereich liegende Übereinstimmung mit dem Wert von 20 % bis 80 % aus der Arbeit von Nermut [Ner98]. Für die Rasterkraftmikroskopie kann auf Grund des kleineren Scanfensters von maximal 100 Mikrometern von einer Ausbeute von 100 % ausgegangen werden beziehungsweise von 0 %, je nachdem, ob das Scanfenster im Bereich II oder I der Abbildung 5.28 liegt. Unbeachtet in dieser Aussage der Ausbeute ist jedoch die unzureichende Höhe der Decaptierung von Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode zur Decaptierung sich nur bedingt eignet, da sie in den seltensten Fällen ein für die im Rahmen dieser Arbeit zufriedenstellendes und reproduzierbares Ergebnis liefert. Wünschenswert wäre eine vollständige Decaptierung eines Zelllayers, so dass nur die Basalmembran mit dem Zytoskelett auf dem porösem Substrat verbleibt. Eine vollständige Decaptierung bis auf die Basalmembran ist nur in wenigen Fällen möglich und war für die Zielsetzung dieser Arbeit nicht zufriedenstellend. Zwar ist diese Methode experimentell nicht sehr aufwendig und erzeugt einen homogenen decaptierten Zellayer, jedoch zeigen sich in der Präparation grosse Variationsmöglichkeiten zum Schwellen der Zellen, die großen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die verschiedenen Möglichkeiten bei der Applikation der lateralen Scherkräfte (Winkel zum Substrat und Druck), Wahl des Mediums zum Schwellen der Zellen und der große Einfluss der Inkubationszeit während des Schwellens der Zellen gaben im Rahmen dieser Arbeit den Anlass, ein alternatives Protokoll zu benutzen.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode zur Verbesserung der Decaptierung untersucht: das *Sandwich-Cleaving* Verfahren. Die Veröffentlichung von Le Grimellec et al. war eine der ersten, die die basolaterale Zellmembran mittels rasterkraftmikroskopischen Methoden untersuchten, die durch das *Sandwich-Cleaving* decaptiert wurden [LeG95]. Dabei wird der Einfluss der Inkubationszeit umgangen, denn bei diesem Verfahren erfolgt das Decaptieren durch „Aufkleben“ eines mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckglases, das nach Andrücken mit hohem Druck möglichst gleichmäßig wieder entfernt wird. Durch die Anbindung der Oberseite der Zellmembran an das Deckglas werden die MDCK-II Zellen bei dem Separationsprozess zerteilt. Die Zellen brechen in willkürlicher Position.

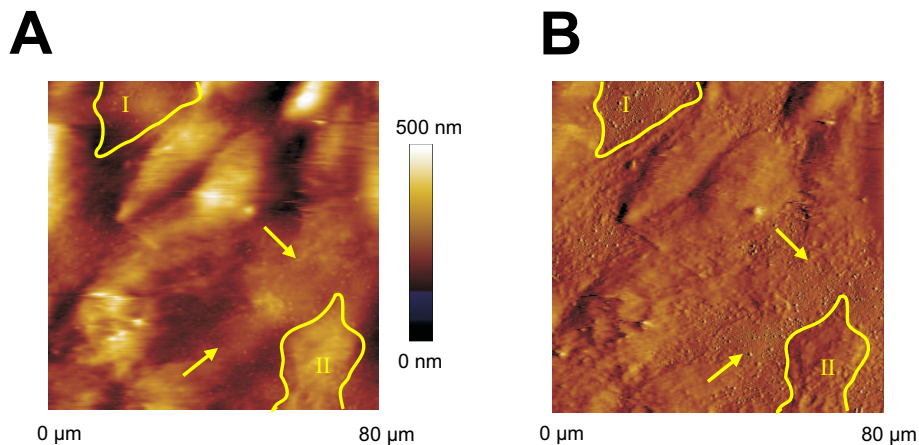


Abbildung 5.29: A: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Topographie von nicht fixierten decaptierten MDCK-II Zellen auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 67 nm. Die Zellen wurden nach dem Verfahren von Le Grimellec et al. (*Sandwich-Cleaving*) decaptiert [LeG95]. B: Die zu Abbildung C gehörige *Deflection*-Information.

Teilweise bleiben die Zellen sogar intakt am porösen Substrat oder am Deckglas zurück. Dies erzeugt, dargestellt in Abbildung 5.29 A und B, eine völlig inhomogene Schicht von fehlenden (Bereich I), intakten (Bereich II) oder decaptierten Zellen (Pfeile).

Die Höheninformation gibt Aufschluss, an welcher Position die Zellen decaptiert wurden. Ist Material mit einer Höhe von mehreren Mikrometern sichtbar, wird dies als ein Misserfolg gewertet. Geringe Höhen und die geordnete Punkte-Struktur deuten auf eine vollständige Decaptierung hin. Eine grobe Abschätzung der Ausbeute ergibt einen Wert um 30 %, das heißt, dass nur jede dritte Zelle mit

der Basalmembran und ohne Zytosol auf dem porösen Substrat verbleibt. Dieser Wert liegt wiederum in dem von Nermut angegebenen Bereich [Ner98] und ist für die Durchführung erster Experimente zum mechanischen Verhalten von nativen Membranen als zufriedenstellend anzusehen, da eine vollständig decaptierte Zelle bereits über 500 Poren bedeckt.

Beide verwendeten Verfahren liefern nicht nur unterschiedliche Quantitäten an decaptierten Zellen, sondern auch in der Qualität der Decaptierung. Das *Squirting-Lysing*-Verfahren besitzt eine grössere Quantität an decaptierten Zellen als das *Sandwich-Cleaving*-Verfahren. Jedoch liefert bezüglich der Qualität der Decaptierung von Zellen das verwendete *Sandwich-Cleaving*-Verfahren ein besseres Ergebnis. Genauer betrachtet, liefert das *Squirting-Lysing*-Verfahren, welches mit einem experimentell geringeren Aufwand als das *Sandwich-Cleaving*-Verfahren durchzuführen ist, einen in gleicher Position homogenen, decaptierten Zelllayer, jedoch meist in ungeeigneter Höhe. Das *Sandwich-Cleaving*-Verfahren, welches die Zellen willkürlicher Höhe zerteilt, erzielt wesentlich häufiger die gewünschte Höhe einer Basalmembran. Es ist unbedeutend wie die gesamte Topographie, die Verteilung und die Ausbeute der decaptierten Zellen aussieht, solange eine einzige einzelne Zelle ohne verbleibendes Zytosol decaptiert ist. So ist wegen der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften einer Basalmembran das *Sandwich-Cleaving*-Verfahren dem *Squirting-Lysing* vorzuziehen, obwohl letzteres ein homogeneres Ergebnis liefern würde.

5.4.2 Native porenüberspannende Membranen

Le Grimmelc, der in seiner Arbeit Zellen decaptierte, konnte nur rasterkraftmikroskopische Untersuchungen mit geringen Auflösung durchzuführen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es zusätzlich gelungen, hochauflösende topographische Aufnahmen und erste Analysen des mechanischen Verhaltens von nativen porenüberspannenden Zellmembranen zu untersuchen [LeG95].

Abbildung 5.30 A zeigt die Topographie einer decaptierten MDCK-II Zelle auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 67 nm⁸. Der subkonfluente MDCK-II Zelllayer wurde zuvor mit Glutaraldehyd fixiert. Deutlich ist eine decaptierte Zelle in der Mitte zu sehen. Ferner ziehen sich feine „Linien“ durch die Zelle, die sich als Aktinfilamente identifizieren lassen (Pfeil in Abbildung 5.30). Ein Aktinfilament besitzt eine Höhe von etwa 40 bis 60 nm, die Höhe der Ba-

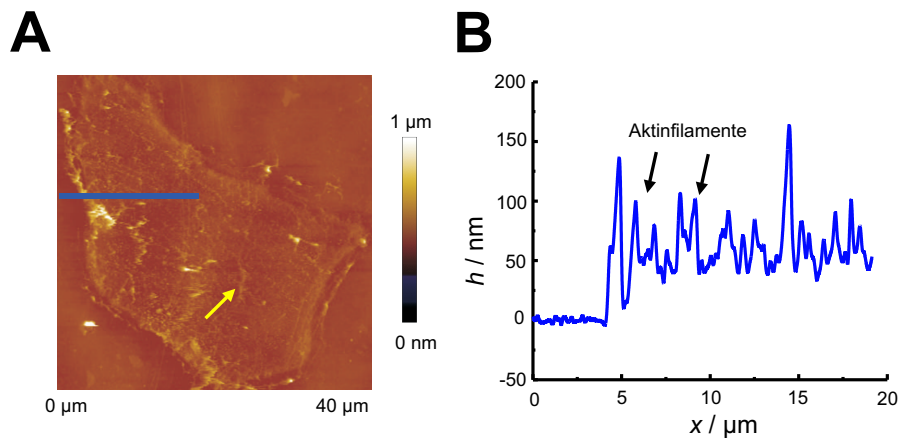


Abbildung 5.30: A: Rasterkraftmikroskopische Topographie-Aufnahme einer mit Glutaraldehyd fixierten MDCK-II Zelle auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 67 nm, gemessen im *Contact* Modus. Der gelbe Pfeil deutet auf ein Aktinfilament. B: Höhenprofil entlang der in Abbildung A gezeigten Linie.

salmembran beträgt 30 bis 40 nm. Das stimmt gut mit den festkörpergestützten, nativen Membranen von Ziegler et al. überein [Zie98]. Somit verbleiben nach dem Decaptieren der Zelle im Idealfall nur die extrazelluläre Matrix, die basolaterale Membran mit ihren Proteinen und das Zytoskelett auf dem porösen Substrat.

⁸Bei einem Scanfenster von 45 µm und einer Auflösung von maximal 512 Pixel sind die einzelnen Poren nicht abbildbar.

Die einzelnen kleineren „*Spikes*“ im Höhenprofil 5.30 B entsprechen den Aktinfilamenten des Zytoskeletts, wie ein Vergleich von Abbildung 2.3 mit der Literatur ergibt [Zie98, LeG95, Alb02]. Die Höhe der Filamente ist sehr heterogen in einer Zelle [Arc97, Alb02]. Zum Beispiel sind kleinere Aktin-Filamente etwa 7 bis 9 nm hoch [Zie98]. So können in der Höhenanalyse 5.30 B die „*Spikes*“ mit einer Höhe von etwa 6 bis 10 nm als Aktinfilamente zugeordnet werden. In der Literatur angegebene elektronenmikroskopische Höheninformation der Aktin-Filamente korrespondieren mit den hier gefundenen Ergebnissen sehr gut [Arc97, Ner98, Alb02]. Eine Auswertung der nativen Membranen wird in Analogie zu den artifiziellen Membranen in dem Kapitel 5.3.3 durchgeführt. Hierbei werden Höhenprofile durch ausgewählte Poren analysiert, um das Eindringverhalten bei unterschiedlichen Kräften zu untersuchen.

