

# Nano- und mikrostrukturierte organische Erkennungsstrukturen in Lipidmembranen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

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

**Patrick Scheibe**  
geboren in Bottrop-Kirchhellen

März 2011

Dekan: Prof. Dr. [REDACTED]

Erster Gutachter: Prof. Dr. [REDACTED]

Zweiter Gutachter: Jr. Prof. Dr. [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2011

# Inhalt

1. Einleitung .....	1
1.1 Motivation .....	1
1.2 Immunologischer Ansatz in der Krebstherapie .....	2
1.3 Krebsvakzine .....	6
1.4 Lipide und biologische Modellsysteme .....	8
1.5 Langmuir-Blodgett Technik .....	10
1.6 Binäre Monoschichten .....	12
1.7 Stabilisierung durch Polymerisation .....	15
1.8 Brewsterwinkelmikroskopie .....	17
1.9 Rasterkraftmikroskopie .....	19
1.9.1 Contact mode im constant force Betrieb .....	21
1.9.2 Tapping mode .....	22
1.9.3 Auflösungsvermögen und Abbildungsfehler .....	22
1.10 Quarzmikrowaage .....	23
2. Zielsetzung .....	26
3. Allgemeiner Teil .....	29
3.1 Synthese und Charakterisierung der verwendeten Verbindungen .....	30
3.1.1 Lipid 1 .....	30
3.1.2 Lipid 2 .....	34
3.1.3 Lipid 3 .....	35
3.1.4 Lipid 4 .....	37
3.1.5 Lipid 5 .....	38
3.1.6 Lipid 6 .....	40
3.1.7 Lipid 7 .....	41
3.1.8 Lipid 8 .....	42
3.1.9 Lipid 9 .....	43
3.2 Binäre Lipidmischung der Lipide 1 und 3 .....	44
3.2.1 $\pi$ -A Isothermen .....	45
3.2.2 Brewsterwinkelmikroskopie .....	48
3.2.3 Rasterkraftmikroskopie .....	49
3.2.4 Polymerisation .....	52
3.3 Binäre Mischung der Lipide 2 und 3 .....	55

3.3.1 $\pi$ -A Isothermen .....	55
3.3.2 Brewsterwinkelmikroskopie .....	58
3.3.3 Rasterkraftmikroskopie .....	60
3.3.4 Polymerisation .....	63
3.4 Binäre Mischung der Lipide 2 und 7 .....	64
3.4.1 $\pi$ -A Isothermen .....	65
3.4.2 Brewsterwinkelmikroskopie .....	67
3.5 Binäre Mischung der Lipide 1 und 6 .....	69
3.5.1 $\pi$ -A Isothermen .....	70
3.5.2 Brewsterwinkelmikroskopie .....	72
3.5.3 Rasterkraftmikroskopie .....	73
3.6 Binäre Mischung der Lipide 1 und 8 .....	76
3.6.1 $\pi$ -A Isothermen .....	76
3.6.2 Brewsterwinkelmikroskopie .....	78
3.6.3 Rasterkraftmikroskopie .....	80
3.7 Ternäre Mischung der Lipid 1, 3 und 4 .....	83
3.7.1 Brewsterwinkelmikroskopie .....	83
3.7.2 Rasterkraftmikroskopie .....	85
3.8 Ternäre Mischung der Lipide 1,3 und 5.....	86
3.8.1 Brewsterwinkelmikroskopie .....	87
3.8.2 Rasterkraftmikroskopie .....	89
3.8.3 Antikörperbindungsstudie mit Hilfe der Quarzmikrowaage .....	90
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	98
5. Experimenteller Teil .....	100
5.1 Verwendete Geräte .....	100
5.1.1 Langmuir-Blodgett Trog .....	100
5.1.2 Brewsterwinkelmikroskop.....	100
5.1.3 Rasterkraftmikroskopie .....	101
5.1.4 Quarzmikrowaage .....	101
5.1.5 Kernresonanzspektroskopie .....	101
5.1.6 FT-IR-Spektroskopie.....	101
5.1.7 Reinstwasser .....	102
5.2 Verwendete Chemikalien und Verbindungen .....	102
5.2.1 Antikörper für die QCM-Messungen .....	102

5.2.2 PDA, fluorierte und teilfluorierte Lipide.....	102
5.3 Langmuir-Blodgett Experimente.....	103
5.4 AFM-Messungen.....	103
5.5 BAM Messungen.....	104
5.6 QCM-Messungen.....	105
5.7 Vesikelpräparation.....	106
5.8 Synthese.....	107
5.8.1 Synthese des Dioctadecylamin (DODA).....	107
5.8.2 Synthese des Lipid 1 (DODAMA).....	108
6. Abkürzungsverzeichnis.....	111
7. Publikationen.....	112
8. Danksagung.....	113
9. Curriculum Vitae.....	115
Allgemeines.....	115
Ausbildung.....	115
10. Literaturverzeichnis.....	116

# 1. Einleitung

## 1.1 Motivation

Krebs ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Mehr als 7,4 Millionen Todesfälle werden im Jahr 2004 auf Krebs zurückgeführt.<sup>1</sup> Das sind etwa 13% aller registrierten Todesfälle. Lungen-, Bauch-, Leber-, Dickdarm- und Brustkrebs sind hierbei für die meisten Todesfälle verantwortlich und von diesen können bis zu 30% vermieden werden.<sup>2,3</sup> Ein Beispiel hierfür ist der Tabakkonsum, der als einer der Hauptfaktoren für eine Krebserkrankung gilt. Und auch im Jahr 2011 rechnet das statistische Bundesamt mit 1,3 Millionen Krebstoten in der Europäischen Union.<sup>4</sup> Es ist also in unser aller Interesse die therapeutischen Möglichkeiten weiter auszubauen und so die Chancen auf Heilung zu erhöhen. Ansätze hierfür gibt es reichlich. Die klassischen Methoden wie die Chemotherapie und die Strahlentherapie werden nach wie vor eingesetzt. Bei der Chemotherapie kommen hierbei Medikamente zum Einsatz, so genannte Zytostatika, die die Zellteilung stoppen sollen und entartete Zellen schließlich absterben lassen. Das Hauptproblem hierbei ist, dass auch gesunde Zellen abgetötet werden können, so dass die bekannten Nebenwirkungen wie Haarausfall oder Übelkeit auftreten können. Eine weitere Behandlungsmethode nutzt die Tatsache aus, dass maligne Zellen unter Umständen von Hormonen abhängig sind. Auf diese Weise kann eine spezielle Antihormontherapie dazu beitragen, dass das Tumorwachstum gehemmt wird.<sup>5,6</sup> Die moderne „zielgerichtete Krebstherapie“ hingegen nutzt monoklonale Antikörper. Diese können sich nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ an bestimmte Oberflächenstrukturen von malignen Zellen binden, machen damit das körpereigene Abwehrsystem auf deren Existenz aufmerksam und leiten so deren Abtötung ein. Diese spezielle Tumoringpfung ist ein viel versprechender Ansatz in der Krebstherapie und gibt vor allem bei der Behandlung des bislang nicht heilbaren nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Prostatakarzinoms Hoffnung. Gerade der Lungenkrebs, der mit voraussichtlich über 255000 Todesfällen im laufenden Jahr 2011 in der Europäischen Union, davon allein mehr als 40000 in Deutschland, zu Buche schlägt, ist somit mit Abstand für die meisten durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich.<sup>4</sup> Auf die letztgenannte Methode wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1.2 Immunologischer Ansatz in der Krebstherapie

Um die bei den klassischen Behandlungsmethoden auftretenden Nebenwirkungen für den Patienten möglichst gering zu halten, wird intensiv an schonenderen Methoden geforscht. Ein solch schonender Ansatz beruht auf der zielgerichteten Aktivierung des menschlichen Immunsystems mit nicht-toxischen Tumorimpfstoffen zur Bekämpfung des Tumors sowie der frei zirkulierenden (Mikro-) Metastasen. Diese spezifische Tumorimmuntherapie<sup>7,8</sup> würde dabei in erster Linie als Folgetherapie, also nach vorangegangener konventioneller Behandlung, von enormem Nutzen sein, indem sie durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses vor einem erneuten Auftreten der Krankheit schützt.

Dazu müssen zunächst geeignete Zielstrukturen für die Entwicklung von Tumorzellen identifiziert werden. Sind diese Zielstrukturen zugänglich, ist es entscheidend deren immunologisches Verhalten zu untersuchen, wobei hier die Antigen-Antikörper Erkennungsreaktion ein wesentlicher Faktor ist, da sie eine Grundvoraussetzung für eine spezifische Immunantwort im menschlichen Körper ist. Weil die Bindung zwischen Antikörper und Antigen hochspezifisch ist, da komplementär zu der Oberfläche des Antigens bzw. zu Teilen dieser Oberfläche, ist es wichtig zu verstehen wie sich potentielle Krebsvaccine (Antigene) innerhalb einer Membran anordnen bzw. verhalten. Ein einfacher Zugang zum Verständnis dieser Mechanismen bieten verschiedene Modellsysteme wie z.B. schwarze Membranen<sup>9</sup>, Vesikel<sup>10,11</sup> oder Langmuir-Blodgett Techniken, wobei gerade die Langmuir-Blodgett Techniken einen einfachen Zugang zu verschiedenen Charakterisierungsmethoden wie z.B. der Fluoreszenz-, Brewsterwinkel- oder der Rasterkraftmikroskopie bieten.

Da sich die Oberflächenstrukturen der Krebszellen von denen der gesunden Zellen unterscheiden und das Immunsystem hoch spezifisch reagiert, sollte es sehr gut möglich sein, selektiv und effektiv maligne Zellen abzutöten, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung geeigneter Antigenstrukturen, welche in der Lage sind, eine Tumorzelle eindeutig von einer gesunden Zelle zu unterscheiden. Des Weiteren muss die vorhandene Toleranz des Immunsystems gegenüber eben diesen (tumorassoziierten) Antigenen durchbrochen werden. Eine geeignete Zielstruktur für die Entwicklung von Tumorzellen (Tumorimpfstoffen) stellen die tumorspezifischen neoantigenen Epitope (Oberflächenstrukturen der Zellen) des auf Epithelzellen exprimierten Mucins MUC1, eines Glycoproteins, dar.<sup>12,13,14</sup>

Die Bezeichnung Mucin leitet sich vom lateinischen mucus (= der Schleim) ab und beschreibt polymorphe hochmolekulare Glycoproteine,<sup>15</sup> deren Glycosylierungsgrad 50-90 Gewichtsprozent beträgt. Sie werden von den sekretorischen, epithelialen Geweben des Verdauungs- und Bronchialtraktes sowie der Genitalregion produziert und sezerniert. Ihre Hauptfunktion ist der Schutz der Zelloberfläche,<sup>16</sup> die im respiratorischen, gastrointestinalen und reproduktiven Trakt externen Angriffen und Reizen, wie sie z.B. durch die Einwirkung von Mikroorganismen und Säuren hervorgerufen werden, ausgesetzt ist.

Mucine werden ausschließlich auf der apicalen Zelloberfläche exprimiert und reichen mit ihrer extrazellulären Domäne weit ins Lumen hinein. Die bisher bekannten 17 humanen Mucine<sup>17</sup> werden in zwei Gruppen eingeteilt: in sekretorische (z.B. MUC2, MUC5, MUC6) und in membrangebundene Formen (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12). Während die sekretorischen Mucine ein hochviskoses, über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpftes oligomeres Skelett bilden, sind die membrangebundenen Mucine über ein lipophiles transmembranes Proteinfragment fest in der Plasmamembran verankert. Alle Mucine zeichnen sich jedoch durch Domänen mit sich wiederholenden Aminosäuresequenzen aus, den sogenannten „tandem repeats“ (variable number of tandem repeats, VNTR).<sup>18</sup>

Obwohl die „tandem repeat“-Domänen der verschiedenen Mucinarten charakteristische Unterschiede aufweisen, denn sie unterscheiden sich in ihrer Zahl, Länge und Aminosäuresequenz, sind sie doch in allen Fällen reich an Prolin, Serin und Threonin. Serin und Threonin stellen außerdem potentielle *O*-Glycosylierungsstellen dar. Im Falle des MUC1 liegen insgesamt fünf solcher Glycosylierungsstellen pro „tandem repeat“-Einheit vor, da hier zwei Serin- und drei Threoninreste vorhanden sind. Je nach Gewebe und Entwicklungsstand der Zelle ändern sich die Positionen und die Anzahl der komplexen, oligomeren Kohlenhydratseitenketten. Für diese Kohlenhydrat-Strukturen existieren insgesamt acht verschiedene Kernstrukturen.<sup>19</sup>

Epitheliales Mucin MUC1<sup>20</sup> wurde als erstes Mucin unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern aus humaner Milch isoliert<sup>21,22</sup> und zählt zu den am besten untersuchten Mucinen. Seine extrazelluläre Domäne ist durch eine wechselnde Anzahl von „tandem repeat“-Domänen, die aus 20 Aminosäuren der Sequenz AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA (Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala) bestehen, gekennzeichnet.<sup>23</sup> Die Anzahl dieser „tandem repeat“-Domänen variiert mit 20 bis 120 Wiederholungseinheiten stark. Grund hierfür ist ein vererbter Polymorphismus des codierenden Genabschnittes.<sup>24</sup>

Aufgrund des hohen Prolinanteils und der großen Anzahl komplexer Kohlenhydratseitenketten (bis zu fünf pro „tandem repeat“-Domäne) nimmt die extrazelluläre Proteindomäne eine starre lang gestreckte Konformation ein, die weit in das Lumen hineinragt.<sup>25</sup> In gesunden Zellen wird MUC1 ausschließlich auf der apicalen Seite exprimiert, wohingegen diese Polarisation in malignen Zellen verloren geht und das Protein auf der gesamten Zelloberfläche in erhöhter Weise exprimiert wird. Zusätzlich zu dieser Überexpression treten charakteristisch veränderte Kohlenhydratstrukturen auf, die aus fehlerhaften Aktivitäten verschiedener Glycosyltransferasen resultieren.<sup>26</sup>

Die verzweigten Kohlenhydratseitenketten, die bei gesunden Zellen auftreten, werden aus *N*-Acetylgalactosamin, Fucose, Galactose, *N*-Glucosamin und *N*-Acetylneuraminsäure gebildet. Hierbei führt die Addition von *N*-Acetylgalactosamin an Serin oder Threonin im Golgi-Apparat zunächst zur Bildung des sogenannten T<sub>N</sub>-Antigens. Eine weitergehende Glycosylierung in den Positionen C-3 und C-6 führt zur Ausbildung der verschiedenen Kernstrukturen und durch schrittweise Verlängerung der Saccharidseitenketten schließlich zu den komplexen *N*-Acetylglucosaminketten. Das bedeutet nun, dass in gesunden Zellen auf der Core2-Einheit (einer Kerneinheit) basierende Oligosaccharidstrukturen vorliegen, welche das Peptidrückgrat effektiv umhüllen.<sup>27</sup> Im Fall maligner Zellen kommt es dagegen, aufgrund einer stark verminderten Aktivität der  $\beta$ -(1,6)-Glucosamintransferase zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Bildung von komplexen auf der Core2-Struktur basierenden Oligosacchariden. Gleichzeitig werden die galactosespezifische  $\alpha$ -3-Sialyltransferase und mehrere GalNAc-spezifische  $\beta$ -6-Sialyltransferasen überexprimiert und bewirken so an der akkumulierenden Core1-Struktur (dem T-Antigen) eine vorzeitige Sialylierung (STN- und ST-Antigene). Diese Sialylierung verhindert ein weiteres Wachstum der Glycanketten<sup>28</sup>.

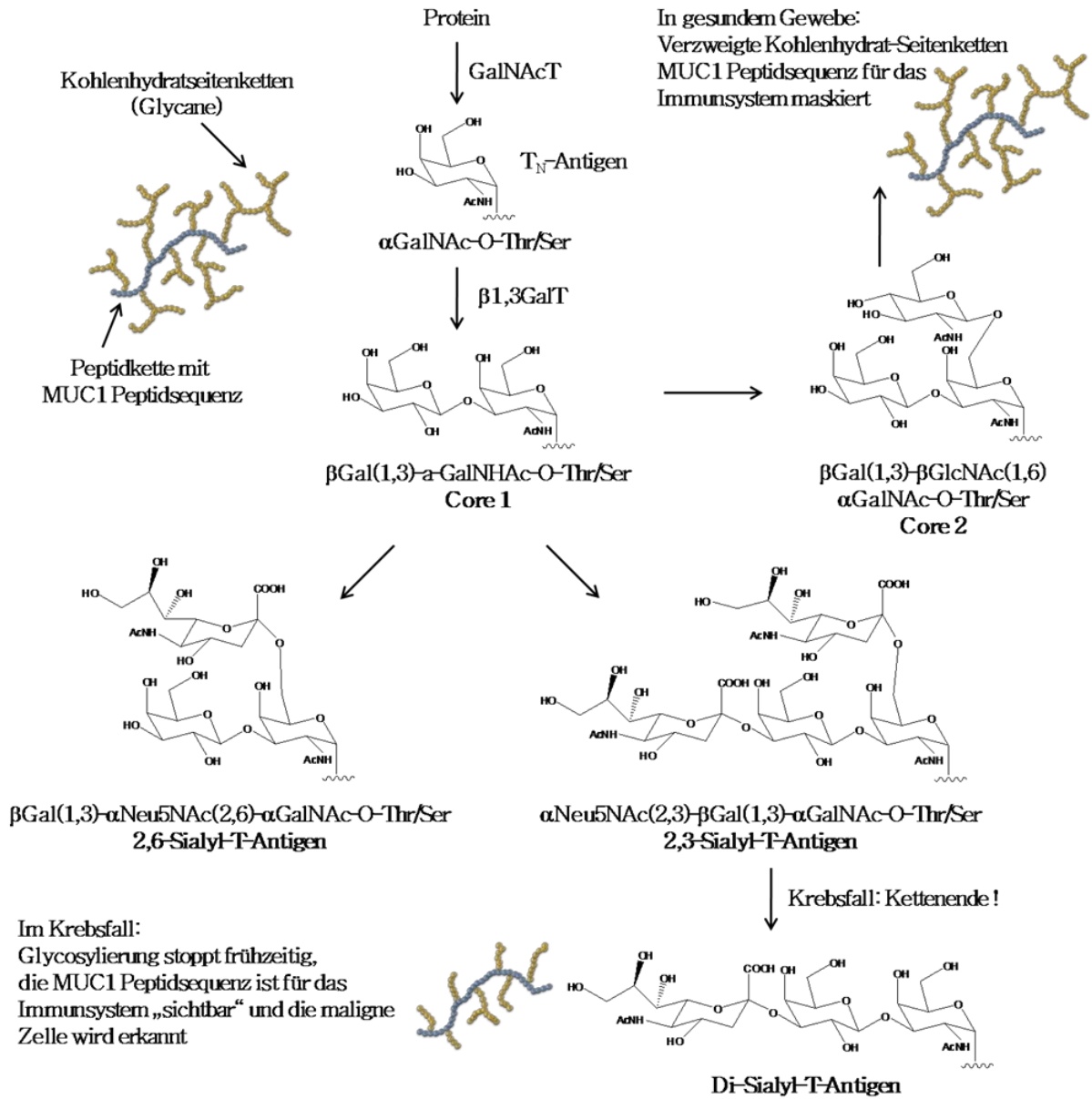


Abbildung 1: Biosynthese von O-Glycanen.

Vereinfacht ausgedrückt ist die „tandem repeat“-Domäne des MUC1 im gesunden Gewebe durch die verzweigten Kohlenhydrat-Seitenketten für das Immunsystem maskiert, während die im malignen Gewebe verkürzten Kohlenhydrat-Seitenketten diesen Effekt nicht haben, so dass die Zelle aufgrund der Erkennung der „tandem repeat“-Domäne des MUC1 als Krebszelle erkannt werden kann. Die Abbildung 1 gibt das eben Geschilderte schematisch wieder.

Auftretende Abweichungen in den Oberflächenstrukturen maligner Zellen betreffen darüber hinaus auch die Zahl der Glycanketten. Während diese in normalem Brustgewebe

durchschnittlich bei etwa 2,5 pro „tandem repeat“-Einheit liegen, scheinen in entsprechenden Tumorgewebe durchschnittlich alle fünf potentiellen Glycosylierungsstellen belegt zu sein.

### 1.3 Krebsvakzine

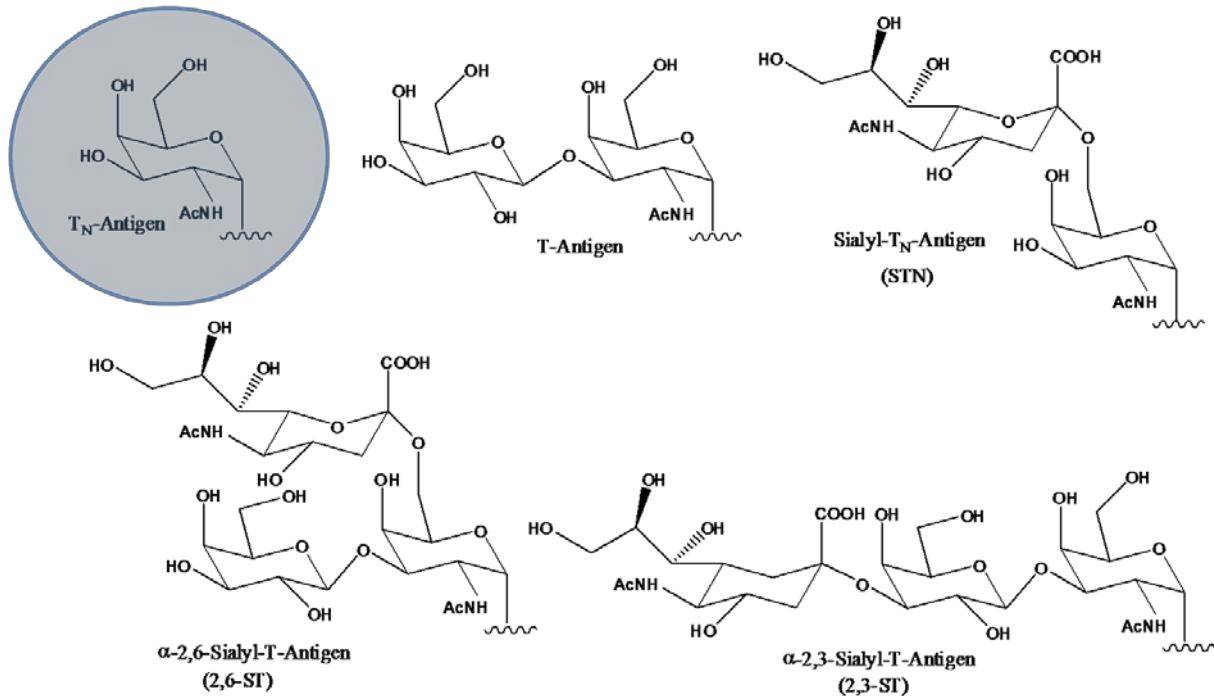
Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits erwähnt, dass sich die Glycosylierungsmuster der Zelloberflächen normaler Zellen stark von denen maligner Zellen unterscheiden, so dass diese abweichenden Strukturen einen Erfolg versprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung effizienter, auf Kohlenhydraten basierender Krebsvakzine darstellen.<sup>29,30,31,32</sup> Des Weiteren führt das Auftreten der zuvor beschriebenen verkürzten Glycanketten zu einer ungenügenden Maskierung des Peptidgerüsts und damit zur Freilegung neuer tumorspezifischer Peptidpitope, die nun ebenfalls vom Immunsystem erkannt werden können. So stellt beispielsweise die in den „tandem repeat“-Domänen von MUC1 auftretende Peptidsequenz PDTRPAP ein bevorzugtes Bindungsmotiv für verschiedene monoklonale Antikörper dar.<sup>33,34</sup> Leider ist das menschliche Immunsystem aufgrund immunsuppressiver Mechanismen des Tumors in aller Regel nicht oder nur eingeschränkt in der Lage, MUC1 exprimierende Krebszellen anzugreifen.<sup>35</sup> Der Grad der MUC1-Expression und das verstärkte Auftreten der tumorassoziierten Zellen lassen sich daher häufig mit einem aggressiven Vorschreiten der Krankheit und einer deutlich verringerten Heilungschance des Patienten korrelieren.<sup>36</sup>

Die Tumorimmuntherapie ermöglicht nun eine Krebsbehandlung, da hier theoretisch die auf den Krebszellen auftretenden spezifischen Antigenstrukturen nicht nur vom Immunsystem erkannt werden, sondern auch eine starke Immunantwort nach sich ziehen können. Im Idealfall sollte dabei eine robuste T-Helferzell-vermittelte Antikörperproduktion induziert und gleichzeitig eine starke cytotoxische T-Zellantwort initiiert werden.

Also besteht die Herausforderung darin, geeignete Vakzinkandidaten zu identifizieren, synthetisch herzustellen und dem Immunsystem in geeigneter Form zu präsentieren. Diese müssen sowohl den zellulären als auch den humoralen Arm des Immunsystems ansteuern, um einen Erfolg zu versprechen. In den letzten Jahren wurden dazu eine Vielzahl unterschiedlicher Glykokonjugate synthetisiert und immunologischen Studien unterzogen,<sup>37,38,39</sup> wobei neben den mucinanalogen T<sub>N</sub>-, T-, ST<sub>N</sub>- und ST-Antigenen selbst auch komplexere Saccharidstrukturen zum Einsatz kamen.

Da die Immunogenität der tumorassoziierten Oberflächen-Antigenstrukturen von den Kohlenhydratseitenketten (Abbildung 1) und den neoantigenen Peptidpitopen beeinflusst

wird, sollte eine Kombination aus diesen beiden Elemente in Form definierter synthetischer Partialstrukturen von tumorassoziierten Glycoproteinen einen besonders vielversprechenden Weg in der Entwicklung von Krebsimpfstoffen darstellen.

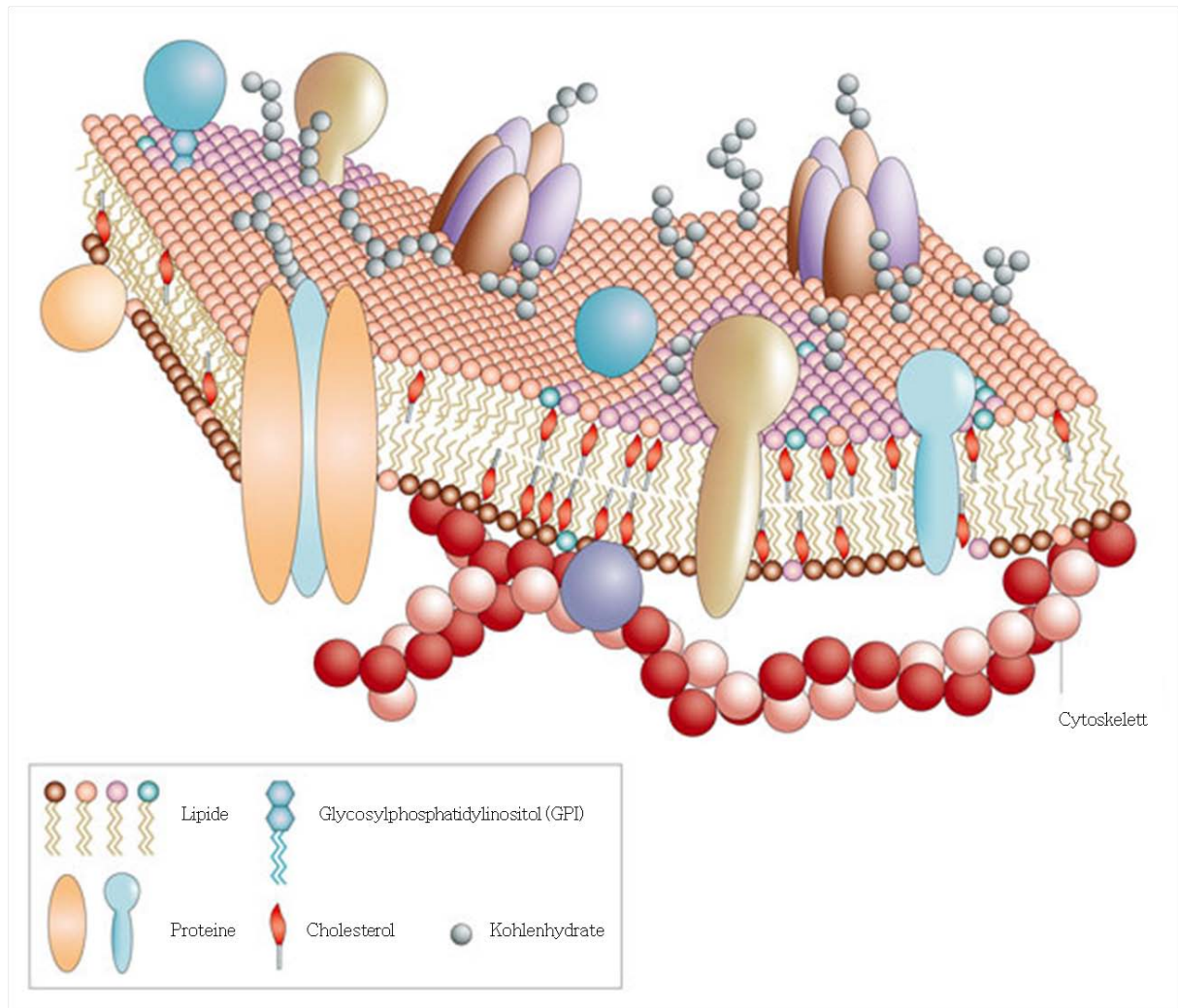


**Abbildung 2:** Übersicht über tumorassoziierte Kohlenhydrat Antigene.

Von hoher Immunogenität sind in der Regel partikelförmige oder aggregierte Proteine, da diese besonders leicht in die antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird das in Abbildung 2 blau markierte T<sub>N</sub>-Antigen und die zuvor erwähnte „tandem repeat“-Domäne des MUC1 von besonderer Bedeutung sein. Bilden diese beiden Funktionen die Kopfgruppe eines Lipides, so können solche Lipide in eine Membran, z.B. in einem unilamellaren Vesikel, eingebaut werden. Hierbei ist von besonderem Interesse in welcher Weise diese Lipide eingebaut werden - die räumliche Anordnung der Peptidpitope ist ein wichtiger Faktor für die Immunogenität - und ob bzw. wie stark das potentielle Krebsvakzin in dieser Form eine Immunantwort auslösen kann. Ein solches Verständnis erlangt man mit Hilfe verschiedener Modellsysteme, wie z.B. der Langmuir Monoschicht, deren Struktur mittels Brewsterwinkel- und Rasterkraftmikroskopie analysiert werden kann. Darauf wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1.4 Lipide und biologische Modellsysteme

Membranen und Membranmechanik spielen eine essentielle Rolle für lebende Zellen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene. Von wesentlicher Bedeutung sind die Eigenschaften der Zellmembran, z.B. bei der Zellteilung und bei Transportprozessen. Native Zellmembranen bestehen aus einer Vielzahl von Komponenten: Phospholipiden, Sphingolipiden, Glycolipiden, Proteinen, Peptiden und Steroiden, um hier nur die wichtigsten zu nennen. In einer Membran sind die Lipide in einer Doppelschicht angeordnet. Man kann diese Zellmembran nach dem „fluid mosaic model“ von Singer und Nicholson<sup>40</sup> als eine flüssigkristalline Matrix auffassen. In dieser Lipidmatrix herrscht freie laterale Diffusion und Mischbarkeit, analog den Phasen von klassischen Flüssigkristallen, in der die integralen Proteine wie Eisberge in einem zweidimensionalen Lipidmeer schwimmen. Die peripheren Proteine schwimmen wie Eisschollen oben auf. Die Zusammensetzung der Lipide innerhalb dieser Membran bestimmt ihre Funktion und hat maßgeblichen Einfluss auf die Flexibilität und Stabilität der Membran. Die Membran wird durch das Zytoskelett stabilisiert, welches aus Aktinfilamenten besteht und direkt an der Membran verankert ist. In Abbildung 3 ist eine Zellmembran mit einigen Inhaltsstoffen der Membran nach dem „fluid mosaic model“ dargestellt. Das Modell wird heutzutage als nicht mehr ganz korrekt angesehen, da die Lipide keine homogene Phase bilden, sondern Bereiche unterschiedlicher Zusammensetzung (Domänen). Ein heute häufig verwendetes Modell ist das „lipid raft model“.<sup>41,42</sup> Dieses basiert auf der dynamischen Clusterbildung von vornehmlich Sphingolipiden und Cholesterin innerhalb einer fluiden Doppelschicht, wobei man diese Domänen als „lipid rafts“ bezeichnet. Dieses Modell erklärt die angenommenen Funktionen dieser Domänen bzw. Cluster als Plattformen für vielfältige Abläufe wie z.B. die Anlagerung von Proteinen während der Signalweitergabe deutlich besser.<sup>43</sup> Zur vereinfachten Darstellung einer Zellmembran eignen sich jedoch beide Modelle.

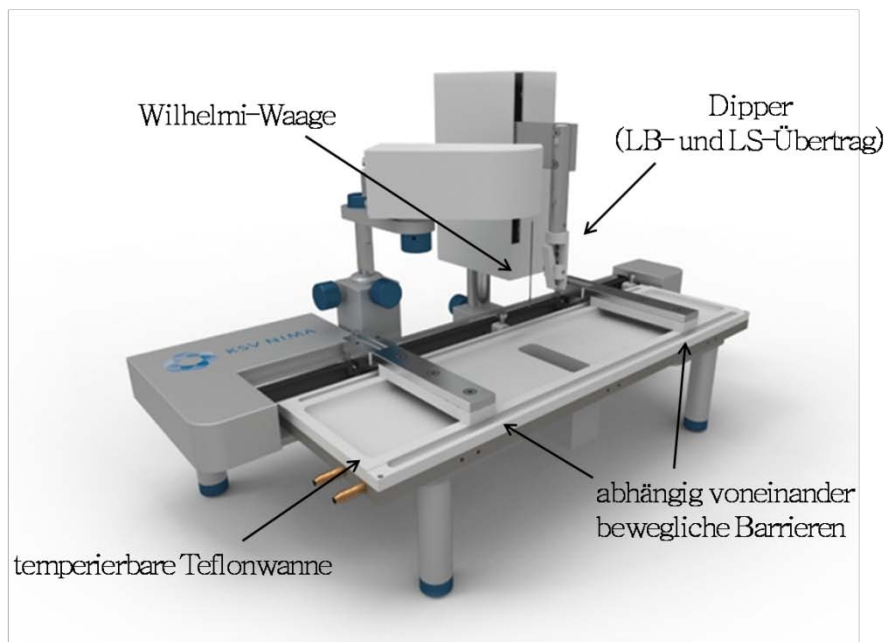


**Abbildung 3:** „Fluid mosaic model“ der Zellmembran nach Singer und Nicholson.<sup>44</sup>

Das lebende System ist zu komplex, um ein allumfassendes Verständnis von einzelnen Vorgängen innerhalb einer Membran zu erlangen oder den Einfluss einzelner Komponenten auf die Membran zu bestimmen. Aus diesem Grund werden häufig Modellsysteme verwendet, um einzelne physikalische Phänomene detailliert zu beschreiben, die in ihrer Gesamtheit dann zum realen biologischen Objekt führen können. Neben der Langmuir-Monoschicht, welche im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben wird, gehören die schwarzen Lipidmembranen<sup>9</sup> (BLM = black lipid membrane), Vesikel<sup>10,11</sup>, und Festkörperunterstützte Membranen zu den wichtigsten Modellsystemen, wobei letztere entweder durch Spreiten von Vesikeln oder durch Langmuir-Blodgett-Techniken erzeugt werden.<sup>45,46</sup>

## 1.5 Langmuir-Blodgett Technik

Die Langmuir-Blodgett-Technik wurde bereits im Jahr 1918 von dem späteren Nobelpreisträger Irving Langmuir entwickelt und später von Kathrine Blodgett weiterentwickelt. Das Prinzip ist folgendes: Ein Teflontrog wird mit einer Subphase gefüllt, bei der es sich häufig um Reinstwasser, oft aber auch, gerade bei biologischen Fragestellungen, um Pufferlösungen handelt. Auf Höhe der Wasseroberfläche befinden sich ein oder zwei bewegliche Barrieren, die abhängig oder unabhängig voneinander bewegt werden können. Weiter besitzt die Apparatur einen Sensor, der die Oberflächenspannung misst, die so genannte Wilhelmi-Waage. In Abbildung 4 ist ein Langmuir-Blodgett Trog schematisch dargestellt.

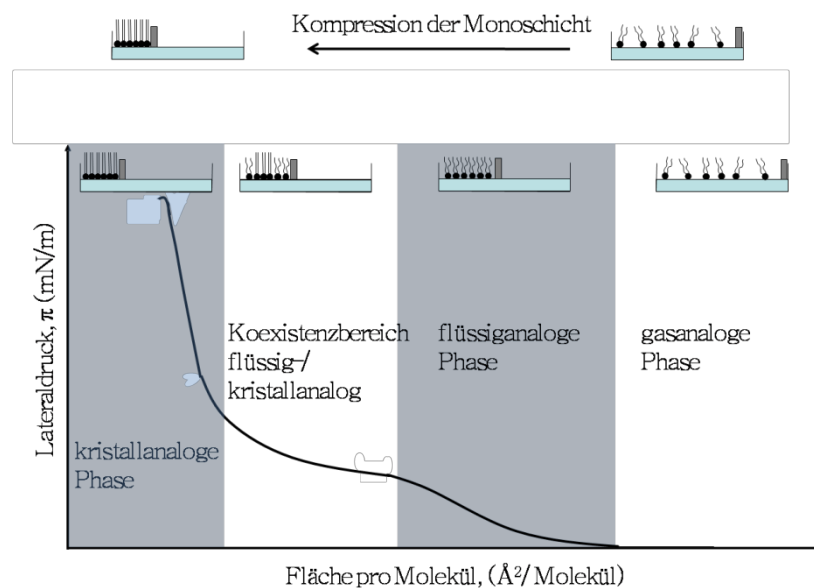


**Abbildung 4:** Langmuir-Blodgett Trog mit charakteristischen Teilen.<sup>47</sup>

Durch vorsichtiges Aufbringen (Spreiten) einer sehr verdünnten Lipidlösung auf die Oberfläche der Subphase entsteht nach Verdunsten oder Abtauchen des organischen Lösungsmittels in die Subphase eine monomolekulare Molekülschicht. Die amphiphilen Moleküle richten sich derart aus, dass der hydrophile Kopf in die Subphase weist, während der hydrophobe Schwanz in die Luft weist. Durch Zusammenfahren der Barrieren wird diese Monoschicht komprimiert und der Lateraldruck mittels Drucksensor in Abhängigkeit von der Fläche zwischen den Barrieren gemessen. Da bei dieser Messung die Temperatur konstant gehalten wird, spricht man bei der Auftragung von Lateraldruck gegen Fläche von einer

Isothermen ( $\pi$ -A Isotherme), wobei die Fläche hier auf die absolute Molekülzahl normiert wird (Abbildung 5).

Die  $\pi$ -A Isothermen oder auch Schub-Flächen-Diagramme besitzen einen charakteristischen Verlauf für ein bestimmtes Amphiphil. Bei großer Fläche und genügend niedriger Lipidkonzentration erkennt man einen Lateraldruck von null. Hier beeinflussen sich die Moleküle praktisch nicht, in Analogie zu dem dreidimensionalen Fall des idealen Gas, weshalb man hier von einer gasanalogen Phase spricht.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung einer  $\pi$ -A Isotherme.