In Abbildung 5.31 A bis C sind rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Topographie eines decaptierten subkonfluenten MDCK-II Zelllayers, kultiviert auf porösem Aluminium mit einem Porendurchmesser von 400 nm, dargestellt. Alle Abbildungen wurden an unfixierten Zellenfragmenten im *Contact* Modus abgerastert und mittels der *Sandwich-Cleaving*-Technik decaptiert. Zunächst wurde die Probe mit einer Kraft von 1,8 nN *gescannt* (Abbildung 5.31 A). Es grenzen sich deutlich zwei Bereiche auf dem porösen Substrat voneinander ab. Der Bereich I liegt außerhalb einer Zelle, während der Bereich II das Innere der decaptierten Zelle markiert. Der gelbe große Pfeil markiert ein Aktin-Filament, das sich in allen drei Aufnahmen wiederfindet. Für die folgende Aufnahme (Abbildung 5.31 B) wurde die Kraft auf 7,2 nN erhöht, um für Abbildung C wieder auf 0,9 nN reduziert zu werden. Bei hoher Kraft lassen sich die Membranfragmente in die Poren drücken, ähnlich wie bei Modellmembranen. Bei anschließendem *Scannen* mit niedriger Kraft relaxieren die Membranfragmente wieder und die Topographie ähnelt der bei anfänglicher, verhältnismäßig niedriger Kraft. Die verschiedenen Höhenprofile zeigen beispielhaft die Analyse einer mit Zellmembran überspannten Pore (weißer kleiner Pfeil in den Abbildungen 5.31 A bis C). Die gestrichelte Linie gibt die Analyse bei einer Kraft von 1,8 nN, die durchgezogene Linie die bei einer Kraft von 7,2 nN und die gepunktete Linie die bei einer Kraft von 0,9 nN an. Die Eindringtiefen bei Kräften von 1,8 nN und 0,9 nN sind innerhalb der Messunsicherheit gleich. Bei hoher Kraft (7,2 nN) wird die Membran etwa 80 nm und bei niedriger Kraft (1,8 nN und 0,9 nN) jeweils um circa 45 nm in die Poren gedrückt. Bei einem Porendurchmesser von 400 nm ist das Erreichen der maximalen Eindringtiefe bei den gemessenen Eindringtiefen auszuschließen

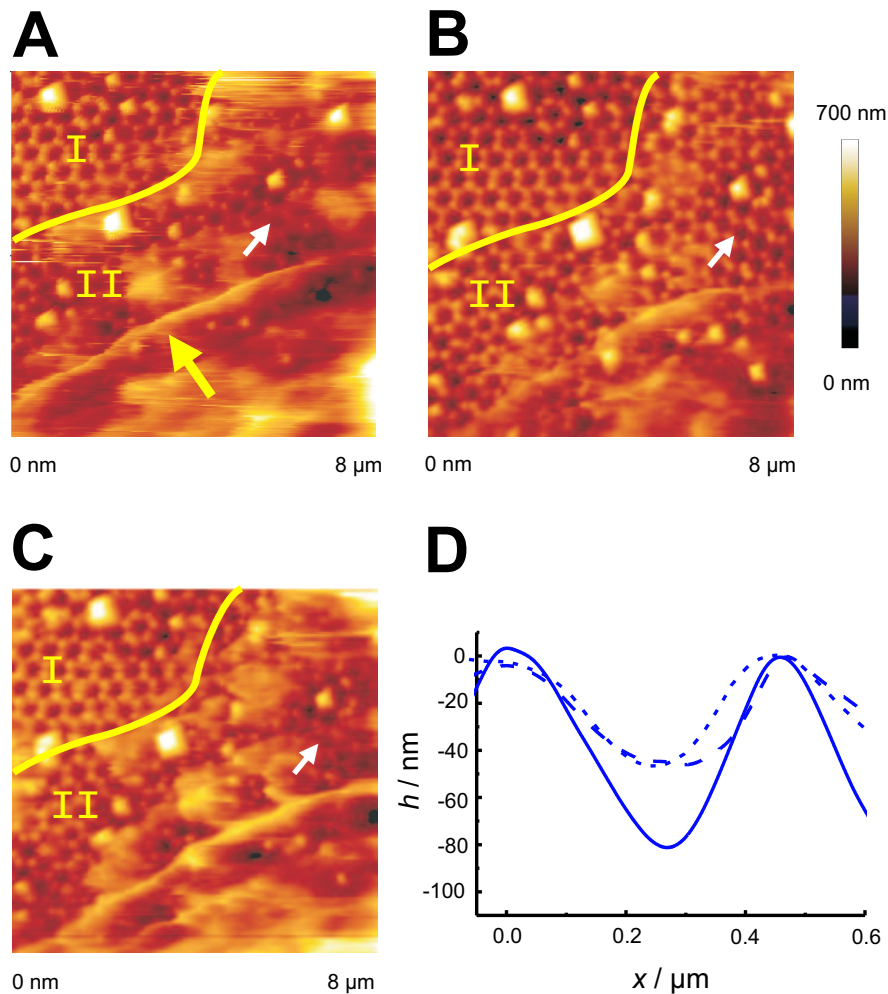


Abbildung 5.31: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Topographie von MDCK-II Zellen auf porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 400 nm bei unterschiedlichen Kräften. Bild A ist bei einer Kraft von 1,8 nN aufgenommen. Nach dem Abrastern bei einer Kraft von 7,2 nN (Bild B) wurde Bild C bei einer Kraft von 0,9 nN aufgenommen. Bereich I befindet sich außerhalb und Bereich II innerhalb der Zelle, während der weiße Pfeil ein Zytosklett-Filament markiert. D: Die Profilanalyse der mit dem weißen Pfeil gekennzeichneten Pore aus den Abbildungen A bis C. Dabei entspricht die gestrichelte Linie einer Kraft von 1,8 nN, die durchgezogene Linie einer von 7,2 nN und die gepunktete Linie einer Kraft von 0,9 nN.

(vergleiche Gleichung 5.1).

Die große Heterogenität der basolateralen Membran verhindert eine systematische Analyse aller Poren, wie sie zum Beispiel in Abbildung 5.22 durchgeführt wurde. Eine Analyse aller Poren ist nicht möglich, da das Zytoskelett (Abbildung 5.31 A gelber großer Pfeil) zusätzlich in der nativen Membran verankert ist. Somit ist keine konstante Eindringtiefe wie in Kapitel 5.3.3 bestimmbar, da eine starke Abhängigkeit vom Ort der mit Zellmembran überspannten Pore existiert und sich der Qualität der Decaptierung auf das verbleibende Zytosol auswirkt. Dabei hat nicht nur das Zytoskelett einen Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften, sondern auch die Qualität der Decaptierung. So besteht momentan noch keine geeignete Möglichkeit, das Ergebnis der Eindringtiefen mit den in Kapitel 5.2 entwickelten theoretischen Eindringtiefen in Abhängigkeit der Kraft zu vergleichen. Dazu müsste die Bindung an das relativ starre Zytoskelett in der theoretischen Berechnung in Abhängigkeit der Orte zusätzlich berücksichtigt werden. Dies ist bislang noch nicht in den gängigen Theorien berücksichtigt worden und beinhaltet einen extrem großen Rechenaufwand (vergleiche Merkel et al. [Mer00]). Es bleibt weiterhin die Frage bestehen, in welchem Maße die Bindung der Membran an das Zytoskelett Einfluss auf die Abbildung mit dem Rasterkraftmikroskop und dem Indentationsverhalten nimmt.

Abschließend ist zu sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, die MDCK-II Zellen durch verschiedene Verfahren zu decaptieren und die Ergebnisse zu vergleichen. Die Protokolle müssen weiter optimiert werden, um eine basale porenüberspannende Membran zu gewährleisten. Ferner zerreißen die nativen Membranen auf den Poren nicht bei Indentation der AFM-Spitze und verhalten sich wie die porenüberspannenden Modellmembranen. Diese Ergebnisse geben eine weitere Berechtigung das Modellsystem der porenüberspannenden Membranen zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von biologischen Membranen zu verwenden.

5.5 Elastisches Verhalten von MDCK-II Zellen unter osmotischem Stress

Zellmembranen sind permeabel für Wasser, bilden jedoch für Metabolite und Ionen eine Barriere. Zellen stehen so unter einem sensiblen osmotischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung. Änderungen in der Osmolarität der Umgebung können dieses Gleichgewicht empfindlich stören und zu einem Wasseraustausch mit dem Extrazellulärraum führen. Durch eine De- und Hydratisierung können die Zellen ihr Volumen reduzieren oder vergrößern. Die MDCK-II Zellen sind als Nierenzellen in der Lage, auf osmotischen Druck zu reagieren.

In diesem Abschnitt soll das mechanische Verhalten in Bezug auf die De- und Hydratisierung unter extrazellulärem osmotischen Druck untersucht werden, indem konfluente Zellschichten hyper- und hypoosmolaren Medien ausgesetzt werden, die in Folge des Wasseraustausch eine Veränderung des Volumens und somit auch der mechanischen Eigenschaften der Zellen erfahren. Der Hintergrund zu dieser Untersuchung entwickelte sich aus den Experimenten von Periasamy et al. und der Arbeit von Wegener, die zum einen Messungen der zytoplasmischen Viskosität an adhärennten MDCK-II Zellen und zum anderen mikrogravimetrische Untersuchungen durchführten [Per92, Weg98].

Zur Untersuchung dieser Eigenschaften werden MDCK-II Monolayer auf einer Petrischale kultiviert und unter verschiedenen osmotischen Stresszuständen mit dem CLSM untersucht (Abbildung 5.32 A)⁹. Um einen unkontrollierten Fluss des verwendeten Farbstoffs FITC-Dextran (0,5 mM, 4 kDa) in die Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen zunächst dem hypo-, hyper-, beziehungsweise isotonen Puffer ohne Farbstoff ausgesetzt, der die Zellen anschwellen, beziehungsweise schrumpfen lässt. Erst später wurde dieser gegen einen Farbstoff enthaltenden Puffer ausgetauscht, um eine unkontrollierte Diffusion zu vermeiden.

In Abbildung 5.32 A sind konfluente im isotonen Zustand befindliche MDCK-II Zellen in einer dreidimensionalen Abbildung, mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie aufgenommen, dargestellt. Nach Erhöhung der Sucrose-Konzentration im Puffer auf 500 mM ist ein Zusammenschrumpfen des Zellmonolayers deutlich sichtbar (Abbildung 5.32 B). In der dreidimensionalen

⁹Dabei wurde HEPES Puffer (75 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 20 mM HEPES) verwendet, bei dem die Osmolarität durch unterschiedliche Sucrosekonzentrationen (0 mM bis 650 mM) eingestellt wurde.

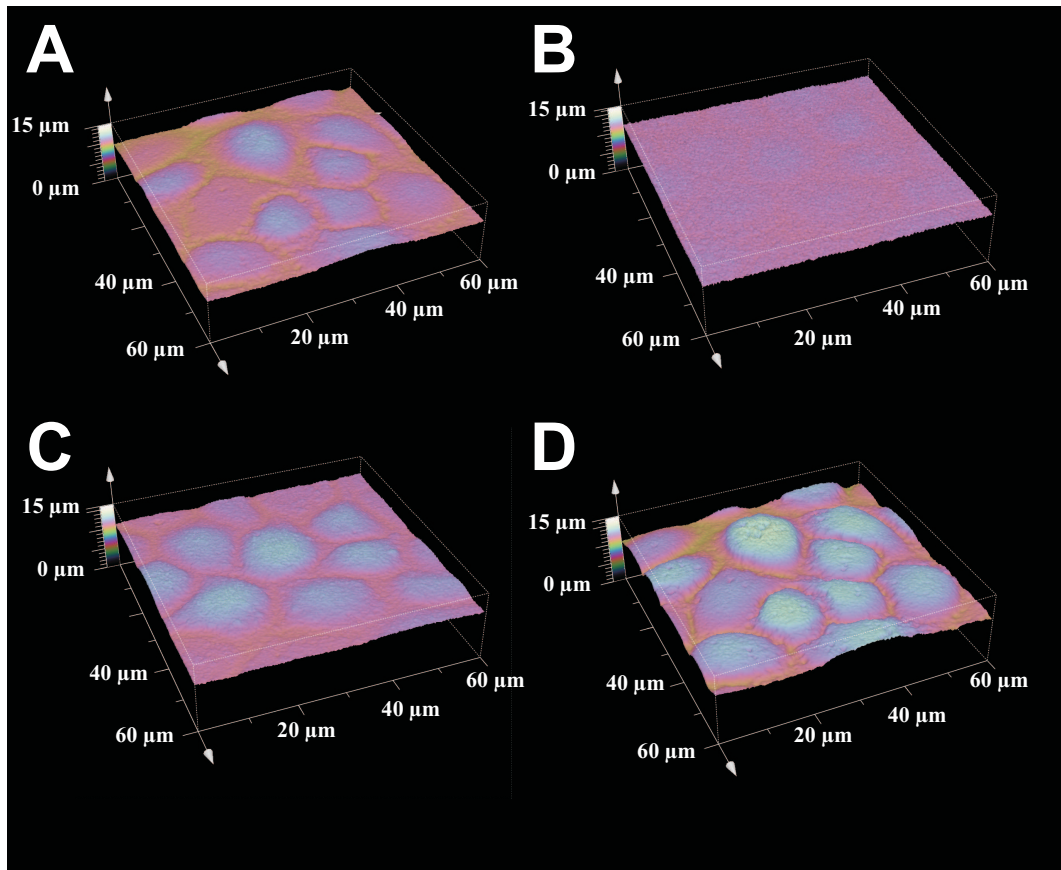


Abbildung 5.32: Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von MDCK-II Zellen bei unterschiedlichen Sucrose-Konzentrationen. In allen vier Aufnahmen ist immer der gleiche $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ Ausschnitt mit einer z-Skala von $15\ \mu\text{m}$ dargestellt.

Darstellung der Fluoreszenz Aufnahmen ist eine Verringerung der Höhe von etwa von $6\ \mu\text{m}$ auf $4\ \mu\text{m}$ zu erkennen. Nach der Wiederherstellung des isotonischen Zustandes (Abbildung 5.32 C) schwellen die Zellen wieder auf die vorherige Höhe von $6\ \mu\text{m}$ an. In Abbildung 5.32 D ist der Zellschicht in einem hypertonem Puffer dargestellt. Deutlich zeigt sich das Anschwellen der Zellen auf eine Höhe von etwa $8\ \mu\text{m}$. Da die Zellmembran eine Barriere für die Sucrose darstellt, ist der Wasseraustausch die einzige Möglichkeit für die Zellen, den osmotischen Druck auszugleichen. Die Volumenänderung ist somit auf eine Diffusion von Wasser durch die Zellmembran zurückzuführen. In der Literatur finden sich viele Arbeiten über die Volumenänderung, jedoch untersuchten nur die wenigsten dabei auch das mechanische Verhalten der Zellen [Sch98, Beh00, Mar01]. Zum

Beispiel ließen Schneider et al. MDCK-F Zellen mittels *Charybdotoxin* (CTX) anschwellen und mittels Ionomycin schrumpfen [Sch98]. Dabei ermittelten sie die Änderung der Höhe mittels der Rasterkraftmikroskopie.

Im Folgenden werden die Zellen auf mechanische Eigenschaften in Stadien von isotonen, hypertonen und hypotonen Zuständen mittels des Rasterkraftmikroskops untersucht, wobei unter anderem auch die speziell angefertigten sphärischen *Cantilever*-Spitzen verwendet wurden. Abbildung 5.33 A zeigt beispielhaft eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer verwendeten sphärischen *Cantilever*-Spitze zusammen mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines konischen *Cantilevers*. Die Polystyrolkugeln (Si_2 , Durchmesser

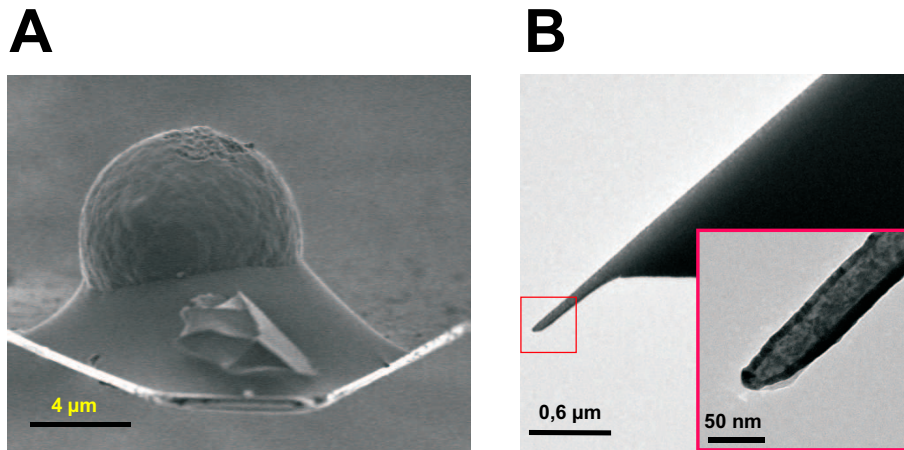


Abbildung 5.33: A: Elektronenmikroskopische Aufnahme (SEM) eines benutzten Kugel-*Cantilevers* mit einem Kugeldurchmesser von $9 \mu\text{m}$, hergestellt nach der Methode von Heim et al. [Hei99] basierend auf einem Olympus PSA TR-400. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme (TEM) eines Olympus BL-RC150VB-C1 *Cantilevers*. Beide *Cantilever* sind zuvor bei Experimenten zur Untersuchung des elastischen Verhaltens von MDCK-II Zellen unter osmotischem Stress zum Einsatz gekommen.

$9 \mu\text{m}$) an den sphärischen *Cantilever*-Spitzen wurden analog zu dem Verfahren von Heim et al. mit Heißkleber angebracht [Hei99]. Die konische Spitze des *Cantilevers* in der Vergrößerung von Abbildung 5.33 B hat einen Öffnungswinkel von $\alpha = (18 \pm 4)^\circ$. Durch die Verwendung verschiedenartiger *Cantilever*-Spitzen können die Vorteile der jeweiligen ausgenutzt und die jeweils sich ergebenden Nachteile minimiert werden. Während es nicht möglich ist, mit einer sphärischen Spitze mit einem Durchmesser von $9 \mu\text{m}$ einen Zelllayer abzubilden und somit lokal aufgelöste Elastizitätsmodule zu bestimmen, ist die Bestimmung des

Winkels α der *Cantilever*-Spitzen mit einer großen Ungenauigkeit behaftet. Der konfluente MDCK-II Zelllayer wurde zunächst auf einer Petrischale kultiviert und wurden zur Vorbereitung für die Untersuchung mit dem Rasterkraftmikroskop mit PBS⁺⁺ gespült. Für die einzelnen osmolaren Zustände wurde der Puffer mit entsprechender Menge Sucrose versehen. Nach ausreichender Inkubation wurden Kraftkurven auf dem Zelllayer aufgenommen, der sich jeweils in den einzelnen osmotischen Zustände befunden hat. Beispielhaft sind in Abbildung 5.34 A Kraftkurven dargestellt, die mittels einer sphärischen *Cantilever*-Spitze bei verschiedenen osmotischen Zuständen aufgenommen wurden. Dabei bezeichnet die rote Linie die Kraftkurve, die bei isotonischen Bedingungen aufgenommen wurde. Die Kraftkurven, bei der die Sucrose-Konzentration schrittweise erhöht wurde, sind als blaue und grüne Kurven und die Kraftkurve bei hypotonen Bedingungen als schwarze Kurve dargestellt. Die Steifigkeit des Zellmonolayers, die als Ableitung der Kraftindentationskurve im Kontaktbereich definiert ist [Hoh94], erhöht sich deutlich mit steigender Sucrose-Konzentration. Ohne Sucrosezusatz im Puffer ist eine sehr geringe Steigung zu erkennen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zellen mit steigender Sucrose-Konzentration nicht nur ihre Höhe verringern, sondern zudem das *Youngsche* Modul zunimmt. Dies wird im Folgenden genauer untersucht. Zuvor wird jedoch auf die Geschwindigkeitsabhängigkeit der Kraftkurven eingegangen.

Zunächst ist zu beachten, dass bei einem *Cantilever* mit einer Kugel als Spitze zusätzlich hydrodynamische Effekte bei zu großen vertikalen Geschwindigkeiten auftreten können. Die hydrodynamischen Effekte wirken als eine zusätzliche Rückstellkraft auf den *Cantilever*: $F_{\text{Eff}} = F + F_{\text{Hydro}}$ mit $F_{\text{Hydro}} = \frac{6\pi v \eta R_{\text{Tip}}^2}{h}$, wobei a der Radius der Kugel, η die Viskosität, v die Geschwindigkeit und h die Eindringtiefe, beziehungsweise der Abstand ist [Alc02, Jan05]. Da im Rahmen dieser Arbeit *Cantilever* mit einer Kugel verwendet wurden, ist der Einfluss dieses Effektes zu quantifizieren. Dazu wurden Kraftkurven auf reinem Substrat in einem isotonischen Puffer aufgenommen und die Funktion der Hydrodynamik ermittelt. Bei einem Radius $R_{\text{Tip}} = 4,5 \mu\text{m}$, einer Geschwindigkeit von circa $7 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ und den Werten für die Viskosität aus Tabelle 5.5 stimmt die berechnete hydrodynamische Kurve mit der gemessenen sehr gut überein (nicht gezeigt). Es zeigt sich, dass die hydrodynamischen Effekte keine Rolle bei der Berechnung der Elastizitätsmodule spielen und vernachlässigbar klein sind. Des Weiteren kann so über die Hydrodynamik der Punkt des Kontaktes von Spitze und Probe bestimmt werden. So ist neben der Nullpunktsbestimmung gewährleistet,

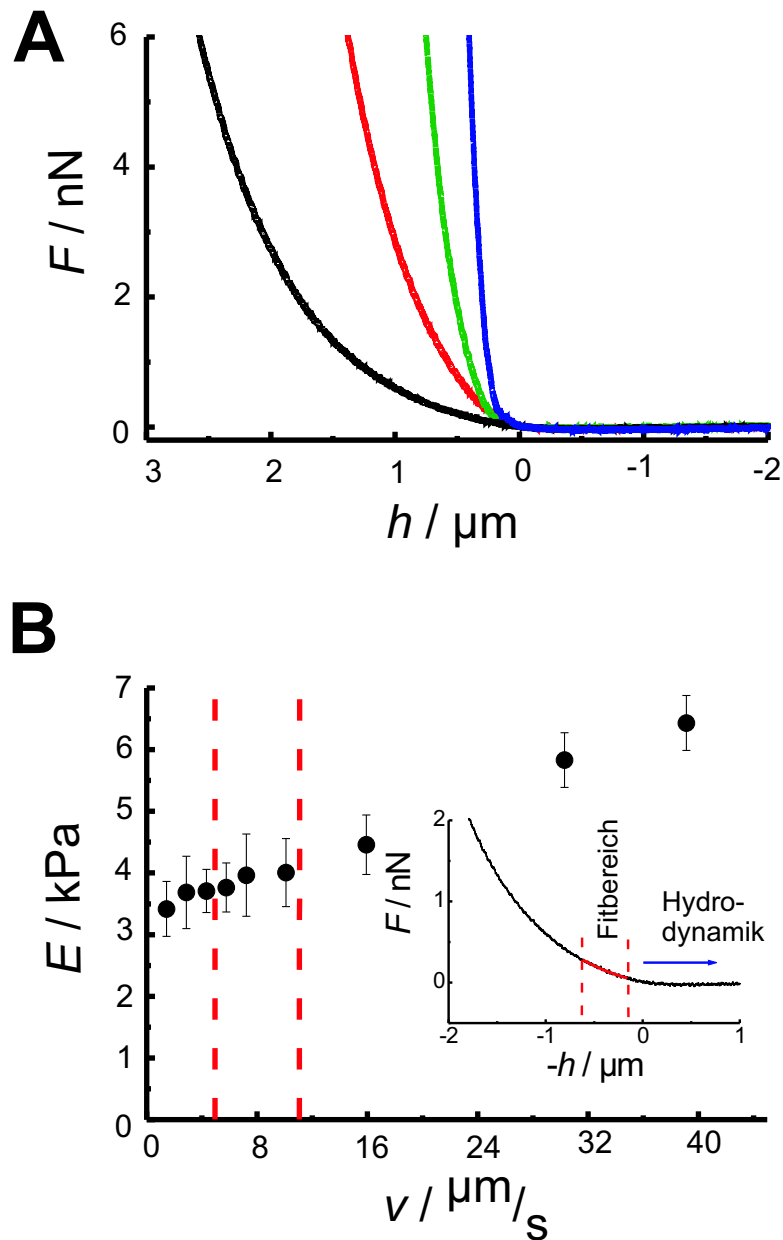


Abbildung 5.34: A: Kraft-Indetationskurven in Abhängigkeit der Sucrose Konzentration. Die schwarze Linie entspricht einer 0,17 osmol/kg Sucrose-Konzentration (hyperton), die rote einer von 0,33 osmol/kg (isoton), die grüne Linie einer von 0,67 osmol/kg (hyperton) und die durchgezogene blaue Linie einer von 0,93 osmol/kg (hyperton). B: Die Abhängigkeit des Elastizitätsmoduls von der Geschwindigkeit der z-Bewegung des *Cantilevers*. In dem rot gekennzeichneten Geschwindigkeitsbereich wurde für die Geschwindigkeit der Kraftindetationskurven gewählt. Das Inset zeigt den Bereich, in dem die Hydrodynamik vor dem Kontakt mit der Probe wirkt und den Bereich, in dem das *Youngsche* Modul berechnet wird.