Wenn die Barrieren nun weiter zusammen fahren und somit die Fläche weiter verkleinert wird, gelangt man in einen Zustand, der einer Flüssigkeit ähnelt. Die Moleküle wechselwirken bereits miteinander, besitzen aber keinerlei Fernordnung. Hierbei handelt es sich um den flüssiganalogen Bereich, der durch einen leichten Druckanstieg gekennzeichnet ist. Wenn man die Fläche weiter reduziert, gelangt man in einen Bereich, in dem die Moleküle dicht gepackt sind, wie es für einen Kristall typisch ist, weshalb man hier von einer kristallanalogen bzw. festanalogen Phase spricht. Für diesen Bereich charakteristisch ist ein starker Anstieg des Lateraldrucks bei geringer Flächenabnahme. Genau wie dreidimensionale Kristalle in verschiedenen Modifikationen vorliegen können, so kann auch der kristallanaloge Bereich im Zweidimensionalen mehr als nur eine kristallanaloge Form annehmen. In diesem Fall tritt ein Knick im steilen Bereich der Isotherme auf, der ein andersartiges Packen der Amphiphile indiziert. Dieses veränderte Kristallisationsverhalten geht in aller Regel mit einem veränderten Tiltwinkel (also dem Winkel zwischen Wasseroberfläche und Alkylkette des

Amphiphils) des Lipids einher. Häufig besitzen Amphiphile, insbesondere dann, wenn sie über eine große Kopfgruppe mit Spacer verfügen, noch einen zusätzlichen Zustand, welcher zwischen flüssiganalog und kristallanalog auftritt. In diesem Fall steigt der Lateraldruck in der  $\pi$ -A Isotherme trotz Flächenreduzierung praktisch nicht an, so dass sich ein Plateau ausbilden kann. Hier kristallisieren erste Domänen des Lipids aus und liegen in einer flüssiganalogen Matrix vor, weshalb man vom flüssig-/ kristallanalogen Koexistenzbereich spricht. In diesem Koexistenzbereich kristallisieren die Moleküle langsam aus. Charakteristisch für ein jedes Lipid ist schließlich der Punkt, an dem keine weitere Druckzunahme, sondern eine drastische Druckabnahme trotz weiterer Kompression der Monoschicht zu beobachten ist und die Isotherme kollabiert. Hier wird der monomolekulare Film gebrochen und die Lipide tauchen entweder ab oder schieben sich übereinander. Diesen charakteristischen Punkt bezeichnet man als Kollapsunkt (mit der dazu gehörenden Kollapsfläche und dem zugehörigen Kollapsdruck). Bevor der Kollapsunkt erreicht ist, ist das Lipid dichtest möglich gepackt und besitzt seinen minimalen Flächenbedarf. Die in Abbildung 5 gezeigte  $\pi$ -A Isotherme ist die eines Amphiphils, welches ein Koexistenzplateau zeigt.

Unter Umständen kann man auch das Phasenverhalten von Polymeren anhand ihrer  $\pi$ -A Isothermen untersuchen. Denn im Prinzip kann auch ein Polymer als Amphiphil wirken, je nachdem aus welchen Monomeren das Polymer aufgebaut ist und wie diese Monomereinheiten angeordnet sind. So zeigte sich, dass sich das Phasenverhalten eines N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA) Blockcopolymers deutlich von dem des zugehörigen statistischen Copolymers unterschied.<sup>48</sup> Denn natürlich fungiert das Blockcopolymer hier als echtes Amphiphil, wohingegen sich die hydrophilen und hydrophoben Einheiten beim statistischen Copolymer auf das ganze Polymerrückgrat verteilen. So war der Flächenbedarf im Falle des Blockcopolymers deutlich kleiner und die flüssiganaloga Phase deutlich weniger ausgeprägt als im Falle des statistischen Copolymers.

## 1.6 Binäre Monoschichten

Komprimiert man eine Lipidmonoschicht, dann kristallisieren bei einem bestimmten Lateraldruck festanaloge Domänen aus der flüssiganalogen Phase. Dieser Vorgang ist analog zu dem Kristallisationsprozess eines dreidimensionalen Kristalls aus einer Lösung. Besteht die Monoschicht nun aus verschiedenen Lipiden, kann dies zu einer Phasenseparation führen, wobei sich Kristalle bilden, die mehrheitlich aus einer Komponente bestehen, und von einer

flüssiganalogen Phase umgeben sind, die aus anderen Lipiden besteht.<sup>49,50,51</sup> Auf diese Weise ist es möglich räumlich aufgelöste zweidimensionale Muster zu erzeugen, wobei die verschiedenen Bereiche dann natürlich auch über unterschiedliche Kopfgruppen verfügen können. Die Möglichkeit einer kontrollierten Phasenseparation, besonders im Hinblick auf eine Kontrolle der Domänengröße, ist aus biologischer Sicht von großem Interesse, denn es ist bekannt, dass für die zelluläre Immunantwort die Clusterbildung der Bindungs epitope für die Selektin-Ligand Wechselwirkung eine entscheidende Voraussetzung ist. Dies gilt zum Beispiel für das Selektin induzierte Leukocytenrollen entlang des Endotheliums, was ein wesentlicher Schritt in der Immunantwort ist. Bendas et al. konnten zeigen, dass die Größe der selektinenthaltenden Domänen während der Phasenseparation den Beginn des Zellrollens maßgeblich bestimmt.<sup>52</sup> Hier wurden Domänen präpariert, die das Glycopeptid sialyl Lewis X (sLeX) als Bindungs epitop enthielten. Aber auch im Fall weniger komplexer Glycopeptide, die zum Beispiel ein T<sub>N</sub>-Antigen (GalNAc) tragen, wird angenommen, dass die Domänen- bzw. Clusterbildung einen Einfluss auf den Erkennungsprozess hat.

Um nun die Domänenformation beeinflussen zu können, ist es entscheidend zu wissen, welche Faktoren diese beeinflussen. Im Fall reiner Fettsäuren ist bei einem Kettenunterschied von ein bis zwei Kohlenstoffatomen eine vollständige Mischbarkeit zu erwarten. Beträgt der Unterschied acht oder mehr Kohlenstoffatome werden die Fettsäuren vollständig entmischen. Die Entmischung beruht darauf, dass die eine Komponente noch ein flüssiganalogen Verhalten aufweist, während die andere bereits im kristallanalogen Bereich ist und somit schon auskristallisiert. Ein Beispiel hierfür ist das Mischsystem Palmitinsäure (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COOH) / Lignorinsäure (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>22</sub>COOH), welches vollständige Entmischung zeigt.<sup>53,54</sup>

Diese Faustregel besitzt jedoch nur für Moleküle mit gleicher Kopfgruppe Gültigkeit. Betrachtet man hingegen ein System, bei dem die Kopfgruppen einerseits ein Amin und andererseits eine Carbonsäure enthalten, dann ist auf Grund von Wasserstoffbrückenbindungen eine Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen zu erwarten. Generell gilt, dass die Kopfgruppen bzw. deren chemische Struktur einen bedeutenden Einfluss auf das Mischungsverhalten besitzen.

Eine weitere Möglichkeit eine Phasenseparation zwischen verschiedenen Lipiden zu erreichen ist die Verwendung von Systemen aus nichtfluorierten und fluorierten Verbindungen. Denn es ist bekannt, dass fluorierte Lipide eine starke Entmischungstendenz gegenüber Lipiden mit Kohlenwasserstoffketten aufweisen.<sup>55,56,57,58</sup> Verantwortlich für das Verhalten der Fluorketten sind die Eigenschaften des Fluors. Es besitzt eine hohes Ionisierungspotential, eine starke

Elektronegativität und eine Größe, die über der des Wasserstoffatoms liegt und vergleichbar mit der des Sauerstoffs ist, wenn die Polarisierbarkeit hier auch geringer ist. Diese Eigenschaften sind auch der Grund für eine geringere Metabilisierbarkeit fluorierter Verbindungen. Fluorketten unterscheiden sich in ihrem Verhalten in vielerlei Hinsicht von Kohlenwasserstoffketten.<sup>59,60,61,62</sup> Fluorketten sind viel sperriger als Kohlenwasserstoffketten, denn sie besitzen mit 27-30 Å<sup>2</sup> eine deutlich größere Querschnittsfläche als die nichtfluorierten Ketten mit 19-21 Å<sup>2</sup>. Hierbei hängt die tatsächliche Querschnittsfläche von der jeweiligen Packung der Fluorketten untereinander ab. Generell gilt, dass Fluorketten einen höheren Flächenbedarf haben, auch bei niedrigen Lateraldrücken, was ein maßgeblicher Grund für ihre Hydrophobizität<sup>63,64</sup> und Oberflächenaktivität ist. Diese erhöhten sterischen Anforderungen sind auch der Grund warum sie deutlich starrer sind als Kohlenwasserstoffketten. Deswegen tendieren Fluorketten unter Standardbedingungen auch eher zu einer *all-trans* helikalen Konformation als zu einer planaren.<sup>65,66</sup> Die Freiheit, verschiedene Konformationen einzunehmen, ist also gegenüber den Kohlenwasserstoffketten deutlich reduziert. Die oben angesprochenen Faktoren sorgen dafür, dass sich die Kohäsionskräfte der Fluorketten deutlich von denen der Kohlenwasserstoffketten unterscheiden, was dazu führt, dass das Mischungsverhalten solcher Verbindungen häufig stark vom idealen Verhalten abweicht.<sup>67,68,69</sup> Zusammenfassend kann man sagen, dass Mischungen aus Fluor- und Kohlenwasserstoffketten zu einer Phasenseparation tendieren, was zur Bildung von Domänen im Mikro- und Nanometerbereich in Lösungen, Monoschichten, Membranen und Kolloiden führt. Darüber hinaus zeigen Doppelschichten (Membranen) aus Fluorketten eine deutlich höhere Temperaturstabilität, so dass sie sogar eine Hitzesterilisation ihrer Liposomen erlauben.<sup>70</sup>

Um ein gut strukturiertes Domänenmuster zu erhalten, ist es entscheidend, dass der Entmischungsprozess von einer homogenen flüssiganalogen Phase ausgeht. Andernfalls, das heißt falls die Entmischung schon in der flüssiganalogen Phase beginnt, würden sehr große Kristalle entstehen und die Möglichkeit der strukturellen Kontrolle wäre nicht mehr gegeben. Im Hinblick darauf kann eine Mischung aus fluorierten und nicht fluorierten Lipiden problematisch sein, da die Entmischungstendenz dann sehr groß ist und somit schon die flüssiganaloge Phase inhomogen sein kann. Aus diesem Grund sind Mischung aus teilfluorierten Lipiden und Lipiden mit Kohlenwasserstoffketten interessant, da hier die Entmischungstendenz deutlich weniger ausgeprägt ist.

Ob und in welcher Form ein Entmischungsverhalten in binären Monoschichten vorliegt, ist unter Umständen bereits durch einfache Untersuchungen der  $\pi$ -A Isothermen (Schub-Flächen-

Diagramme) zu erkennen. In Analogie zur physikalischen Betrachtung dreidimensionaler Mischsysteme gilt für ideal mischbare bzw. unmischbare Systeme ein additives Gesetz.<sup>71</sup> Die theoretischen Grundlagen hierfür stammen aus dem Jahr 1966 und wurden von Gains entwickelt. Danach entspricht der von der Mischung benötigte Platzbedarf der Summe des jeweils von den reinen Verbindungen benötigten Raumes (bei gleichem Lateraldruck), wobei natürlich auf die absoluten Teilchenzahlen gewichtet werden muss.

Es gilt also:

$$A_{12} = N_1 A_1 + N_2 A_2,$$

wobei  $A_{12}$  Platzbedarf des Mischsystems,  $N_{1,2}$  Teilchenzahl der Komponente 1 bzw. 2 im Mischsystem,  $A_{1,2}$  Platzbedarf der reinen Komponente 1 bzw. 2 bedeutet.

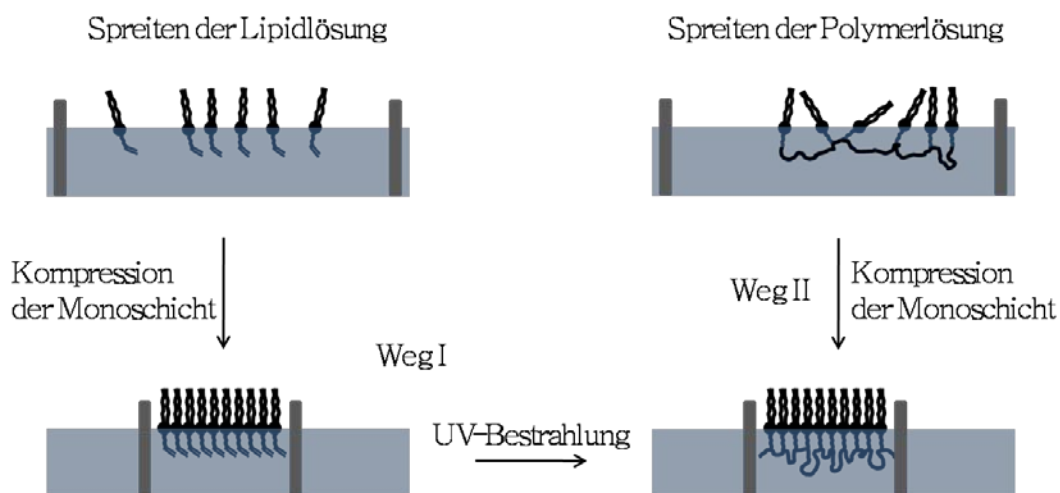
Falls dieses Gesetz erfüllt ist, handelt es sich um eine vollständige ideale Mischung oder eine vollständige ideale Separation. Bei Abweichungen ist auf Wechselwirkungen der Amphiphile untereinander zu schließen, welche eventuell auf Grund der  $\pi$ -A Isothermen (Schub-Flächen-Diagramm) gedeutet werden können. Das zuvor erwähnte System Palmitin-/ Lignorinsäure ist ein Beispiel für eine vollständige Separation. Die obige Gleichung wird in diesem Fall über den kompletten Lateraldruckbereich erfüllt. Durch Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop, nach Langmuir-Blodgett-Überträgen auf z.B. Glimmer (Mica), und durch Untersuchungen mit Hilfe der Brewsterwinkel- bzw. Fluoreszenzmikroskopie lassen sich solche Mischungsphänomene belegen. Im folgenden Kapitel wird die Möglichkeit der Stabilisierung solcher binären Mischungen diskutiert.

### 1.7 Stabilisierung durch Polymerisation

Wenn in einer binären Mischung entweder das Lipid, das in der kristallanalogen Phase Domänen bildet, oder das Lipid, das in der flüssiganalogen Phase verbleibt, über eine polymerisierbare Gruppe verfügt, ist es möglich die gebildeten Domänen zu stabilisieren und zu fixieren.<sup>72</sup> Hierbei gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, nämlich die Polymerisation vor und nach der Orientierung der Lipide innerhalb der Monoschicht. Diese Methode ist effektiv und gut durchführbar. Anschließend sind die zuvor gebildeten Domänen nicht länger abhängig von äußeren Parametern wie zum Beispiel dem Lateraldruck. Als Alternative zu einer klassischen Polymerisation ist auch die Polykondensation von Lipidmolekülen möglich.<sup>73,74</sup> Außer durch derartige kovalente Verknüpfungen von Lipidmolekülen können

Lipiddoppelschichten auch durch nichtkovalente Bindung von Polymeren an die Membranoberfläche stabilisiert werden.<sup>75</sup> Eine Methode, um eine Stabilisierung ohne Beteiligung von Polymeren zu erreichen, basiert auf dem Einbau von membrandurchspannenden Lipiden in die Lipidmembran.<sup>76</sup>

Zum Aufbau geordneter polymerisierter Modellmembranen existieren zwei Wege. Zum einen können aus polymerisierbaren Amphiphilen zunächst geordnete, monomere Modellmembranen aufgebaut werden, die dann in polymerisierte Modellmembranen überführt werden (Weg I). Die Einführung einer Spacergruppe zur Entkopplung der ungeordneten Polymerkette von der geordneten Membran oder aber die Verwendung oligomerer Amphiphiler ermöglichen zum anderen den Aufbau von Membranen aus präpolymerisierten Amphiphilen (Weg II). Dies veranschaulicht schematisch Abbildung 6. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der erste Weg beschritten, da es auf diesem Wege möglich wird ein Entmischung (vor der Polymerisation) zu realisieren und die auftretenden Strukturen anschließend photochemisch zu fixieren.



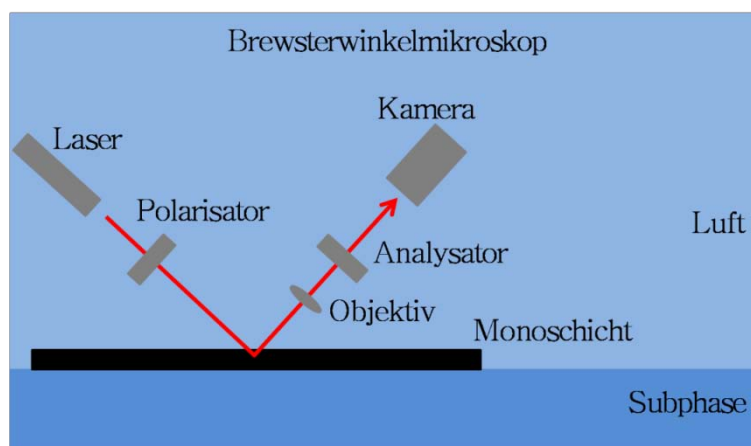
**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der beiden möglichen Wege, um durch Polymerisation stabilisierte Monoschichten darzustellen.

Bei der photochemischen Polymerisation (Weg I) auf dem Langmuir-Blodgett Trog lassen sich erneut zwei Möglichkeiten unterscheiden. Zum einen können die Monoschichten in der hydrophilen Kopfgruppe polymerisiert werden, zum anderen lassen sich Amphiphile spreiten, die im Bereich der hydrophoben Alkylkette polymerisiert werden können. Als Beispiel für die Polymerisation in der hydrophilen Kopfgruppe lassen sich die Acrylate nennen. Dazu zählt auch das in dieser Arbeit verwendete Lipid **1**. Im Bereich der Alkylkette lassen sich zum Beispiel die Diacetylene sehr gut polymerisieren. Wobei die Monoschichten auf einem

Langmuir-Blodgett Trog hier ideale Voraussetzungen für eine topochemische Polymerisation bieten, da hier die notwendige Vororientierung der Lipide leicht zu bewerkstelligen ist. Ein Vertreter dieser Diacetylene ist die bekannte *10,12*-Pentacosadiinsäure (Lipid **2**), welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird. Boons et al. konnten bereits zeigen, dass die Polymerisation eines Glycopeptides mittels topochemischer Polymerisation möglich war, wobei es sich bei dem Lipidanker, also dem Molekülteil, der das voluminöse Glycopeptid in der Membran verankert, um die *10,12*-Pentacosadiinsäure handelte.<sup>77</sup>

### 1.8 Brewsterwinkelmikroskopie

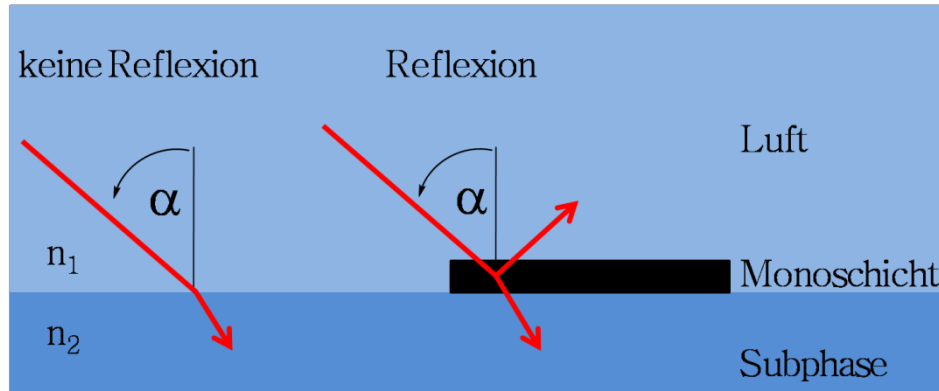
Mit Hilfe dieser Methode (BAM = brewster angle microscopy) kann die Morphologie von Oberflächenfilmen an der Grenzfläche Wasser/ Luft sichtbar gemacht werden. Die Brewsterwinkelmikroskopie liefert unter Berücksichtigung von Brechungsindex, Dicke und Anisotropie detaillierte Informationen über die Eigenschaften von Monofilmen wie Homogenität, Defekte, Orientierung, Größe und Morphologie von Domänen. Weiterhin können Prozesse wie Phasenübergänge, das Wachstum von Domänen und die Adsorption aus der Subphase untersucht und charakterisiert werden. Der Aufbau des verwendeten Brewsterwinkelmikroskops ist in Abbildung 7 wiedergegeben.



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau des verwendeten Brewsterwinkelmikroskops.

Das in dieser Arbeit verwendete Brewsterwinkelmikroskop ist ein EP3 BAM der Firma Nanofilm (Göttingen), das auf einem Langmuir-Blodgett Trog (Nima, Typ 601 BAM) montiert ist. Als Lichtquelle dient ein 50 mW Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm. Der

reflektierte Strahl wird von einer Kamera erfasst. Die laterale Auflösung beträgt etwa  $2 \mu\text{m}$ , wobei die Aufnahmen eine Größe von  $500 \times 400 \mu\text{m}$  haben und mit einem 10-fach Objektiv (Nikon) aufgenommen werden.



**Abbildung 8:** Lichtreflexion unter Brewsterbedingung. Links eine reine Wasseroberfläche, rechts eine mit einer Monoschicht bedeckte Oberfläche.

Die Brewsterwinkelmikroskopie basiert auf lateralen Unterschieden des Brechungsindex bzw. der Dicke eines Films an der Grenzfläche zweier transparenter Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Der Brewsterwinkel gibt dabei den Winkel an, bei dem von einfallendem, unpolarisiertem Licht nur die senkrecht zur Einfallsebene (d. h. parallel zur Grenzfläche) polarisierten Anteile reflektiert werden. Das reflektierte Licht ist dann linear polarisiert, weshalb man den Brewsterwinkel auch Polarisationswinkel nennt. Für Licht mit einer Polarisation parallel zur Einfallsebene (d. h. senkrecht zur Grenzfläche), welches mit dem Brewsterwinkel einfällt, entfällt also die Reflexion. Der Brewsterwinkel  $\alpha_B$  wird durch die Brechungsindices der beiden Phasen  $n_1$  und  $n_2$  bestimmt<sup>78,79</sup>:

$$\tan \alpha_B = \frac{n_2}{n_1}$$

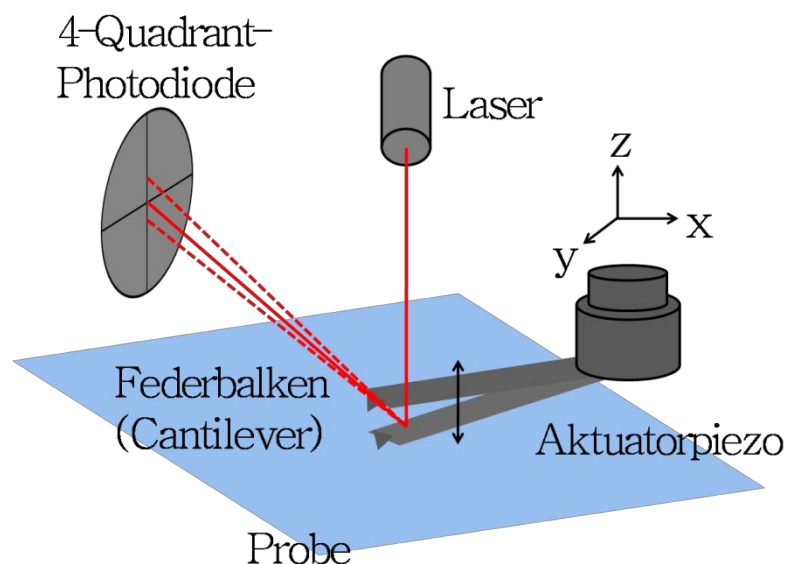
Für die Grenzfläche zwischen Luft ( $n_1 = 1$ ) und Wasser ( $n_2 = 1,33$ ) ergibt sich bei  $20^\circ\text{C}$  ein Brewsterwinkel von  $\alpha = 53,1^\circ$ . Durch die Anwesenheit eines Monofilms auf der Wasseroberfläche ist das Brewster-Gesetz nicht mehr erfüllt, weder an der Luft/ Monoschicht Grenzfläche noch an der Monoschicht/ Wasser Grenzfläche. Dafür treten Reflexe an beiden Grenzflächen auf sowie auch innerhalb der Monoschicht (Abbildung 8). Diese Reflexe überlagern sich und erzeugen ein Signal, welches von einem Sensor, zum Beispiel einer Kamera, detektiert werden kann. Die Intensität der Reflexion hängt nicht nur von der

Filmdicke und deren optischen Eigenschaften ab, sondern auch von den Fluktuationen an der Wasseroberfläche.<sup>80</sup> Für eine typische organische Monoschicht (Schichtdicke etwa 20 Å) ist die Intensität der reflektierten Strahlen im Bereich von  $10^{-6}$  der Intensität des einfallenden Laserstrahls. Dies ist nicht sehr viel, reicht aber aus, um kontrastreiche räumlich aufgelöste Bilder zu erzeugen.<sup>81</sup>

Da die Auflösung des Brewsterwinkelmikroskops bei etwa 2 µm liegt, muss man sich einer anderen Methode bedienen, um auch Strukturen auflösen zu können die kleiner sind. Eine geeignete Methode, um Monoschichten höher aufzulösen ist die Rasterkraftmikroskopie, welche im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

### 1.9 Rasterkraftmikroskopie

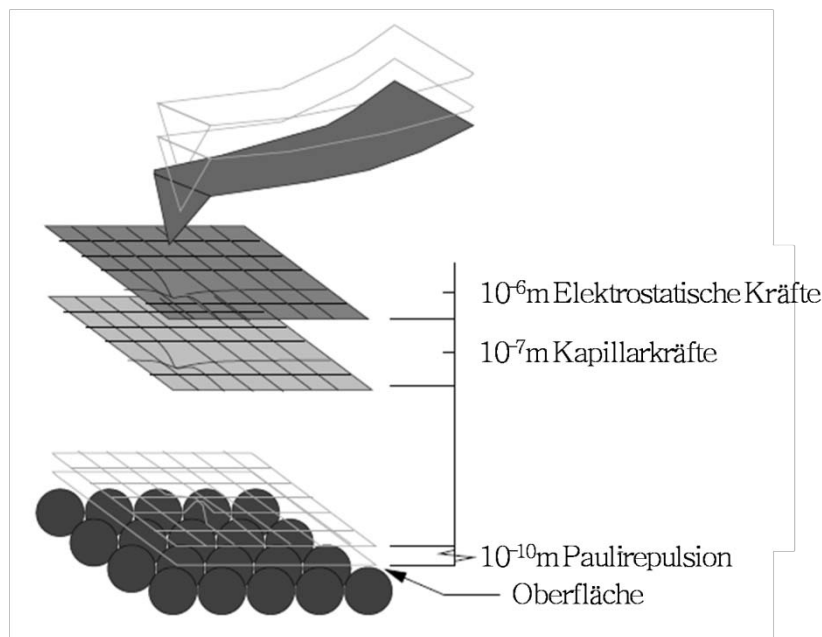
Das erste Rasterkraftmikroskop (AFM = atomic force microscope) wurde 1986 von Binnig und Quate vorgestellt.<sup>82</sup> Gemessen werden Kräfte mit einer Reichweite zwischen  $10^{-10}$  m bis  $10^{-5}$  m (vergleiche Abbildung 10). Das AFM gehört zu den Rastersondenmikroskopen. Die Funktionsweise ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung von Aufbau und Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops (AFM = atomic force microscope)

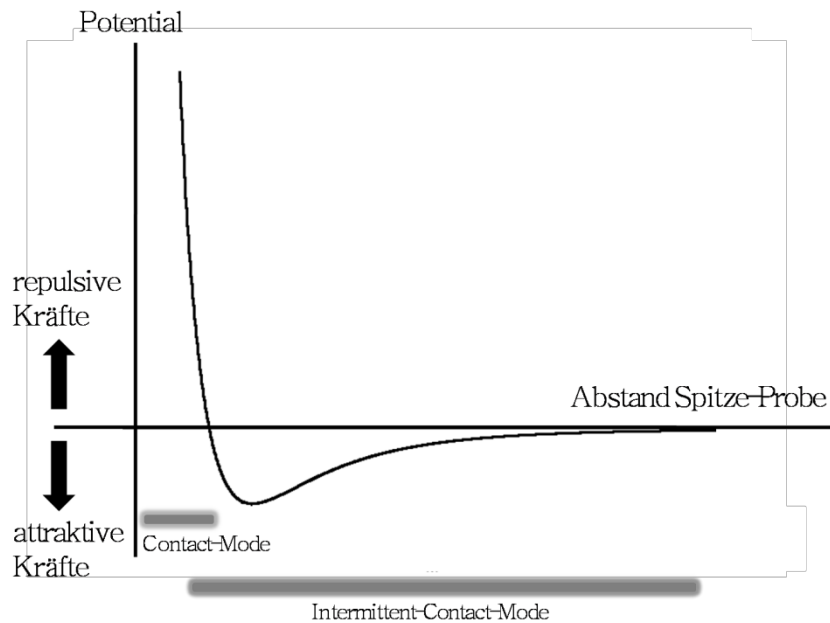
Eine feine Spitze an einem Federbalken (engl. Cantilever) rastert über die Oberfläche einer Probe. Auf der Oberseite des Federbalkens wird ein Laserstrahl reflektiert, der von einer Vier-

Quadrant-Photodiode detektiert wird (Licht-Zeiger-Prinzip<sup>83</sup>). Die Informationen werden mit Hilfe eines Computerprogramms in ein topographisches Bild der Oberfläche umgewandelt, indem Höheninformationen in Graustufen übersetzt werden. Abbildung 10 zeigt einige Kräfte zwischen Spitze und Probe, die in Abhängigkeit des Abstandes zu einer Verbiegung des Cantilevers führen.



**Abbildung 10:** Reichweite einiger Wechselwirkungskräfte zwischen Spitze und Probe.<sup>84</sup>

Elektrostatische Kräfte, Paulirepulsion und Van der Waals Kräfte wirken stets zwischen Spitze und Probe. Bei Messungen in flüssigen Medien kann eine Fluidfilmdämpfung auftreten, und Kapillarkräfte können bei Messungen an Luft durch Kondensation von Wasser zwischen Spitze und Probe entstehen. In Abbildung 11 ist ein Modellpotenzial dargestellt, welches die Arbeitsbereiche der in dieser Arbeit genutzten Betriebsmodi (*contact mode* und *intermittent contact mode*, auch als *tapping mode* bezeichnet) zeigt. Bei dem unter anderem für diese Arbeit verwendeten Mikroskop, dem MFP-3D der Firma Asylum Research, kommt anstatt eines herkömmlichen Röhrenpiezos ein System von Aktuatorpiezos zum Einsatz, welches alle drei Raumrichtungen getrennt ansteuert, da die drei Raumrichtungen besser voneinander entkoppelt sind. Dieses System wird „nano positioning system“ genannt.



**Abbildung 11:** Das Wechselwirkungspotential als Funktion des Abstands zwischen Spitze und Probe. Zusätzlich sind die Arbeitsbereiche zweier Betriebsmodi skizziert.

Die Entkopplung der drei Raumrichtungen führt zu einer hohen Genauigkeit bei der Positionierung des Cantilevers. Zusätzlich wird die Position in allen drei Raumrichtungen kontrolliert und mittels einer „closed loop“ Steuerung korrigiert. Durch dieses System werden auch störende Effekte der Piezokeramiken beseitigt. Im Folgenden werden verschiedene Betriebsmodi vorgestellt.

### 1.9.1 Contact mode im constant force Betrieb

Im *contact mode* steht die Spitze in ständigem Kontakt mit der Probe. Die Verbiegung (engl. deflection) wird konstant gehalten. Da die „deflection“ direkt proportional zur auftretenden Kraft ist, wird die Probe bei konstanter Kraft abgerastert (constant force). Die Höheninformation wird aus den für eine konstante Auslenkung des Cantilevers nötigen Höhenänderungen des z-Piezos und dem Photodiodensignal gewonnen, wobei die Kompensation der Verbiegung des Cantilevers über das Hook'sche Gesetz erfolgt, nach dem die Kraft  $F$ , die an der Spitze des Cantilevers wirkt, gleich dem Produkt der Federkonstanten  $k$  des jeweiligen Cantilevers und der Auslenkung des Cantilevers  $z_F$  ist:

$$F = k \times z_F$$

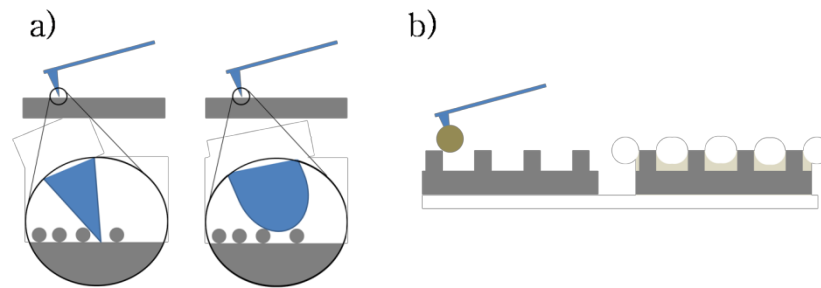
Die lateralen Kräfte sind von den Normalkräften entkoppelt und können diese um eine Größenordnung überschreiten.<sup>85</sup> Je nach wirkender Kraft kann eine Beschädigung der Probe erfolgen. Dies passiert besonders leicht, wenn weiche Proben abgebildet werden. So kann es z.B. beim Abbilden von Lipidfilmen bei zu hohen lateralen Kräften zu einem von Gaub et al. beschriebenen "Wasserski"-Effekt<sup>86</sup> kommen. Um die größtmögliche Auflösung zu erreichen, ohne die Probe zu beschädigen, ist es nötig Cantilever zu benutzen, deren Federkonstante der des zu vermessenden Systems ähnlich ist. Im Contact Mode verwendet man Cantilever mit niedrigen Federkonstanten, meist kleiner als 0,5 N/m, um die Probe nicht zu beschädigen.

### 1.9.2 Tapping mode

Der *tapping mode* wird auch als *intermittent contact mode* bezeichnet. Der Cantilever wird hierbei mit seiner Resonanzfrequenz angeregt und in eine Schwingung mit konstanter Amplitude versetzt. Durch wiederholtes Eindringen der Spitze in Bereiche mit repulsiven Kräften im Wechselwirkungspotential kommt es zu einer Dämpfung der Amplitude. Im Gegensatz zum *contact mode* steht die Sonde nicht in ständigem Kontakt mit der Oberfläche, dies reduziert die lateralen Kräfte und vermindert das Risiko der Beschädigung. Bei einer konstanten Amplitude wird die Oberfläche abgerastert. Neben der Höheninformation kann aus der Phasendifferenz der angeregten und der resultierenden Schwingung eine Information über die Energiedissipation des Cantilevers auf der Oberfläche gewonnen werden. Es lassen sich dadurch also auch Unterschiede im Material sichtbar machen.

### 1.9.3 Auflösungsvermögen und Abbildungsfehler

Das Auflösungsvermögen eines AFM ist, neben den Unterschieden, die schon durch die Betriebsmodi bedingt sind, durch die Spitzengeometrie begrenzt. In Abbildung 12 ist verdeutlicht, dass eine breite kurze Spitze die Auflösung von Höheninformationen herabsetzt. Die beste Auflösung wird durch lange Spitzen mit geringem Öffnungswinkel erreicht. Während einer Messung kann es aber zu einer Verschmutzung oder Beschädigung der Spitze kommen. Durch die veränderte Spitzengeometrie und die veränderten Eigenschaften der Spitze durch Fremdpartikel kann sowohl die laterale Information als auch die Höheninformation beeinflusst werden. Abbildungsfehler können durch Eigenschaften der Piezokeramik während einer Spannungsänderung am Piezo entstehen oder durch die Positionierung der Probe.



**Abbildung 12:** a) Der Einfluss der Spitzengeometrie auf das Auflösungsvermögen b) Einfluss einer kontaminierten Spitze auf die Bildinformation.

Die Keramiken zeigen ein träges Antwortverhalten auf eine Änderung der Ausdehnung, das so genannte „creeping“. Sie besitzen außerdem eine Hysterese und die Antwort auf eine Längenänderung kann nicht linear sein. Dies alles führt zu Abbildungsfehlern und Artefakten wie z.B. zu einem „Nachfließen“ des Bildes im Falle des „creeping“. Das zuvor erwähnte „closed loop“ System soll diese unerwünschten Eigenschaften der Piezokeramiken ausgleichen. Um Abbildungsfehler, die aus einer falschen Positionierung der Probe entstehen, aus dem Bild zu beseitigen, können Korrekturen durch Bildbearbeitungsprogramme angewendet werden. Dabei wird zwischen einer Zeilenkorrektur und einer Ebenenkorrektur unterschieden. Die Zeilenkorrektur nimmt alle Datenpunkte einer Bildzeile, passt ein Polynom an diese Messwerte an und subtrahiert dieses dann von den Datenpunkten dieser Zeile. Die Ebenenkorrektur korrigiert die Neigung einer Probe, indem eine Ebene an die Bilddaten angepasst wird und diese dann von den Datenpunkten abgezogen wird.

### 1.10 Quarzmikrowaage

Die Quarzmikrowaage findet seit vielen Jahren Anwendung, um z.B. die Adsorption dünner Lipidfilme zu messen oder das Bindungsverhalten zwischen einem Rezeptor und einem Liganden zu untersuchen.<sup>87</sup> Denn im Falle einer Abscheidung von Lipiden auf der Oberfläche der Quarzkristalle findet man eine Änderung der Resonanzfrequenz des oszillierenden Quarzkristalls. Bereits im Jahre 1959 konnte Sauerbrey zeigen, dass die Ablagerung von Massen unter Vakuum und an Luft zu einer Änderung dieser Resonanzfrequenz führen.<sup>88</sup> Die gefundene Proportionalität wird durch die sogenannte Sauerbrey Gleichung ausgedrückt:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m = -S_f\frac{\Delta m}{A}$$

Wobei  $f_0$  der fundamentalen Resonanzfrequenz des Quarzresonators,  $\rho_q$  der Dichte und  $\mu_q$  dem Scheermodul des Quarzkristalls entspricht.  $A$  entspricht der Fläche der Quarzelektrode und  $S_f$  der integralen Massenintensivität, dem sogenannten Sauerbrey Koeffizienten. Etwa um 1980 konnte gezeigt werden, dass die Methode der Quarzmikrowaage auch für Messungen in Flüssigkeiten geeignet ist. Hier hängt die Änderung der Resonanzfrequenz allerdings von der Viskosität  $\eta_l$  und der Dichte  $\rho_l$  der Lösung ab:

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}}\sqrt{\frac{\eta_l\rho_l}{\rho_q\mu_q\pi}}$$

Das der Funktionsweise der Quarzmikrowaage zugrunde liegende Prinzip beruht auf dem piezoelektrischen Effekt. Der piezoelektrische Effekt beschreibt das Auftreten von elektrischen Ladungen ausgelöst durch mechanische Deformation. Die inverse Anwendung von elektrischer Spannung verursacht Deformation und alternierende Spannung, die über zwei Elektroden auf der Ober- und Unterseite des Quarzkristalls angelegt wird, führen zu periodisch alternierenden Deformationen. Dies führt zu einer Scheeroszillation des Quarzkristalls und verursacht eine akustische transversale Welle, die sich durch den Kristall ausbreitet. Regt man bei der Resonanzfrequenz (nullte Ordnung) des Schwingquarzes an, ist die Wellenlänge genau doppelt so groß, wie die Dicke des Quarzes und eine stehende akustische Welle wird herbeigeführt. Als Elektroden verwendet man häufig im Vakuum aufgedampfte Goldelektroden, wobei zur Haftungsverbesserung zuvor oft eine dünne Schicht Chrom oder Titan aufgedampft wird. Des Weiteren muss der verwendete Schwingquarz in einem definierten Winkel aus einem Einkristall geschnitten werden. Hierbei erweist sich der so genannte AT-Schnitt als besonders günstig, bei dem in einem Winkel von  $35,15^\circ$  zur optischen Achse des Quarzkristalls geschnitten wird. Die so gewonnenen Quarzscheiben schwingen im massenempfindlichsten Dickenschermmodus und besitzen dabei eine sehr geringe Temperaturempfindlichkeit ( $1 \text{ Hz}/^\circ\text{C}$ ).<sup>89</sup>

Um nun die Anlagerung eines Antikörpers auf einem mit einem Antigen funktionalisierten Quarzkristall kinetisch zu untersuchen, wird zusätzlich die Energiedissipation der Anlagerung bestimmt. Dazu wird der Quarzkristall über eine Spannungsquelle bei seiner fundamentalen

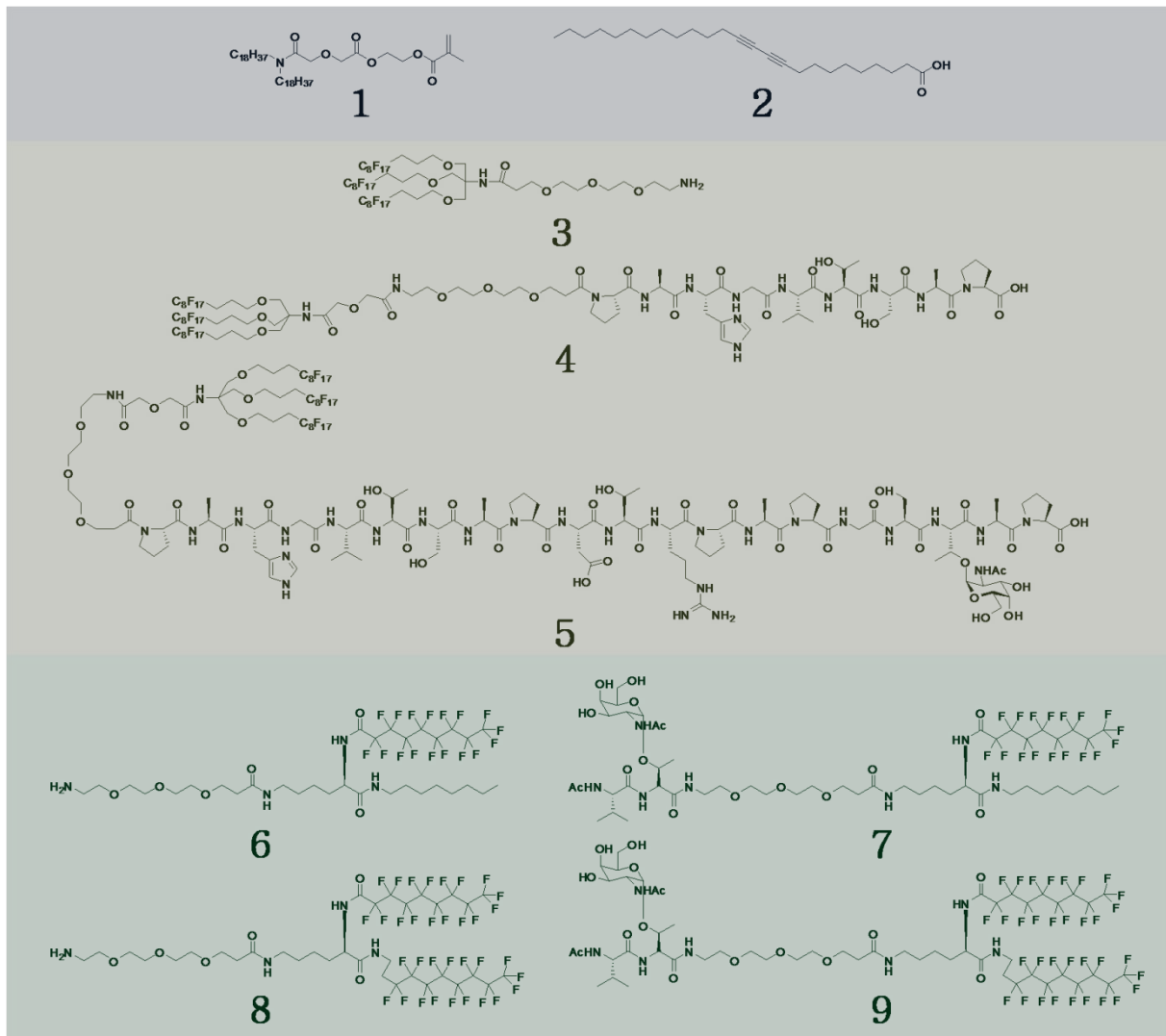
Resonanzfrequenz angeregt. Dies geschieht durch die aufgedampften Elektroden. Wenn die Scheerauslenkung des Resonators stationär ist, wird die Spannung von dem Resonator computergesteuert getrennt. Die auftretende Dämpfung wird erfasst, so dass die Resonanzfrequenz  $f$  und die charakteristische Dämpfungszeit erhalten wird. Aus letzterer ergibt sich die Energiedissipation. Diese beiden Größen, also Resonanzfrequenz und Dissipation, werden fortwährend mit einer Zeitauflösung kleiner als zehn Sekunden bestimmt. Die Frequenz des oszillierenden Quarzkristalls korreliert mit dessen Gesamtbeladung, während die Dissipation Rückschlüsse auf die viskoelastischen Eigenschaften der Filme zulässt. Auf diese Weise ist es möglich, zum Beispiel die Anlagerung von Lipiden auf eine Oberfläche zu untersuchen. Es lassen sich aber auch komplexe Erkennungsreaktionen wie die eines geeigneten Antikörpers mit einer antigenfunktionalisierten Oberfläche verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Lipid, welches nicht nur das T<sub>N</sub>-Antigen, sondern auch die „tandem repeat“-Domäne des MUC1 trägt, auf seine Reaktivität zu dem spezifischen Antikörper hin mit Hilfe der Quarzmikrowaage untersucht werden.

### 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Mischungsverhalten und die Domänenbildung binärer und ternärer Mischungen verschiedener Lipide untersucht werden. Die Zielsetzung hierbei ist es, die Domänenbildung hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Form zu kontrollieren. Dabei soll letztendlich eine ideale ternäre Mischung gefunden werden, welche ein  $T_N$ -Antigen tragendes Lipid lokal in hoher Konzentration exprimiert und somit eine gerichtete Wechselwirkung mit einem geeigneten monoklonalem Antikörper ermöglicht. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich diese binären und ternären Mischungen durch photochemische Polymerisation stabilisieren lassen. Hierbei werden verschiedene Lipide benötigt, die unterschiedliche Funktionen innerhalb der Mischungen haben. Dies erfordert die Synthese von polymerisierbaren und funktionellen Lipiden, die selbst oder von Kooperationspartnern hergestellt werden müssen. Eine Übersicht der interessierenden Lipide ist in Abbildung 13 gegeben.

Die Lipide **1** und **2** sollen verwendet werden, da sie die Möglichkeit bieten die zu untersuchenden binären und ternären Mischungen durch photochemische Polymerisation zu stabilisieren (blau markierte Lipide in Abbildung 13). Hierbei lässt sich das Lipid **1** sowohl in der flüssiganalogen als auch in der festanalogen Phase polymerisieren. Lipid **2** hingegen lässt sich nur in der festanalogen Phase polymerisieren. Dafür hat es den Vorteil, dass die Diacetylenfunktion im hydrophoben Schwanz des Lipids sitzt, so dass eine Polymerisation keinen Einfluss auf das Verhalten der hydrophilen Kopfgruppe hat.

Die fluorierten bzw. teilfluorierten Lipide sollen verwendet werden, da sie eine klare Tendenz zur Phasenseparation mit den alkylierten Lipiden **1** und **2** aufweisen sollten, so dass eine Strukturbildung innerhalb der Monoschichten sehr wahrscheinlich wird. Die in der Abbildung 13 grau markierten Lipide basieren alle auf demselben Grundbaustein, dem Tris(hydroxymethyl)aminomethan. Die drei Alkylketten des Moleküls sind fluoriert, damit zum einen eine sehr große Separationstendenz zu alkylierten Lipiden gegeben ist und zum anderen wird der durch diesen Grundbaustein eingenommene Platzbedarf innerhalb einer Membran groß, verglichen mit dem zum Beispiel durch Lipid **1** eingenommenen Platz, so dass auch voluminöse Kopfgruppen die Packung der Lipide nicht massiv verändern sollten.



**Abbildung 13:** Übersicht der verwendeten Lipide.

Aus diesem Grund kann Lipid **3** als Matrixlipid für die perfluorierten Lipide **4** und **5** innerhalb einer ternären Mischung fungieren, welche voluminöse Kopfgruppen besitzen. Das Lipid **4** verfügt über eine Aminosäuresequenz bestehend aus neun Aminosäuren und soll einen ersten Einblick bieten, wie sich das Phasenverhalten des Trisankers bei großer Kopfgruppe ändert. Die Kopfgruppe des Lipids **5** ist noch einmal deutlich voluminöser, da die Aminosäuresequenz nun aus 20 Aminosäuren besteht und außerdem das T<sub>N</sub>-Antigen (GalNAc) angebunden ist. Bei dieser Aminosäuresequenz handelt es sich um die „tandem repeat“-Domäne des MUC1, welche ein bekanntes Bindungsmotiv für die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper darstellt. Anhand des auftretenden Phasenseparationsverhaltens der polymerisierbaren Lipide mit Lipid **3**, soll zunächst das geeignete polymerisierbare Lipid gefunden werden, welches dann auch für alle anderen Mischungen verwendet werden soll. Von besonderer Bedeutung wird hierbei die Frage sein,

ob die Domänenbildung, in einer ternären Mischung der Lipide **3** und **5** mit dem geeigneten polymerisierbaren Lipid, einen positiven Einfluss auf die Erkennungsreaktion mit einem geeigneten Antikörper hat.

Die in der Abbildung 13 grün markierten Lipide sollen verwendet werden, da sie eine Möglichkeit bieten das Phasenverhalten in einer Mischung mit einem alkylierten Lipid, auch hier wird das zuvor als geeignete polymerisierbare Verbindung identifizierte Lipid verwendet, in Abhängig vom jeweiligen Fluorierungsgrad zu untersuchen. In einer Mischung mit dem polymerisierbaren Lipid sollte die teilfluorierte Verbindung **6** ein anderes Phasenseparationsverhalten zeigen als die baugleiche perfluorierte Verbindung **8**. Denn im Falle der teilfluorierten Verbindung sollte die Alkylkette eine gute Mischbarkeit unterstützen, wohingegen die Fluorkette zu einer Entmischung führen sollte. Außerdem soll durch die T<sub>N</sub>-Antigen Kopfgruppe (Lipide **7** und **9**) der Einfluss dieser Kopfgruppe auf die Stabilität der Monoschichten dieser Lipide untersucht werden.

Hierzu werden die interessierenden Lipide zunächst anhand ihrer  $\pi$ -A Isothermen (Schub-Flächen-Diagramme) untersucht. Auch die binären und ternären Mischungen werden zunächst anhand der Isothermen charakterisiert. Eine Auswertung anhand des Additivitätsgesetzes nach Gains soll einen ersten Einblick in das Phasenseparationsverhalten der Mischungen geben. Mit Hilfe der Brewsterwinkelmikroskopie lässt sich das Phasenseparationsverhalten makroskopisch visualisieren und die während einer Kompression der Monoschicht auftretenden Kristallisationseffekte beobachten. Anschließend wird das Mischungsverhalten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy = AFM) untersucht werden. Dazu werden die betreffenden binären und ternären Mischungen durch Langmuir-Blodgett Übertrag auf Glimmerplättchen übertragen und anschließend vermessen. Dies liefert einen noch detaillierteren Einblick in das Mischungsverhalten. Denn mit Hilfe dieser Methode lassen sich auch Domänen visualisieren, die nur wenige Nanometer groß sind. In ausgesuchten Mischungen soll zudem versucht werden, diese Mischungen durch photochemische Polymerisation zu stabilisieren. Dazu soll die Monoschicht mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden und anschließend, nach Langmuir-Blodgett Übertrag, mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie untersucht werden. Zu guter letzt soll anhand einer ternären Mischung, bestehend aus dem gewählten polymerisierbaren Lipid und den Lipiden **3** und **5**, untersucht werden, in welcher Weise die Antigen-Antikörper Erkennung von der jeweiligen Konzentration des Vakzinlipids (Lipid **5**) abhängt und ob die Strukturbildung in einer ternären Mischung einen Einfluss auf diese Erkennungsreaktion hat.

### 3. Allgemeiner Teil

Alle im folgenden Kapitel charakterisierten Lipide wurden aufgrund besonderer Eigenschaften ausgewählt. Hierbei sind die Lipide **1** und **2** ausgewählt worden, weil sie sich photochemisch Polymerisieren lassen. Im Falle des Lipids **1** kann die Polymerisation sowohl in der flüssiganalogen als auch in der kristallanalogen Phase erfolgen, wohingegen Lipid **2** nur in der kristallanalogen Phase polymerisierbar ist. Dies liegt daran, dass Lipid **2** topochemisch polymerisiert, so dass eine Vororientierung der Diacetyleneinheiten notwendig ist, welche nur in der kristallanalogen Packung vorhanden ist. Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Lipide darin, dass sie entweder in der hydrophilen Kopfgruppe oder im hydrophoben Molekülschwanz polymerisieren. Die Polymerisation im Molekülschwanz (Lipid **2**) hat den Vorteil, dass durch die Polymerisation das Verhalten der hydrophilen Kopfgruppe nicht beeinflusst wird.

Die Lipide **3,6** und **8** wurden ausgewählt, da sie aufgrund ihrer fluorierten Seitenketten eine starke Entmischungstendenz zu den polymerisierbaren Lipiden haben sollten. Hier lässt sich auch der Einfluss des Fluorierungsgrades untersuchen, da die Lipide **6** und **8** baugleich sind und sich nur dadurch unterscheiden, dass Lipid **6** teilfluoriert ist und Lipid **8** vollfluoriert. An die Grundkörper dieser Lipide können komplexere Kopfgruppen angebracht werden, wobei die Grundkörper später als Matrixlipide für diese komplexeren Lipide innerhalb eines ternären Systems dienen sollen. Dementsprechend haben die Lipide **4,5,7** und **9** komplexe Kopfgruppen. Lipid **4** verfügt über eine Peptidsequenz von neun Aminosäuren und soll einen ersten Einblick geben, wie eine größere Kopfgruppe das Phasenseparationsverhalten beeinflusst. Lipid **5** verfügt über die vollständige Peptidsequenz, also die vollständige „tandem repeat“-Einheit des MUC1, an welcher das T<sub>N</sub>-Antigen (GalNAc) angebunden ist. An diesem System lässt sich somit auch die biologische Aktivität, also die Antigen-Antikörper Erkennung, mit Hilfe der Quarzmikrowaage und eines geeigneten Antikörpers untersuchen. Die Lipide **7** und **9** sollen den Einfluss der größeren Kopfgruppe im Vergleich zu dem Grundmolekül zeigen.

Im Folgenden werden also zunächst die verwendeten Lipide anhand ihrer  $\pi$ -A Isothermen charakterisiert. Anschließend werden die verschiedenen binären Mischungen untersucht werden, wobei auch die Brewsterwinkelmikroskopie und die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy = AFM) Anwendung finden, um ein besseres Verständnis für die Phasenseparation, also die Domänenbildung, zu erhalten. Abgeschlossen wird diese Arbeit

durch die Untersuchung der ternären Mischungen und die Untersuchung der Antigen-Antikörper Erkennung mit Hilfe der Quarzmikrowaage.

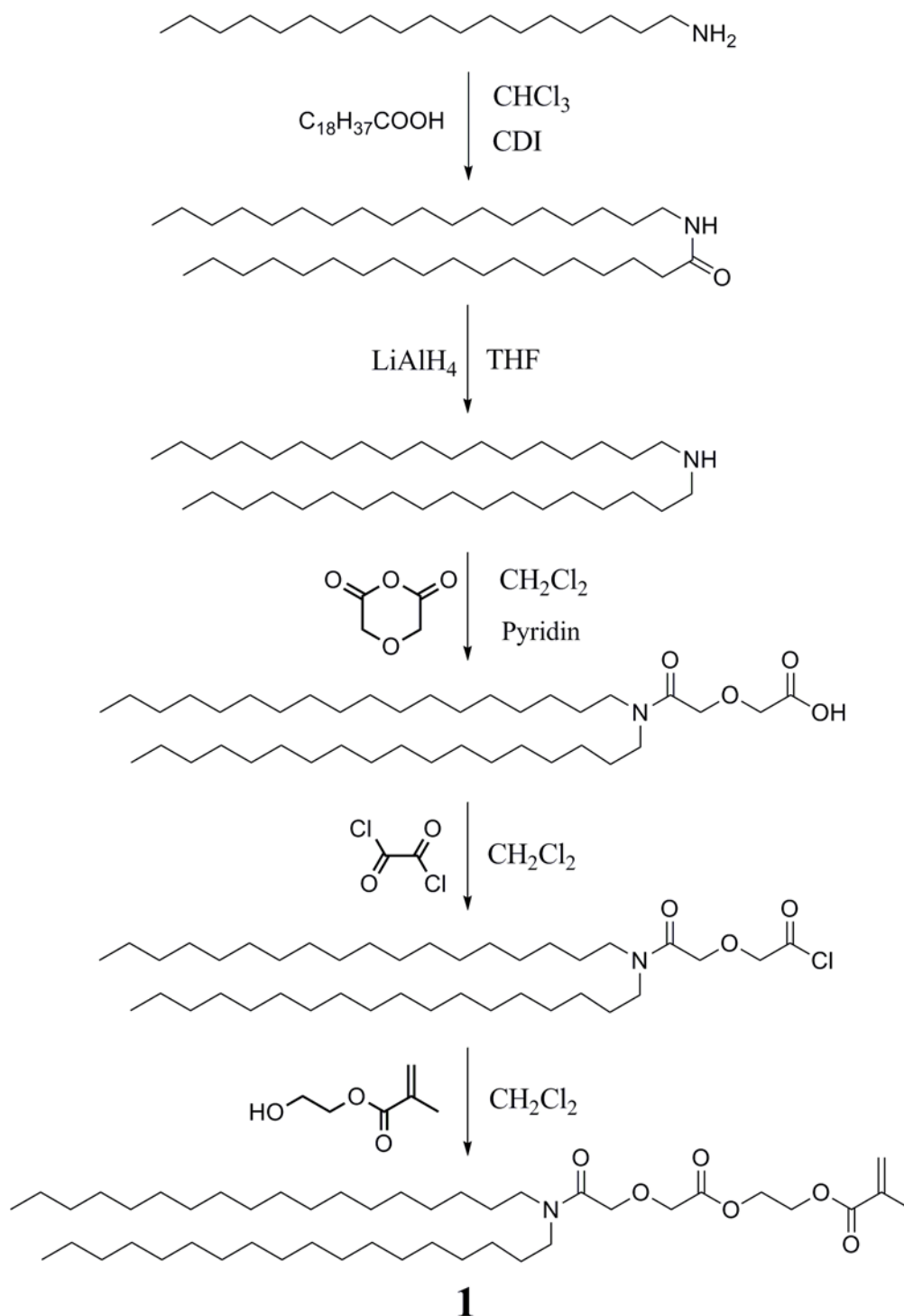
### 3.1 Synthese und Charakterisierung der verwendeten Verbindungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lipide werden im Folgenden zunächst anhand ihrer  $\pi$ -A Isothermen charakterisiert. Diese sind, sofern nicht anders angegeben, alle bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen. Dabei wird zum einen das charakteristische Phasenverhalten der einzelnen Lipide untersucht, zum anderen aber auch der Einfluss unterschiedlicher Kopfgruppen auf eben dieses Verhalten. Die Darstellung des Lipids **1** gelang in einer mehrstufigen Synthese, während Lipid **2** kommerziell erworben wurde. Die fluorierten und teilfluorierten Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Jr. Prof. Dr. [REDACTED] synthetisiert und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.<sup>90</sup>

#### 3.1.1 Lipid 1

Die Synthese von Lipid **1** (DODAMA) gelingt über einen 5-stufigen Mechanismus (Abbildung 14). Zunächst setzt man Octadecylamin mit Stearinsäure in einer nucleophilen Substitution zum Amid um. Dieses wird mit Lithium-Aluminiumhydrid unter Verwendung eines Extraktors zum Amin reduziert. Nach Umkristallisation aus Ethanol kann der farblose Feststoff weiter umgesetzt werden. Die anschließende Umsetzung mit Glycolsäureanhydrid führt zur Carbonsäure, welche vor der Reaktion mit Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) durch eine Chlorierung mit Oxalylchlorid aktiviert werden muss. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung erhält man auf diese Weise ein viskoses nahezu farbloses Öl. Nach Gefriertrocknung erhält man das Lipid als farblose wachsartige Substanz. In Lösung ist dieses im Kühlschrank lagerstabil.

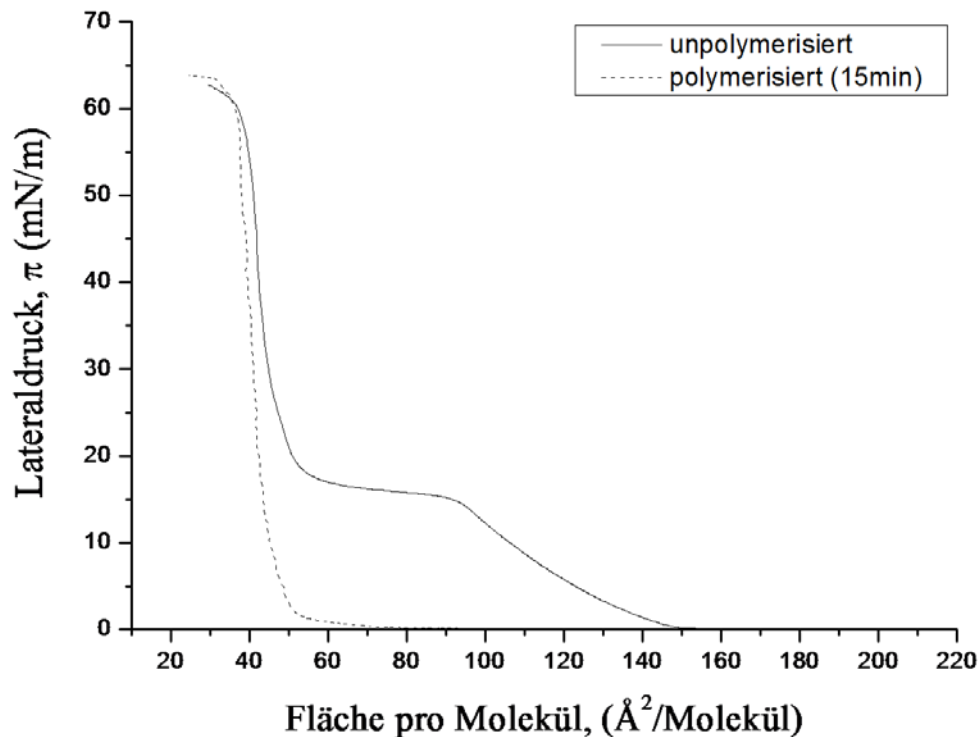
Wie eingangs angesprochen wurde Lipid **1** aufgrund der Möglichkeit zur Polymerisation ausgewählt. Eine grundlegende Charakterisierung wurde mithilfe der Langmuir-Blodgett Technik durchgeführt.



**Abbildung 14:** Synthese von Lipid **1** (DODAMA).

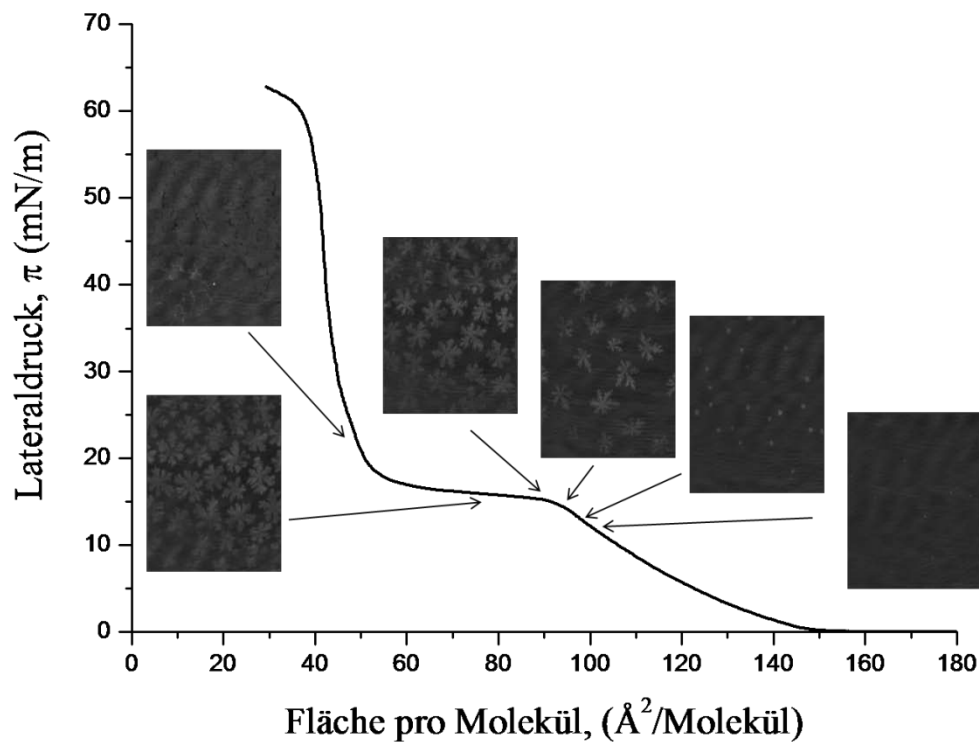
Die Isotherme des unpolymerisierten Lipids **1** (Abbildung 15) zeigt ab einer Fläche von etwa  $160 \text{ \AA}^2$  pro Molekül eine flüssiganaloge Phase. Ab einer Flächenbelegung von etwa  $100 \text{ \AA}^2$  erkennt man die Phasenumwandlung in den flüssig-/ kristallanalogen Koexistenzbereich. Hier entstehen kleine festanaloge Domänen in einer flüssiganalogen Umgebung. Diese Domänen wachsen mit Abnahme der zur Verfügung stehenden Fläche, bis die flüssiganalogen Bereiche

verschwunden sind und eine rein kristallanaloge Packung vorliegt, welche durch einen starken Druckanstieg bei kleiner Flächenabnahme gekennzeichnet ist.



**Abbildung 15:**  $\pi$ -A Isothermen von Lipid **1** vor und nach der photochemischen Polymerisation bei 25°C.

Diese Phasenumwandlung findet bei einer Fläche von etwa  $60 \text{ \AA}^2$  pro Molekül statt. Der minimale Flächenbedarf liegt bei etwa  $40 \text{ \AA}^2$  und einem Kollapsdruck von etwa  $55 \text{ mN/m}$ . Das Schub-Flächen-Diagramm des mittels photochemischer UV-Polymerisation dargestellten polymeren Lipids **1** bildet keine flüssiganaloge Phase mehr aus. Bei etwa  $55 \text{ \AA}^2$  findet direkt ein Phasenübergang gas-/ kristallanalog statt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Polymerisation nahezu vollständig verlaufen ist. Der minimale Flächenbedarf ist mit ca.  $38 \text{ \AA}^2$  geringer. Der Kollapsdruck hingegen ist auf etwa  $60 \text{ mN/m}$  angewachsen. Beide Beobachtungen sind aufgrund der Polymerisation zu erwarten, da dabei zum einen die Packung der Amphiphile dichter und zum anderen die Stabilität der Monoschicht erhöht wird. Eine Visualisierung der geschilderten Kristallisation, welche zu Beginn des Koexistenzbereichs flüssig-/ kristallanalog startet, ist mithilfe der Brewsterwinkel Mikroskopie möglich. In Abbildung 16 ist die  $\pi$ -A Isotherme des Lipids **1** mit den zugehörigen BAM Aufnahmen gezeigt.



**Abbildung 16:**  $\pi$ -A Isotherme des reinen Lipids **1** bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Man erkennt sehr schön wie ab einem Lateraldruck von etwa 12,5 mN/m die ersten kleinen Domänen auskristallisieren, welche die Form von sechsarmigen Sternen haben. Komprimiert man nun weiter, wachsen diese Domänen rasch weiter und bereits bei einem Lateraldruck von 15 mN/m erreichen diese Domänen einen Durchmesser von bis zu 65  $\mu\text{m}$ . Bei weiterer Kompression werden diese Domänen zahlreicher, innerhalb der flüssiganalogen Matrix aus noch nicht kristallisiertem Lipid **1**, wobei sie allerdings nicht mehr größer werden. Bei weiterer Kompression wachsen diese dann zusammen und bilden schließlich bei einem Lateraldruck von 20 mN/m eine nahezu geschlossene Schicht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Lipid **1** aufgrund seines Phasenverhaltens und der photochemischen nahezu vollständigen Polymerisierbarkeit ein ideales Matrixlipid für die fluorierten und teilfluorierten Lipide sein kann.

### 3.1.2 Lipid 2

Die Pentacosadiinsäure (Lipid 2), die im Folgenden anhand ihres Schub-Flächen-Diagramms charakterisiert wird, wurde verwendet, da sie die Möglichkeit bietet Domänen innerhalb einer Membran durch photochemische Polymerisation zu stabilisieren. Allerdings handelt es sich bei der Polymerisation von Diacetylenen um eine topochemische Polymerisation.<sup>91</sup> Das bedeutet, es muss eine Vororientierung gegeben sein, um einen hohen Polymerisationsgrad zu erreichen.

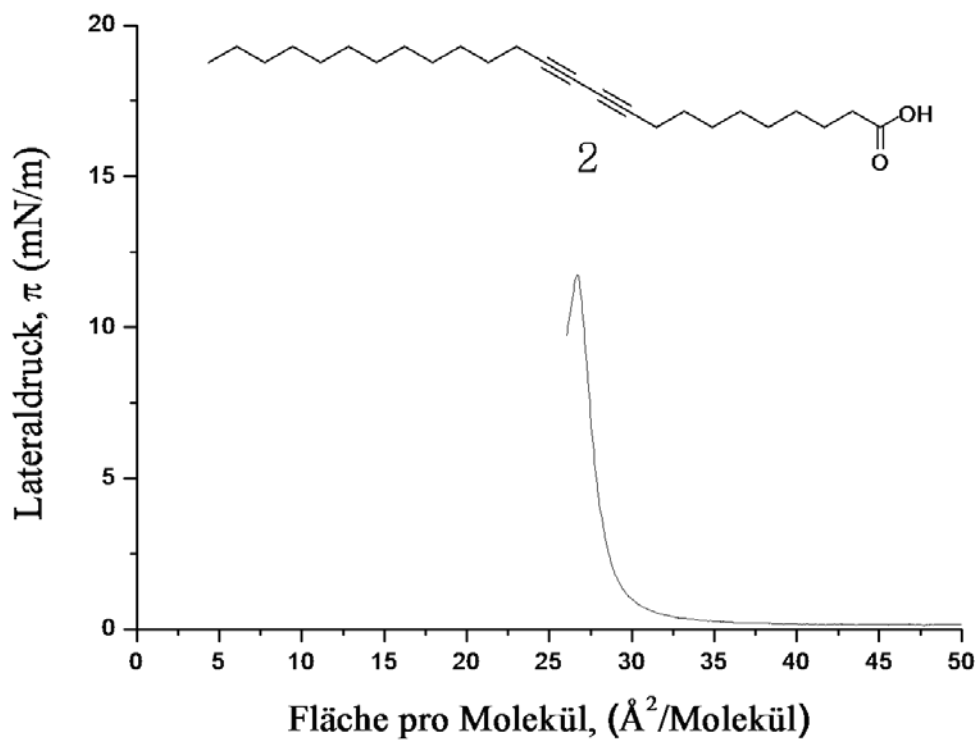


Abbildung 17:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 2 bei 25°C.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass ein scharfer Übergang gas-/ kristallanalog, der bei einem Flächenbedarf von etwa 30  $\text{\AA}^2$  pro Molekül auftritt, charakteristisch für Lipid 2 ist. Die Isotherme steigt bei weiterer Kompression stark an bis sie bei einem minimalen Flächenbedarf von 27  $\text{\AA}^2$  pro Molekül zusammen bricht. Der Kollapsdruck beträgt hier 12 mN/m. Diese Werte stehen in Übereinstimmung mit denen, die für die reine Pentacosadiinsäure in der Literatur angegeben werden.<sup>92,93,94</sup>

Bestrahlt man die Monoschicht in ihrer kristallanalogen Phase mit UV-Licht, so stellt man schon nach kurzer Zeit eine Farbänderung von farblos über rot nach blau-violett fest. Diese Farbänderung aufgrund der fortschreitenden Polymerisation ist in der Literatur schon beschrieben worden. So berichten Geiger et al.<sup>95</sup> und Ma et al.<sup>92</sup> über die Farbänderung von rot nach blau-violett, die nicht nur aufgrund der fortschreitenden Bestrahlungszeit eintritt, sondern auch von Faktoren wie Temperatur und pH-Wert beeinflusst wird.

Obwohl Lipid **2** kein so breites Phasenverhalten aufweist wie Lipid **1**, kann man aufgrund des direkten Auftretens der kristallanalogen Phase erwarten, dass die Domänenbildung in Mischsystemen deutlich von der im reinen System abweicht. Ebenso lässt es sich gut photochemisch polymerisieren und sollte auch eine deutliche Entmischungstendenz gegenüber den fluorierten Lipiden aufweisen. Des Weiteren ist das Fortschreiten der Polymerisation hier sehr gut anhand der auftretenden Farbänderung zu verfolgen.

### 3.1.3 Lipid 3

Das verwendete Lipid **3** zeichnet sich dadurch aus, dass es über drei fluorierte Ketten verfügt und somit eine gute Entmischung mit alkylierten Verbindungen wie Lipid **1** und **2** zeigen sollte. In Anbetracht der Zielsetzung - es sollen entmischte Strukturen von Lipiden (unter ihnen potentielle Krebsvakzine) untersucht werden - bieten die fluorierten Ketten außerdem die Möglichkeit als Platzhalter für die komplexen Kopfgruppen der Vakzinlipide zu fungieren, da der minimale Flächenbedarf hier aufgrund der fluorierten Ketten deutlich größer sein sollte als bei den alkylierten Lipiden.

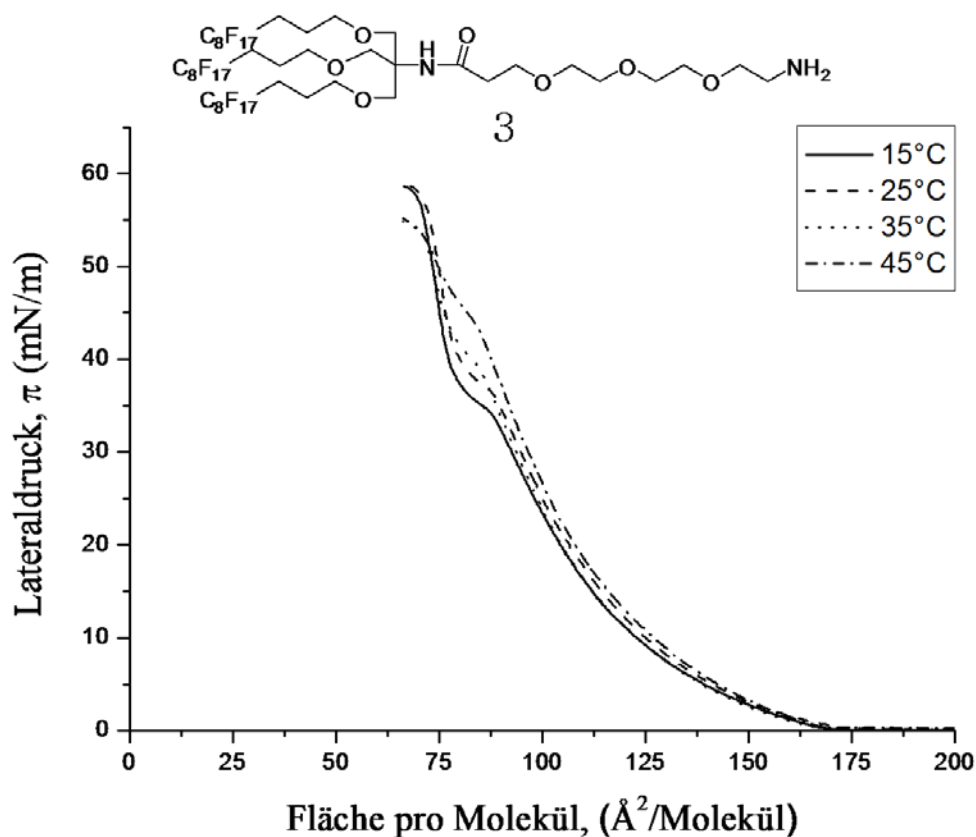


Abbildung 18:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 3 bei 25°C.

Wie man anhand der  $\pi$ -A Isothermen (Abbildung 18) sofort erkennen kann, zeigt das Lipid 3 ein temperaturabhängiges Verhalten. Die flüssiganaloge Phase beginnt bei 170  $\text{\AA}^2$  pro Molekül und reicht für alle Temperaturen bis etwa 90  $\text{\AA}^2$  pro Molekül. Bei diesem Flächenbedarf zeigt die  $\pi$ -A Isotherme (Schub-Flächen-Diagramm) ein Plateau. Je nach Temperatur beginnt dieses bei unterschiedlichen Lateraldrücken. Bei 15°C beginnt das Plateau bei einem Lateraldruck von 35 mN/m und bei 45°C beginnt es bei einem Lateraldruck von 45 mN/m. Nach dem Plateau kann eine weitere Phase beobachtet werden. Im Falle der Isotherme bei 15°C kollabiert die Monoschicht bei einem Lateraldruck von 58 mN/m. Bei 45°C kollabiert sie bei einem Lateraldruck von 55 mN/m. Das Auftreten des Plateaus bei einem Flächenbedarf von 90  $\text{\AA}^2$  steht in guter Übereinstimmung zu dem zu erwartenden Flächenbedarf für drei fluorierte Ketten.<sup>96,97,98,99</sup> Aufgrund von repulsiven F-F Wechselwirkungen innerhalb der Fluorkette, ist die Konformation mit der niedrigsten Energie hier eher spiralförmig als all-trans planar. Die spiralförmige Konformation sorgt für ein starres Rückgrat der Kohlenstoffkette und erhöht somit die Querschnittsfläche von etwa 20  $\text{\AA}^2$  für eine Alkylkette auf 30  $\text{\AA}^2$  für eine Fluorkette.<sup>65,100,101</sup> Da die Monoschicht bei diesem

Flächenbedarf aber noch nicht kollabiert, sondern erst bei einem minimalen Flächenbedarf von  $72 \text{ \AA}^2$  kann man vermuten, dass hier eine Änderung der Packung auftritt.

### 3.1.4 Lipid 4

Bei Lipid 4 handelt es sich um ein Vorläufermolekül zu Lipid 5. Die Peptidsequenz besteht aus neun Aminosäuren, wobei die letzten acht ein Teil der „tandem repeat“-Einheit des MUC1 sind. Hieran soll untersucht werden, welche Auswirkungen eine voluminöse peptische Kopfgruppe auf das Phasenverhalten des Trisankers (Lipid 3) hat.

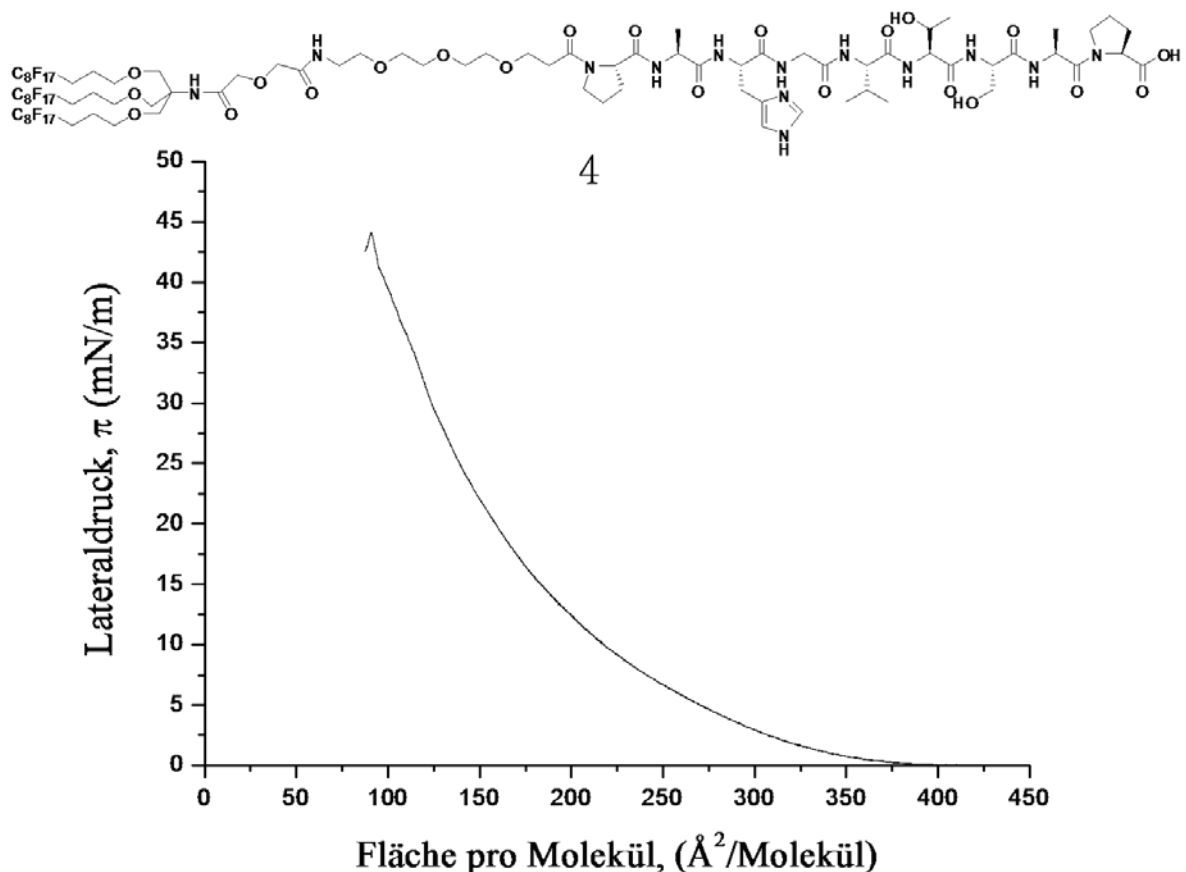


Abbildung 19:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 4 bei  $25^\circ\text{C}$ .