Konzentration von Sucrose in [mM]	Zustand	Osmolaritäten in [$\frac{\text{osmol}}{\text{kg}}$]	Viskosität in [$\text{Pa}\cdot\text{s}$] $\cdot 10^{-3}$
0	hypoton	0,17	1
150	isoton	0,33	1,15
250	hyperton	0,49	1,25
350	hyperton	0,67	1,43
650	hyperton	0,93	1,94

Tabelle 5.6: Die Viskosität η in Abhängigkeit der Sucrose-Konzentration im Puffer, beziehungsweise der Osmolaritäten.

dass hydrodynamische Effekte bei der Berechnung der *Youngschen* Module ausgeschlossen werden können (vergleiche Abbildung 5.34 Inset).

Wie aus den Arbeiten von A-Hassan et al. und Hoh et al. hervorgeht, hängt das *Youngsche* Modul von der Geschwindigkeit v ab, mit der sich der *Cantilever* auf den Monolayer zubewegt [Hoh94, Aha98]. Zum Beispiel erhöht sich bei steigenden vertikalen Geschwindigkeiten die Steifigkeit der Zellen auf Grund einer in der Hydrodynamik resultierenden zusätzlichen Rückstellkraft. Die Abhängigkeit des *Youngschen* Moduls von der Geschwindigkeit, aufgenommen mit einem sphärischen *Cantilever* unter isotonischen Bedingungen, ist in Abbildung 5.34 B gezeigt. Dabei wurde das *Youngsche* Modul mittels Gleichung 3.13 berechnet. Für den Spitzenradius wurde ein Wert von $R_{\text{Tip}} = 4,5 \mu\text{m}$, für das Poisson Verhältnis einer von $\nu = 0,5$ angenommen [Dom98, Aha98, Alm04]. Es ist zu beachten, dass das Poisson Verhältnis einer Zelle nicht über die gesamte Fläche konstant sein muss und bislang noch nicht exakt bestimmt wurde. Ein Vorteil einer sphärischen Spitze liegt in der Mittellung des Poisson Verhältnisses über eine große Fläche der Zelle, was zu einer Minimierung dieser Unbestimmtheit führt und somit die Annahme eines konstanten Poisson Verhältnisses zulässt [Aha98].

Aus Abbildung 5.34 B ist deutlich erkennbar, dass die Berechnung der *Youngschen* Module bis zu einer Geschwindigkeit von $15 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ innerhalb der Standardabweichung liegt¹⁰. Hoh et al. geben in ihren Arbeiten eine maximale Geschwindigkeit von $4,6 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ an, während A-Hassan et al. reproduzierbare Kraft-

¹⁰Jeder Datenpunkt enthält dabei über 70 Kraftindentskurven aus verschiedenen Proben mit MDCK-II Monolayern.

indentationskurven in einem Bereich von 5 - 25 $\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ erhielten [Hoh94, Aha98]. Hategan et al. hingegen erzielten reproduzierbare Kraftkurven bei einer Geschwindigkeit von 10 - 20 $\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. In Bezug auf die oben genannten Werte wurden alle Kraftindentationskurven mit Geschwindigkeiten von 5 bis 10 $\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ aufgenommen, um eine bestmögliche Reproduzierbarkeit in der Berechnung des *Youngschen* Moduls zu gewährleisten.

Des Weiteren hängt das *Youngsche* Modul von der Eindringtiefe ab, in der die Gleichung 3.13 den Kraftindentationskurven angepasst wird [Hoh94, Dom98, Hat03]. Für eine reproduzierbare Bestimmung der *Youngschen* Module wurde aus diesem Grunde nur in Bereichen von Eindringtiefen bis etwa 1 μm die Funktion 3.13 den Daten angepasst, da dort die berechneten *Youngschen* Module unabhängig von der Eindringtiefe anzusehen sind.

Unter Berücksichtigung obiger Effekte sind in Abbildung 5.35 A und B die *Youngschen* Module dargestellt, die unter verschiedenen osmotischen Bedingungen mit konischen beziehungsweise sphärischen *Cantilevern* aufgenommen wurden. In Abbildung 5.35 A sind die *Youngschen* Module unter verschiedenen osmotischen Bedingungen, die mittels einer sphärischen Spitze bestimmt wurden, dargestellt. Der Fehler des *Youngschen* Moduls wird dabei aus der Standardabweichung von über 70 der mittels Gleichung 3.13 angepassten *Youngschen* Module berechnet. Im isotonischen Zustand liegt das *Youngsche* Modul bei $(6,2 \pm 1,2)$ kPa. Marthus et al. geben ein *Youngsches* Modul von MDCK-II Zellen unter isotonischen Bedingungen von 5 - 7 kPa an [Mar01], während Caille et al. ein *Youngsches* Modul von 0,1 - 2,5 kPa für Endothelzellen bestimmten, indem sie die Zellen mittels eines „Mikroplattensandwiches“ untersuchten [Cai02]. Almqvist et al. untersuchten Endothelaortazellen vom Rind mittels *Force-Volume*-Technik und fanden ein Modul von 3 - 6 kPa [Alm04]. Das hier angegebene *Youngsche* Modul liegt somit sehr gut im Rahmen der in der Literatur angegebenen Werte.

Wird nun die Sucrose-Konzentration erhöht, so steigen die *Youngschen* Module wie oben angedeutet an (Pfeile in Abbildung 5.35 A). Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang vom *Youngschen* Modul $E(c_{\text{Suc}}) = (0,3 \pm 0,8)[\text{kPa}] + (18 \pm 2)10^{-3}[\frac{\text{kPa}}{\frac{\text{mOsm}}{\text{kg}}}] \cdot c[\frac{\text{mOsm}}{\text{kg}}]$ bei der Erhöhung der Sucrose-Konzentration. Ferner ist eine Reversibilität deutlich zu erkennen (Abbildung 5.35 A, Punkte: I-V). Es stehen dabei die \bullet und \star Symbole für die einzelnen Experimente und die römischen Ziffern für Erhöhung und

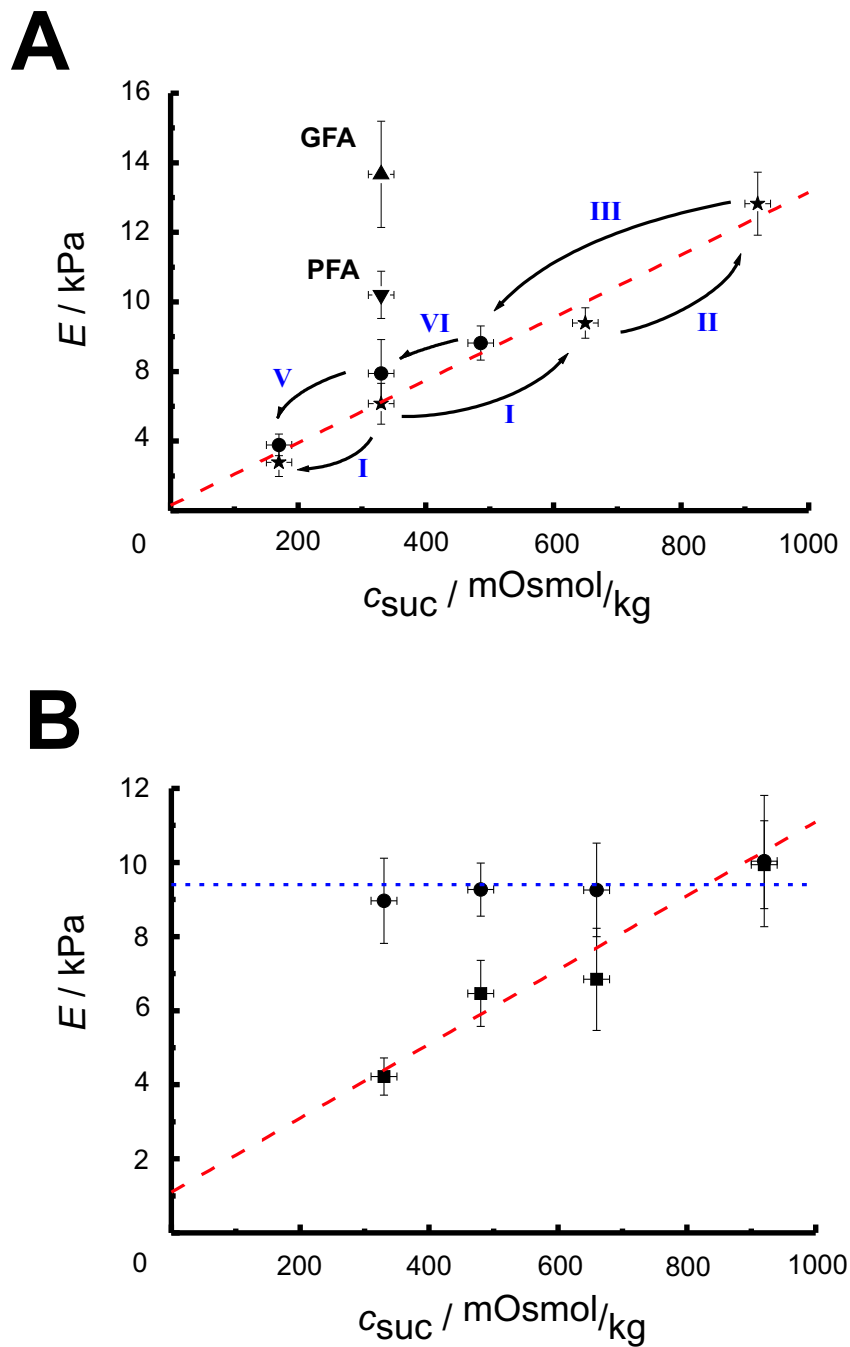


Abbildung 5.35: A: Das *Youngs*che Modul in Abhängigkeit von der Sucrose-Konzentration. Verwendet wurde ein Kugel-*Cantilever*. Die Pfeile markieren die Reihenfolge, in der die Zellen verschiedenen osmotischen Drücken ausgesetzt wurden. Die Module markiert mit \bullet Symbole wurden bei Erhöhung der Sucrose-Konzentration, die mit markierten \star Module bei Reduzierung aufgenommen. Zusätzlich wurden das *Youngs*che Modul von GDA- (\blacktriangle) und PFA- (\blacktriangledown) fixierten Zellen ermittelt. B: *Youngs*che Module in Abhängigkeit der Sucrose-Konzentration. Verwendet wurden die Olympus BL-RC150VB-C1-*Cantilever*. Es sind dabei *Youngs*chen Module auf Zellkernen (\bullet) und in der Peripherie der Zelle (\blacksquare) bestimmt.

Erniedrigung der Sucrose-Konzentration.

Zusätzlich zu den Messungen mit einer sphärischen Spitze sind in Abbildung 5.35 B *Youngsche* Module dargestellt, die mit einer konischen Spitze aufgenommen und mittels Gleichung 3.11 berechnet wurden. Die herkömmlichen *Cantilever* mit konischen Spitzen ermöglichen neben der topographischen Abbildung lokal aufgelöste Kraftindentationskurven auf den MDCK-II Zellmonolayern. In Abbildung 5.35 B sind die *Youngschen* Module in Abhängigkeit der Sucrose-Konzentration dargestellt, die auf dem *Nucleus* (• Symbole) und in der Zellperipherie (■ Symbole) bestimmt wurden. Grundlage jedes Datenpunktes waren mehr als 60 Kraftindentationskurven. Es zeigt sich, dass die *Youngschen* Module, bestimmt auf den *Nucleus*, unabhängig von der Sucrose-Konzentration sind und sich somit ein mittleres Modul von $(9,4 \pm 0,4)$ kPa ergibt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Arbeiten von Caille et al., die ein Modul von 8,8 kPa von isolierten Endothelzellkernen angeben [Cai02].