Anhand der in Abbildung 19 gezeigten  $\pi$ -A Isotherme erkennt man, dass die Vergrößerung der Kopfgruppe schon bei einer sehr kurzen Peptidsequenz einen großen Einfluss auf das Phasenverhalten hat. Ab einem Flächenbedarf von  $380 \text{ \AA}^2$  beginnt die flüssiganaloge Phase. Diese ist ähnlich ausgeprägt wie im Fall des Lipids 3. Allerdings sorgt die große Kopfgruppe

hier dafür, dass der Beginn der flüssiganalogen Phase zu deutlich größeren Flächen hin verschoben worden ist, was auf Wechselwirkungen der Kopfgruppen untereinander schließen lässt. Das charakteristische Plateau, welches man im Fall des Lipids **3** noch klar erkennen konnte, ist hier deutlich weniger ausgeprägt und beginnt ebenfalls schon bei einem höheren Flächenbedarf von etwa  $110 \text{ \AA}^2$ . Auch hier zeigt die Isotherme danach eine andere Steigung, so dass man vermuten kann, dass auch hier eine Packungsänderung vorliegt. Der minimale Flächenbedarf ist mit  $91 \text{ \AA}^2$  pro Molekül um gut  $20 \text{ \AA}^2$  pro Molekül grösser als im Falle des Lipids **3**. Der Kollapsdruck ist mit  $44 \text{ mN/m}$  geringer. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Lipide innerhalb der Monoschicht nicht so gut komprimiert werden können, wie dies im Fall des Lipids **3** möglich ist und die Monoschicht dadurch nicht so stabil und starr ist. Man kann nun erwarten, dass bei einer deutlich größeren Kopfgruppe, z.B. mit einer deutliche längeren Aminosäuresequenz, der Kollapsdruck und damit die Stabilität der Membran noch einmal erniedrigt werden wird. Dies soll im Folgenden untersucht werden.

### 3.1.5 Lipid 5

Bei dem Lipid **5** handelt es sich um ein Molekül, das potentiell als Krebsvakzin dienen kann. Durch die lange Peptidesequenz, bestehend aus den 20 Aminosäuren der „tandem repeat“-Domäne des MUC1, und die  $T_N$ -Antigen (GalNAc) Kopfgruppe bildet es die tumorassoziierten Glycoproteine nach, und macht diese Strukturen dem Immunsystem zugänglich. Die Komplement-Aktivierung führt zu der Bildung von hoch selektiven Antikörpern gegen dieses tumorassoziierte Glycoprotein. Somit kann eine Stimulierung des Immunsystems erreicht werden.

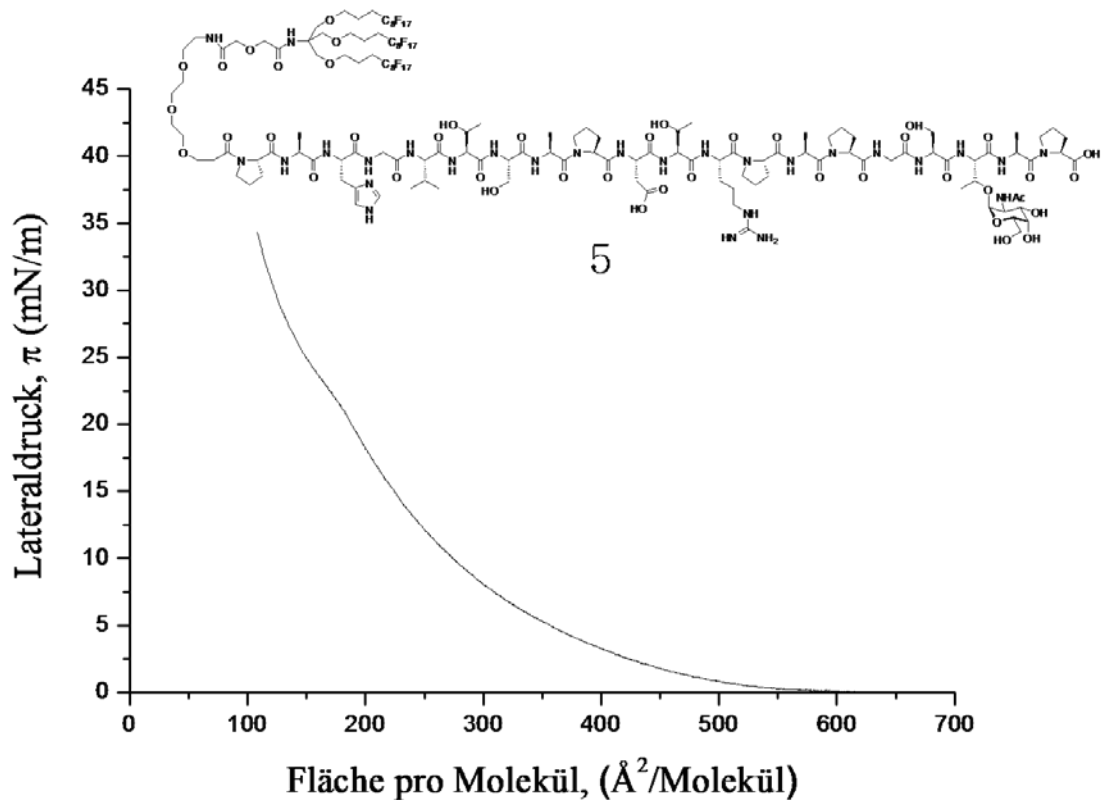


Abbildung 20:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 5 bei 25°C.

Die Abbildung 20 zeigt die  $\pi$ -A Isotherme des Vakzinlipids. Bereits ab einem Flächenbedarf von 560 Å<sup>2</sup> beginnt die flüssiganaloge Phase. Die Ursache hierfür ist die große Kopfgruppe des Lipids, welche dafür sorgt, dass es schon sehr früh zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen kommt. Nach der langen flüssiganalogen Phase beobachtet man auch hier eine Phasenumwandlung bzw. ein kleines Plateau bei 175 Å<sup>2</sup>. Dieses ist allerdings weniger ausgeprägt als im Falle der Lipide 3 und 4, was wiederum auf die voluminöse Kopfgruppe zurückgeführt werden kann. Bei einem Flächenbedarf von 110 Å<sup>2</sup> konnte noch kein Kollabieren der Monoschicht beobachtet werden. Der Lateraldruck beträgt bei diesem Flächenbedarf 34 mN/m. Aber man kann vermuten, dass der Kollapsdruck unter dem des Lipids 4 liegt, welcher bei 44 mN/m ermittelt wurde.

### 3.1.6 Lipid 6

Um den Einfluss des Fluorierungsgrades auf das Phasenseparationsverhalten zu untersuchen, sind die Lipide **6** bis **10** besonders interessant. Hierbei blieb die Kopfgruppe jeweils die gleiche, allerdings wurde der hydrophobe Schwanz dahingehend variiert, dass entweder beide Ketten des Lipids fluoriert waren oder nur eine von beiden. Von den teilfluorierten Verbindungen verfügt Lipid **6** nur über einem kurzen Spacer, wohingegen Lipid **7** auf diesem Spacer die T<sub>N</sub>-dipeptidische Kopfgruppe trägt. Bestehend aus einem acetylierten Valin und dem T<sub>N</sub>-Antigen.

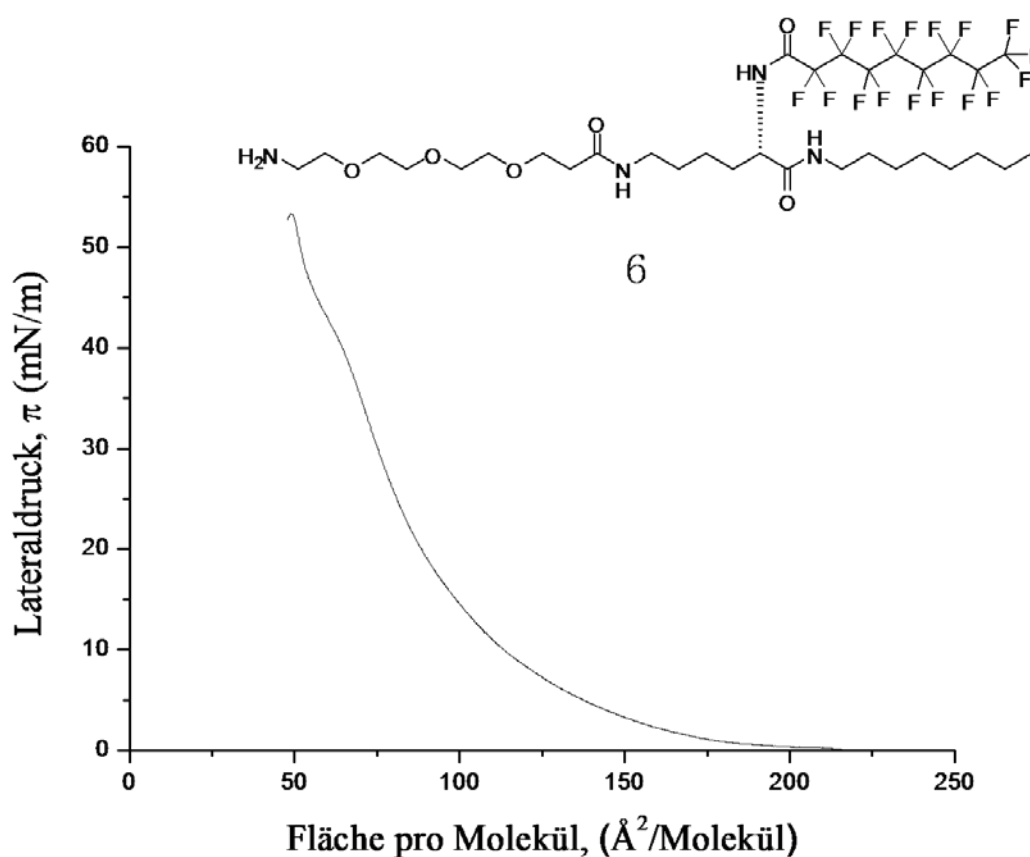


Abbildung 21:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid **6** bei 25°C.

Aus der in Abbildung 21 dargestellten  $\pi$ -A Isotherme erkennt man, dass auch Lipid **6** über eine lange flüssiganaloge Phase verfügt. Diese beginnt schon bei einem Flächenbedarf pro Molekül von etwa 215 Å<sup>2</sup> und reicht bis etwa 66 Å<sup>2</sup>. Hier findet man ein Koexistenzplateau flüssig-/kristallanalog. Bei einem minimalen Flächenbedarf von etwa 51 Å<sup>2</sup> kollabiert die Monoschicht. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem theoretisch zu erwartenden Wert für

eine Verbindung, welche über eine fluoridierte und eine alkylierte Kette verfügt ( $50 \text{ \AA}^2$ ). Der gefundene Kollapsdruck beträgt  $54 \text{ mN/m}$ .

### 3.1.7 Lipid 7

Lipid 7 besitzt, im Vergleich mit Lipid 6, zusätzlich eine  $T_N$ -Antigen Kopfgruppe. Wie aus der  $\pi$ -A Isotherme in Abbildung 22 zu erkennen ist, ändert das den Verlauf des Schub-Flächen-Diagramms deutlich.

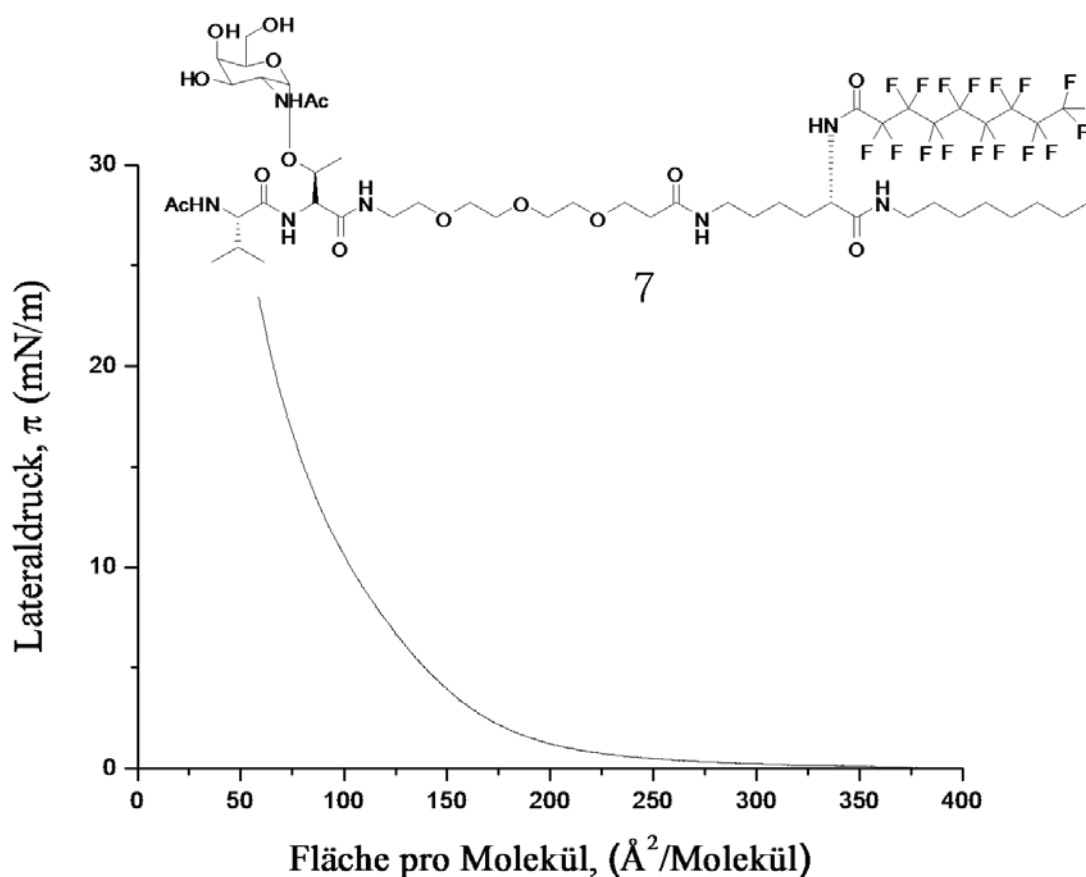


Abbildung 22:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 7 bei  $25^\circ\text{C}$ .

Die flüssiganaloge Phase beginnt deutlich früher als im Fall des Lipids 6 bei einem Flächenbedarf von  $375 \text{ \AA}^2$  und setzt sich fort bis zu einem Flächenbedarf von  $58 \text{ \AA}^2$ . Dies ist etwas höher als für eine dichte Packung der beiden Ketten zu erwarten wäre und auch für das Lipid 6 (etwa  $50 \text{ \AA}^2$ ) gefunden wurde. Die Ursache hierfür ist in der voluminösen  $T_N$ -Antigen Kopfgruppe zu suchen. Denn wie im Fall des Lipids 6 gesehen, hat der kurze Spacer keinen

nennenswerten Einfluss auf die Packung der Ketten. Das T<sub>N</sub>-Antigen ist also alleine verantwortlich für den verringerten Kollapsdruck, welcher eine direkte Folge der schlechteren, also nicht mehr so dichten, Packung der beiden Ketten ist.

### 3.1.8 Lipid 8

Das Lipid **8** ist genauso aufgebaut wie Lipid **6**. Allerdings sind hier beide Seitenketten des Moleküls fluoriert. Die in Abbildung 23 gezeigte  $\pi$ -A Isotherme zeigt ein abweichendes Verhalten im Vergleich zum partiell fluorierten Molekül. Die flüssiganaloge Phase beginnt bereits bei einem Flächenbedarf pro Molekül von 280 Å<sup>2</sup> und reicht bis 92 Å<sup>2</sup>, was auf den erhöhten Flächenbedarf der Fluorketten zurückzuführen ist. Bei 92 Å<sup>2</sup> findet man ein Koexistenzplateau beim Übergang flüssig- nach kristallanalog.

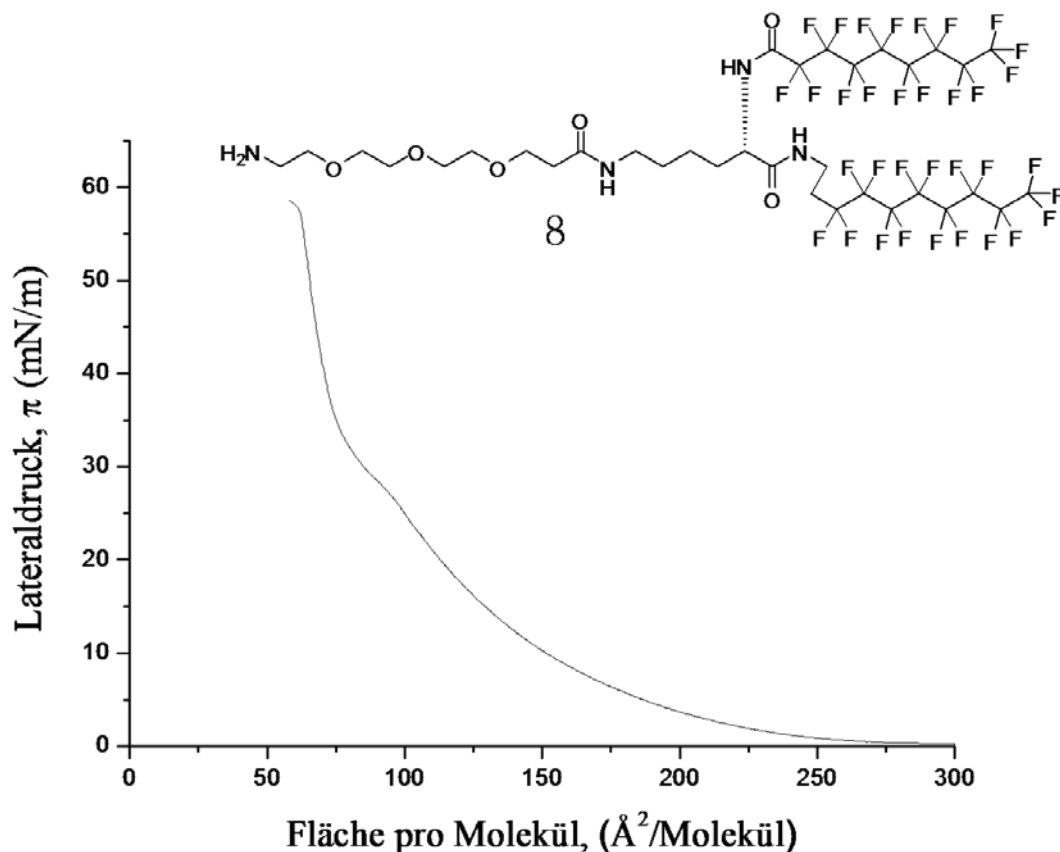


Abbildung 23:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid **8** bei 25°C.

Bei einem minimalen Flächenbedarf von 62 Å<sup>2</sup> kollabiert die Monoschicht, was - wie in der Einleitung (Kapitel 1.6) beschrieben - sehr gut dem theoretisch zu erwartenden Wert für zwei

Fluorketten entspricht ( $60 \text{ \AA}^2$  pro Molekül). Der Kollapsdruck beträgt hier  $58 \text{ mN/m}$  und liegt damit geringfügig über dem des teilfluorierten Analogons.

Ein Vergleich mit dem partiell fluorierten Lipid **6** zeigt, dass die festanaloge Phase hier (Lipid **8**) deutlich stärker ausgeprägt ist. Die Ursache hierfür kann nur im unterschiedlichen Fluorierungsgrad gesucht werden, da die beiden Moleküle sonst baugleich sind. Im Fall der perfluorierten Verbindung lassen sich die fluorierten Ketten untereinander offensichtlich besser packen, als dies im Fall der teilfluorierten Verbindung der Fall ist. Bei einer teilfluorierten Verbindung werden die Alkylketten jeweils ihres gleichen suchen, da die hier auftretenden Van-der-Waals Kräfte größer sind als die zwischen den Fluorketten, so dass die Packung maßgeblich von den Alkylketten bestimmt wird. Da deren bevorzugte Konformation aber all-trans planar ist, im Gegensatz zu den Fluorketten, die eine helikale Konformation bevorzugen, ist eine dichte Packung der Ketten hier nicht möglich.

### 3.1.9 Lipid 9

Verfügt Lipid **8** außerdem über eine  $T_N$ -Antigen Kopfgruppe, so ändert sich das Verhalten auf dem Langmuir-Blodgett Trog, ähnlich wie im Fall der teilfluorierten Verbindungen, deutlich. Die Isotherme von Lipid **9** ist in der Abbildung 24 gezeigt. Wie zu erwarten beginnt die flüssiganaloge Phase deutlich früher, nämlich bereits bei einem Flächenbedarf pro Molekül von  $475 \text{ \AA}^2$ . Außerdem ist sie deutlich ausgeprägter, was wiederum auf die voluminöse  $T_N$ -Antigen (GalNAc) Kopfgruppe zurückgeführt werden kann, die schon sehr früh zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen führt. Der Übergang flüssig- zu kristallanaloger Phase ist deutlich weniger ausgeprägt und wird bei einem Flächenbedarf pro Molekül von  $106 \text{ \AA}^2$  gefunden. Bei einem minimalen Flächenbedarf von  $69 \text{ \AA}^2$  kollabiert die Monoschicht. Ursache für den höheren Flächenbedarf ist natürlich auch die voluminöse  $T_N$ -Antigen Kopfgruppe, die ein dichteres Packen der fluorierten Ketten verhindert. Der gefundene Kollapsdruck ist mit  $40 \text{ mN/m}$  deutlich kleiner als im Fall des Lipids **8**. Es zeigt sich also auch hier, dass die  $T_N$ -Antigen Kopfgruppe einen enormen Einfluss auf das Phasenverhalten und die Stabilität der Monoschicht hat.

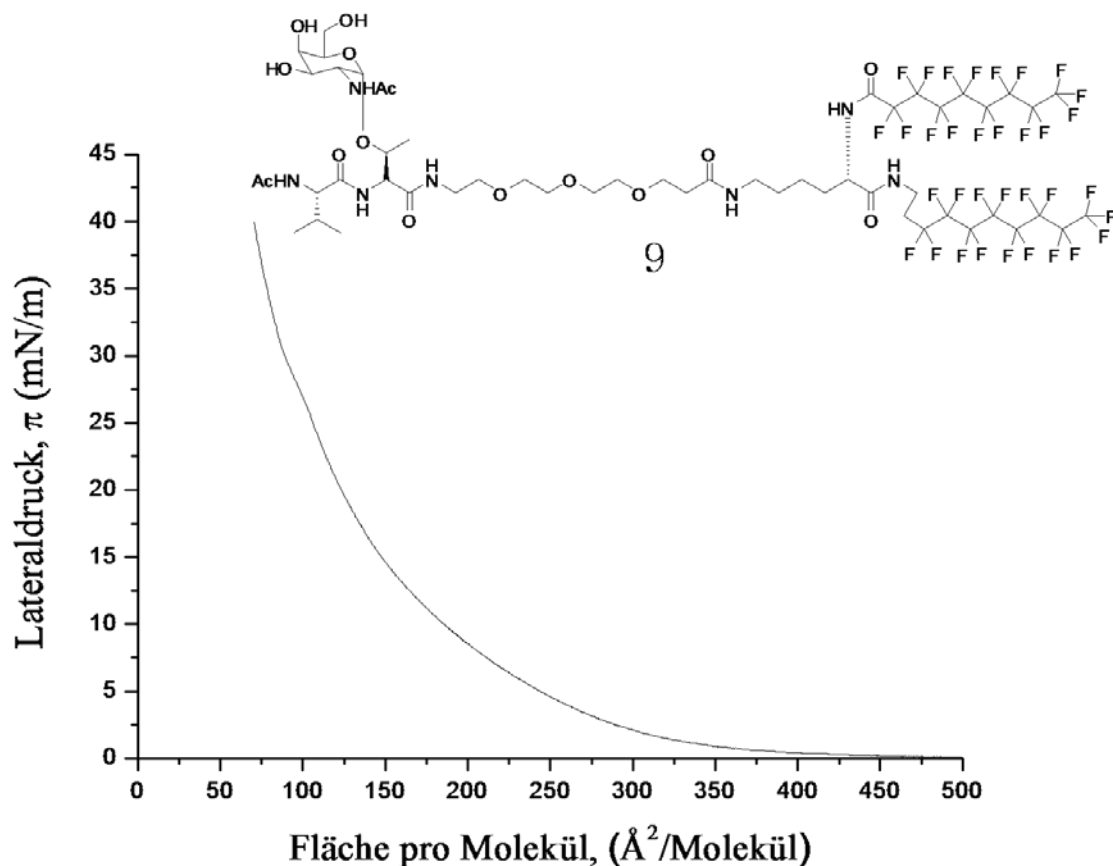
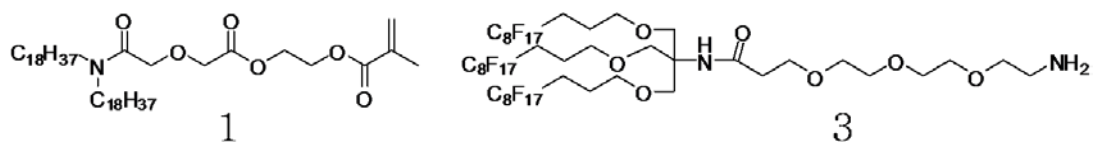


Abbildung 24:  $\pi$ -A Isotherme von Lipid 9 bei 25°C.

Nach der Charakterisierung der interessierenden Lipide werden im Folgenden zunächst die binären Mischungen untersucht werden, wobei neben der Langmuir-Blodgett Technik auch die Brewsterwinkel- und Rasterkraftmikroskopie verwendet werden wird.

### 3.2 Binäre Lipidmischung der Lipide 1 und 3

Untersucht werden soll das Phasenseparationsverhalten der beiden dargestellten Verbindungen. Diese sollten ein gutes Entmischungsverhalten zeigen, da Lipid 1 über zwei Alkylketten verfügt, wohingegen Lipid 3 über drei fluorierte Ketten verfügt. Und wie in der Einleitung ausführlich dargelegt ist bekannt, dass nicht nur unterschiedliche Kettenlängen bzw. unterschiedliche Anzahl an Ketten für eine klare Phasenseparation verantwortlich sind, sondern dass auch fluorierte und nicht fluorierte Ketten ein solches Entmischungsverhalten zeigen.



Neben der angestrebten Entmischung der beiden Komponenten, sollte sich mit Lipid **1** die Möglichkeit bieten die entmischten Strukturen durch photochemische Polymerisation zu stabilisieren und die gebildeten Domänen anschließend genauer zu untersuchen.

### 3.2.1 $\pi$ -A Isothermen

Die  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung von Lipid **1** und **3** bei  $25^\circ\text{C}$  auf einer Subphase aus Reinstwasser sind in Abbildung 25 wiedergegeben. Dabei wurde der Molenbruch des fluorierten Amphiphils stufenweise um jeweils etwa 10 mol% erhöht. Die binäre Mischung der beiden Lipide zeigt dabei ein charakteristisches Verhalten. Der minimale Flächenbedarf pro Molekül steigt dabei mit steigendem Anteil an Lipid **3**. Dieser Trend konnte erwartet werden, da der minimale Flächenbedarf pro Molekül von Lipid **3** ( $72 \text{ \AA}^2$ ) fast doppelt so groß ist wie der minimale Flächenbedarf des polymerisierbaren Lipids ( $40 \text{ \AA}^2$ ). Interessant ist, dass das charakteristische Koexistenzplateau von Lipid **3** für jede Isotherme bei nahezu dem selben Lateraldruck zu finden ist, wohingegen sich das Koexistenzplateau des Lipids **1** mit zunehmendem Anteil an Lipid **3** verschiebt. Dies ist ein direkter Hinweis auf partielle Mischbarkeit des Lipids **1** mit dem fluorierten Lipid **3**.

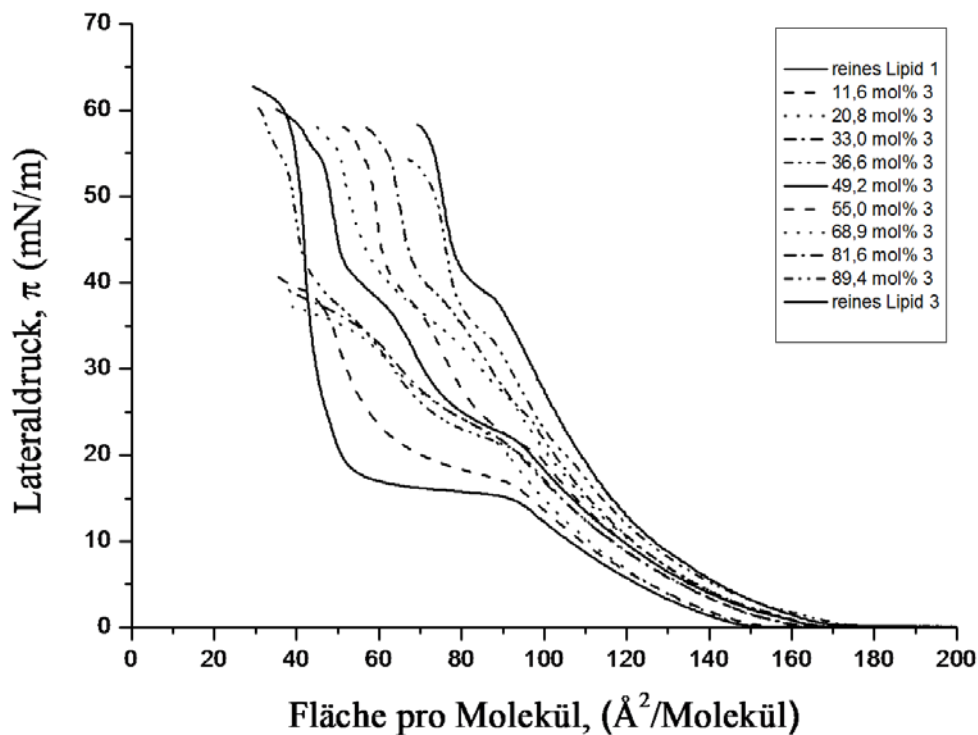
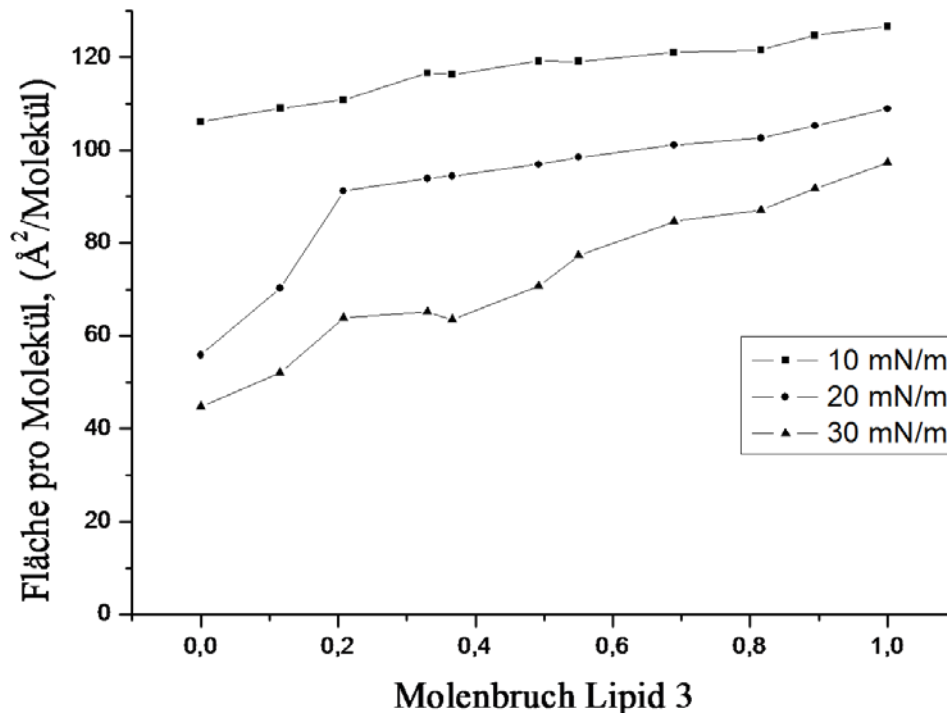


Abbildung 25:  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung 1/3 bei 25°C.

Ob und in welcher Form Wechselwirkungen in binären Monoschichten existieren, ist bereits durch einfache Untersuchungen der Schub-Flächen-Diagramme ( $\pi$ -A Isothermen) zu erkennen. In Analogie zur physikalischen Betrachtung dreidimensionaler Mischsysteme gilt für ideal mischbare bzw. unmischbare Systeme ein additives Gesetz.<sup>71</sup> Die theoretischen Grundlagen hierfür stammen aus dem Jahr 1966 und wurden von Gains entwickelt. Danach entspricht der von der Mischung benötigte Platzbedarf der Summe des jeweils von den reinen Verbindungen benötigten Raumes (bei gleichem Lateraldruck), wobei natürlich auf die absoluten Teilchenzahlen gewichtet werden muss. Falls dieses Gesetz erfüllt ist, handelt es sich um eine vollständige ideale Mischung oder eine vollständige ideale Separation. In diesem Fall erhält man einen linearen Verlauf. Bei Abweichungen ist auf Wechselwirkungen der Amphiphile untereinander, welche eventuell auf Grund der  $\pi$ -A Isothermen gedeutet werden können, oder auf eine Entmischung aus einer zuvor gemischten - hauptsächlich flüssiganalogen Phasen - zu schließen.<sup>102,103,104</sup> Zu diesem Zweck wird der Flächenbedarf pro Molekül gegen den Molenbruch einer Komponente der binären Mischung aufgetragen (Abbildung 26).

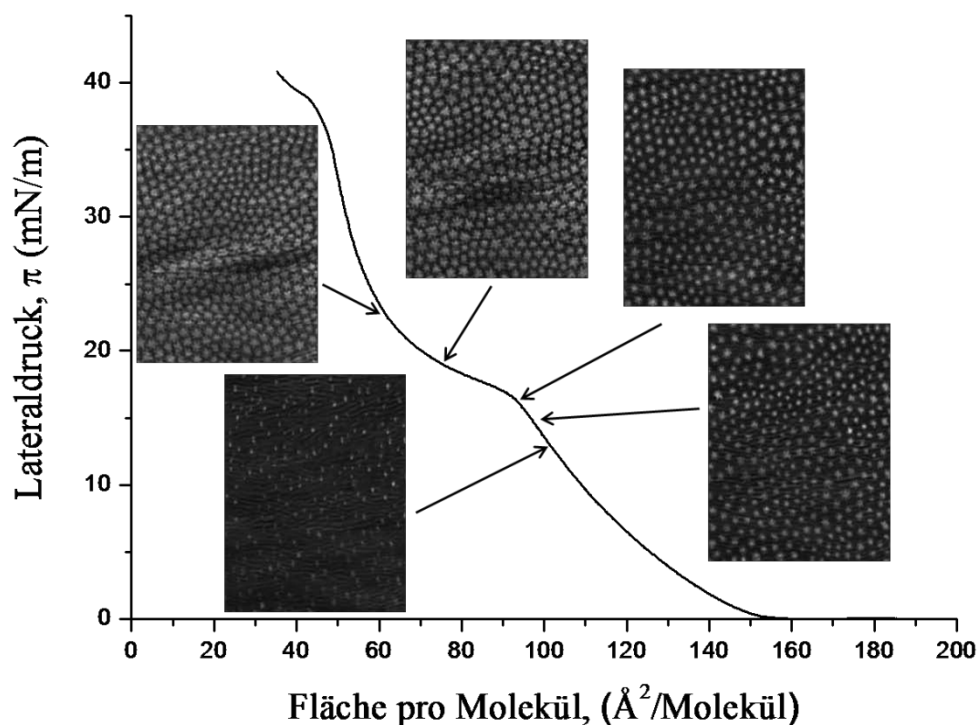


**Abbildung 26:** Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung 1/3.

Für niedrige Lateraldrücke (10 mN/m), flüssiganaloge Phase, und hohe (30 mN/m) Lateraldrücke, hauptsächlich kristallanaloge Phase, findet man eine Übereinstimmung mit der Additivitätsregel. Das binäre System ist also entweder perfekt mischbar oder entmischt. Für einen Lateraldruck von 20 mN/m (Koexistenzbereich) findet man eine starke Abweichung von der Linearität, also der Additivitätsregel. Bei einem molaren Anteil von Lipid 3 von 20,8% ist die Abweichung am deutlichsten und man findet hier einen Wendepunkt, was auf eine partielle Mischbarkeit hindeutet. Dass diese beiden Komponenten eine völlige (flüssiganaloge Phase) oder teilweise Mischbarkeit (Koexistenzbereich) aufweisen würden, konnte nicht unbedingt erwartet werden. Im Bereich hoher Lateraldrücke (30 mN/m) wurde eine nahezu vollständige Entmischung erwartet, da von den reinen Komponenten nur Lipid 1 ein Kristallisation bis zu diesen Lateraldrücken zeigt, so dass dieses Lipid hier schon größtenteils auskristallisiert ist. Um dieses Mischungsverhalten und die Domänenbildung besser verstehen zu können, wird im Folgenden zunächst die Brewsterwinkelmikroskopie und anschließend die Rasterkraftmikroskopie herangezogen.

### 3.2.2 Brewsterwinkelmikroskopie

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.8) beschrieben kann man mit Hilfe der Brewsterwinkelmikroskopie (Brewster angle microscopy = BAM) das Phasenverhalten einer Monoschicht direkt an der Wasser-Luft-Grenzfläche sichtbar machen. Um das Phasenverhalten der binären Mischung von **1** und **3** zu verstehen, wurde eine Mischung mit einem molaren Anteil an Lipid **3** von 11,6 mol% untersucht (Abbildung 27). Die Isotherme wurde bei 25°C auf Reinstwasser aufgenommen.



**Abbildung 27:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 1/3 (11,6 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

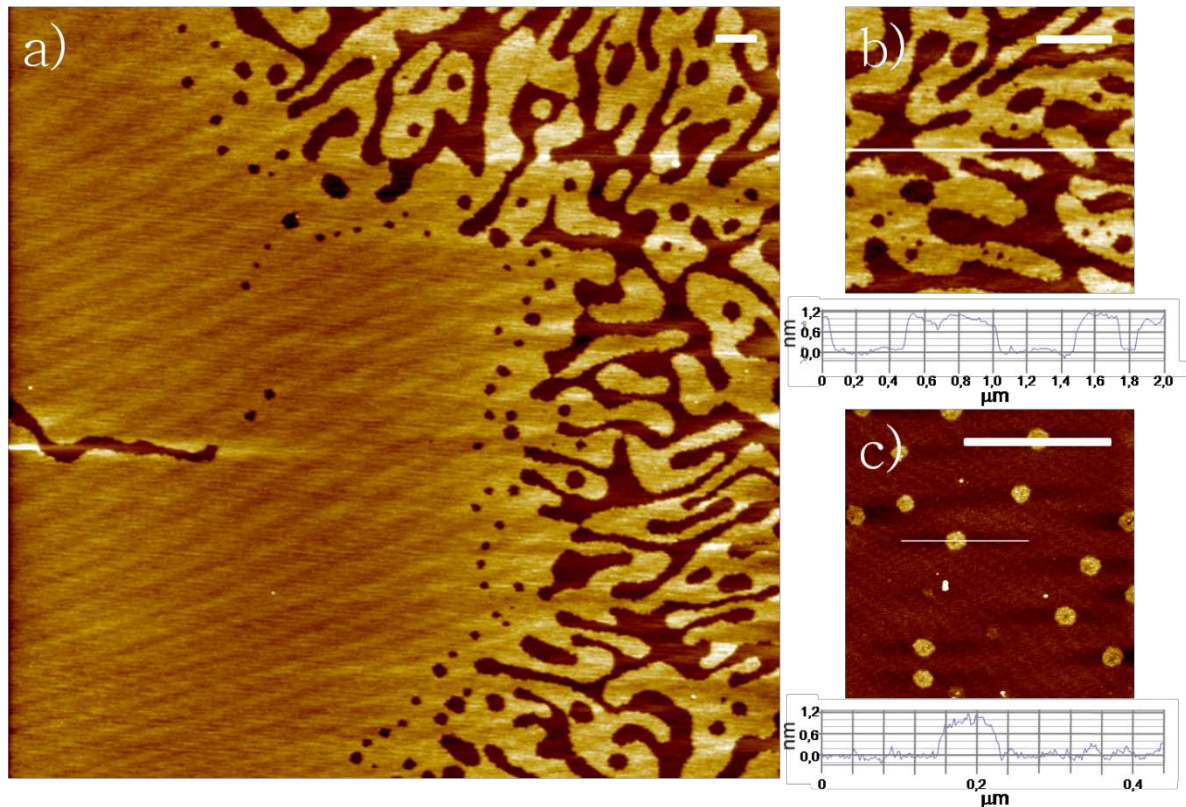
Die gezeigten BAM Aufnahmen wurden bei den Lateraldrücken aufgenommen, die durch die Pfeile angegeben werden. Ihre Größe beträgt in allen Fällen  $500 \times 400 \mu\text{m}$ . In der flüssig-analogen Phase der beiden Komponenten (Lateraldruck  $\leq 10 \text{ mN/m}$ ) konnte keine Kristallisation irgendeiner Art beobachtet werden. Dies belegt, dass die Lipide **1** und **3** in der flüssig-analogen Phase vollkommen mischbar sind, trotz ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur. Die ersten festanalogen Domänen beginnen etwa bei einem Lateraldruck von 12 mN/m zu kristallisieren. Diese Domänen werden von Lipid **1** gebildet, was aus dem

Kristallisationsverhalten der reinen Komponenten geschlossen werden kann, da nur Lipid **1** in diesem Druckbereich (10 mN/m bis 25 mN/m) eine Kristallisation zeigt. Diese Domänen wachsen erwartungsgemäß mit steigendem Lateraldruck. Im Koexistenzbereich flüssig-/kristallanalog wachsen diese Domänen besonders schnell, wobei kleine festanaloge Bereiche sich zu sternförmigen Kristallen entwickeln. Diese Sterne besitzen sechs Arme und bei einem Lateraldruck von 20 mN/m einen mittleren Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$ . Oberhalb von 25 mN/m wachsen diese Domänen zusammen und bilden eine nahezu geschlossene Oberfläche. Es ist also möglich ein zweidimensionales Muster aus fluorierten und nicht fluorierten Lipiden zu realisieren, ausgehend von einer homogenen flüssiganalogen Phase, in der die beiden Komponenten gemischt vorliegen.

Es fällt auf, dass die Form der kristallinen Domänen von denjenigen abweicht, die während der Kompression der reinen Komponente beobachtet werden konnten (Abbildung 16). Die festanaloge sternförmigen Domänen, die das reine Lipid **1** bildet sind mit einem mittleren Durchmesser von 60-80  $\mu\text{m}$  deutlich größer. Der relativ geringe Anteil an fluorierter Komponente hat folglich einen großen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten von Lipid **1**. Da das Auflösungsvermögen des Brewsterwinkelmikroskops auf etwa 2  $\mu\text{m}$  beschränkt ist, werden im Folgenden Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop durchgeführt, um das Phasenseparationsverhalten auch auf der Nanometerskala untersuchen zu können.

### **3.2.3 Rasterkraftmikroskopie**

Nachdem die Monoschicht mittels Langmuir-Blodgett Übertrag auf Glimmerplättchen übertragen wurde, lies sich die Topologie der Oberfläche untersuchen. Die Messungen hierzu wurden alle im *tapping mode* (Kapitel 1.9.2) durchgeführt.

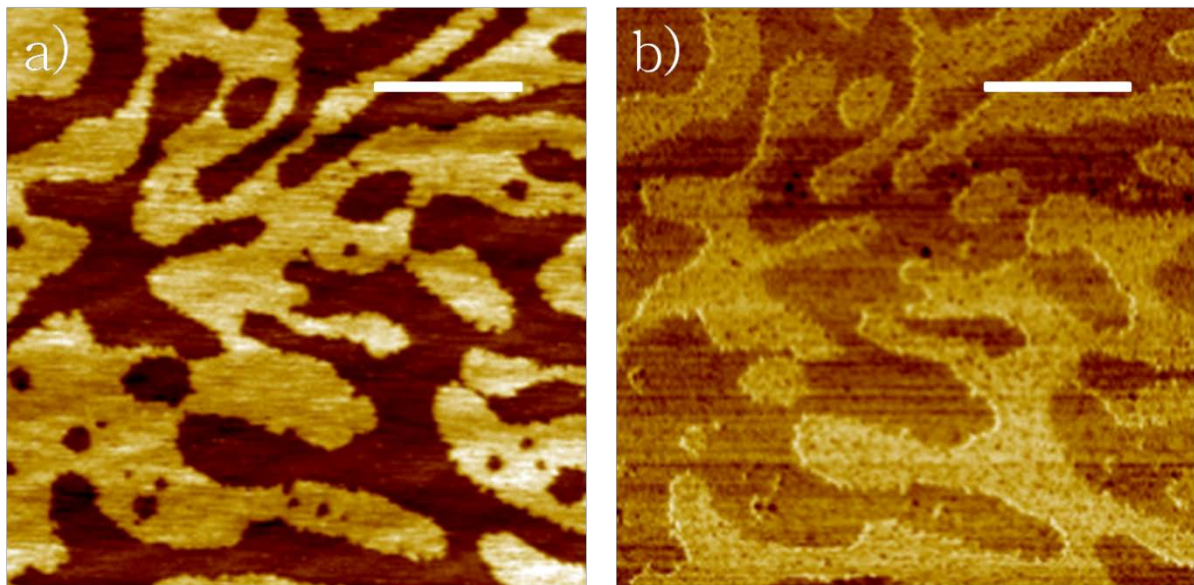


**Abbildung 28:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/3** übertragen bei 30 mN/m. Bei a) und b) beträgt der Anteil an Lipid **3** 11,6 mol% und bei c) 89,4 mol%. Der eingebettete Balken hat jeweils eine Länge von 500 nm.

In der Abbildung 28 sind Aufnahmen der binären Mischung von Lipid **1** und **3** gezeigt. Abbildung 28a und b zeigen die Höhenbilder, übertragen bei einem Lateraldruck von 30 mN/m, der binären Mischung **1/3** (11,6 mol%). Eine Phasenseparation ist sowohl im Mikrometerbereich als auch im Nanometerbereich sichtbar. Man erkennt, dass kleinere Strukturen, sich zwischen den makroskopischen Kristallen befinden, die unter dem Brewsterwinkelmikroskop gefunden wurden. In Abbildung 28a ist der Rand eines solchen makroskopischen Kristalls zu sehen. Aufgrund des Vergleichs der hier gefundenen Form der großen kristallinen Bereiche mit den makroskopischen Kristallen und der Tatsache, dass Lipid **1** größer ist als Lipid **3**, kann man folgern, dass die höheren Bereiche aus dem polymerisierbaren Lipid **1** bestehen. Der Höhenunterschied beträgt etwa 10 Å. Die niedrigeren Bereiche bestehen aus der flüssiganalogen Matrix, in der das fluorierte Lipid und noch nicht auskristallisiertes Lipid **1** enthalten sind. Die Phasenbilder bestätigen, dass die Monoschicht aus eben so einer Mischung aus kristall- und flüssiganalogen Domänen besteht (siehe Abbildung 29) bzw. dass diese beiden Phasen jeweils homogen sind.

In Abbildung 28b sind kleine Domänen bestehend aus Lipid **1** in der Nähe eines großen makroskopischen Kristalls zu sehen. Diese kleinen Domänen kristallisieren mit steigendem

Lateraldruck, was ein weiterer Hinweis auf eine partielle Mischbarkeit innerhalb der flüssiganalogen Phase ist. Denn nur wenn Lipid **1** partiell mischbar mit dem fluorierten Lipid **3** ist, würde man ein solches Kristallisationsverhalten innerhalb der flüssiganalogen Phase erwarten. In Abbildung 28c ist eine andere Zusammensetzung der binären Mischung gegeben. Die Mischung aus **1** und **3**, zusammengesetzt aus 89,4 mol% Lipid **3**, wurde ebenfalls bei 30 mN/m übertragen. Der Höhenunterschied zwischen den kristallinen Bereichen von Lipid **1** und der flüssiganalogen Phase beträgt wiederum etwa 10 Å. Allerdings sind die Domänen hier deutlich kleiner als im Falle der Mischung mit 11,6 mol%.

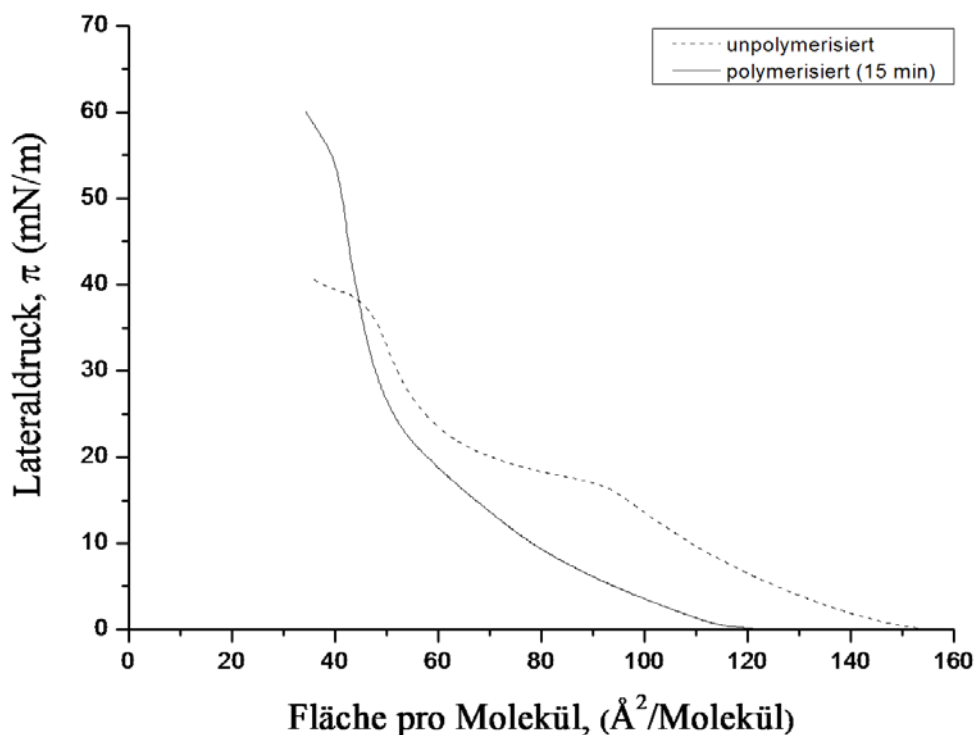


**Abbildung 29:** AFM Aufnahmen der binären Mischung 1/3 (11,6 mol%) übertragen bei 30 mN/m a) Höhenbild b) Phasenbild. Der eingebettete Balken hat jeweils eine Länge von 500 nm.

Die Größe und Form der kristallinen Domänen kann also auf zweierlei Weise kontrolliert werden. Zum einen indem man den Lateraldruck variiert, was die BAM Aufnahmen eindrucksvoll zeigen, und zum anderen indem man die molare Zusammensetzung der binären Mischung ändert. Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass die Domänenmuster innerhalb dieser binären Mischung regulierbar sind, soll im Folgenden nun untersucht werden, ob sich diese Strukturen innerhalb der Monoschicht mittels photochemischer Polymerisation stabilisieren lassen.

### 3.2.4 Polymerisation

Um nun zu untersuchen, ob sich die Strukturen innerhalb einer Monoschicht, aufgebaut aus den beiden Lipiden **1** und **3**, durch eine photochemische Polymerisation stabilisieren lassen, kann man zunächst die Isothermen vergleichen. In Abbildung 30 sind die beiden Isothermen einer Mischung aus **1** und **3** (11,6 mol%) gezeigt. Beide wurden bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen. Bei der Polymerisation wurde dabei wie folgt vorgegangen. Die Mischung wurde bis zu einem Zieldruck von 30 mN/m komprimiert und dann auch während der Bestrahlung bei diesem Druck gehalten. Hier ist eine Polymerisation gut möglich, da sich das Lipid **1** in der kristallanalogen Phase befindet. Die komprimierte Monoschicht wurde dann für 15 Minuten mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Barrieren expandiert und nach einer Relaxationszeit von 15 Minuten wurde eine Isotherme aufgenommen, welche in der Abbildung 30 die durchgezogene Linie ist.

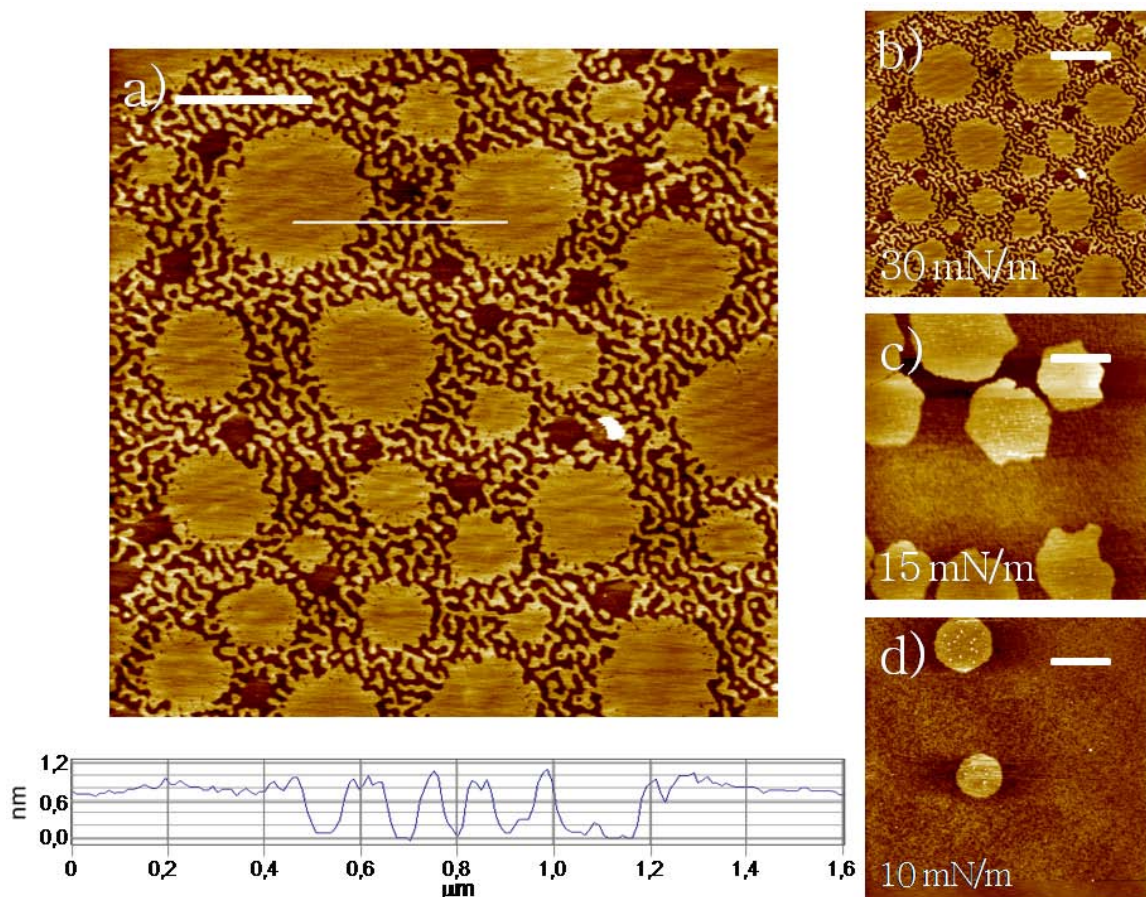


**Abbildung 30:**  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung **1/3** (11,6 mol%) vor und nach der photochemischen Polymerisation bei 25°C.

Die unbestrahlte Mischung zeigt ab einem Flächenbedarf pro Molekül von etwa 155  $\text{\AA}^2$  eine flüssiganaloge Phase. Ab einem Flächenbedarf von etwa 92  $\text{\AA}^2$  beginnt der Koexistenzbereich

zwischen flüssig- und kristallanalog. Bei einem minimalen Flächenbedarf von  $48 \text{ \AA}^2$  pro Molekül kollabiert die Monoschicht und der gefundene Kollapsdruck beträgt  $38 \text{ mN/m}$ . Im Fall der bestrahlten Mischung finden wir einen anderen Verlauf. Bei einem Flächenbedarf von  $120 \text{ \AA}^2$  pro Molekül beginnt eine flüssiganaloge Phase, die bei  $50 \text{ \AA}^2$  in die kristallanaloge Phase übergeht. Ein Koexistenzbereich ist nicht zu finden. Bei einem minimalen Flächenbedarf von  $41 \text{ \AA}^2$  pro Molekül kollabiert die Monolage, was deutlich kleiner ist als im Fall der unbestrahlten Probe. Der charakteristische Kollapsdruck beträgt  $54 \text{ mN/m}$  und liegt damit deutlich über dem der unbestrahlten Mischung. Diese beiden Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Polymerisation der Monoschicht mittels Bestrahlung mit ultraviolettem Licht möglich ist. Da dies schon zuvor für eine Monoschicht aus Lipid **1** gezeigt wurde, war dies auch so erwartet worden.<sup>105</sup>

Um die durch die Polymerisation fixierten Domänen der binären Mischung nun auch bildlich darstellen zu können, wurde sich wiederum der Rasterkraftmikroskopie bedient.



**Abbildung 31:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/3** (11,6 mol%) a) Das Höhenbild der photochemisch polymerisierten Probe und das zugehörige Höhenprofil übertragen bei  $30 \text{ mN/m}$  b) – d) Die photochemisch polymerisierten Proben wurden bei den angegebenen Lateralldrücken übertragen. Die eingebetteten Balken haben in allen Fällen eine Länge von  $1 \mu\text{m}$ .

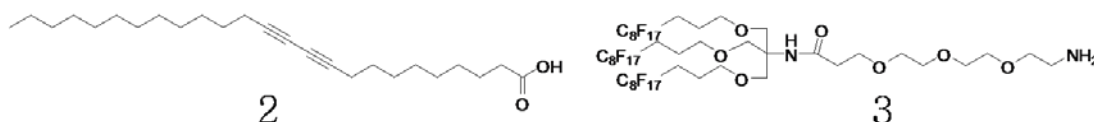
In Abbildung 31a ist eine AFM Aufnahme gegeben, welche die binäre Mischung **1/3** (11,6 mol%) zeigt. Die Monoschicht wurde bei 30 mN/m auf ein Glimmerplättchen übertragen nachdem diese für 15 Minuten mit UV Licht bestrahlt worden war. Man erkennt runde kristallanaloge Domänen, die aus polymerisiertem Lipid **1** bestehen und von einer flüssiganalogen Matrix bestehend aus Lipid **3** umgeben sind. Die flüssiganaloge Phase ist durchzogen von schmalen Streifen aus polymerisiertem Lipid **1**. Der Höhenunterschied zwischen den kristall- und flüssiganalogen Bereichen beträgt 10 Å. Diese Werte entsprechen der unpolymersierten binären Mischung (vergleiche Abbildung 28), deren kristallines Muster auch hier wieder zu finden ist. Um nun zu belegen, dass die gefunden Formen tatsächlich durch die Polymerisation fixiert werden konnten, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Nach der 15 minütigen Bestrahlung wurden die Barrieren des Langmuir-Blodgett Trogs wieder expandiert und nach einer 15 minütigen Relaxationszeit wieder auf den jeweiligen Zieldruck komprimiert, bei dem dann der Übertrag auf ein Glimmerplättchen erfolgte. Hierbei sollten diese kristallinen Domänen nicht nur bei hohen Lateraldrücken auftreten, sondern auch bei niedrigen Lateraldrücken (10 mN/m), bei denen sonst keinerlei Kristallisation zu beobachten ist. Tatsächlich findet man bei Lateraldrücken von 15 mN/m (Abbildung 31c) und 10 mN/m (Abbildung 31d) dieselben Domänen, die zuvor durch die photochemische Polymerisation stabilisiert bzw. fixiert wurden. Die unpolymersierte Mischung **1/3** zeigte hingegen keinerlei Kristallisation bei einem Lateraldruck von 10 mN/m, was ein klarer Beweis dafür ist, dass die von Lipid **1** geformten Strukturen erfolgreich mittels photochemischer Polymerisation fixiert werden konnten.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die binäre Mischung **1/3** ein differenziertes Phasenverhalten zeigt. Für niedrige Lateraldrücke (10 mN/m) findet man eine homogene Mischung, denn hier sind beide Lipide in der flüssiganalogen Phase. Demgegenüber findet man für hohe Lateraldrücke (30 mN/m) eine nahezu vollständige Entmischung, denn hier ist das polymerisierbare Lipid schon nahezu vollständig auskristallisiert wohingegen das fluorierte Lipid immer noch in der flüssiganalogen Phase ist. Bei mittleren Lateraldrücken findet man eine Abweichung vom idealen Verhalten, denn hier findet man Mischphasen neben reinen Phasen. Es zeigte sich weiter, dass Form und Größe der von Lipid **1** ausgebildeten Domänen sowohl über den Lateraldruck als auch über die molare Zusammensetzung der Mischung variiert werden können. Außerdem lässt sich die binäre Mischung mittels photochemischer Polymerisation stabilisieren, so dass die gebildeten Domänen fixiert werden können und sie somit unabhängig von äußeren Parametern wie z.B. dem Lateraldruck sind.

Im Hinblick auf die anderen fluorierten und teilfluorierten Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, bleibt festzuhalten, dass sich Lipid **1** bestens als Matrixlipid für binäre und ternäre Mischungen aus eben diesen Verbindungen eignet, da es sowohl die Domänenbildung unterstützt als auch eine Stabilisierung mittels photochemischer Polymerisation erlaubt.

### 3.3 Binäre Mischung der Lipide **2** und **3**

Mit der binären Mischung **1/3** konnte gezeigt werden, dass Größe und Form der kristallinen Domänen zum einen in Abhängigkeit vom Lateraldruck und zum anderen in Abhängigkeit von der molaren Zusammensetzung variiert werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Strukturen mittels photochemischer Polymerisation stabilisiert werden können.

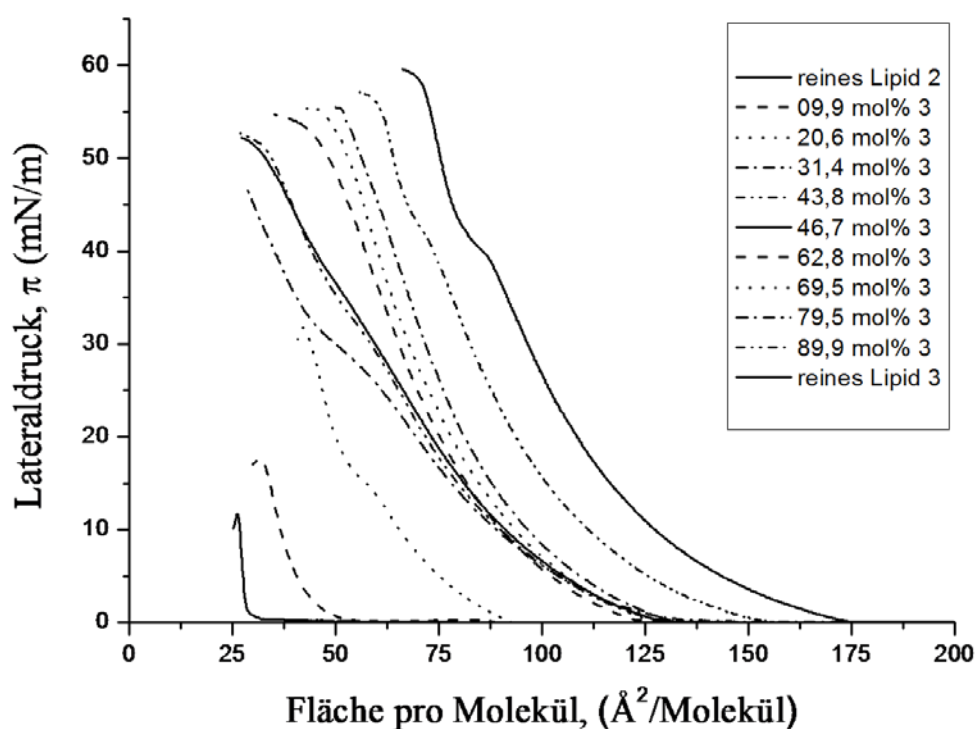


Dies soll im Folgenden auch für die binäre Mischung aus Lipid **2** und **3** untersucht werden. Hierbei bietet Lipid **2** die Möglichkeit, im Gegensatz zum Lipid **1**, welches in der hydrophilen Kopfgruppe polymerisiert wird, eine Polymerisation im hydrophoben Schwanz des Moleküls durchzuführen. Außerdem sollte sich diese Polymerisation auch anhand der auftretenden Farbänderung verfolgen lassen, denn im Fall der topochemischen Polymerisation der Diacetylene treten zunächst rote und später blau-violette Farbmuster auf.

#### 3.3.1 $\pi$ -A Isothermen

Es ist zu erwarten, dass die binäre Mischung aus Lipid **2** und **3** ein etwas anderes Verhalten zeigen wird, denn im Gegensatz zum Lipid **1** verfügt das Diacetylen nur über eine kristallanaloge Phase. In Abbildung 32 sind die Isothermen der binären Mischung **2/3** gegeben, die bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen wurden. Hierbei wurde der molare Anteil an fluoriertem Amphiphil in Stufen von 10 mol% erhöht. Das reine Lipid **2** zeigt einen minimalen Flächenbedarf von 27 Å<sup>2</sup> bei einem Kollapsdruck von etwa 12

mN/m, was in guter Übereinstimmung zu den in der Literatur zu findenden Werten ist.<sup>92,93,94</sup> Der minimale Flächenbedarf der binären Mischungen erhöht sich mit größer werdendem molaren Anteil an fluoriertem Lipid **3**. Aber im Gegensatz zu der binären Mischung **1/3** findet man das charakteristische Plateau von Lipid **3** nur in einigen Isothermen wieder. Zum Beispiel zeigen die binären Mischungen mit molaren Anteilen an Lipid **3** von 62,8 mol%, 69,5 mol% und 79,5 mol% nur eine durchgehend flüssiganaloge Phase, so dass sich die Steigung der Isothermen kaum ändert. Dasselbe gilt für die binären Mischungen mit molaren Anteilen von 9,9 mol% und 20,6 mol%, in denen der Kollapspunkt von Lipid **2** zu finden ist, obgleich er zu höheren Lateraldrücken hin verschoben ist. Diese Ergebnisse weisen auf eine partielle Mischbarkeit für diese Zusammensetzungen hin.



**Abbildung 32:**  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung **2/3** bei 25°C.

Um das Mischungsverhalten nun im Detail zu untersuchen, bedient man sich wiederum der Additivitätsregel nach Gains (Abbildung 33). Die aufgetragene Fläche pro Molekül gegen den Molenbruch von Lipid **3** zeigt, dass das Mischungsverhalten deutlich vom idealen Verhalten abweicht. Besonders für geringe molare Anteile an Lipid **3** (unter 30 mol%) und für hohe Anteile (mehr als 80 mol%) findet man eine Abweichung vom idealen linearen Verlauf. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Carbonsäurefunktion des Lipids **2** mit der

Aminfunktion des Lipids **3** wechselwirkt, z.B. über Wasserstoffbrückenbindungen. Wang et al. fanden ein ähnliches Verhalten für eine binäre Mischung aus Lipid **2** und einem teilfluorierten Tetracosane<sup>106</sup>. Sie zeigten, dass die beiden Moleküle mischbar waren aber starke zwischenmolekulare Wechselwirkungen erfuhren, wobei sie ein Minimum für den minimalen Flächenbedarf bei einem molaren Anteil der fluorierten Komponente von 67 mol% fanden. Im Falle der binären Mischung **2/3** zeigen sich weder Minima noch Maxima im Graphen. Es lässt sich festhalten, dass die binäre Mischung stark vom idealen Verhalten abweicht und eine teilweise Mischbarkeit zeigt.

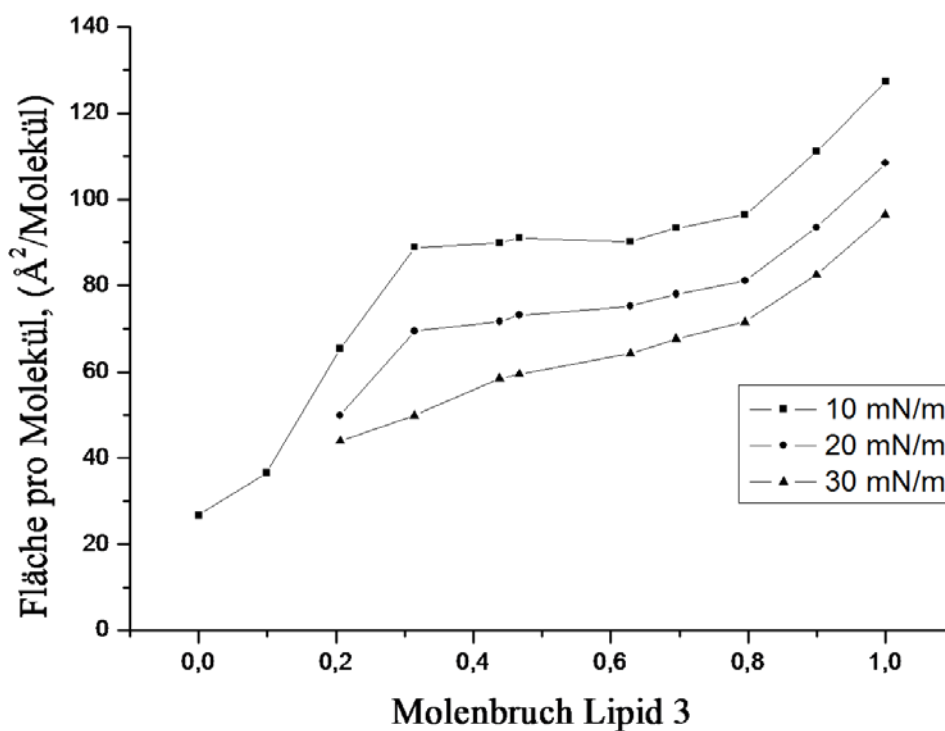


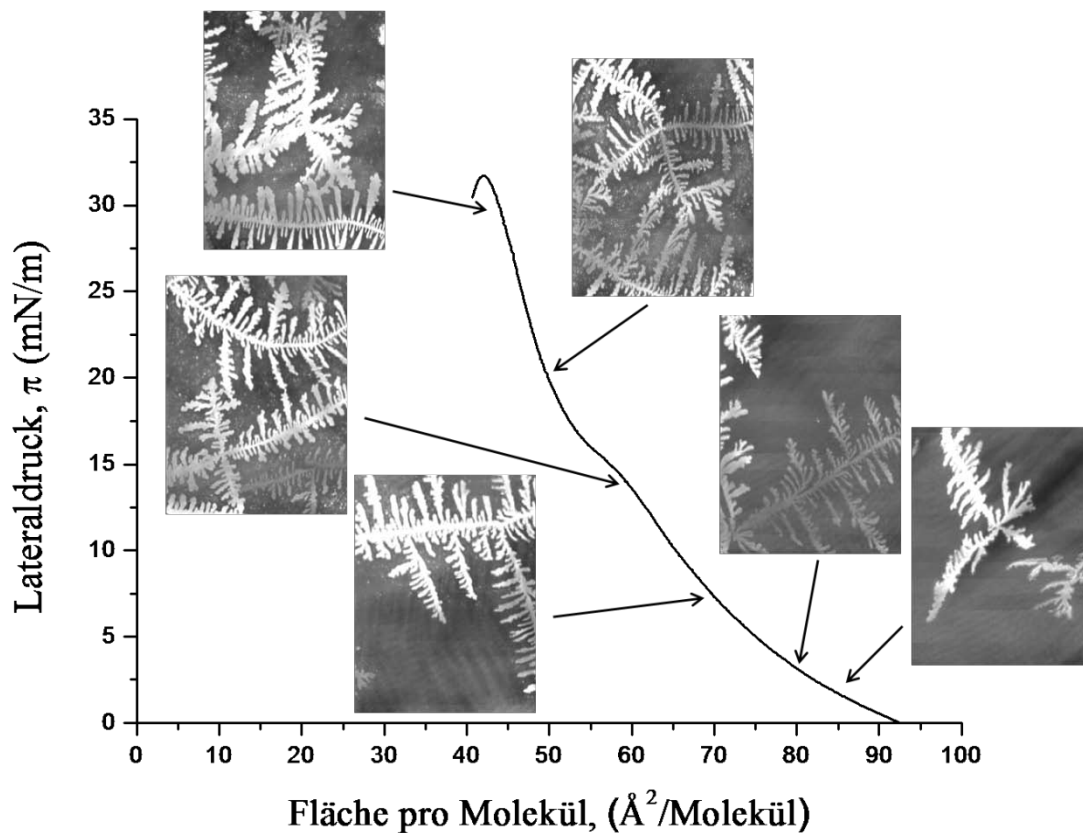
Abbildung 33: Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung **2/3**.

Einen tieferen Einblick in das Phasenverhalten der binären Mischung sollen die Brewsterwinkelmessungen im folgenden Kapitel gewähren.

### 3.3.2 Brewsterwinkelmikroskopie

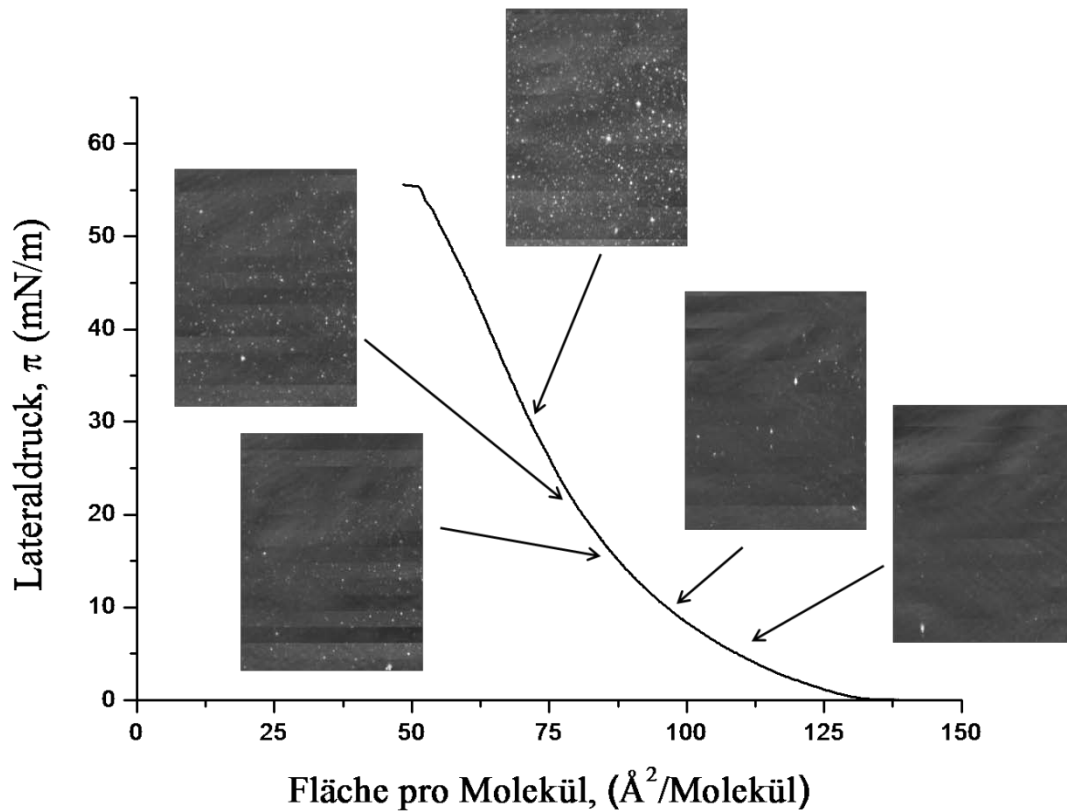
Im Vergleich zur binären Mischung mit dem Lipid **1**, findet man auch für die binäre Mischung **2/3** (20,6 mol%) eine klare Phasenseparation allerdings mit völlig anderen Strukturen (Abbildung 34). Die BAM Aufnahmen wurden bei den durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen und haben alle eine Größe von  $500 \times 400 \mu\text{m}$ . Bereits bei sehr niedrigen Lateraldrücken (kleiner als  $2,5 \text{ mN/m}$ ) findet man große Kristalle mit Verästelungen, wobei diese Äste die Form von Blättern haben. Sie bestehen aus Lipid **2**, dessen kristallanaloge Phase sich im Gleichgewicht mit der gasanalogen Phase befindet. Die Form der Kristalle ist typisch für einen Wachstumsmechanismus unter Nichtgleichgewichtsbedingungen. Ein solcher Mechanismus kann mit Hilfe des DLA (diffusion-limited aggregation) Models erklärt werden.<sup>107</sup> Dieses Model kann dann angewendet werden, wenn kleine kristalline Domänen (hier Lipid **2**) schon bei sehr niedrigen Drücken innerhalb der Monoschicht vorhanden sind. Komprimiert man nun, wachsen diese sehr schnell, kommen in Kontakt miteinander und wachsen zusammen. Dies führt zur Bildung von fraktalen Strukturen, wie sie von Volinsky et al. für eine Diacetylsäure gefunden wurden.<sup>108</sup> Allerdings handelte es sich in diesem Fall um die 10,12-Tricosadiinsäure, welche sich von Lipid **2** aber nur dadurch unterscheidet, dass sie eine um zwei Methyleinheiten längere Alkylkette besitzt. Beim Komprimieren findet man, dass der Kristallisationsprozess bis zu einem Lateraldruck von etwa  $12 \text{ mN/m}$  zu beobachten ist. Beim weiteren Komprimieren wachsen diese Kristalle nicht mehr weiter, was damit zu erklären ist, dass Lipid **2** bei einem Lateraldruck von  $12 \text{ mN/m}$  bereits vollständig kristallisiert ist. Oberhalb dieses Lateraldruckes, also beim weiteren Komprimieren, erscheinen nur noch sehr kleine festanaloge Domänen zwischen den großen Kristallen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der schon anhand der  $\pi$ -A Isothermen gemachten Annahme, dass Lipid **2** und **3** selbst bei niedrigen Lateraldrücken nur teilweise mischbar sind, denn bereits bei weniger als  $2,5 \text{ mN/m}$  findet man große Kristalle. Und die Beobachtung, dass diese Kristalle bei weiterer Kompression wachsen zeigt ebenfalls, dass eine geringe Mischbarkeit des Lipids **2** in der flüssiganalogen Phase von Lipid **3** gegeben ist. Weiterhin ist bemerkenswert, dass die gefundenen kristallinen Formen deutlich von denen abweichen, die Ma et al. für das reine Lipid **2** finden konnte.<sup>92</sup> Sie fanden deutlich kleinere runde und verzweigt Domänen von variierender Größe. Außerdem waren deren Verzweigungen starr und stäbchenförmig. Ein molarer Anteil an fluoriertem Lipid **3** von 20,6 mol% hat also einen großen Einfluss auf den Kristallisationsprozess und die Form der Domänen. Dies wurde auch von Volinsky et al. für

deren System beobachtet, wo ein Anteil von 20 mol% eines Lecithins ebenfalls eine deutliche Änderung der Kristallisation bewirkte.



**Abbildung 34:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 2/3 (20,6 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Erhöht man nun den molaren Anteil an Lipid **3** deutlich (bis auf 79,5 mol%) zeigt sich, dass die nun auftretenden Kristalle deutlich kleiner sind (Abbildung 35). Selbst bei sehr hohen Lateraldrücken werden nur kleine festanaloge Domänen innerhalb einer flüssiganalogen Matrix gefunden. Der hohe Anteil an fluoriertem Lipid verhindert hier offensichtlich eine Kristallisation der Diacetylsäure. Dies ist verständlich, da die Diacetylene aufgrund der Diacetylenfunktion nur in einem bestimmten Winkel untereinander kristallisieren bzw. dicht packen können, so dass bereits geringe Menge an Fremdlipid diese Kristallisation unterbinden.