Betrachtet man die in der Zellperipherie gefundenen *Youngschen* Module (■ Symbole), so zeigt sich wiederum eine lineare Abhängigkeit von der Sucrosekonzentration von vom *Youngschen* Modul $E(c_{\text{Suc}}) = (1,1 \pm 1,5)[\text{kPa}] + (10 \pm 4)10^{-3}[\frac{\text{kPa}}{\frac{\text{mOsm}}{\text{kg}}}] \cdot c[\frac{\text{mOsm}}{\text{kg}}]$. Dies ist in relativ guter Übereinstimmung mit der gefundenen linearen Abhängigkeit der Module, die mittels sphärischer *Cantilever*-Spitzen bestimmt wurden. Für den isotonen Zustand ergibt sich ein *Youngsches* Modul von $(4,2 \pm 0,5)$ kPa, welches mit dem obigen Wert und mit den Werten aus der Literatur sehr gut übereinstimmt.

Bei genauer Betrachtung lässt sich bei einer Sucrose-Konzentration von 650 mM eine Abweichung von der Geraden erkennen (Abbildung 5.35 B, roter Pfeil). Diese Abweichung ist mit der relativ ungenauen Bestimmung des Öffnungswinkels α zu erklären. Kleine Variationen des Öffnungswinkels α innerhalb der Fehlertoleranz führen bei der Berechnung des *Youngschen* Moduls wegen des $\tan \alpha$ zu erheblichen Abweichungen, da der *Cantilever* nur näherungsweise eine konische Form besitzt (vergleiche Abbildung 5.33). Besonders stark sind diese Abweichungen beim Wechsel vom isotonen Zustand zu hohen Sucrose-Konzentrationen. Zusammen mit Abbildung 5.33 B ergeben sich so bei kleinen Eindringtiefen bereits geringe Änderungen des Öffnungswinkels, die zu einer relativ großen Abweichung führen. Wird beispielsweise der Öffnungswinkel um nur zwei Grad erhöht, so liegt der abweichende Datenpunkt aus Abbildung 5.35 B exakt auf der bestimmten linearen Funktion.

Die sphärischen und konischen Spitzen, die bei den Kraftindentationskurven verwendet worden sind, zeigen jeweils einen ähnlichen linearen Verlauf in Abhängigkeit des osmotischen Drucks sehr deutlich. Wie zu erwarten steigt das *Youngsche* Modul mit geringerem Volumen beziehungsweise mit höherer Sucrose-Konzentration an. Das Zytosol wird, als einheitliche viskose Masse angesehen, zusammengepresst und somit erhöht sich das gemessene *Youngsche* Modul (siehe Abbildung 5.36). Vergleicht man die Zelle und das als eine Einheit angesehene Zytosol mit einem gefüllten Ballon, so sollte das *Youngsche* Modul mit steigendem Druck, induziert durch den hypotonen Zustand, steigen.

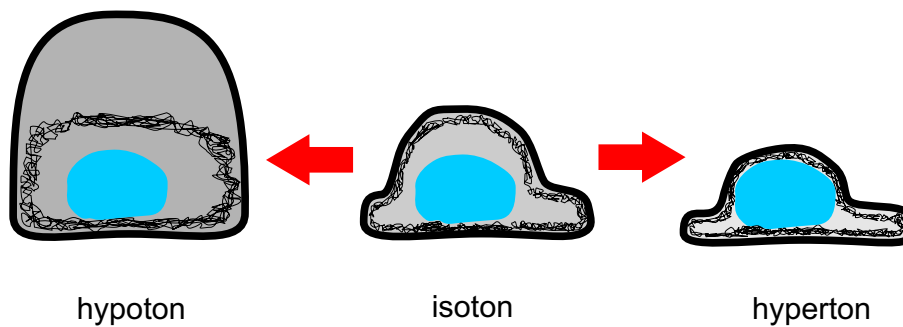


Abbildung 5.36: Schematische Darstellung der einzelnen osmolaren Zustände von MDCK-II Zellen.

Aber bei dem hypotonen Zustand schwellen die Zellen zwar durch den erhöhten Druck an, jedoch besitzen sie ein niedrigeres *Youngsches* Modul als im isotonen Zustand. Dieser Effekt wird vermutlich durch das Separieren von Zytoskelett und Plasmamembran hervorgerufen (vergleiche Abbildung 5.36). Durch die schnelle Reaktion der Zelle auf den osmotischen Druck wird das Zytoskelett nicht in der selben Rate wachsen können, wie die Zelle anschwillt [Mer00]. Dieser Effekt bestätigt die Aussage, dass die mechanischen Eigenschaften im Wesentlichen von den Eigenschaften des Zytoskeletts dominiert werden [Arn00, Bou98] und der Vergleich mit einem Ballon nicht korrekt ist.

In Abbildung 5.35 A wurden zusätzlich die Elastizitätsmodule für fixierte Zellen mittels der *Pulsed-Force*-Technik bestimmt. Dabei wurden die Zellen auf einer Petrischale kultiviert und mit Glutaraldehyd (GDA) beziehungsweise mit Paraformaldehyd fixiert, indem die in der Membran enthaltenen Proteine durch die Aldehyde vernetzt wurden. In Abbildung 5.37 A ist die Topographie einer MDCK-II Zelle abgebildet. Es sind deutlich zwei Bereiche einer Zelle sichtbar.

Der eine Bereich entspricht der in der Literatur angegebenen Höhe von circa 60 nm einer doppelten Zellmembran mit Zytoskelett und extrazellulärer Matrix [Zie98]. Der zweite Bereich mit einer Höhe von etwa 350 nm wird der Zellmembran mit eingeschlossenem Zytosol zugeordnet. Vergleicht man diese Bereiche mit der Steifigkeit (Abbildung 5.37 B) und Adhäsion (Abbildung 5.37 C) in einer synchronisierten Profildarstellung, so spiegeln alle drei Bilder die charakteristischen Strukturen wider. Die Adhäsion ist eine reine Oberflächenfunktion, bei der der Kontaktradius und die Eigenschaften der Oberflächen eingehen, so dass ein homogener Verlauf über alle Bereiche der Zelle beziehungsweise der Petrischale zu erwarten ist. Der mit dem Pfeil markierte Bereich, in dem die Adhäsion ansteigt, ist über die Erhöhung der Kontaktfläche durch den Anstieg der Höhe zu erklären. Das entspricht den zu erwartenden Ergebnissen. Während die Adhäsion über die gesamte Zelloberfläche nahezu konstant ist, steigt und sinkt die Steifigkeit mit entsprechender Höhenänderung. Der Höhenunterschied, bedingt durch die Menge an Zytosol unter der Membran, bewirkt auch eine Änderung der Steifigkeit, so dass in Abbildung 5.37 D die unterschiedlichen Höhen mit der Steifigkeit korrelieren. Zellen, die mittels Glutaraldehyd fixiert worden sind, weisen eine um den Faktor 1,8 größere Steifigkeit auf als einem mit Paraformaldehyd immobilisierten Zellen (nicht gezeigt). Dabei ergab sich eine Steifigkeit von $S_{\text{Stiff}} = 0,8 \text{ nN}$ in der Peripherie einer mit Glutaraldehyd immobilisierten MDCK-II Zelle und eine Steifigkeit von $S_{\text{Stiff}} = 0,45 \text{ nN}$ für Paraformaldehyd immobilisierten MDCK-II Zellen im peripheren Bereich. Dies ist eine gute Übereinstimmung mit den in Abbildung 5.35 A gefundenen Ergebnissen. Dabei unterscheiden sich bestimmten Werte von Glutaraldehyd beziehungsweise Paraformaldehyd immobilisierten Zellen um den Faktor $1,6 \pm 0,4$ (vergleiche Abbildung 5.35), während sich bei den *Pulsed Force* Messungen ein Unterschied von etwa 1,8 ergibt. Die Zellen werden durch das Glutaraldehyd auf Grund dessen chemischen und biologischen Eigenschaften wesentlich stärker als durch Paraformaldehyd immobilisiert. Kleine Abweichungen sind durch die unterschiedlichen Messmethoden zu begründen, zum anderen wurden bei den PFM-Messungen zwei verschiedene Rasterkraftmikroskope verwendet. Dennoch stimmen diese Ergebnis in Rahmen der Fehler sehr gut überein.

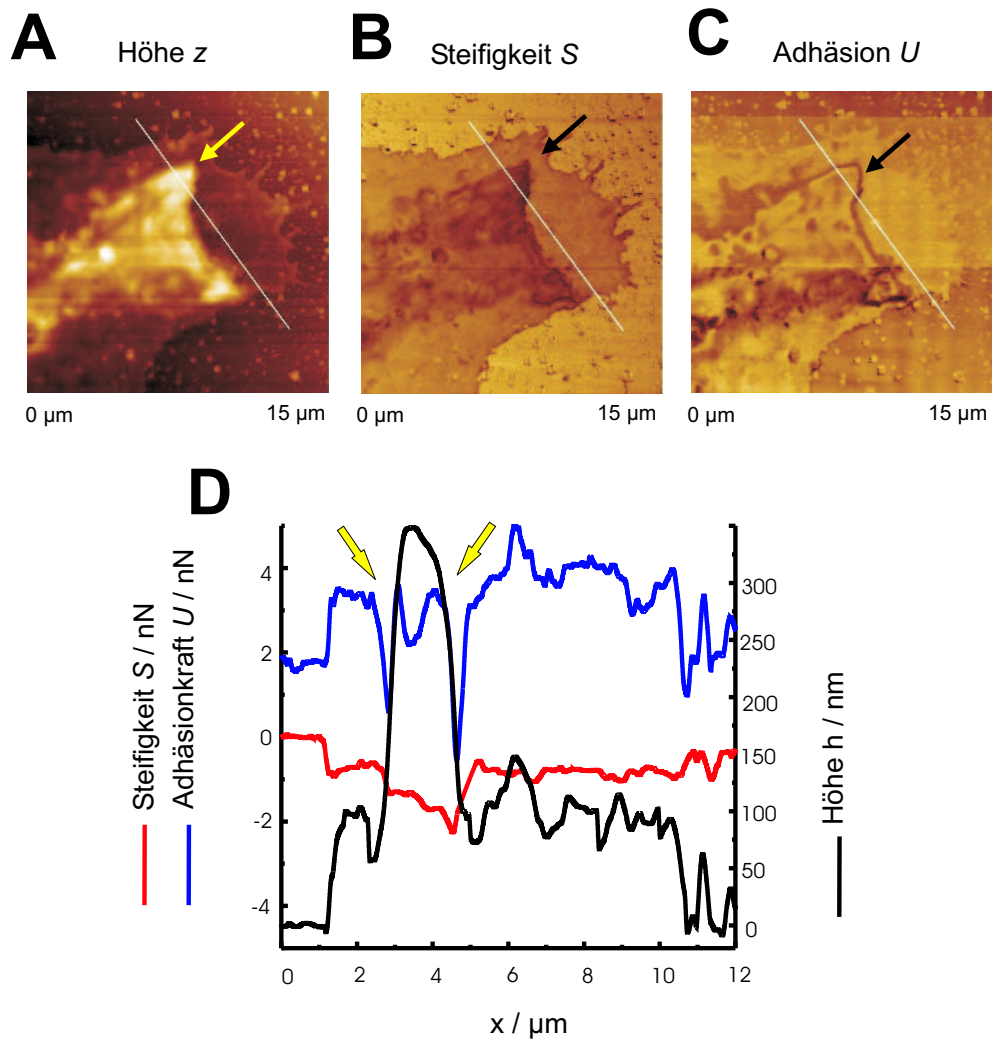


Abbildung 5.37: Rasterkraftmikroskopische Abbildung einer mit Glutardialdehyd fixierten MDCK-II Zelle im *Pulsed-Force*-Modus (A: Topographie, B: Steifigkeit, C: Adhäsion mit entsprechend synchronisierten Profillinien (D)).