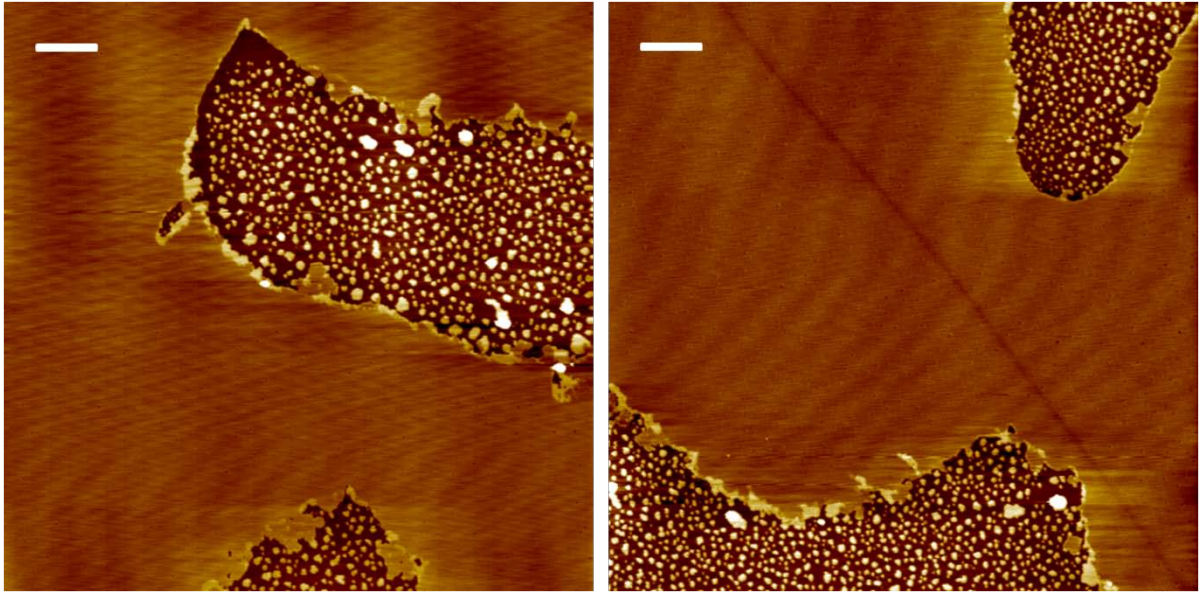


**Abbildung 35:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 2/3 (79,5 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Auch hier sollen die Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einen tieferen Einblick in das Kristallisationsverhalten der binären Mischung geben.

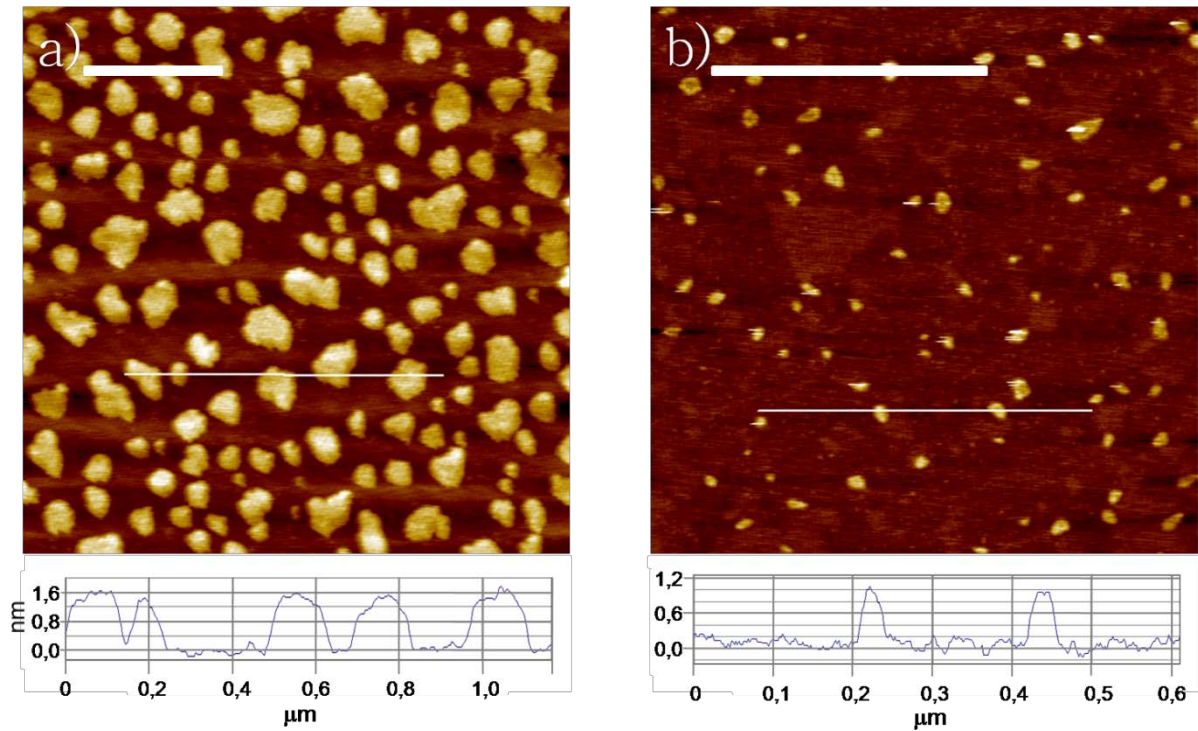
### 3.3.3 Rasterkraftmikroskopie

Auch hier soll mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie versucht werden das Phasenverhalten der binären Mischung auch im Nanometerbereich zu verstehen. Die Messungen wurden alle im *tapping mode* durchgeführt. In Abbildung 36 ist die Mischung 2/3 (9,9 mol%) gezeigt, welche bei 10 mN/m übertragen wurde. Man erkennt die Ränder der unter dem Brewsterwinkelmikroskop gefundenen makroskopischen Kristalle und zwischen diesen Bereiche, in denen kleine kristalline Domänen zu finden sind, die deutlich kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind.



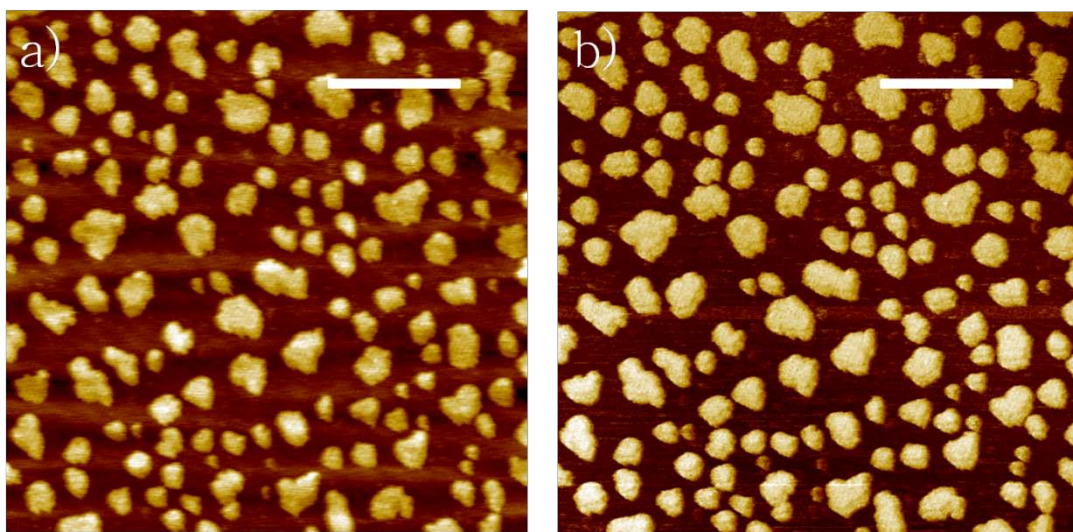
**Abbildung 36:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **2/3** (9,9 mol%) übertragen bei 10 mN/m. Der eingebettete Balken hat jeweils eine Länge von 1  $\mu\text{m}$ .

Schaut man sich einen Bereich genauer an (Abbildung 37a), dann findet man, dass diese kleinen kristallanalogen Domänen ebenfalls von Lipid **2** gebildet werden. Ein Beleg dafür ist, dass die Höhe der kleinen Domänen mit 16  $\text{\AA}$  vergleichbar ist mit der Höhe der makroskopischen Kristalle. Die Größe der kleinen kristallinen Domänen variiert von 50 nm bis 250 nm. Als Erklärung hierfür kann die partielle Mischbarkeit von Lipid **2** im fluorierten Lipid angeführt werden. Lipid **3** ist in der flüssiganalogen Phase, während Lipid **2** in einem Gleichgewicht zwischen gas- und kristallanaloger Phase ist. Komprimiert man die Monoschicht scheiden sich kristalline Domänen von **2** innerhalb einer Matrix aus fluoriertem Lipid ab. Folgt man dem DLA (diffusion-limited aggregation) Model, dann handelt es sich bei diesen kleinen Domänen um genau die Strukturen, die während der Kompression zusammenwachsen und die großen fraktalen Formen bilden. Ein Vergleich von Höhen- und Phasenbild zeigt auch hier eindeutig (Abbildung 38), dass die Zusammensetzung der gefundenen Domänen für die gesamte Probe einheitlich ist bzw. dass sowohl die kristallinen als auch die flüssiganalogen Bereiche homogen sind.



**Abbildung 37:** AFM Aufnahmen der binären Mischung 2/3 und deren Höhenprofile a) binäre Mischung 2/3 (9,9 mol%) übertragen bei 10 mN/m b) binäre Mischung 2/3 (89,9 mol%) übertragen bei 30 mN/m. Der eingebettete Balken hat eine Länge von 500 nm.

In Abbildung 37b ist der Anteil an fluoriertem Lipid mit 89,9 mol% deutlich höher und, wie schon bei der binären Mischung 1/3, die gefundenen kristallinen Domänen mit Größen von weniger als 50 nm kleiner.



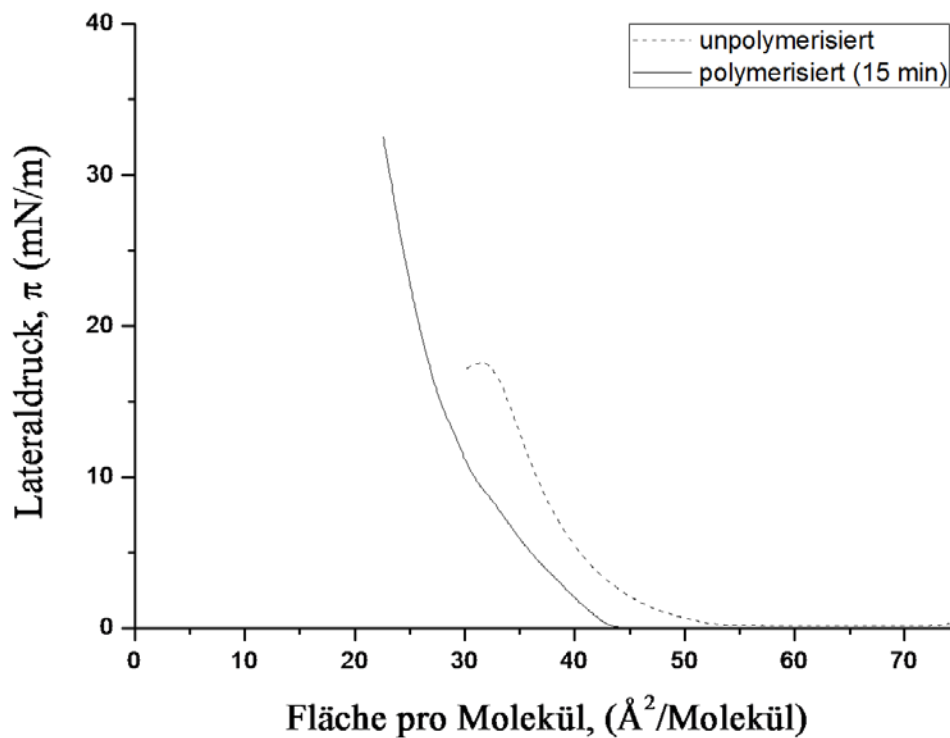
**Abbildung 38:** AFM Aufnahmen der binären Mischung 2/3 (mol%) übertragen bei 30 mN/m a) Höhenbild b) Phasenbild. Der eingebettete Balken hat jeweils eine Länge von 500 nm.

Dies bedeutet, dass auch im Fall der binären Mischung **2/3** eine Kontrolle der Domänen in Größe und Form sowohl über den Lateraldruck als auch anhand der jeweiligen Komposition der Mischung möglich war. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich diese binäre Mischung auch mittels photochemischer Polymerisation stabilisieren lässt.

### 3.3.4 Polymerisation

Auch im Falle dieser binären Mischung war eine Zielsetzung die gefundenen Strukturen durch eine photochemische Polymerisation zu fixieren bzw. zu stabilisieren. Hierzu wurde die Mischung **2/3** (9,9 mol%) für 15 min mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Die Abbildung 39 zeigt die beiden  $\pi$ -A Isothermen, welche jeweils bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen wurden. Ob eine Polymerisation erfolgreich ist bzw. stattfindet, kann man im Falle des Lipids **2** schon an einer während der Bestrahlung auftretenden Farbänderung verfolgen. Schon nach kurzer Zeit verfärbte sich die Monolage rot. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass eine topochemische Polymerisation erfolgte, wobei sich einige Bereiche der Monoschicht in der Folge auch blau-violett verfärbten. Dieses Phänomen beruht darauf, dass sich während der Polymerisation von Diacetylenen zwei verschiedene polymere Formen bilden.<sup>109</sup>

Eine Polymerisation zeigen auch die  $\pi$ -A Isothermen. Im Fall der unpolymerisierten Mischung beginnt die flüssiganaloge Phase bei einem Flächenbedarf pro Molekül von 52 Å<sup>2</sup> und setzt sich fort bis zu einem minimalen Flächenbedarf von 33 Å<sup>2</sup> pro Molekül. Der Kollapsdruck beträgt hier 17,5 mN/m. Vergleicht man dies mit der polymerisierten Mischung, erkennt man sofort, dass aufgrund der Polymerisation der minimale Flächenbedarf der Mischung abgenommen hat, was an der dichteren Packung der Moleküle liegt, und dass sich die Stabilität dieser Monoschicht deutlich erhöht hat.

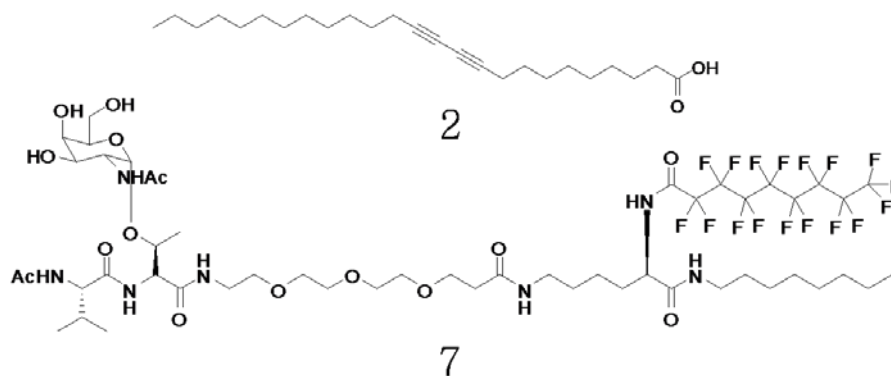


**Abbildung 39:**  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung 2/3 (9,9 mol%) vor und nach der photochemischen Polymerisation bei 25°C.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass auch im Fall der binären Mischung 2/3 die Domänenbildung in Form und Größe anhand des Lateraldrucks und der Zusammensetzung der Mischung kontrolliert werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich diese binären Mischungen auch durch Polymerisation stabilisieren lassen.

### 3.4 Binäre Mischung der Lipide 2 und 7

Da sich für die binäre Mischung 2/3 gezeigt hat, dass die Mischbarkeit der beiden Lipide stark begrenzt ist, soll hier untersucht werden, ob sich das Phasenseparationsverhalten ändert, wenn man statt des perfluorierten Lipids ein teilfluoriertes verwendet.



Neben der zu erwartenden niedrigeren Entmischungstendenz aufgrund der partiellen Fluorierung der Molekülketten, verfügt Lipid **7** außerdem über eine T<sub>N</sub>-Antigen (GalNAc) Kopfgruppe, welche auf Grund ihrer Größe einen Einfluss auf das Mischungsverhalten haben kann.

### 3.3.1 $\pi$ -A Isothermen

Die in Abbildung 40 gegebenen  $\pi$ -A Isothermen wurden bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen. Der molare Anteil an Lipid **7** wurde in Schritten von jeweils etwa 10 mol% erhöht. Auch für diese binäre Mischung findet man einen generellen Trend von zunehmendem minimalem Flächenbedarf bei steigendem Anteil an Lipid **7**. Allerdings fällt hierbei auf, dass das reine Lipid **7** aus diesem Trend herausfällt, denn hier findet man einen minimalen Flächenbedarf pro Molekül, der sogar geringer ist als die Mischung mit 49,3 mol% Lipid **7**. Dies liegt daran, dass die flüssiganaloge Phase des reinen Lipids deutlich ausgeprägter ist als im Falle der Mischisothermen. Offensichtlich stabilisiert die Diacetylenkomponente die Mischungen bzw. reduziert deren flüssiganaloge Phase, weil sie die kristallanaloge Phase bevorzugt. Des Weiteren findet man den charakteristischen Kollapspunkt in fast allen Isothermen, wobei er allerdings in allen Fällen verschoben ist. Diese beiden Beobachtungen weisen darauf hin, dass es eine partielle Mischbarkeit auch in dieser binären Mischung gibt. Dies konnte man allerdings mit Blick auf die Mischungen mit den fluorierten Komponenten erwarten, denn ein teilfluoriertes Molekül sollte eine bessere Mischbarkeit mit einer Alkylverbindung zeigen als ein perfluoriertes Lipid.

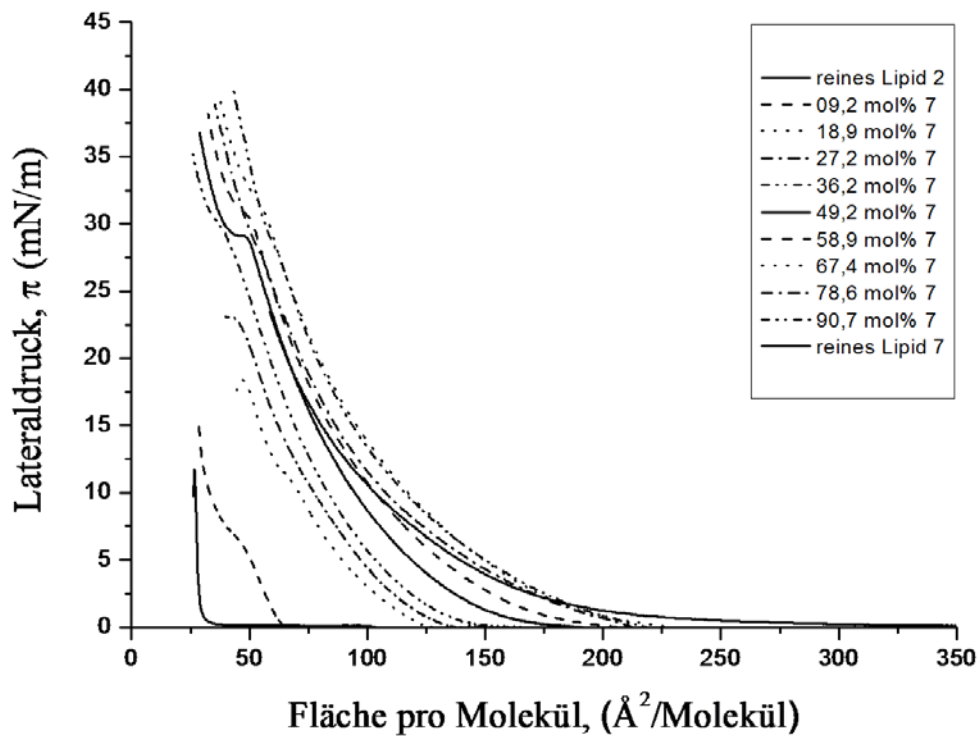


Abbildung 40:  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung 2/7 bei 25°C.

In Abbildung 41 ist der Flächenbedarf pro Molekül gegen den Molenbruch der teilfluorierten Komponente aufgetragen. Man erkennt sofort, dass der Verlauf nicht linear ist. Wiederum findet man eine besonders große Abweichung für geringe Anteile an Lipid 7 (weniger als 20 mol%) und für hohe Anteile (mehr als 70 mol%). Die starke Abweichung vom idealen Verhalten, im Vergleich zu der binären Mischung 2/3, kann mit der deutlich komplexeren Kopfgruppe des Lipids 7 begründet werden. Denn die Zuckerstruktur des T<sub>N</sub>-Antigens ist sehr groß und verursacht schon allein aus sterischen Gründen Probleme während der Kompression. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die hohe Anzahl an Alkoholgruppen sicher ebenfalls einen Einfluss auf das Packungsverhalten dieses Lipids hat.

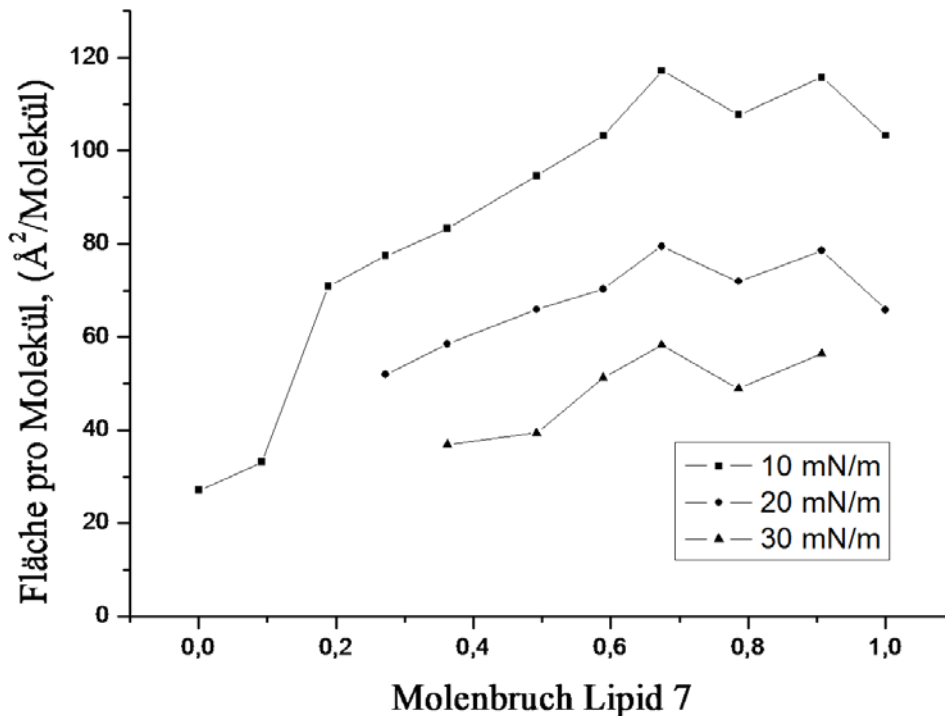


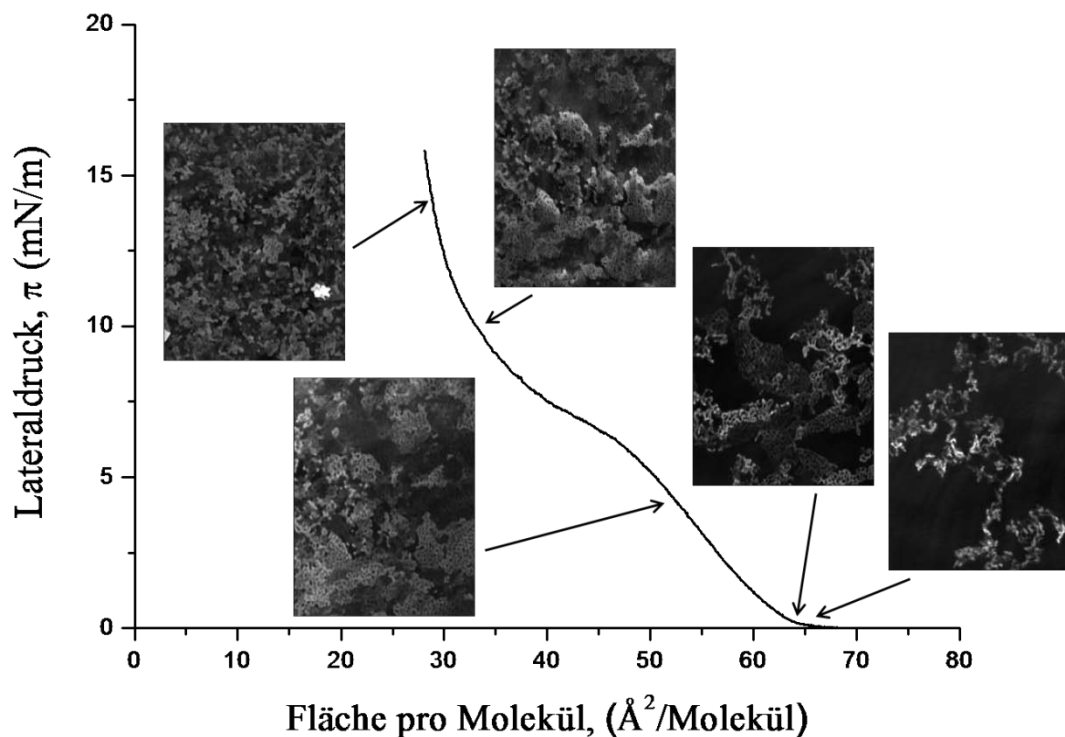
Abbildung 41: Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung 2/7.

Die Brewsterwinkelmikroskopie soll im Folgenden einen tieferen Einblick in das Phasenverhalten der binären Mischung 2/7 liefern.

### 3.3.2 Brewsterwinkelmikroskopie

Wie schon für die binäre Mischung 2/3 gesehen findet man auch im Fall der binären Mischung 2/7 (9,2 mol%), dass der Kristallisationsprozess schon bei sehr geringen Lateraldrücken beginnt. In Abbildung 42 ist die  $\pi$ -A Isotherme gegeben. Die Aufnahmen mit dem Brewsterwinkelmikroskop wurden bei den durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen und haben alle eine Größe von  $500 \times 400 \mu\text{m}$ . Die ersten kristallinen Domänen können schon bei 0,1 mN/m beobachtet werden und die Kristallisation schreitet schnell voran. Die Ursache hierfür ist erneut das Phasenverhalten des Lipids 2. Denn selbst bei sehr geringen Lateraldrücken kommt es aufgrund des Gleichgewichtes zwischen der kristall- und gasanalogen Phase zur Bildung von Domänen. Bei einem Lateraldruck von 4 mN/m ist der Kristallisationsprozess nahezu abgeschlossen. Hier können poröse Strukturen beobachtet

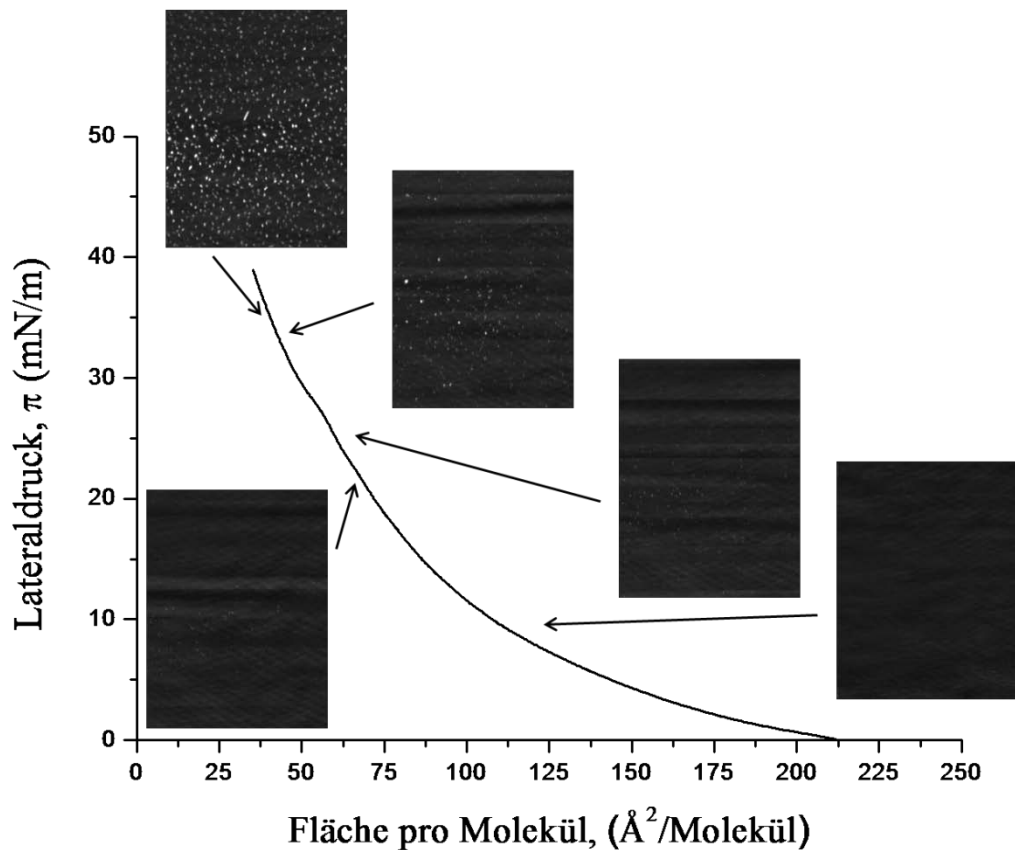
werden. Bei weiterer Kompression ändern die Kristalle nicht mehr ihre Form, sondern schieben sich nur noch dichter zusammen. Dieser Prozess ist bis zu einem Lateraldruck von 12 mN/m zu beobachten. Danach schieben sich die zuvor beobachteten porösen Strukturen ineinander, so dass es zu Überlappungen kommt. Verglichen mit der binären Mischung **2/3** ist die Kristallisationsgeschwindigkeit hier erheblich höher. Zeigten die BAM Aufnahmen im Fall der Mischung **2/3** bei einem Lateraldruck von 4 mN/m, dass etwa 29% des Lipids **2** kristallisiert waren, so sind es für die Mischung **2/7** bereits 65% beim selben Lateraldruck. Bei einem Lateraldruck von 8 mN/m findet man, dass 56% und 70% kristallisiert sind. Eine Erklärung hierfür kann eine bessere Vororientierung im Falle der binären Mischung **2/7** sein, also eine höhere Entmischung als im Falle der Mischung **2/3**.



**Abbildung 42:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung **1/7** (9,2 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Erhöht man nun den Anteil an Lipid **7** deutlich, so findet man ein ganz anderes Kristallisationsverhalten. In Abbildung 43 ist eine  $\pi$ -A Isotherme wiedergegeben, bei welcher der molare Anteil an Lipid **7** bei 78,6 mol% liegt. Die BAM Aufnahmen wurden bei den durch die Pfeile markierten Lateraldrücken aufgenommen und haben alle eine Größe von  $500 \times 400 \mu\text{m}$ . Auch hier findet man, wie schon für die Mischung **2/3** nur sehr kleine kristalline

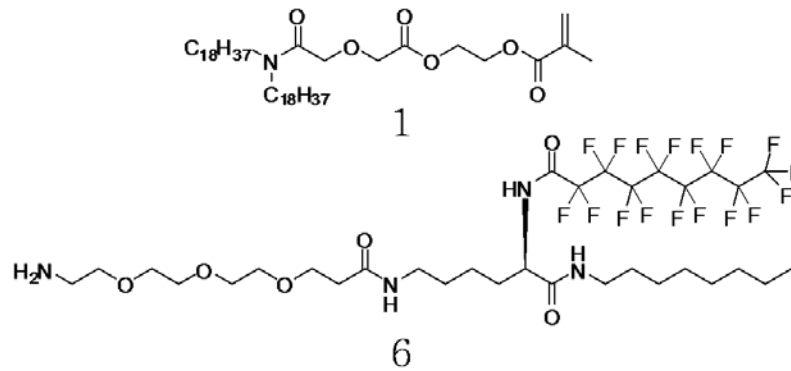
Domänen und selbst bei weiterer Kompression wachsen diese Domänen nicht merklich. Der hohe Anteil an Lipid **7** verhindert also auch hier eine Kristallisation der Diacetylsäure. Die Erklärung hierfür ist erneut der für eine dichte Packung nötige Tiltwinkel der Diacetylene, der bei Verunreinigungen durch das teilfluorierte Lipid nicht mehr eingenommen werden kann, so dass eine Kristallisation unterbunden wird.



**Abbildung 43:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 1/7 (78,6 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

### 3.5 Binäre Mischung der Lipide 1 und 6

Um eine Aussage über das Phasenseparationsverhalten in Abhängigkeit des Grades der Fluorierung treffen zu können, sollen im Folgenden binäre Mischungen untersucht werden, deren fluorierter Komponente entweder eine Alkylkette und eine Fluorkette (Lipid **6**) oder zwei Fluorketten (Lipid **8**) aufweist. Zunächst soll die binäre Mischung 1/6 untersucht werden.



Hierbei werden zunächst die p-A Isothermen ausgewertet und anschließend wird das Phasenseparationsverhalten mit Hilfe der Brewsterwinkel- und Rasterkraftmikroskopie untersucht werden.

### 3.5.1 $\pi$ -A Isothermen

In Abbildung 44 sind die Isothermen der binären Mischung 1/6 gegeben. Sie wurden bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen.

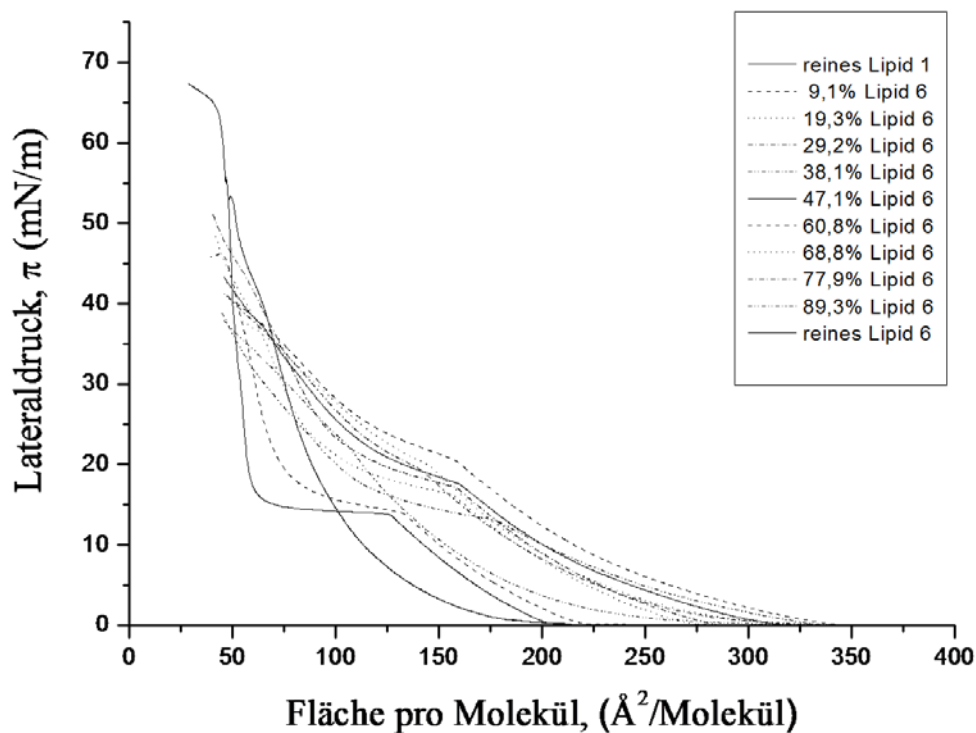


Abbildung 44:  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung 1/6 bei 25°C.

Man erkennt, dass der Flächenbedarf der Mischungen zunächst mit steigendem Anteil an teilfluorierter Komponente zunimmt. Bis zu einem molaren Anteil an Lipid **6** von 60,8 mol%. Danach wird der Flächenbedarf geringer bis er dann bei dem reinen Lipid **6** deutlich geringer ist als bei den Mischungsisothermen. Das Koexistenzplateau des Lipids **1** taucht in allen Isothermen auf. Allerdings ist seine Lage stark verschoben. Demgegenüber ist das Plateau der teilfluorierten Komponenten in keiner Isotherme zu sehen. Dieser unregelmäßige Verlauf der Isothermen legt schon nahe, dass es sich hierbei nicht um ein ideales System handelt. Eine Erklärung für das gefundene Verhalten ist, dass die teilfluorierte Komponente das Lipid **1** partiell löst. Hierbei nimmt das Lipid **1** dann, aufgrund der unterschiedlichen Kettenlängen, einen größeren Raumbereich ein, da seine mehr als doppelt so lange Alkylkette auf die Alkylketten der umgebenden partiell fluorierten Lipide faltet. Dies führt dazu, dass die gefundenen Flächenbedarfe der Mischungen größer sind als man das mit Blick auf die reinen Komponenten erwarten konnte.

Dies wurde anhand des Additivitätsgesetzes untersucht. In Abbildung 45 ist der Molenbruch von Lipid **6** gegen den Flächenbedarf in  $\text{\AA}^2$  pro Molekül aufgetragen. Man sieht deutlich, dass hier kein linearer Verlauf gegeben ist, sondern das System **1/6** deutlich davon abweicht. Wie schon aus den  $\pi$ -A Isothermen zu sehen war, gibt es ein Maximum bei einem molaren Anteil an teilfluorierter Komponente von 60,8 mol%. Hier nimmt der Flächenbedarf wieder ab. Dieser Effekt ist umso deutlicher je niedriger die Lateraldrücke sind. Bei einem Lateraldruck von 30 mN/m ist der Effekt am geringsten, was daran liegt, dass bei diesem Lateraldruck Lipid **1** bereits zu großen Teilen auskristallisiert ist und so ein nahezu entmischtes System vorliegt, bei welchem Lipid **1** die kristallanaloge Phase bildet und das noch nicht kristallisierte Lipid **1** sowie die teilfluorierte Komponente die flüssiganaloge Phase.

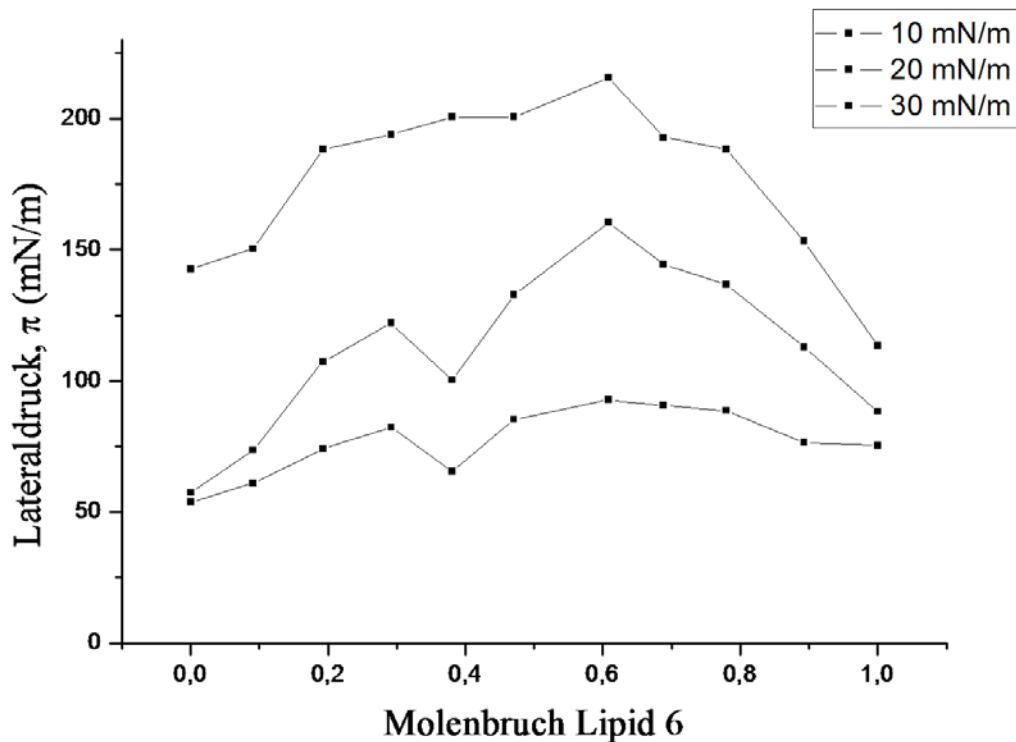


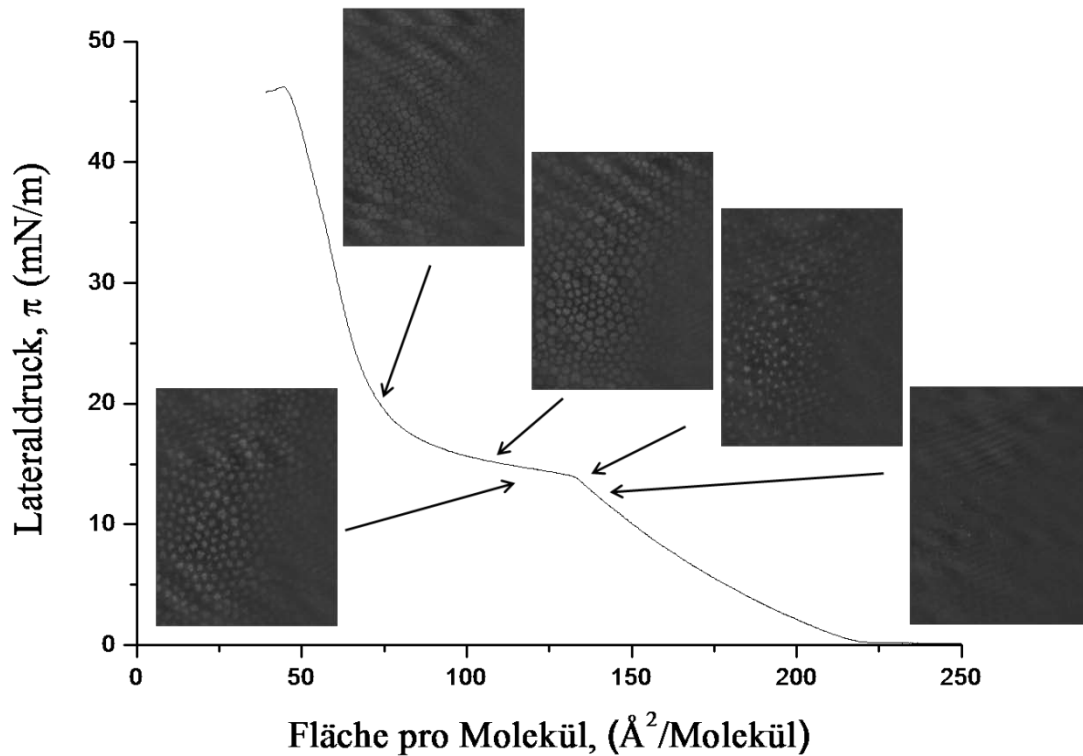
Abbildung 45: Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung 1/6.

Um diese Befunde näher untersuchen zu können, wurden Brewsterwinkelmessungen durchgeführt. Diese geben einen makroskopischen Eindruck der Phasenseparation.

### 3.5.2 Brewsterwinkelmikroskopie

Die Isotherme in Abbildung 46 zeigt die binäre Mischung 1/6 (9,1 mol%). Die BAM Aufnahmen wurden bei den durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen. Man erkennt sofort, dass die Kristallisation des Lipids 1 durch die teilfluorierte Komponente dahingehend beeinflusst wird, dass die ausgeschiedenen Domänen kleiner sind und zudem ihre hexagonale Grundstruktur kaum zu erkennen ist. Die Kristallisation beginnt bei einem Lateraldruck von etwa 12,5 mN/m. Die hier auftretenden Kristallite sind mit etwa 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser noch sehr klein. Komprimiert man weiter bis zu einem Lateraldruck von 16 mN/m wachsen diese Domänen. Ihr Durchmesser variiert hier zwischen 10 und 20  $\mu\text{m}$ , wobei auch Bereiche gefunden werden, in denen die Domänen sogar noch kleiner sind. Bei weiterer Kompression findet man, dass diese Domänen selbst nicht weiter wachsen, sondern dass sie

zusammengeschoben werden und schließlich zusammenwachsen, bis eine nahezu geschlossene Schicht entsteht (20 mN/m). Komprimiert man bis zu Lateraldrücken von 40 mN/m und mehr, so werden einzelne Bereiche aus dieser Schicht herausgeschoben und die Monoschicht beginnt zu kollabieren.



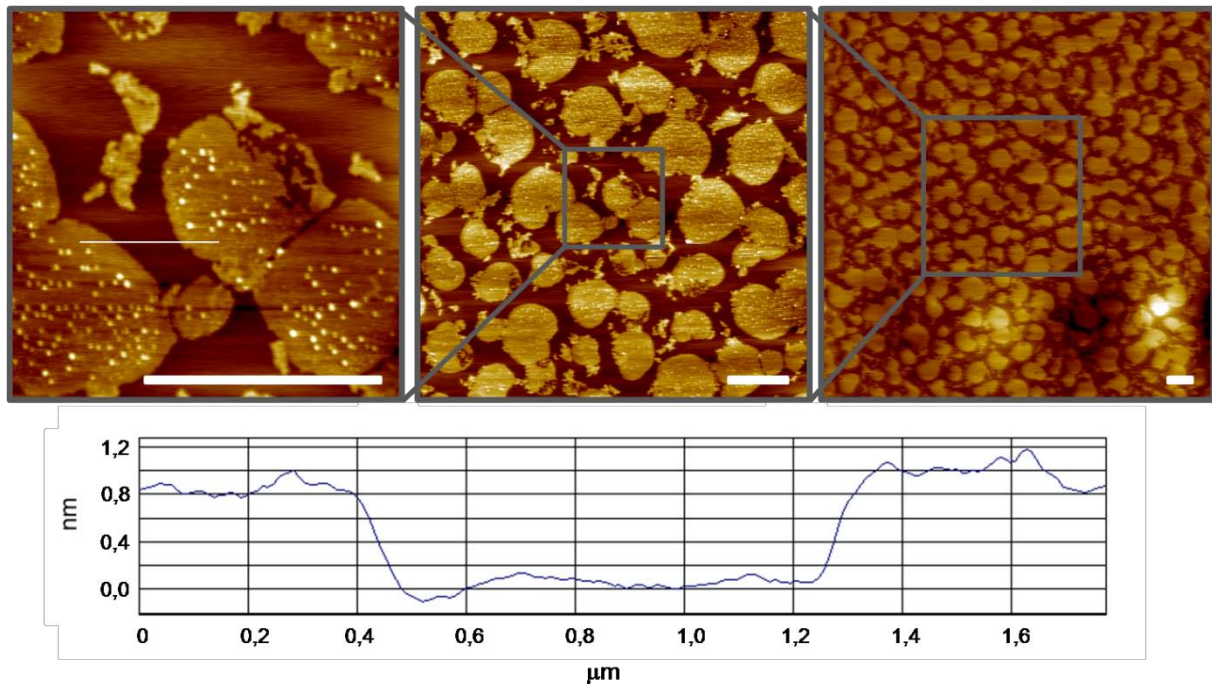
**Abbildung 46:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 1/6 (9,1 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücke aufgenommen.

Die Rasterkraftmikroskopie soll nun Aufschluss darüber geben, wie sich die Phasenseparation der binären Mischung im Nanometerbereich darstellt.

### 3.5.3 Rasterkraftmikroskopie

Die in Abbildung 47 gezeigten AFM Aufnahmen wurden bei 17 mN/m übertragen. Die Aufnahme ganz rechts ( $50 \times 50 \mu\text{m}$ ) zeigt die unregelmäßig rund geformten Domänen wie sie auf den BAM Bildern zu sehen waren. Die mittlere Abbildung ist eine Vergrößerung mit einer Auflösung von  $20 \times 20 \mu\text{m}$ , wobei die vergrößerte Stelle mit einem grauen Viereck umgeben ist. Die Abbildung ganz links zeigt eine Ausschnitt des mittleren Bildes, ist also eine weitere

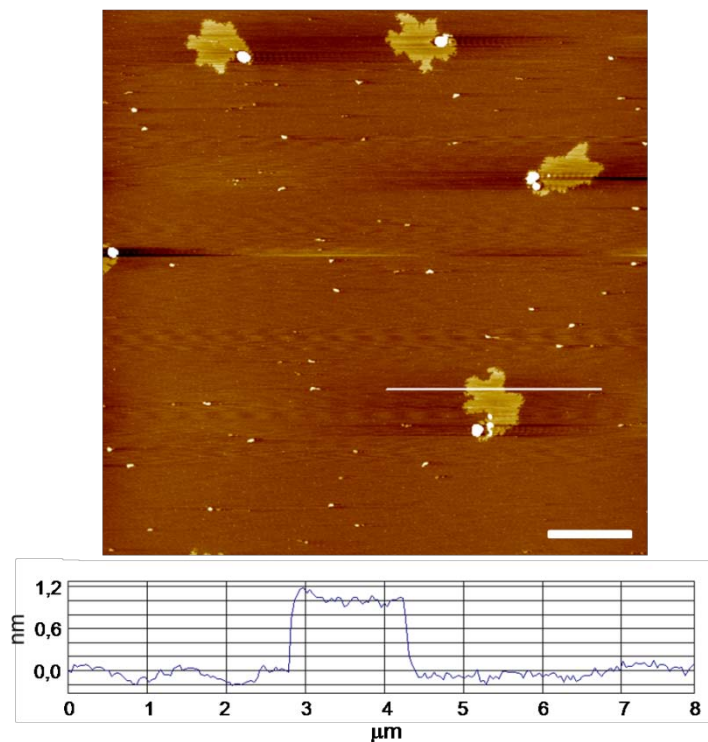
Vergrößerung ( $5 \times 5 \mu\text{m}$ ). In dieser hochauflösenden Aufnahme ist eine Linienanalyse eingezeichnet. Das zugehörige Höhenprofil ist in Abbildung 47 ebenfalls angegeben.



**Abbildung 47:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/6** (9,6 mol%) übertragen bei 17 mN/m. Der rechts unten jeweils eingebettete Balken hat eine Länge von  $3 \mu\text{m}$ .

Man erkennt, dass die höheren Domänen eine Höhe von etwa  $10 \text{ \AA}$  haben. Dies liegt im Bereich für die Werte, die in der binären Mischung **1/3** gefunden wurden und dem Lipid **1** zugeordnet werden konnten. Da das Lipid **6** eine vergleichbare Länge wie Lipid **3** hat, kann man folgern, dass es sich bei den hier kristallisierten Domänen ebenfalls um Lipid **1** handelt. Die umgebende flüssiganaloge Matrix besteht aus noch nicht auskristallisiertem Lipid **1** und der teilfluorierten Komponente, die bei diesem Lateraldruck (17 mN/m) ohnehin noch in der flüssiganalogen Phase ist und somit keine Kristallisation zeigt. Außerdem erkennt man, dass die gefundenen Domänen nicht mehr die im Fall der binären Mischung **1/3** für das Lipid **1** gefundenen hexagonalen Grundformen besitzen. Eine Erklärung hierfür ist, dass hier eine teilweise Löslichkeit des Lipids **1** durch das teilfluorierte Lipid vorliegt, welche dazu führt, dass man kleine Bereiche, also „Tropfen“, des Lipids **1** innerhalb der flüssiganalogen Matrix bestehend aus beiden Lipiden findet. Diese Kristallisationskeime wachsen bei fortschreitender Kompression, sind aber voneinander durch die teilfluorierte Komponente separiert. Erhöht sich der molare Anteil an teilfluorierte Komponente nochmal deutlich, so findet man Strukturen, die noch kleiner sind als die zuvor bei niedrigen Anteilen gefundenen. In

Abbildung 48 ist eine Aufnahmen der binären Mischung **1/6** (89,3 mol%) übertragen bei 30 mN/m gegeben. Man findet bei dieser Auflösung ( $20 \times 20 \mu\text{m}$ ), dass die Domänen im Durchmesser etwa 1 bis 3  $\mu\text{m}$  groß sind. Die gefundene Höhendifferenz beträgt wiederum rund 10 Å. Es handelt sich also auch hier um Lipid **1** umgeben von einer flüssiganalogen Matrix aus dem teilfluorierten Lipid und noch nicht kristallisiertem Lipid **1**.

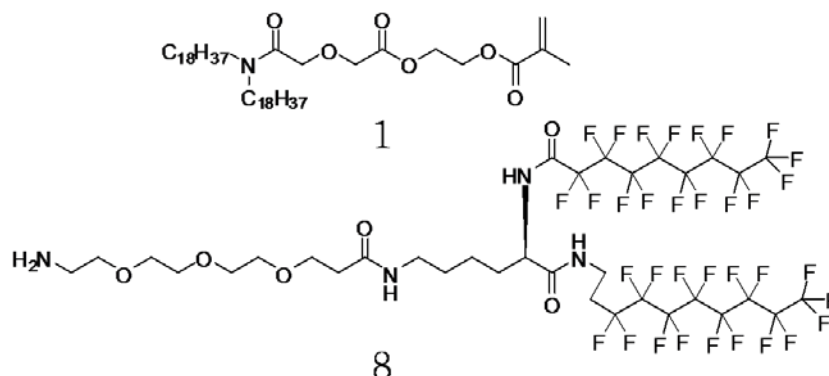


**Abbildung 48:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/6** (89,3 mol%) übertragen bei 30 mN/m. Der rechts unten eingebettete Balken hat eine Länge von 3  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich Form und Größe der Domänen in dieser binären Mischung sowohl anhand des Lateraldrucks als auch durch die Zusammensetzung der Mischung kontrollieren lassen. Allerdings unterscheidet sich das Kristallisationsverhalten deutlich von dem in der binären Mischung **1/3** gefundenem, denn es lassen sich keine sternförmigen Domänen mehr finden. Stattdessen sind die gefundenen Domänen bei vergleichbaren Lateraldrücken deutlich kleiner und haben eine runde Grundform. Ursache für dieses Kristallisationsverhalten ist wahrscheinlich die partielle Fluorierung des Lipids **6**.

### 3.6 Binäre Mischung der Lipide 1 und 8

Im Fall der binären Mischung **1/8** kann man ein anderes Phasenseparationsverhalten erwarten, als im Fall der binären Mischung **1/6**, da es sich bei Lipid **8** um ein perfluoriertes Amphiphil handelt, welches eine ähnliche Entmischungstendenz gegenüber dem polymerisierbaren Lipid zeigen sollte wie Lipid **3**.

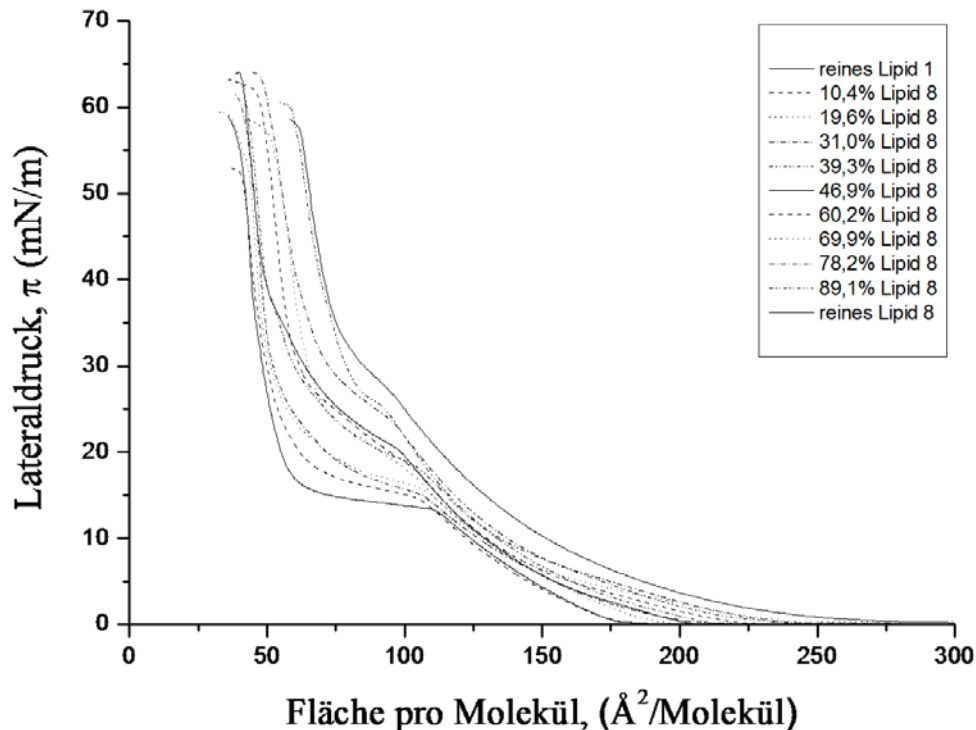


Dies wird im Folgenden zunächst anhand der  $\pi$ -A Isothermen untersucht. Anschließend wird die Domänenbildung anhand von Aufnahmen mit dem Brewsterwinkel- und Rasterkraftmikroskop visualisiert werden.

#### 3.6.1 $\pi$ -A Isothermen

Eine einfache Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens soll anhand der Untersuchung der  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung erfolgen. Die in Abbildung 49 gezeigten  $\pi$ -A Isothermen wurden bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen. Wiederum findet man den generellen Trend, dass der minimale Flächenbedarf pro Molekül mit steigendem Anteil an Lipid **8** zunimmt. Dies ist natürlich zu erwarten, da die fluorierte Komponente mit 62 Å<sup>2</sup> pro Molekül einen deutlich größeren Flächenbedarf hat als Lipid **1**. Das Plateau, welches in der  $\pi$ -A Isotherme des Lipids **1** den Koexistenzbereich flüssig-/kristallanalog kennzeichnet, ist in allen  $\pi$ -A Isothermen zu finden. Allerdings ist die Lage des Plateaus mit zunehmendem Anteil an Lipid **8** zu höheren Lateraldrücken hin verschoben und geht schließlich in das Koexistenzplateau der fluorierten Verbindung über. Die bei den

jeweiligen Zusammensetzungen gefundenen Kollapsdrücke variieren zwischen 53 mN/m und 64 mN/m.



**Abbildung 49:**  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung 1/8 bei 25°C.

Um das Mischungsverhalten nun im Detail zu untersuchen, bedient man sich wiederum der Additivitätsregel nach Gains (Abbildung 50). Die aufgetragene Fläche pro Molekül gegen den Molenbruch von Lipid 8 zeigt, dass für niedrigen Lateraldrücke (10 mN/m) und für hohe Lateraldrücke (30 mN/m) ein linearer Verlauf gefunden wird und man somit in diesen Bereichen von einem idealen Verhalten ausgehen kann. Im Bereich mittlerer Lateraldrücke (20 mN/m) findet man eine Abweichung des Graphen vom linearen Verlauf. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch schon für das binäre System 1/3 gemacht. Dies bedeutet, dass sich die Phasenseparation hier ähnlich verhält. Im Bereich der niedrigen Lateraldrücke, beide Lipide sind in der flüssiganalogen Phasen, ist eine homogene Mischung gegeben. Im Bereich der hohen Lateraldrücke sind die beiden Lipide nahezu vollständig entmischt, wobei Lipid 1 nahezu vollständig auskristallisiert ist, während Lipid 8 noch in der flüssiganalogen Phase ist. Im mittleren Druckbereich (20 mN/m) befindet sich das auskristallisierte Lipid 1 in einer Matrix aus noch nicht kristallisiertem Lipid 1 und der fluorinierten Verbindung.

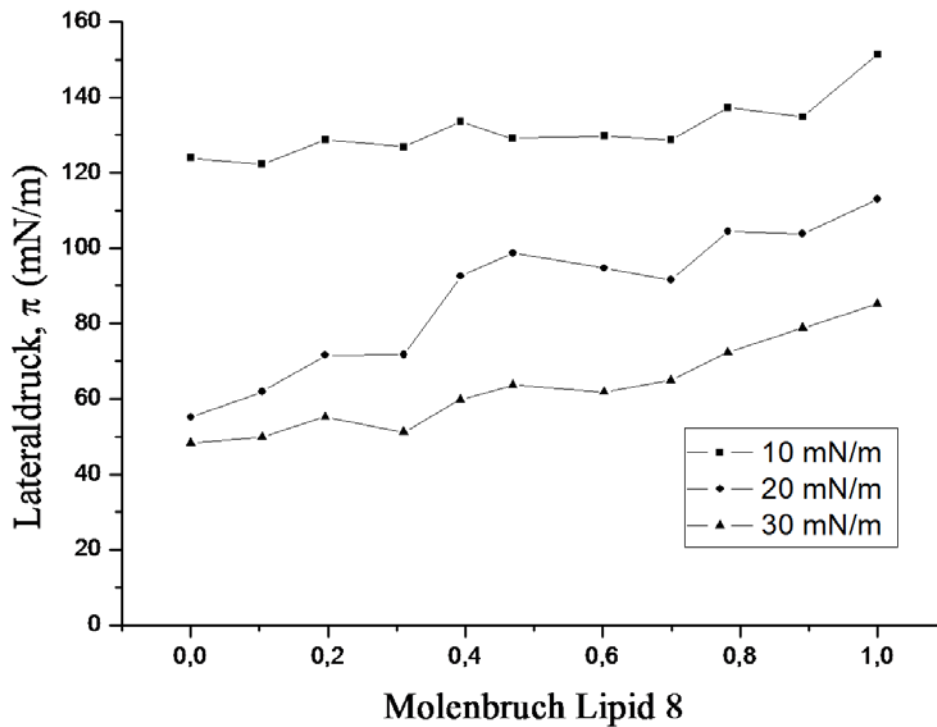
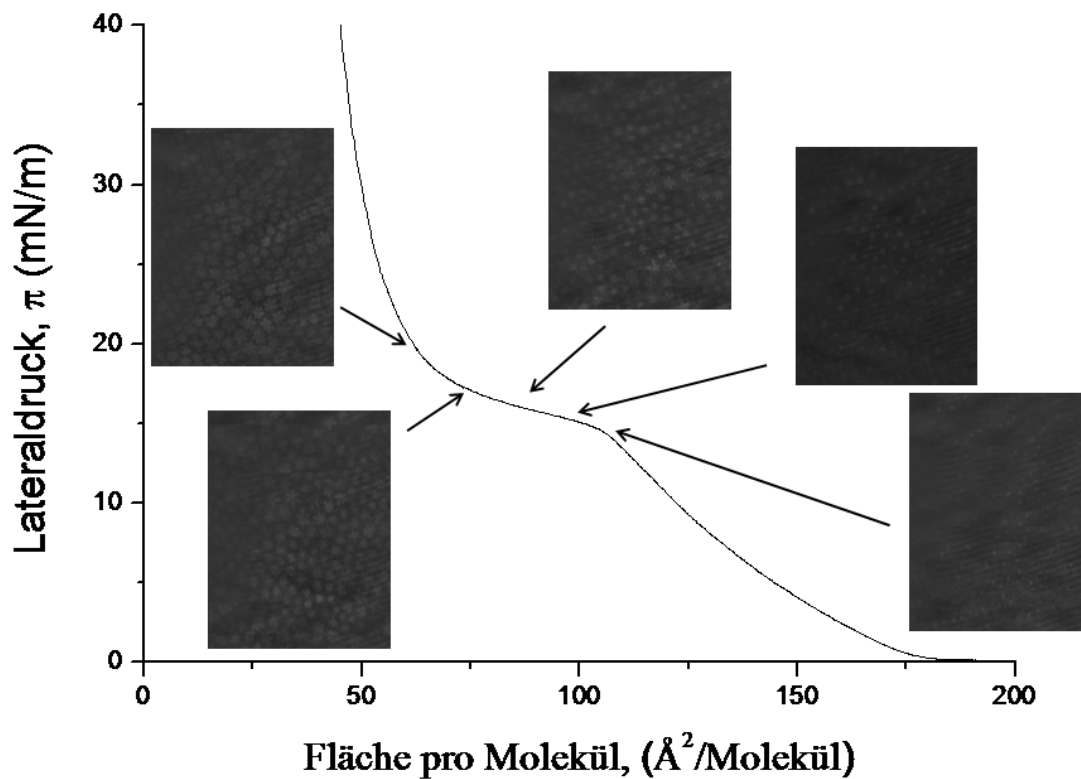


Abbildung 50: Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung 1/8.

Ob es sich tatsächlich wie oben beschrieben verhält, soll im Folgenden mit Hilfe der Brewsterwinkelmikroskopie genauer untersucht werden.

### 3.6.2 Brewsterwinkelmikroskopie

In Abbildung 51 ist die Isotherme der binären Mischung 1/8 (10,4 mol%) aufgenommen auf einer Subphase aus Reinstwasser gegeben. Die BAM Bilder wurden jeweils bei den durch die Pfeile gezeigten Lateraldrucke aufgenommen.



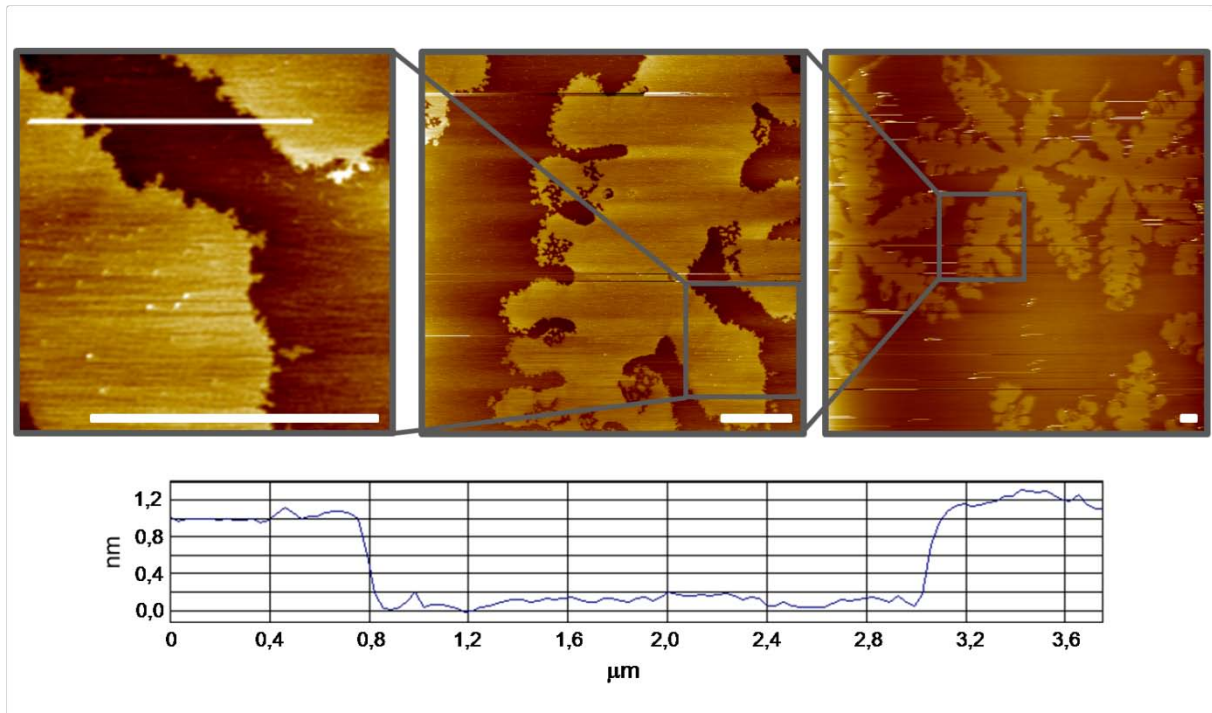
**Abbildung 51:**  $\pi$ -A Isotherme der binären Mischung 1/8 (10,4 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Bis zu Lateraldrücken von 13 mN/m findet man keine Kristallisation. Erst danach beginnt Lipid 1 auszukristallisieren. Dass es sich hierbei um Lipid 1 handelt, ist wahrscheinlich, weil die fluoridierte Verbindung bis zu Lateraldrücken von 25 mN/m im flüssiganalogen Bereich ist und somit hier noch keine Kristallisation zeigt. Bei weiterer Kompression der Monoschicht wachsen diese Kristalle schnell zu sechsarmigen Sternen. Diese haben bei einem Lateraldruck von 20 mN/m eine durchschnittliche Größe von 30  $\mu\text{m}$ . Dies ist geringfügig größer als im Falle der binären Mischung 1/3. Da der molare Anteil an fluoridierter Komponente beider Mischungen vergleichbar ist, kann man folgern, dass der Grund hierfür darin zu suchen ist, dass hier nur zwei fluoridierte Ketten vorhanden sind. Bei weiterer Kompression findet man, dass die gebildeten sternförmigen Domänen zusammenwachsen und eine nahezu geschlossene Schicht entsteht.

Nach diesem Blick auf die makroskopische Kristallisation soll nun mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie ein Blick in den Nanometerbereich geworfen werden.

### 3.6.3 Rasterkraftmikroskopie

Die in Abbildung 52 gezeigten AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/8** wurden bei 18 mN/m übertragen.

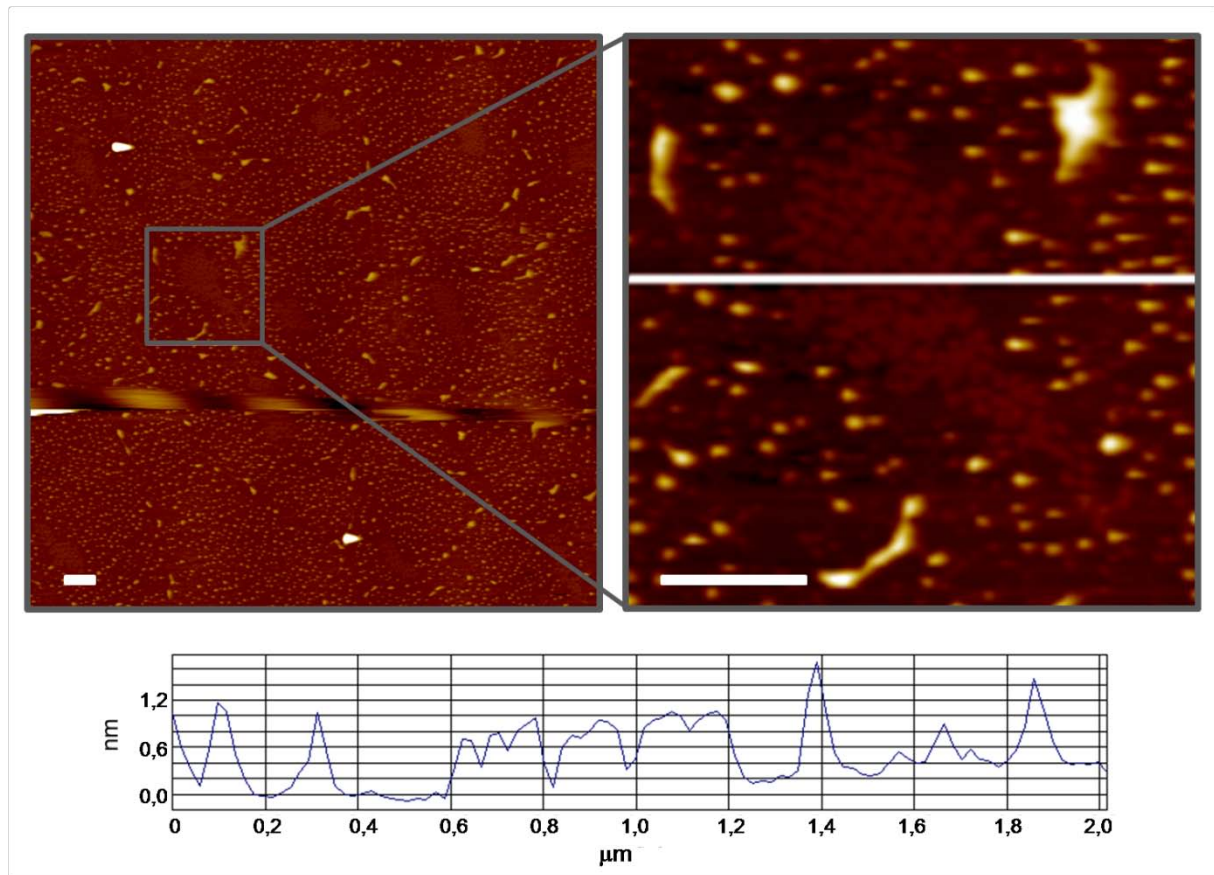


**Abbildung 52:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/8** (10,4 mol%) übertragen bei 18 mN/m. Der rechts unten jeweils eingebettete Balken hat eine Länge von 3 µm.

Die Aufnahme ganz rechts ( $80 \times 80 \mu\text{m}$ ) zeigt die sechsarmigen Sterne wie sie auf den BAM Bildern zu sehen waren. Die mittlere Abbildung ist eine Vergrößerung mit einer Auflösung von  $16,8 \times 16,8 \mu\text{m}$ , wobei die vergrößerte Stelle mit einem grauen Viereck umgeben ist. Die Abbildung ganz links zeigt einen Ausschnitt des mittleren Bildes, ist also eine weitere Vergrößerung ( $4 \times 4 \mu\text{m}$ ). In dieser hochauflösenden Aufnahme ist eine Linienanalyse durchgeführt, welche ebenfalls eingezeichnet ist. Das zugehörige Höhenprofil ist in Abbildung 52 ebenfalls angegeben. Man erkennt, dass die höheren Domänen eine Höhe von 10 bis 12 Å haben. Dies liegt im Bereich für die Werte, die in der binären Mischung **1/3** gefunden wurden und dem Lipid **1** zugeordnet werden konnten. Da das Lipid **8** eine vergleichbare Länge wie Lipid **3** hat, ist anzunehmen, dass es sich bei den hier kristallisierten Domänen ebenfalls um Lipid **1** handelt. Die umgebende flüssiganaloge Matrix besteht aus noch nicht auskristallisiertem Lipid **1** und der fluorierten Komponente, die bei diesem Lateraldruck (18 mN/m) ohnehin noch in der flüssiganalogen Phase ist. Klar erkennbar ist

auch die Feinstruktur der sechsarmigen Domänen. Dies ist ein signifikanter Unterschied zu der binären Mischung **1/6** mit dem teilfluorierten Lipid. Denn in diesem Fall wurde Domänen gefunden, die zum einen deutlich kleiner waren und zum anderen auch nicht mehr die sechsarmige (hexagonale) Grundform der Domänen aufwiesen, wie sie zuvor sowohl für das reine Lipid **1** als auch in der binären Mischung **1/3** gefunden wurde. In Mischsystemen mit dem polymerisierbaren Lipid **1** führt also eine teilweise Fluorierung zu einem Mischungsverhalten, welches die Kristallisation des Lipids **1** signifikant beeinflusst. Wohingegen ein perfluoriertes Lipid, wohl aufgrund der geringen Wechselwirkung mit einem Alkylketten tragenden Lipid wie **1**, die Kristallisation kaum beeinflusst, so dass die hexagonale Grundform der Kristalle nicht beeinflusst wird.

Erhöht sich der molare Anteil an fluorierter Komponente, so findet man Strukturen, die deutlich kleiner sind. In Abbildung 53 ist eine Aufnahmen der binären Mischung **1/8** (89,1 mol%) übertragen bei 30 mN/m gegeben. Die rechte Abbildung ist eine Vergrößerung ( $2 \times 2 \mu\text{m}$ ) des im linken Bildes grau markierten Bereiches. Man erkennt sofort, dass sich nur kleine kristalline Domänen bilden. Die Höhe dieser Domänen liegt zwischen 10 und 14 Å. Die Größe der Domänen variiert von 100 bis 200 nm. Da ähnliche Beobachtungen auch bei der binären Mischung **1/3** gemacht wurden, denn auch in diesem Fall waren die gefundenen Domänen sehr klein, kann man dies auch hier auf den hohen Anteil an fluoriertem Lipid zurückführen, das die Kristallisation des polymerisierbaren Lipids behindert.

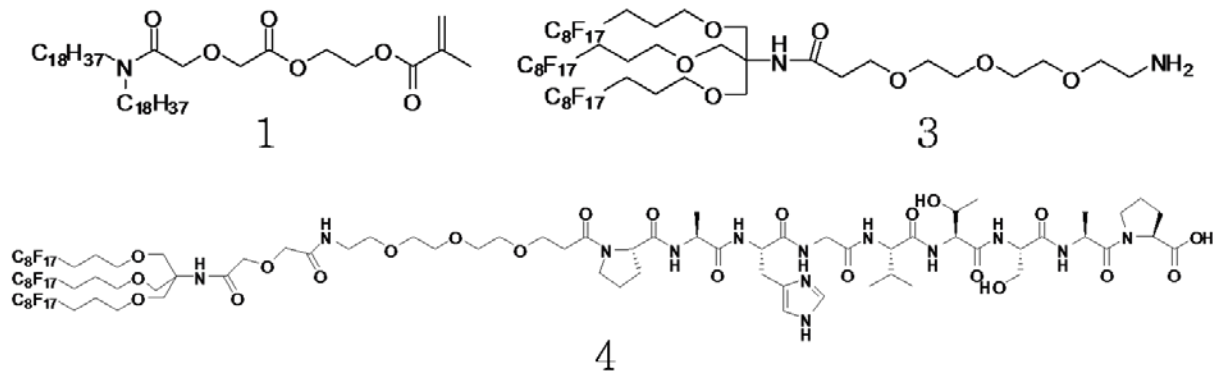


**Abbildung 53:** AFM Aufnahmen der binären Mischung **1/8** (89,1 mol%) übertragen bei 30 mN/m. Der links unten jeweils eingebettete Balken hat eine Länge von 500 nm.

Man kann also für die binäre Mischung **1/8** festhalten, dass man die Form und Größe der Domänen in der Monoschicht variieren kann. Zum einen durch eine Variation des Lateraldrucks und zum anderen durch eine Variation der molaren Zusammensetzung der Probe. Wobei man generell festhalten kann, dass die Domänen mit steigendem Lateraldruck größer werden und dass sie mit steigendem Anteil an fluorierte Komponente kleiner werden. Des Weiteren gibt es beim Vergleich der binären Mischung **1/6** (teilfluoriert) und der binären Mischung **1/8** (perfluoriert) einen signifikanten Unterschied im Kristallisationsverhalten des Lipids **1**. Denn in einer Mischung mit dem teilfluorierten Lipid ist die hexagonale Grundstruktur der Kristalle des Lipids **1** nicht mehr gegeben. Stattdessen findet man eine runde Grundstruktur in den Domänen, welche außerdem deutlich kleiner sind als im Fall der Mischung mit perfluorierte Komponente.

### 3.7 Ternäre Mischung der Lipid 1, 3 und 4

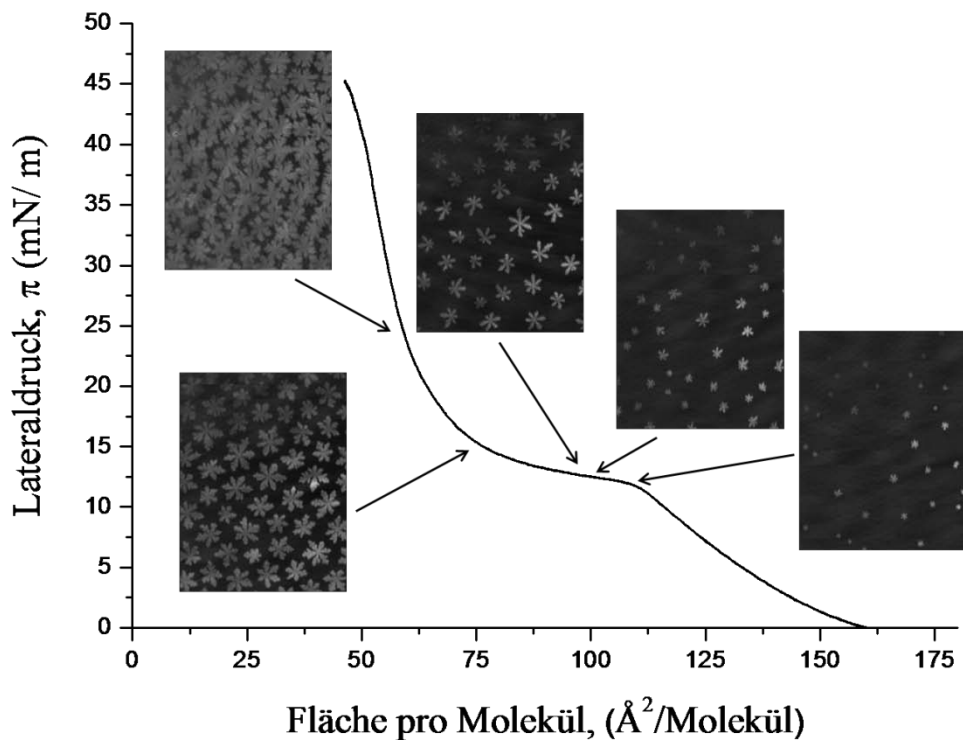
Um nun eine stabile Membran aufbauen zu können, die auch mittels photochemischer Polymerisation stabilisiert werden kann, muss man ein System aus drei Lipiden verwenden.