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Die mechanischen Eigenschaften von zellulären Membranen spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel Exo- und Endozytose, Zellteilung, Adhäsion und Migration. Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Quantifizierung der lokalen mechanischen Eigenschaften von nativen und artifiziellen, porenüberspannenden Membransystemen. Für die Untersuchung solcher nativer und artifizieller *Nanodrums* wurden poröse Aluminate über einen zweistufigen Anodisierungsprozess hergestellt. So ist es gelungen eine hexagonal geordnete Porenstruktur mit definiertem, aber einstellbarem Porendurchmesser herzustellen.

Für das Verständnis der zentralen Indentation und der dabei auftretenden Rückstellkräfte wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein theoretisches Modell entwickelt, das die Eindringtiefe eines parabolischen Indenters in einer porenüberspannenden Membran (dünne Platte) in Abhängigkeit der Kraft beschreibt: $\left[F(h(\kappa, \sigma, R_{\text{Pore}}, R_{\text{Tip}}, U)) \right]_{\varrho=0}$. Mittels dieses theoretischen Modells war es möglich den Einfluss von Poren- und Indenterradius R_{Pore} , R_{Tip} vorherzusagen, sowie die Oberflächenspannung σ und das Biegemodul κ von unterschiedlichen Lipidgemischen zu bestimmen. Um diese Vorhersagen zu bestätigen, wurden hexagonal geordnete Poren in Aluminium mit einem *Bilayer* überspannt und mittels Kraftindentationskurven untersucht. Aus diesem Grund wurde N,N-Dimethyl-N,N-dioctadecylammoniumbromid als Vertreter eines Lipids in der Gelphase und 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan Chlorid als fluides Lipid ausgewählt, um zusätzlich die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Phase zu quantifizieren. An die gemessenen Kraftkurven wurde die Vorhersage des theoretischen

Modells angepasst, indem bei einem festen Biegemodul für fluide Membranen ($\kappa = 10^{-19}$ J) und für Membranen in der Gelphase ($\kappa = 10^{-18}$ J) die Oberflächenspannung variiert wurde. Für die bestmögliche Übereinstimmung der Kraft-indentationskurven wurde eine physikalisch sinnvolle und zu erwartende Oberflächenspannung von $\sigma_{\text{Gel}} = 5 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$, beziehungsweise von $\sigma_{\text{fluide}} = 1 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ für Poren mit einem Radius von $R_{\text{Tip}} = 90$ nm gefunden. Die Variation des Indenterradius zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Rückstellkraft, während der Porenradius einen wesentlich signifikanteren Effekt zeigte.

Das System der porenüberspannende Membranen bildet zusammen mit dem theoretischen Modell die Grundlage zur Untersuchung von molekularen Besonderheiten der Lipide, wie zum Beispiel den Einfluss der Methylgruppen an den Fettsäureketten (1,2-Diphytanoyl -*sn*-glycero-3-phosphocholin) auf die mechanische Stabilität eines 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol/1,2-Diphytanoyl -*sn*-glycero-3-phosphocholin/Cholesterin Gemisches. Durch die Verzahnung der Methylgruppen ergibt sich eine signifikante Erhöhung der apparenten MembranstEIFigkeit. Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Basis zur Bestimmung des Einflusses von Cholesterin auf die mechanischen Eigenschaften von porenüberspannenden Lipidmembran entwickelt werden. Eine Veränderung des Cholesteringehalts ergab in ersten Messungen keinen signifikanten Einfluss auf die Versteifung der Membraneigenschaften.

Diese Erkenntnis der obigen Experimente wurde nun im Rahmen dieser Arbeit auch auf native Systeme übertragen. So gelang die Präparation und Charakterisierung einer nativen Membran, der Basalmembran von MDCK-II Zellen, die zuvor auf porösem Aluminat kultiviert wurden. Dabei wurden zwei Decaptierungsverfahren entwickelt und deren Effizienz verglichen. Es zeigte sich, dass das *Squirt-Lysing*-Verfahren einen Zelllayer homogen decaptiert, jedoch oftmals nicht in der geeigneten Höhe. Bessere Ergebnisse wurden bei dem *Sandwich-Cleaving*-Verfahren erzielt. Erste Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften konnten durchgeführt werden und bilden die wichtige Grundlage für zukünftige Kraft-indentationsmessungen zur Bestimmung der lateralen Spannung und des Biegemoduls. Damit wurde der Grundstein für ein hochauflösendes lokales *Mapping* der elastischen Eigenschaften von nativen Membranen gelegt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des osmotischen Drucks auf die mechanischen Eigenschaften von lebenden MDCK-II Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass das *Youngsche* Modul in der Peripherie der Zellen reversibel auf extreme osmotische Stimulation reagiert. In der Zellperipherie verringert sich das

Youngsche Modul, da sich bei einem Anschwellen der Zellen die Zellmembran vom Zytoskelett löst. Beim Schrumpfen werden die Zellorganellen und das Zytoplasma komprimiert und so resultiert eine lineare Erhöhung des *Youngschen* Moduls zum osmotischen Druck. Im Gegensatz zu der Zellperipherie ist das *Youngsche* Modul bei Messungen auf dem Zellkern konstant.

Literaturverzeichnis

- [Aha98] A-Hassan, E., Heinz, W. F., Antnik, M. D., D'Costa, N. P., Nageswaran, S., Schoeneberger C.-A., Hoh, H. J.
Relative Microelastic Mapping of Living Cells by Atomic Force Microscopy
Biophys. J. (1998) 74, 1564
- [Alb02] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.
Molecular Biology of the Cell
ISBN: 0815332181, Garland, 2002
- [Alc02] Alcaraz, J., Buscemi, L., Puig-de-Morales, M., Colchero, J., Baró, A, Navajas D.
Correction of microrheological measurements of soft samples with atomic force microscopy for the hydrodynamic drag on the cantilever
Langmuir 18 (2002), 716-721
- [Ale89] Alexander, S., Hellemanns, L., Marti, O., Schneir, J., Elings, V., Hansma P.K., Longmire, M., Gurley, J.
An atomic-resolution atomic-force-microscope implement using optical lever
J. Appl. Phys. 65 (1989), 164-167
- [Alm04] Almqvist, N., Bhatia, R., Primbs, G., Desai, N., Banerjee, S., Lal, R.
Elastic and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties
Bioph. J. 86, 1753-1762 (2003)
- [Arc97] Arcangeletti, C., Sutterlin, R., Aebi, U., Deconto, F., Missorini, S., Chezzi, C. and Scherrer, K.
Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and ac-

- tin networks by instantaneous fixation preserving the cytoskeleton*
J. Struct. Biol. 119 (1997), 35-58.
- [Arn00] Arnoldi, M., Fritz, M., Bäuerlein, E., Radmacher, M., Sackmann, E., Boulbitch, A.
Bacterial turgor pressure can be pressed by atomic force microscopy
Phys. Rev. E 62(1) (2000), 1034-1044.
- [Aug99] Augustin, L., Chi, L.-F., Fuchs, H., Höppener, S., Rakers, S., Röthig, C., Schwaak, T., Starrberg, F.
Preparation and characterization of lowdimensional nanostructures
Appl. Surf. Sci. 141 (1999), 219-227
- [Avanti] Online Katalog, <http://www.avantilipids.com>
- [Beh00] S. Behmanesh, Kempinski, O.,
Mechanisms of endothelial cell swelling from lactacidosis studied in vitro
Am. J. Physiol. Herat Circ. Physiol. H1512 (2000), 279
- [Bei91] Beisswanger, G.
Agnes Pockels (1862-1935) und die Oberflächenchemie
Chemie in unserer Zeit 25(2) (1991), 97-101
- [Ben97] Benoit, M., Holstein, T., Gaub, H. E.
Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles
Eur. Biophys. J. 26 (1997), 283-290
- [Ben04] Benz, M., Gutschmann, T., Chen, N., Tadmor, R., Israelachvili, J.
Correlation of AFM and SFA measurements concerning the stability of supported lipid bilayers
Biophys. J., 86 (2004), 870-879
- [Bin86] Binnig, G., Quate, C. F.
Atomic force microscope
Physical Letter 56(9) (1986), 930-934
- [Bio94] Karlson, P., Doenecke, D., Koolmann, J.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1994), 14 Auflage

- [Boa02] Boal D.
Mechanics of the cell
Cambridge (2002): Cambridge University Press.
- [Bou98] Boulbitch, A.
Deflection of a cell membrane under application of a local force
Phys. Rev. E 57(2) (1998), 2123-2128
- [Bro98] Brown, D.A., London E.
Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes
Annual Review of Cell and Developmental Biology 14 (1998) 111-136
- [Bro00] Brown, D.A., London, E.
Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts
J. Bio. Chem. 275(23) (2000), 17221-17224
- [Cai02] Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., Meiser, J.-J.
Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells
J. Biomech. 35 (2002), 177-187
- [Can74] Canham, P.B.
The minimum energy of bending as a possible explanation of biconcave shape of the human red blood cell
J. Theor Biol. 26 (1974), 61-81
- [Car76] Carmo, M. D.
Differential geometry of curves and surfaces
Prentice Hall (1976)
- [Che00] Cheng, Y., Ogier, S. D., Bushby, R. J., Evans, S. D.
Discrete membrane arrays
Rev. Mol. Biotechn. 74 (2000), 159-174
- [Che01] Cheng, S., Bushby, R. J., Evans, S. D., Knowles, P. F., Miles, R. E., Ogier, S. D.
Single ion channel sensitivity in suspended bilayers on micromachined supports.
Langmuir 17 (2001), 1240-1242
- [Chu05] Cuvelier, D., Chiaruttini, N., Bassereau, P., Nassoy, P.
Pulling long tubes from firmly adhered vesicles
Europhys. Lett. 71 (2005), 1015-1021

- [Dem77] Demel, R. A., Jansen, J. W. C. M., Van Dijk, P. W. M., Van Deenen, L. L. M.
The preferential Interaction of Cholesterol with Different Classes of Phospholipids
Biochimica et Biophysica Acta 465 (1977), 1-10
- [DeP91] De Priester, W.
Techniques for the visualisation of cytoskeletal components in Dictyostelium discoideum
Electron Microsc. Rev. 4 (1991), 343-376
- [Der75] Derjaguin, B. B., Muller, B. M., Toporov, Y. P.
Effect of contact deformation on the adhesion of particles
Journal of Colloid and Interface Science 53(2) (1975), 314-325
- [Der02] Derényi, I., Jülicher F., Prost, J.
Formation and interaction of membrane tubes
Phys. Rev. Lett. 88 (2002), 238101-1-238101-4
- [Des03] Deserno, M., Bickel T.,
Wrapping of a spherical colloid by a fluid membrane
Europhys. Lett. 62 (2003), 767-773
- [Des04] Deserno, M.
Notes on Differential Geometry
Privat Communication
- [Des04Web] Deserno, M.
Elastic deformation of a fluid membrane upon colloid binding
<http://www.mpip-mainz.mpg.de/~muellerm/forschung/pdfs/dgeo.pdf>
- [Dom98] Domke, J., Radmacher, M.
Measuring the elastic properties of thin polymer films with atomic force microscopy
Langmuir 14 (1998), 3320
- [Dre03A] Drexler, J., Steinem, C.
Pore-suspending lipid bilayers on porous alumina investigated by electrical impedance spectroscopy.
J. Phys. Chem. B 107 (2003), 11245-11254.

- [Dre03B] Drexler, J.
*Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen auf Basis poröser Alumina-
te und deren Charakterisierung mittels elektrischer Impedanzspektroskopie*
Dissertation (2003): Fachbereich Chemie und Pharmazie der mathematisch-
naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Regensburg
- [Edw04] Edwards, R. L., Coles, G., Sharpe W. N.
Comparison of tensile and bulge tests for thin-film silicon nitride
Exp. Mech. 44 (1) (2004), 49-54
- [Eng93] Engelhardt, J., Knebel, W.
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
Physik unserer Zeit 24 (1993), 70-78
- [Eva74] Evans, E.A.
Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers
Biophys. J. 14 (1974), 923-931
- [Eva87] Evans, E.
*Physical properties of surface bilayers membranes: thermal transition, elastici-
ty, rigidity, cohesion and colloidal interactions*
J. Phys. Chem. 91 (1987), 4219-4228
- [Eva97] Evans, E., Rawicz, W.
Elasticity of „fuzzy“ membranes
Phys. Rev. E 79 (1997), 122379-122382
- [Eva03] Evans, E., Heinrich, V., Ludwig, F., Rawicz, W.
Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes
Biophys J. 85 (2003), 2342-2350
- [Fai03] Faiß, S.
*Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Phospholipidvesikeln mit Hilfe
der Quarzmikrowaage und Herstellung eines Gradientenmischers für festkör-
pergestützte Lipiddoppelschichten*
Diplomarbeit (2003): Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes
Gutenberg-Universität, Mainz
- [Fan02] Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., Yahi, N.
Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer´s and prion diseases

- Rev. Mol. Med., www.expertreviews.org (2002)
- [Fav02] Favero, G., D'Annibale, A., Campanella, L., Santucci, R., Ferri, T.,
Membrane supported bilayer lipid membrane arrays: preparation, stability and ion-channel insertion.
Anal. Chem. Acta 460 (2002), 23-34
- [Fei00] Feitosa, E., Barreleiro, P.C.A., Olofsson, G.
Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods
Chem. Phys. Lipids 105 (2000), 201-213
- [Fer01] Fertig, N., Meyer, C., Blick, R. H., Trautmann, C., Behrends, J. C.
Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology.
Phys. Rev. E 64 (2001), 1-4
- [Fre04] Freitas, J. A., Ali, S., Rosengarth, A., Luecke, H., Dennin, M. B.
Annexin A1 interaction with a zwitterionic phospholipid monolayer: a fluorescence microscopy study
Langmuir 20 (2004), 11674-11683
- [Gal88] Galla, H.J.
Spektroskopische Methoden in der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1988), New York
- [Got00] Gotsmann B.
Dynamische Kraftspektroskopie
Dissertation (2000): Physikalisches Institut, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster
- [Got02] Gotsmann, B., Fuchs, H.
Damping mechanism in dynamic forces
Appl. Surf. Sci. 188 (2002), 355-362
- [Hat03] Hategan, A. P., Law, R., Kahn, S., Discher, D. E.
Adhesively-tensed cell membranes: lysis kinetics and atomic force microscopy probing
Biophys. J. 85(1) (2003)
- [Heg93] Hegner, M., Wagner, P., Semenza, G.,
Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe mi-

- croscopy*,
Surface Science 291 (1993), 39-46.
- [Hei99] Hein, L.-O., Blum, J., Preuss, M., Butt, H.-J.
Adhesion and friction forces between spherical micrometer-sized particles
Phys. Rev. Lett. 83(16) (1999), 3328-3331
- [Hei04] Heidemann, S. R., Wirtz, D.
Towards a regional approach to cell mechanics
TREND in Cell Biology 14(4) (2004), 160-166
- [Hel73] Helfrich, W.
Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments
Z. Naturforsch. 28(c) (1973), 693-703
- [Hen03A] Hennesthal, C., Drexler, J., Steinem C.
Membrane-suspended nanocompartments based on ordered pores in alumina
Chem. Phys. Chem 10 (2002), 885-889
- [Hen03B] Hennesthal, C.
Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen und deren Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie
Dissertation (2003): Fachbereich Chemie und Pharmazie, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster.
- [Her96] Hertz, H.
Über die Berührung fester elastischer Körper
J. Reine Angew. Math. 92 (1896), 156-167
- [Hoh94] Hoh, J. H., Schoeneberger, C-A.
Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy
J. Cell science 107 (1994), 1105
- [Hön91] Hönig, D., Möbius, D.
Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy
J. Phys. Chem. 95 (1991), 4590-4592
- [Höp97] Höppener, S.
Entwicklung und Charakterisierung von nanostrukturierten Bauteilen und de-

ren potentielle Anwendung

Diplomarbeit (1997): Fachbereich Physik, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster.

[Hop03] Höppener, S.

Dissertation (2003): Fachbereich Chemie und Pharmazie, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster.

[Ins01] Insall, R., Machesky, L.

Cytoskeleton

Encyclopedia of life science (2001)

[Isr03] Israelachvili, J.

Intermolecular and surface forces

Academic Press (2003), 2nd Edition

[Jan90] Janmey, P.A., Hvidt, S., Lamb, J., Stossel, T.P.

Reassemble of actin-binding-protein/actin gels to covalently crosslinked networks

Nature 345 (1991), 89-92

[Jan91] Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P., Schliwa, M.

Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks

J. Cell. Biol. 113 (1991), 155-160

[Jan98] Janshoff, A., Dancil, K.-P. S., Steinem, C., Greiner, D. P., Lin, V. S.-Y., Gurtner, C., Motesharei, K., Sailor, M. J., Ghadiri, M. R.

Macroporous p-type silicon fabry-perot layers. Fabrication, characterization and applications in biosensing

J. Am. Chem. Soc. 120 (1998), 12108-12116

[Jan00] Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdörfer Y., Fuchs, H.

Force spectroscopy of molecular systems - single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules

Ang. Chem. Int. Ed, 39 (2000), 3212-3237

[Jan05] Janovjak, H., Struckmeier, J., Müller, D. J.

Hydrodynamic effects in fast AFM single-molecule force measurements

Eur. Biophys. J. 34 (2005), 91-96

- [Jes97] Jessensky, O.
Untersuchungen zum Porenwachstum in 6H-Siliziumkarbid und anodischem Aluminiumoxid
Dissertation (1997): Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische-Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- [Jes98] Jessensky, O., Müller, F., Goesele, U.
Self-organized formation of hexagonal pore arrays with a 50-400 nm interpore distance formed by self-organisation in anodic alumina
Appl. Phys. Lett. 72(10) (1998), 1173-1175
- [Joh71] Johnson, K. L., Kendall K., Roberts, A. D.
Surface energy and the contact of elastic solids
Proc. R. Soc. Land. A. 324 (1971), 301-313
- [Kno00] Knoll, W., Frank, C. W., Heibel, C., Naumann, R., Offenhausser, A., Ruhe, J., Schmidt, E. K., Shen, W. W., Sinner, A.
Functional tethered lipid bilayers
J. Biotechnol. 74(3) (2000), 137-158
- [Kos05] Koster, G., Cacciuto, A., Derényi, I., Frenkel, D., Dogterom, M.
Force barriers for membrane tube formation
Phys. Rev. Lett. 94 (2005), 068101-1-068101-4
- [Kre91] Kreyszig, E.
Differential geometry
Dover, New York (1991)
- [Kru97] Krüger, D., Anczykowski B., and Fuchs, H.
Physical properties of dynamic force microscopy in contact and noncontact operation
Annalen der Physik 6 (1997), 341-363
- [Kün00] Künneke, S.
Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen,
Dissertation (2003): Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

- [Lan] Landau, L. D., Lifschitz, E. M.
Lehrbuch der theoretischen Physik VII Elastizitätslehre
Akademie Verlag Berlin
- [Lan94] Lang, H., Duschl, C., Vogel, H.
A new class of thiolipids for attached bilayers on gold surfaces
Langmuir 10 (1994), 197-210
- [Lee01] Lee, C-H, Lin, W.-C., Wang, J.
All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions
Phys. Rev. E 64 (2001), 020901.
- [LeG95] Le Grimellec, C., Lesniewska, E., Giocondi, M. C., Cachia, C., Schreiber, J.P. and Goudonnet, J.P.
Imaging of the Surface of Living Cells by Low-Force Contact-Mode Atomic Force Microscopy
Scanning Microsc. 9 (1995), 401-410.
- [Li99] Li, A.-P., Müller, F., Birner, F., Nielsch, K., Goesele, U.
Polycrystalline nanopore arrays with hexagonal ordering on aluminum
J. Vac. Sci. Technol. A. 17(4) (1999), 1428-1431
- [Lie94] Lieser, G., Mittler-Neher, S., Spinke, J., Knoll, W.
Electron microscopic investigations on free-standing mixed lipid Langmuir-Blodgett-Kuhn monolayers: phase separation and aging process.
Biochem. Biophys. Acta 1192(1) (1994), 14-20
- [Mar00] Marti, O.
Handbook of modern tribology: measurement of adhesion and pull-off-forces
CRC, 2000
- [Mar01] Mathur, A. B., Collinsworth, A. M., Reichert, W., Kraus, W. E., Truskey, G. A.
Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy
J. Biomechanics 34 (2001), 1545-1553
- [Mer00] Merkel, R., Simson, R., Simson, D. A., Hohenadl, M., Boulbitch, A., Wallraff, E., Sackmann, E.

- A micromechanic study of cell polarity and plasma membrane cell body coupling in Dictyostelium*
Biophys. J. 79(2) (2000), 707-719
- [Mül62A] Müller, P., Rudin, D. O., Tein, H. T., Wescott, W. C.
Reconstitution of cell membrane structures in vitro and its transformation into an excitable system
Nature, 194(4832) (1962), 979-980
- [Mül62B] Müller, P., Rudin, D. O.
Action potential phenomena in experimental biomolecular lipid membranes
Nature 213(76) (1962), 603-604
- [Mül63] Müller, P., Rudin, D. O., Tein, H. T., Wescott, W. C.
Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions.
J. Phys. Chem. 67 (1963), 534-535
- [Mul80] Muller, V. M., Yushchenko, V. S., Derjaguin, B. V.
On the influence of molecular forces on the deformation of an elastic sphere and its sticking to a rigid plane
Journal of Colloid and Interface Science 77(1) (1980), 91-101
- [Mul83] Muller, V. M., Yushchenko, V. S., Derjaguin, B. V.
General theoretical consideration of the influence of surface forces on contact deformations and reciprocal adhesion of elastic spherical particles
Journal of Colloid and Interface Science 92(1) (1983), 92-101
- [Mül04] Müller, M. M.
Theoretical examinations of interface mediated interaction between colloidal particles
Diplomarbeit (2004): Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- [Mül05] Müller M. M., Deserno, M.
Geometry of surface mediated interactions
J. Europhys. Lett. 69 (2005), 482-488
- [Neit99] Neitzert, M.
Kraftspektroskopie: Von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zur Mechanik von

Einzelmolekülen

Dissertation (1999): Physikalisches Institut, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster

[Ner98] Nermut, M. V.

Strategy and tactics in electron microscopy of cell surfaces

Electron Microsc. Rev. 2 (1998), 171-196

[Nie00] Nielsch, K., Müller, F., Li, A.-P., Goesele, U.

Uniform nickel deposition into ordered alumina pores by electrodeposition

Adv. Mater. 12(12) (2000), 582-586

[Nor06] Norouzi, D., Müller, M. M., Deserno, M.

Indentation of a pore-spanning lipid bilayer membrane by an AFM tip

Submitted, Phys. Rev. Lett. (2006)

[Ogi00] Ogier, S. D., Bushby, R.J., Cheng, Y., Evans, S. D., Evans, S. W., Jenkins, A. T. A., Knowles, P. F., Miles, R. E.

Suspended planar phospholipid bilayers on micromachined supports

Langmuir 16 (2000), 5696-5701

[Os95] Osborn, T. D., Yager, P.

Formation of planar solvent-free phospholipid bilayers by Langmuir-Blodgett-transfer of monolayers to micromachined apertures in silicon.

Langmuir 11 (1995), 8-12

[Pau00] Paulo, A., Garcia, R.

High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes

Biophys. J. 78 (2000), 1599-1695

[Per92] Periasamy, N., Pin Kao, H., Fushimi, K., Verkman, A. S.,

Organic osmolytes increase cytoplasmic viscosity in kidney cells

Am. J. Physiol. 263 (1992), 901-907

[Per04] Pera, I. A.

Direct measurements of interaction between two solid supported lipid membranes and the influence of synapsin I

Dissertation (2004): Johannes Gutenberg-Universität, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Mainz

- [Poc91] Pockels, A.
Surface Tension
Nature 43 (1891), 437
- [Pow02] Powers, T.R., Huber, G., Goldstein, R. E.
Fluid membrane tether: minimal surfaces and elastic boundary layers
Phys. Rev. E 65 (2002), 0419011-04190110
- [Rad94] Rädler, J., Radmacher, M., Gaub, H. E.
Velocity-dependent forces in atomic force microscopy imaging of lipid films
Langmuir 10 (1994), 3111-3115
- [Rei94] Reinl, H. M., Bayerl, T. M.
Lipid transfer between small unilamellar vesicles and single bilayers on a solid support: self-assembly of supported bilayers with asymmetric lipid distribution
Biochemistry 33 (1994), 14091-14099
- [Rev00] Reviakine, I., Brisson, A.
Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by AFM
Langmuir, 16 (2000), 1806-1815
- [Ros97] Rosa-Zeiser, A., Weilandt, E., Hild, S., Marti, O.
The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation
Meas. Sci. Technol. 8 (1997) 1333–1338.
- [Ros01] Ross, M., Steinem, C., Galla, H.-J., Janshoff, A.
Visualization of chemical and physical properties of calcium induced domains in DPPC/DPPS Langmuir-Blodgett layers
Langmuir 117 (2001), 2437-2445
- [Röm03] Römer, W.
Pore-suspending lipid bilayers mimicking the cell membrane: Impedance analysis and single ion channel recordings on supported black lipid membranes based on porous materials
Dissertation (2004): Fachbereich Chemie und Pharmazie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Regensburg

- [Röm04] Römer, W., Steinem, C.
Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina
Biophys. J. 86 (2004), 955-965
- [Sac96] Sackmann, E.
Supported membranes: scientific and practical applications.
Science 271(5245) (1996), 43-48
- [Sac00] Sackmann, E., Tanaka, M.
Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications
Trend. Biotechnol. 18(2) (2000), 58-46
- [Sac04] Sackmann, E.
Mikromechanik der Zelle
Phys. J., 3(2) (2004), 35-41
- [Sap06] Sapper, A., Reiss, B., Janshoff, A., Wegener, J.
Adsorption and fluctuations of giant liposomes studied by electrochemical impedance measurements
Langmuir, 22(2) (2006), 676 -680
- [Sch98] Schneider, S. W., Pagel, P., Stork, J., Yano, Y., Sumpio, B. E., Geibel, J. P., Oberleithner, H.
Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy
Kidney Blood Press Res. 21 (1998), 256-258
- [Sch03] Schuy, S.
Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von planaren und mikrostrukturierten festkörpergestützten Lipidmembranen
Diplomarbeit (2003), Fachbereich Chemie und Pharmazie Johannes Gutenberg-Universität
- [Sei90] Seifert, U., Lipowski, R.
Adhesion of vesicles
Phys. Rev. A., 42(8) (1990)

- [Sei91] Seifert, U.
Adhesion of vesicles in two dimensions
Phys. Rev. A., 43(12) (1991)
- [Sim97] Simons, K., Ikonen, E.
Functional Rafts in Cell Membranes
Nature 387 (1997), 569-572
- [Sin72] Sing, S. J., Nicolson G. L.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Science 175 (1972), 720-731
- [Sin01] Sinner, E. K., Knoll, W.
Functional tethered membranes
Curr. Opin. Chem. Biol. 5(6) (2001), 705-711
- [Sne65] Sneddon, I. N.
The relation between load and penetration in axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile
Int. J. Eng. Sci. 3 (1965), 47-57
- [Ste96] Steinem, C., Janshoff, A., Ulrich, W. P., Sieber, M., Galla, H. J.
Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes
Biochem. Biophys. Acta 1279(2) (1996), 169-180
- [Ste91] Stelzer, E. H. K., Merdes A., De Mey J.
Konfokale Fluoreszenzmikroskopie in der Zellbiologie,
Biologie unserer Zeit 1 (1991), 19-25
- [Ste00] Stewart, M. P., Buriak, J. M.
Chemical and biological applications of porous silicon technology
Adv. Mater. 12(12) (2000), 859-869
- [Str99] Stryer, L.
Biochemistry
W.H. Freeman and Co., New York (1999)
- [The00] Theato, P., Zentel, E., Rudolf, G.
Formation of lipid bilayers on a new amphiphilic polymer support
Langmuir 16 (2000), 1801-1805

- [Tie05] Tierney, K. J., Block, D. E., Longo, M. L.
Elasticity and phase behaviour of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol and ethanol
Biophys. J., 89 (2005), 2481-2493
- [Ver03] Verdier, C.
Rheological properties of volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy materials: From cells to tissues
J. theor. Med. 5(2) (2003), 67-91
- [Vin98] Vinckier, A., Semenza, G.
Measuring elasticity of biological material by atomic force microscopy
FEBS Letters 430 (1998), 12-16
- [Vog95] Vogel, H., Gerthsen
Physik
Springer Verlag (1995), Berlin, Heidelberg
- [Wag95] Wagner, P., Hegner, M., Güntherodt, H.-J., Semenza G.
Formation of in situ monolayers chemisorbed on ultraflat template-stripped gold surfaces
Langmuir 11 (1995), 3867-3875
- [Wan02] Wan, K., Chan, V., Dillard, D. A.
Constitutive equation for elastic indentation of thin-walled biomimetic microcapsule by an atomic force microscope tip
Biointerfaces 27 (2002), 241-248
- [Weg98] Wegner, J.
Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Goldelektroden
Dissertation (1993): Fachbereich Chemie und Pharmazie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster
- [Wei96] Weidemann, G., Vollhardt, D.
Long-range tilt orientational order in phospholipid monolayers: a comparative study
Biophys. J., 70(6) 11 (1996), 2758-2766

- [Yam97] Yamakawa, H.,
Helical wormlike chains in polymer solution
Springer Verlag, 1997
- [Yao02] Yao, X., Walter, J., Burke, S., Stewart, S., Jericho, H., Pink, D., Hunter, R., Beveridge, T. J.
Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria
Coll. Surf. B: Biointerfaces 23 (2002), 213-220
- [Zie98] Ziegler U., Vinckier, A., Kernen, P., Zeisel, D., Biber, J., Semenza, G., Murer H. and Groscurth G.
Preparation of basal cell membranes for scanning probe microscopy
FEBS Letter 436 (1998), 179-184
- [Zhd00] Zhdanov, V. P., Keller, C. A., Glasmästar, K., Kasemo, B,
Simulation of adsorption kinetics of lipid vesicles
J. Chem. Phys. 112 (2000), 900-909

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>Atomic force microscope</i>)
a. u.	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)-methan
BLM	Schwarze Membranen (<i>Black lipid membrane</i>)
Chol	Cholesterin, Cholesterol
CLSM	Konfokale Laser-Rastermikroskopie
DODAB	N,N-Dioctadecyl-N,N-dimethylammoniumbromid
DPPTE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphothioethanol
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphocholine
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GA	Glutardialdehyd
HEPES	2-(4-(2- <i>Hydroxyethyl</i>)-1- <i>piperazinyl</i>)ethanesulfonic acid
LVDT	Linear Variable Differential Transformer
MDCK	Mardine-Darby Canine Kidney
MFP	Molecular Force Pulling
MPA	3-Mercaptopropionsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS ⁺⁺	<i>phosphate buffered saline</i> mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PFA	Paraformaldehyd
PID	Proportional Integral und Differential
QCM	Quarzmikrowaage (<i>Quartz crystal micro balance</i>)
SAM	Selbstordnende Monoschichten (<i>self assembled monolayer</i>)
SSM	Festkörpergestützte Membranen (<i>solid supported membrane</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Geräte

Mikroskopie:

Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH
LEO1530 with GEMINI field emission column	Carl Zeiss SMT AG
Philips EM420 Acc. Vol. 120 kV	Philips
Dimension 3100, Nanoscope IIIa+A/D Controller	Veeco, USA
Bioscope, Nanoscope IIIa Controller	Veeco, USA
Pulsed Force Box	WITec GmbH, Ulm, D.
Asylum Research MFP-3D AFM	Atomic Force FE GmbH, D.
Kalibriergitter mit Spitzen TGT01	Anfatec, D.
Cantilever:	
OMCL-TR400PSA	Olympus Optical Co., Japan
DNP-S-10	Veeco, Santa Barbara, CA, USA
OMCL-BL-RC150VB-C1	AFFE, Mannheim, D.
Oszillatorkarte NI 5911	National Instruments, USA

Probenpräparation:

Sterilbank: FLow BSB 6A und BSB 4A	Gelaire, D.
Miniextruder LiposoFast ©	Avestin, Kanada
Tip Sonifier Labsonic U	Brandt, D.
Plasmareiniger PDC-002	Harrick, USA
Ecocell	Medcenter Einr. GmbH, D.
Vacucell	Medcenter Einr. GmbH, D.
Aufdampfanlage, Bae 250 Balzers Coating System	Liechtenstein
Vortexer Reax Top	Heidolph, D.

Herstellung von porösen Aluminiumträgern:

Keithley 2400 Source Meter

Keithley Instruments, USA

Netzgerät für den Rührer

Tektronix PS 280 DC Power Supply

Tektronix, USA

Tektronix Power Supply EA-PS 9300-02

Tektronix, USA

Ecoline RE 104

Lauda, D.

Kühlaggregat in Mainz

Materialien

Aluminium Folien	Goodfellow, Deutschland
BisTris	Sigma-Aldrich, Deutschland
CaCl ₂ Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Cholesterol	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Chrom(IV)Oxid	Acros, Deutschland
Chrom	Umicore Material AG, Deutschland
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Deutschland
DODAB	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPhPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
DPPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al, USA
Ethanol	Roth, Deutschland
fötale Kälberserum	Seromed, Deutschland
Glasdeckgläser	Plano, Deutschland
Glasobjektträger	Plano, Deutschland
Glimmer	Plano, Deutschland
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glutamin	Merck, Deutschland
Gold	Goodfellow, Deutschland
Hellmanex	VWR, Deutschland
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Roth, Deutschland
Kaliumchlorid KCl	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck, Deutschland
3-Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland
MEM Earle (1×)	Biochrom, Deutschland
MES 2-Morpholinoethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland

Magnesiumchlorid MgCl_2	Sigma-Aldrich, Deutschland
Mucosol	VWR, Deutschland
Natriumchlorid NaCl	Merck, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Sigma-Aldrich Deutschland
Natriumsulfat Na_2SO_4	Acros, Deutschland
Oxalsäure Dihydrat	Acros, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin	Seromed, Deutschland
Petrischalen	Greiner Deutschland
Phosphorsäure H_3PO_4	Fluka, Deutschland
Streptomycin	Seromed Deutschland
Schwefelsäure H_2SO_4	Fluka, Deutschland
Tris	Roth, Deutschland

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

Siegfried Steltenkamp

Mainz, den 8. Juni 2006

Lebenslauf

Angaben zur Person

Steltenkamp, Siegfried Stephanus
geboren am 23.9.1974 in Lüdinghausen

Schulbildung

1985-1995 Privates Gymnasium Canisianum Lüdinghausen, Abitur 1995
1981-1985 Ostwall Grundschule

Hochschullaufbahn

1995-1998 Studium in Mathematik an der Westfälischen-Wilhelms Universität
Münster
1998-2002 Studium in Physik an der Westfälischen-Wilhelms Universität
Münster
1998 Zwischenprüfung in Mathematik
1999 Internationales Sommerstudentenprogramm bei der Gesellschaft für
Schwerionenforschung (GSI), Darmstadt
2000 Vordiplom in Physik
2002 Internationales Sommerstudentenprogramm bei der Helmholtz-
gesellschaft Jülich (Abteilung: Kernphysik)
2002 Diplom (Diplomarbeit in Kernphysik bei Prof. Dr. R. Santo,
Westfälischen-Wilhelms Universität Münster, Thema: Luminositäts-
bestimmung für Protonen-Deuteronen-Streureaktionen am
Experiment COSY-11
2002-2006 Dissertation am Fachbereich Chemie und Pharmazie und Geowissen-
schaften der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz bei Prof. Dr.
A. Janshoff