Mit Lipid **1** hat man die Möglichkeit das System photochemisch zu stabilisieren. Lipid **3** fungiert als Matrix für Lipid **4**, denn Lipid **4** alleine bildet nicht so stabile Monoschichten wie Lipid **3**. Mit dem Lipid **4** hat man die Möglichkeit die Auswirkungen einer komplexen Kopfgruppe, denn dieses trägt eine Peptidsequenz aus neun Aminosäuren, auf das Mischungsverhalten innerhalb der Monoschicht zu untersuchen. Ein Teil dieser Peptidsequenz stellt eine kurze Sequenz der „tandem repeat“-Domäne des MUC1 dar.

#### 3.7.1 Brewsterwinkelmikroskopie

Zunächst wird das Phasenverhalten der ternären Mischung Mischung 1/3/4 (90,5 mol%, 8,2 mol%, 1,3 mol%) mit Hilfe der Brewsterwinkelmikroskopie untersucht. In Abbildung 54 ist die  $\pi$ -A Isotherme bei 25°C angegeben, wobei die BAM Aufnahmen jeweils bei den durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken gemacht wurden.

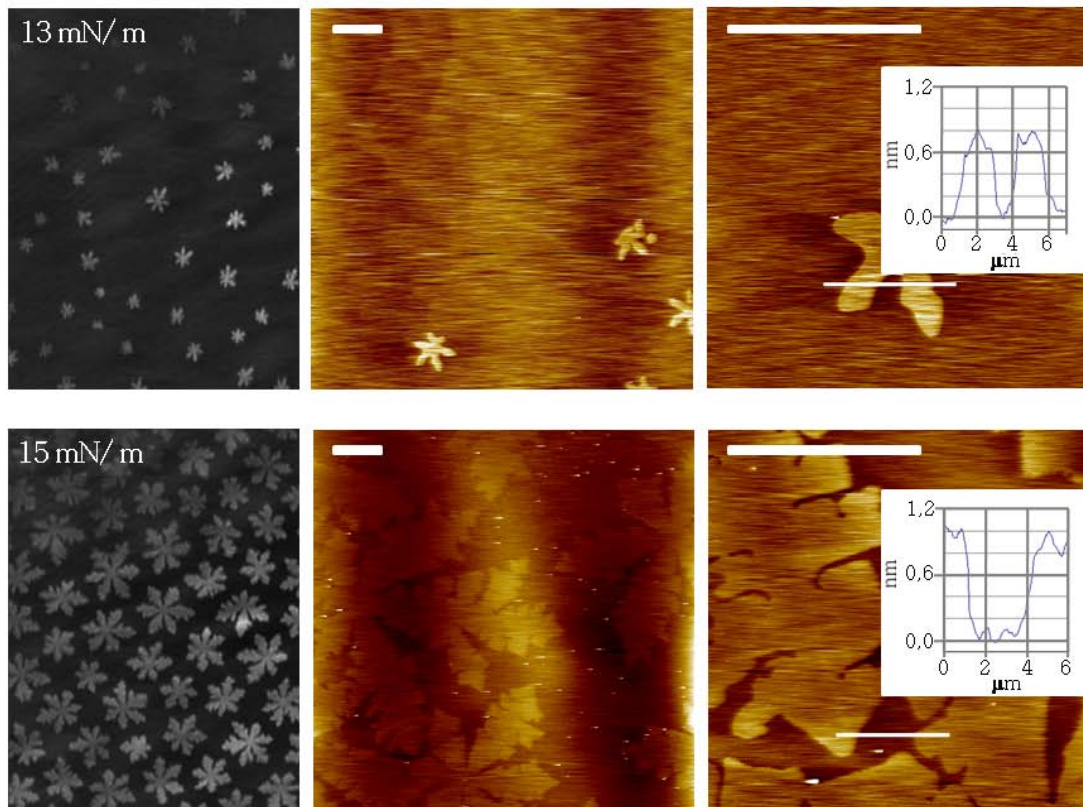


**Abbildung 54:**  $\pi$ -A Isotherme der ternären Mischung 1/3/4 (90,5 mol%, 8,2 mol%, 1,3 mol%) bei 25 °C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Während der flüssiganalogen Phase kann man keine Kristallisation beobachten. Diese startet erst zu Beginn des Übergangs flüssig- zu kristallanaloger Phase bei einem Lateraldruck von 12 mN/m. Es bilden sich sechsarmige sternförmige Domänen, welche eine Größe von etwa 20  $\mu\text{m}$  haben. Bei fortschreitender Kompression wachsen diese sehr schnell zunächst zu sehr großen filigranen sechsarmigen Sternen, welche dann bei einem Lateraldruck von 14,8 mN/m in hexagonale Strukturen mit einer durchschnittlichen Größe von 50  $\mu\text{m}$  übergehen. Diese ähneln in ihrer Form denen des reinen Lipids **1** (Kapitel 3.1.1). Komprimiert man weiter wachsen diese zusammen und bilden so eine nahezu geschlossene Monoschicht, welche bei 45 mN/m kollabiert. Der minimale Flächenbedarf beträgt hier etwa 48  $\text{\AA}^2$  pro Molekül.

### 3.7.2 Rasterkraftmikroskopie

Nach Langmuir-Blodgett Übertrag auf Glimmerplättchen wurden die Proben im *tapping mode* vermessen. Die Abbildung 55 zeigt diese Aufnahmen und vergleicht sie mit den zuvor gezeigten BAM Aufnahmen.



**Abbildung 55:** Vergleich BAM und AFM Aufnahmen der ternären Mischung **1/3/4** (90,5 mol%, 8,2 mol%, 1,3 mol%). Oben: übertragen bei 13 mN/m, unten: übertragen bei 15 mN/m.

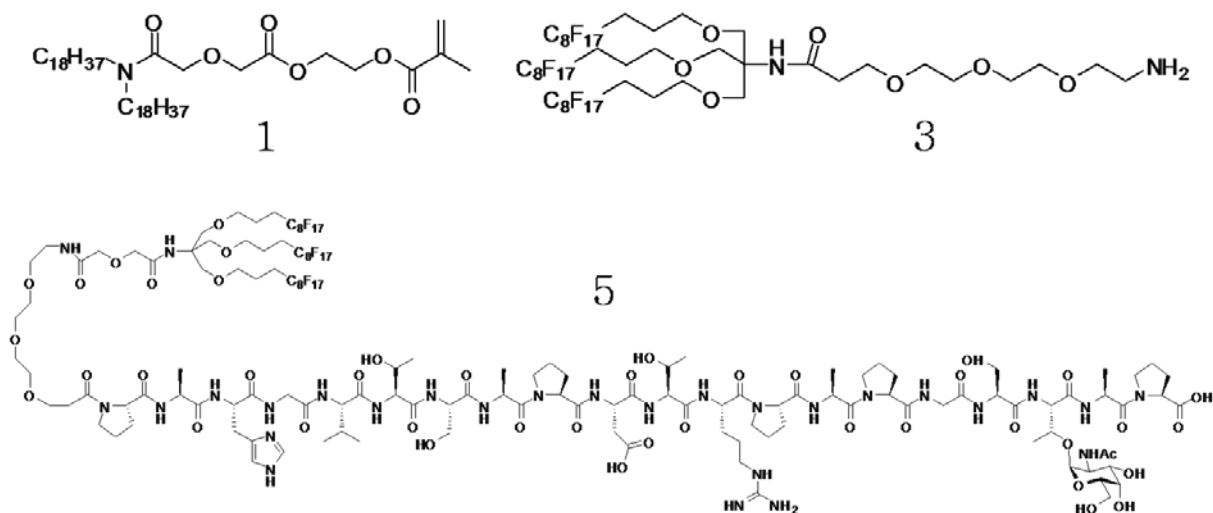
Die kleinen sechsbarmigen sternförmigen Kristalle, die schon ab einem Lateraldruck von 12 mN/m entstehen, sind in dem oberen Teil der Abbildung 55 gezeigt. Diese wurden bei einem Lateraldruck von 13 mN/m übertragen. Man erkennt sofort, dass die Strukturen, die unter dem Rasterkraftmikroskop gefunden werden, genau denen entsprechen, die zuvor schon mit Hilfe der Brewsterwinkelmikroskopie gefunden wurden. Es handelt sich dabei um Lipid **1**, da nur dieses bereits bei diesen Lateraldrücken eine kristallanaloge Phase zeigt. Die Höhendifferenz zwischen den Domänen und der umgebenden flüssiganalogen Matrix beträgt 8 Å. Dies ist etwas kleiner als dies zuvor für das binäre System **1/3** gefunden wurde. Dieser Unterschied kann aber durch den unterschiedlichen Übertragungsdruck und die damit verbundene Packung

des Lipids erklärt werden. Denn betrachtet man nun den unteren Teil der Abbildung 55, in dem die AFM Bilder nach einem Langmuir-Blodgett Übertrag bei 15 mN/m zu sehen sind, so findet man eine Höhendifferenz von 10 Å. Dies entspricht genau der zuvor schon detektierten Höhendifferenz. Man erkennt hier sehr schön die hexagonale Struktur der sternenförmigen Domänen. Außerdem ist die Feinstruktur innerhalb der Kristalle sehr schön zu sehen, die bei den BAM Aufnahmen, aufgrund der geringen Auflösung, nicht zu sehen ist. Bei diesen Lateraldrücken findet man noch keine Kristallite innerhalb der umgebenden flüssiganalogen Matrix, welche aus noch nicht kristallisiertem Lipid **1** und den beiden fluorierten Komponenten besteht. Da diese flüssiganaloge Phase homogen ist, wie das auch schon für das binäre System **1/3** beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die fluorierten Komponenten untereinander mischbar sind. Eine Stabilisierung des Lipids **4**, die  $\pi$ -A Isothermen der reinen Komponente weisen eine ausgeprägte flüssiganaloge Phase und einen geringen Kollapsdruck auf (vergleiche Kapitel 3.1.4), durch das fluorierte Lipid **3** ist demnach möglich. Es handelt sich also auch hier prinzipiell um ein zweiphasiges System, nämlich kristallanaloge Bereiche innerhalb einer flüssiganalogen Matrix.

Nachdem mit dem Lipid **4**, das über eine relativ komplexe Kopfgruppe mit neun Aminosäuren verfügt, die Teil der „tandem repeat“-Domäne des MUC1 sind, gezeigt werden konnte, dass eine Strukturbildung innerhalb des ternären Systems möglich ist und die Monoschicht so stabil ist, dass sie ohne Probleme übertragen werden kann, soll dies im Folgenden für eine ternäre Mischung untersucht werden, die das potentielle Krebsvakzin enthält.

### 3.8 Ternäre Mischung der Lipide **1,3** und **5**

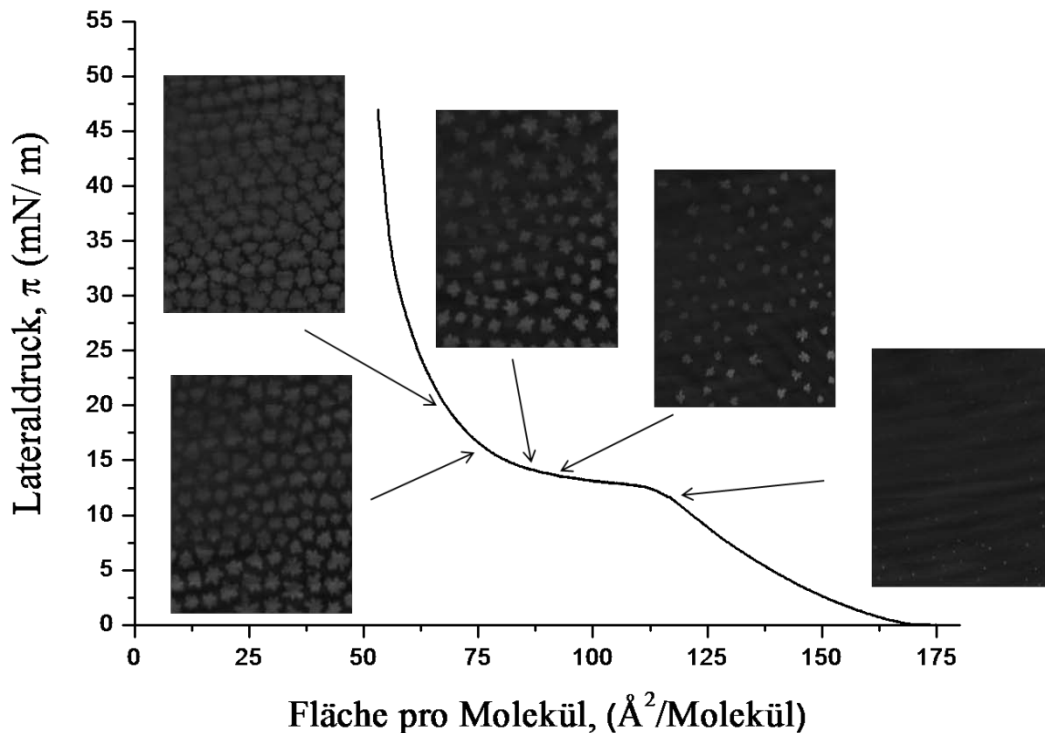
In der ternären Mischung der Lipide **1,3** und **5** (88,3 mol%, 9,9 mol%, 1,8 mol%) fungiert das Lipid **1** als Hauptbestandteil der Mischung. Es bietet hierbei natürlich weiterhin die Möglichkeit die Monoschicht mittels photochemischer Polymerisation zu stabilisieren. Von den beiden fluorierten Komponenten dient Lipid **3** als Matrixlipid für das fluorierte Vakzinlipid **5**. Denn Lipid **5** ist aufgrund seiner komplexen Kopfgruppe, welche die „tandem repeat“-Domäne des MUC1 und die T<sub>N</sub>-Antigen Funktion trägt, nicht in der Lage alleine eine stabile Monoschicht auszubilden. Die Überlegung hierbei ist nun die, dass man die fluorierten Komponenten in ihrer flüssiganalogen Phase stabilisiert, indem sich Lipid **5** in die fluorierte Matrix des Lipids **3** einbettet.



Im Folgenden soll zunächst auf die  $\pi$ -A Isotherme der ternären Mischung eingegangen werden. Dazu werden auch Brewsterwinkelmessungen durchgeführt und diese anschließend mit den AFM Aufnahmen verglichen. Außerdem wird untersucht, ob die fluorierten Komponenten untereinander mischbar sind und ob das Vakzin innerhalb dieser Phase überhaupt in der Lage ist einen Antikörper zu binden. Diese letzt genannte Untersuchung wird mit Hilfe der Quarzmikrowaage vorgenommen, da hier auch geringste Massenänderungen, die zum Beispiel durch den gebundenen Antikörper verursacht werden, detektiert werden können.

### 3.8.1 Brewsterwinkelmikroskopie

In der Abbildung 56 ist die  $\pi$ -A Isotherme der ternären Mischung **1/3/5** (88,3 mol%, 9,9 mol%, 1,8 mol%), aufgenommen bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser, abgebildet. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.



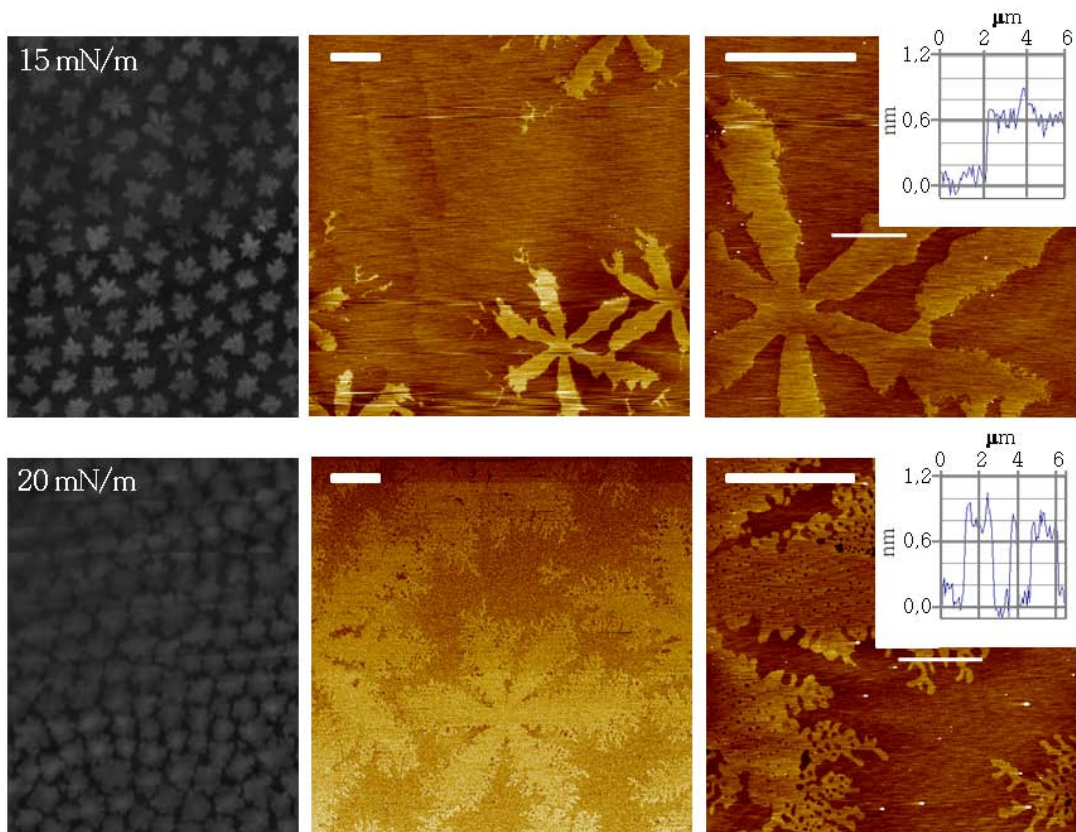
**Abbildung 56:**  $\pi$ -A Isothermen der ternären Mischung 1/3/5 (88,3 mol%, 9,9 mol%, 1,8 mol%) bei 25°C. Die gezeigten BAM Bilder wurden bei den jeweils durch die Pfeile angegebenen Lateraldrücken aufgenommen.

Bei einem Flächenbedarf von  $168 \text{ \AA}^2$  pro Molekül beginnt die flüssiganaloge Phase. Ab einer Fläche von  $115 \text{ \AA}^2$  pro Molekül findet man den Koexistenzbereich flüssig-/ kristallanalog. Hier beginnt die Kristallisation von Lipid 1. Man findet wiederum die sechsarmige Grundform in den Kristallen, wobei diese sich in Form und Größe von denen der reinen Verbindung unterscheiden. Sie sind kleiner und unregelmäßig geformt. Während des Koexistenzplateaus beobachtet man ein rasches Wachstum der Kristalle, deren durchschnittliche Größe bei  $15 \text{ mN/m}$  etwa  $30 \text{ \mu m}$  beträgt. Bei weiterer Kompression wachsen die Domänen nicht mehr wesentlich weiter, sondern lagern sich zusammen, so dass schließlich eine nahezu geschlossene Schicht entsteht.

Einen genaueren Blick auf die Phasenseparation erlaubt wiederum die Rasterkraftmikroskopie.

### 3.8.2 Rasterkraftmikroskopie

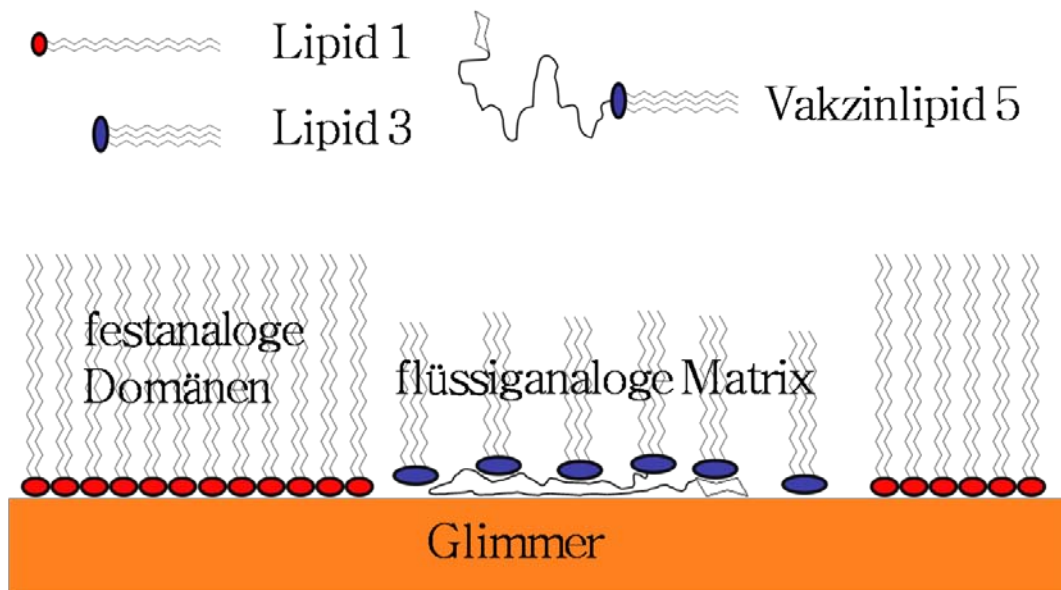
In Abbildung 57 sind die AFM Aufnahmen der ternären Mischung 1/3/5 (88,3 mol%, 9,9 mol%, 1,8 mol%) gezeigt. Die oberen Aufnahmen zeigen die Monoschicht, die bei einem Lateraldruck von 15 mN/m übertragen wurde. Man erkennt sehr schön die sechsarmige Struktur der Domänen und deren Feinstruktur an den Enden der kristallinen Arme. Das gemessene Höhenprofil (schmale weiße Linie) zeigt, dass die Domänen etwa 7 Å höher sind als die umgebende flüssig-analoge Matrix. Dies ist etwas weniger als zuvor für die binären Mischungen gefunden wurde. Dies mag an dem geringeren Lateraldruck liegen, bei dem übertragen wurde und der damit verbundenen geänderten Packung der Lipide.



**Abbildung 57:** Vergleich BAM und AFM Aufnahmen der ternären Mischung 1/3/5 (88,3 mol%, 9,9 mol%, 1,8 mol%). Oben: übertragen bei 15 mN/m, unten: übertragen bei 20 mN/m.

Die unteren Aufnahmen zeigen die Monoschicht übertragen bei 20 mN/m. Man erkennt die sechsarmige Grundstruktur, wobei diese nun eine deutlich stärkere Feinstruktur an den Rändern zeigt. Das Höhenprofil (schmale weiße Linie) zeigt nun einen Höhenunterschied von

10 Å, was den bei den binären Mischungen gefundenen Werten entspricht. Es handelt sich bei den kristallanalogen Domänen also um Lipid 1, wogegen die flüssiganaloge Matrix zum einen aus noch nicht kristallisiertem Lipid 1 und zum anderen aus den fluorierten Komponenten besteht, die beide bei diesen Lateraldrücken in der flüssiganalogen Phase sind. Da die flüssiganaloge Phase homogen ist, kann man davon ausgehen, dass die beiden fluorierten Lipide mischbar sind. Dies bedeutet, dass das Vakzinlipid 5 durch das fluorierte Lipid 3 stabilisiert werden kann. Dies ist im folgenden Schema nochmal skizziert.

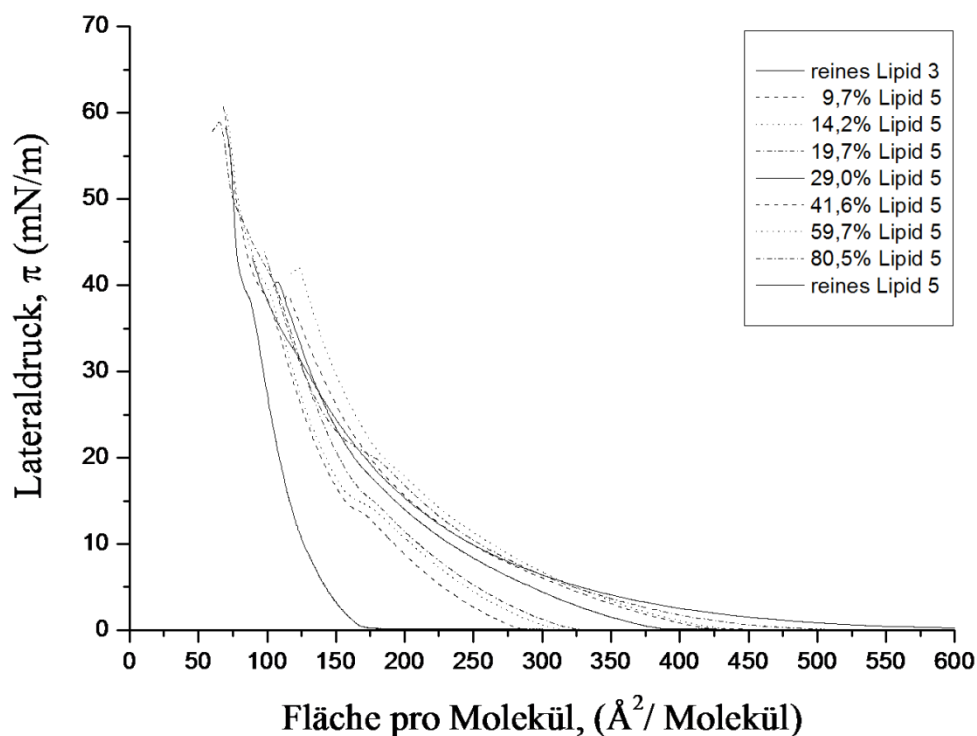


Wie man anhand des Schemas erahnen kann, zeigte sich, dass eine Unterscheidung bzw. eine Untersuchung der Phasenseparation innerhalb der flüssiganalogen Matrix mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie nicht möglich ist. Deshalb wird im Folgenden eine Untersuchung der Phasenseparation des binären Systems 3/5 anhand der  $\pi$ -A Isothermen durchgeführt und anschließend wird die Antigen-Antikörper Erkennungsreaktion in diesem System untersucht.

### 3.8.3 Antikörperbindungsstudie mit Hilfe der Quarzmikrowaage

Die Isothermen der binären Mischung 3/5 sind in Abbildung 58 wiedergegeben. Sie wurden bei 25°C auf einer Subphase aus Reinstwasser aufgenommen. Der Anteil an Vakzinlipid 5 erhöht sich hierbei Schritt für Schritt. Man findet den generellen Trend, dass der minimale Flächenbedarf pro Molekül mit steigendem Anteil an Lipid 5 zunimmt. Dies ist zunächst zu erwarten, da das Vakzin aufgrund der voluminösen Kopfgruppe einen deutlich größeren

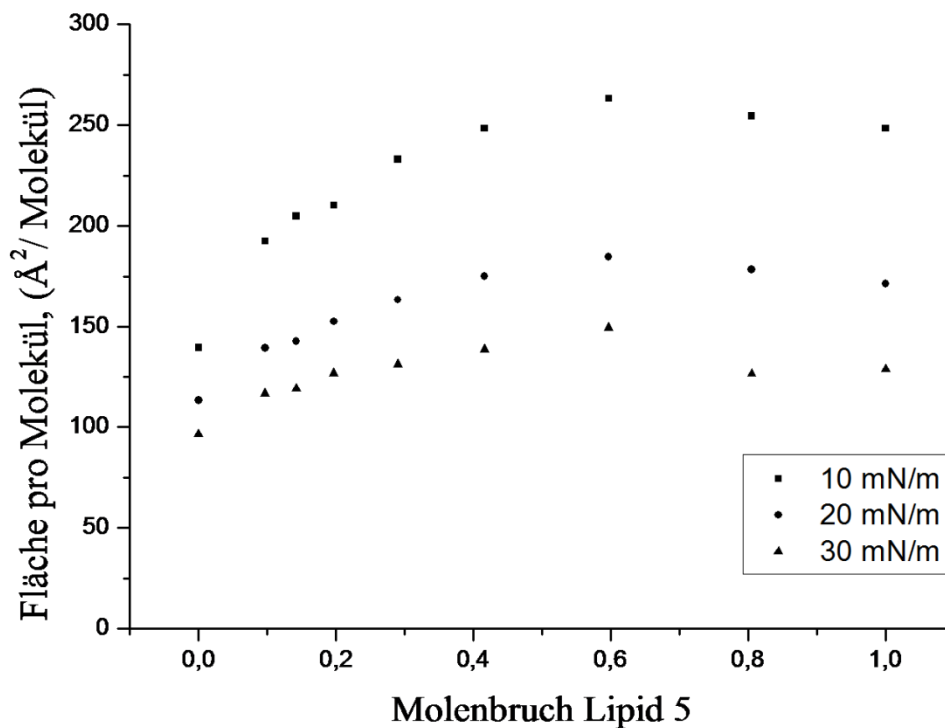
Flächenbedarf hat als Lipid **3**. Allerdings kommt es zwischen den Lipiden zu Wechselwirkungen, denn wie man aus den  $\pi$ -A Isothermen klar erkennt, erfüllen die Mischung **3/5** (80,5 mol%) und das reine Lipid **5** diesen Trend nicht, da deren minimaler Flächenbedarf unter dem der binären Mischung **3/5** (59,7 mol%) liegt. Außerdem findet man in den Mischungsisothermen Phasenübergänge bei den Lateraldrücken 15 mN/m und 20 mN/m, die nicht in den  $\pi$ -A Isothermen der reinen Komponenten zu finden sind. Deren Phasenübergänge treten bei deutlich höheren Lateraldrücken auf, nämlich bei 38 mN/m (Lipid **3**) und 32 mN/m (Lipid **5**). Man erkennt also schon an dieser Stelle, dass es sich nicht um eine ideale Mischung handelt.



**Abbildung 58:**  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung **3/5** bei 25°C.

Dies soll im Folgenden anhand des Additivitätsgesetzes untersucht werden. In Abbildung 59 ist der Molenbruch von Lipid **5** gegen den Flächenbedarf pro Molekül aufgetragen. Untersucht wurden die Lateraldrucke 10 mN/m, 20 mN/m und 30 mN/m. Man erkennt sofort, dass bei keinem der betreffenden Lateraldrucke ein lineares Verhalten vorliegt. Die Graphen zeigen ein Maximum bei einem molaren Anteil an Lipid **5** von 59,7 mol%. Diese Abweichung vom idealen Verhalten kann auf Wechselwirkungen der Kopfgruppen zurückgeführt werden. Aufgrund der Aminfunktion und der Sauerstoffatome in der

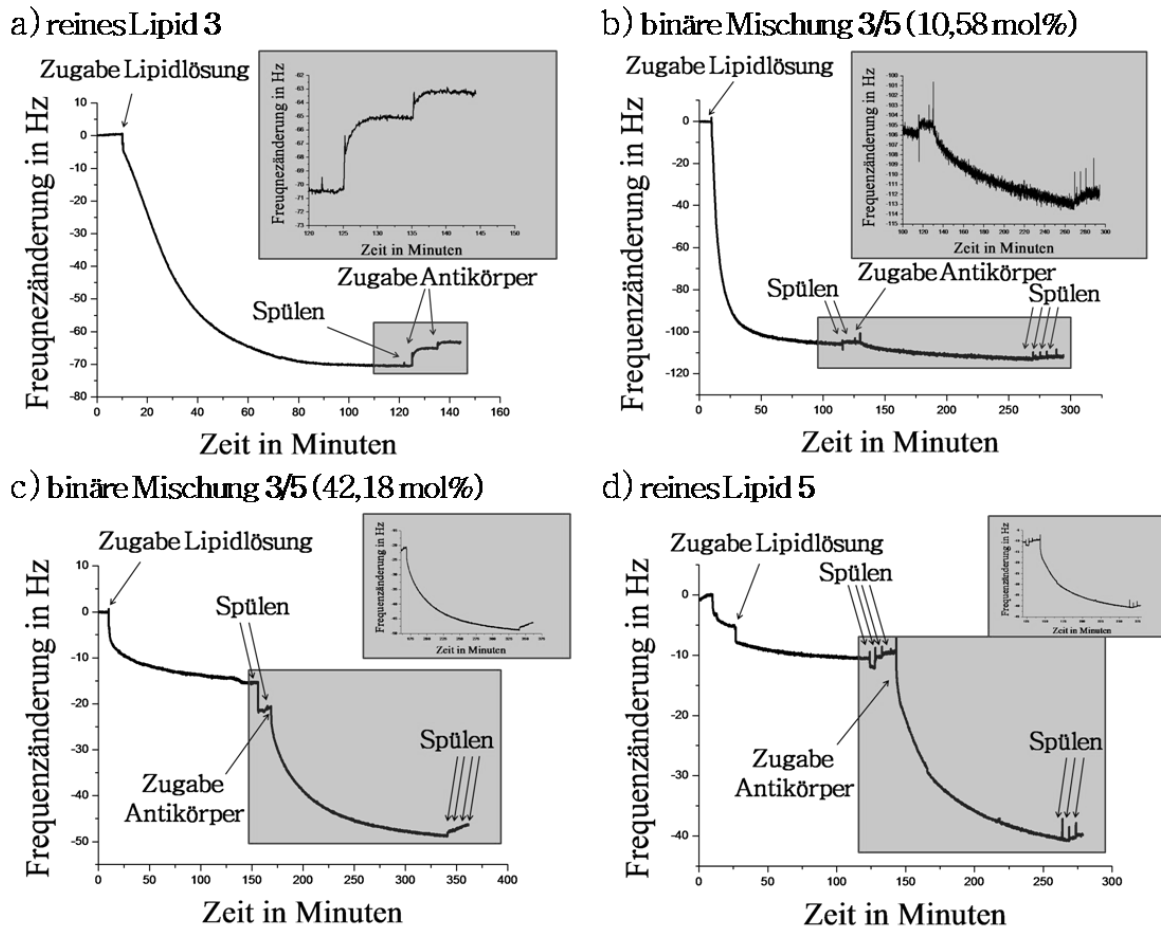
Kopfgruppe des Lipids **3** kann man davon ausgehen, dass hier vielfältige Wechselwirkungen mit der peptidischen Kopfgruppe des Lipids **5** möglich sind, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen. Allerdings bedeutet der nichtlineare Verlauf des Graphen auch, dass es sich nicht um eine vollständige Entmischung handeln kann. Dies und die Beobachtung bei den ternären Systemen, dass die flüssiganaloge Phase homogen ist, lassen den Schluss zu, dass die beiden fluorierten Lipide eine gewisse Mischbarkeit zeigen. Vor allem wenn der Anteil an Matrixlipid **3** deutlich höher ist als der des Vakzinlipids, kann man davon ausgehen, dass die beiden Lipide vollständig mischbar sind. Und dies ist in den ternären Mischungen die Regel, da sonst eine Stabilisierung der Vakzinlipide nicht möglich ist.



**Abbildung 59:** Additivitätsregel nach Gains für die binäre Mischung **3/5**.

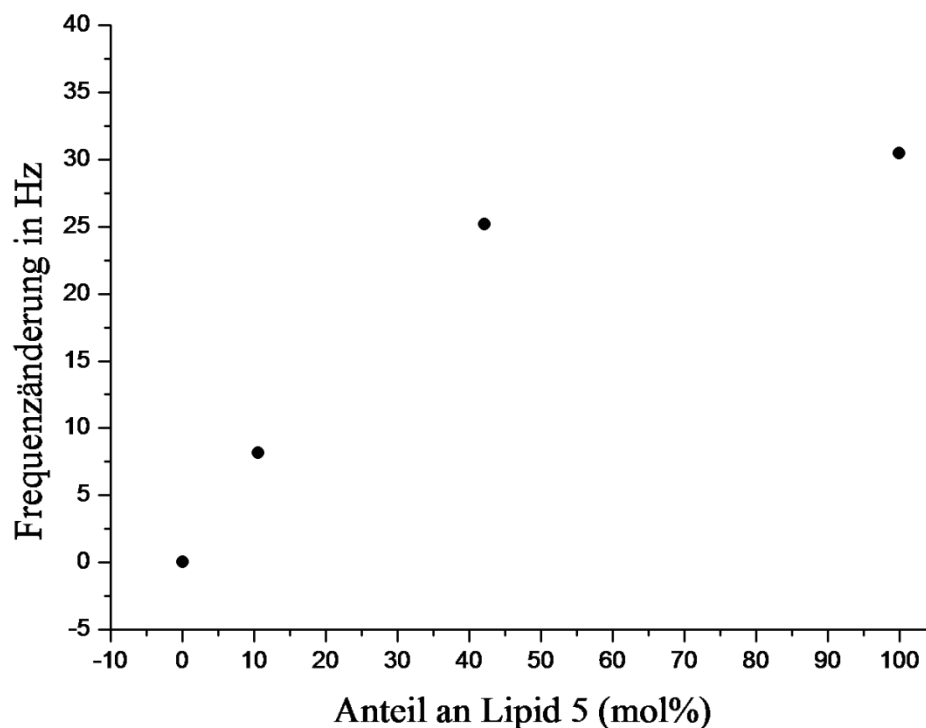
Die eigentliche Antikörper-Antigen Erkennung, eine Grundvoraussetzung für eine spezifische Immunantwort im menschlichen Körper, soll anhand von Messungen mit der Quarzmikrowaage untersucht werden. Da die Bindung zwischen Antikörper und Antigen hochspezifisch ist, weil komplementär zu der Oberfläche des Antigens bzw. zu Teilen dieser Oberfläche, sollte der Antikörper nur mit Lipid **5** wechselwirken und nicht mit dem fluorierten Matrixlipid **3**, da nur Lipid **5** die „tandem repeat“-Domäne des MUC1 trägt gegen

die der hier verwendete MUC1 Antikörper SM3 spezifisch ist. Dies wird im Folgenden untersucht, wobei neben den beiden reinen Verbindungen auch binäre Mischungen aus diesen beiden Lipiden mit Anteilen an Lipid **5** von 10,58 mol% und 42,18 mol% untersucht werden. Dabei sind die QCM Messzellen zuvor mit einem fluorierten Thiol funktionalisiert worden, so dass eine Anlagerung der fluorierten Lipide **3** und **5** wahrscheinlich ist. In der Abbildung 60 sind die QCM Messungen des binären Systems **3/5** dargestellt. Dabei wurden die Messungen stets nach dem gleichen Schema durchgeführt. Nach dem Einschwingen des Quarzkristalls wurde die Vesikellösung zugegeben und das System solange in Ruhe gelassen, bis die Frequenz wieder einen konstanten Wert angenommen hatte, die An- bzw Ablagerung also beendet war. Es handelte sich hierbei um eine Lösung unilamellarer Vesikel, die nach der in Kapitel 5.7 angegebenen Vorschrift präpariert wurden. Anschließend wurde die Messzelle gespült, mit jeweils 1ml Pufferlösung pro Spülung. War die Frequenz anschließend konstant, wurde die Antikörperlösung zugegeben. Auch hier wurde gewartet bis die Frequenz konstant war. Abschließend wurde die Messzelle gespült, bis kein Effekt durch das Spülen mehr festzustellen war. Nun wurde die tatsächliche Frequenzänderung, die durch die Anbindung des Antikörpers verursacht wurde, detektiert. Es zeigt sich, dass im Fall des reinen Lipids **3** (Abbildung 60a) bei Zugabe des Antikörpers keine Massenzunahme detektiert wird. Das bedeutet, dass das fluorierte Lipid **3** keine unspezifische Absorption zeigt und es sich somit als Matrixlipid für das Vakzinlipid **5** eignet. Die binäre Mischung mit einem Anteil an Lipid **5** von 10,58 mol% hingegen (Abbildung 60b), zeigt eine Massenzunahme nach der Zugabe des Antikörpers. Hier findet eindeutig eine Erkennungsreaktion statt. Die nach der Zugabe und dem anschließenden Spülen gefundene Frequenzänderung beträgt 8,14 Hz. Im Fall der binären Mischung mit einem Anteil an Lipid **5** von 42,18 mol% (Abbildung 60c), findet man ebenfalls eine deutliche Massenzunahme, wobei die gefundene Frequenzänderung hier 25,21 Hz beträgt. Das reine Vakzinlipid **5** zeigt, wie zu erwarten, die stärkste Frequenzänderung mit 30,47 Hz.



**Abbildung 60:** QCM Messungen der Erkennungsreaktion des MUC1 SM3 Antikörpers mit dem binären Systems a) 3/5 (0 mol%) b) 3/5 (10,58 mol%) c) 3/5 (42,18 mol%) und d) 3/5 (100 mol%).

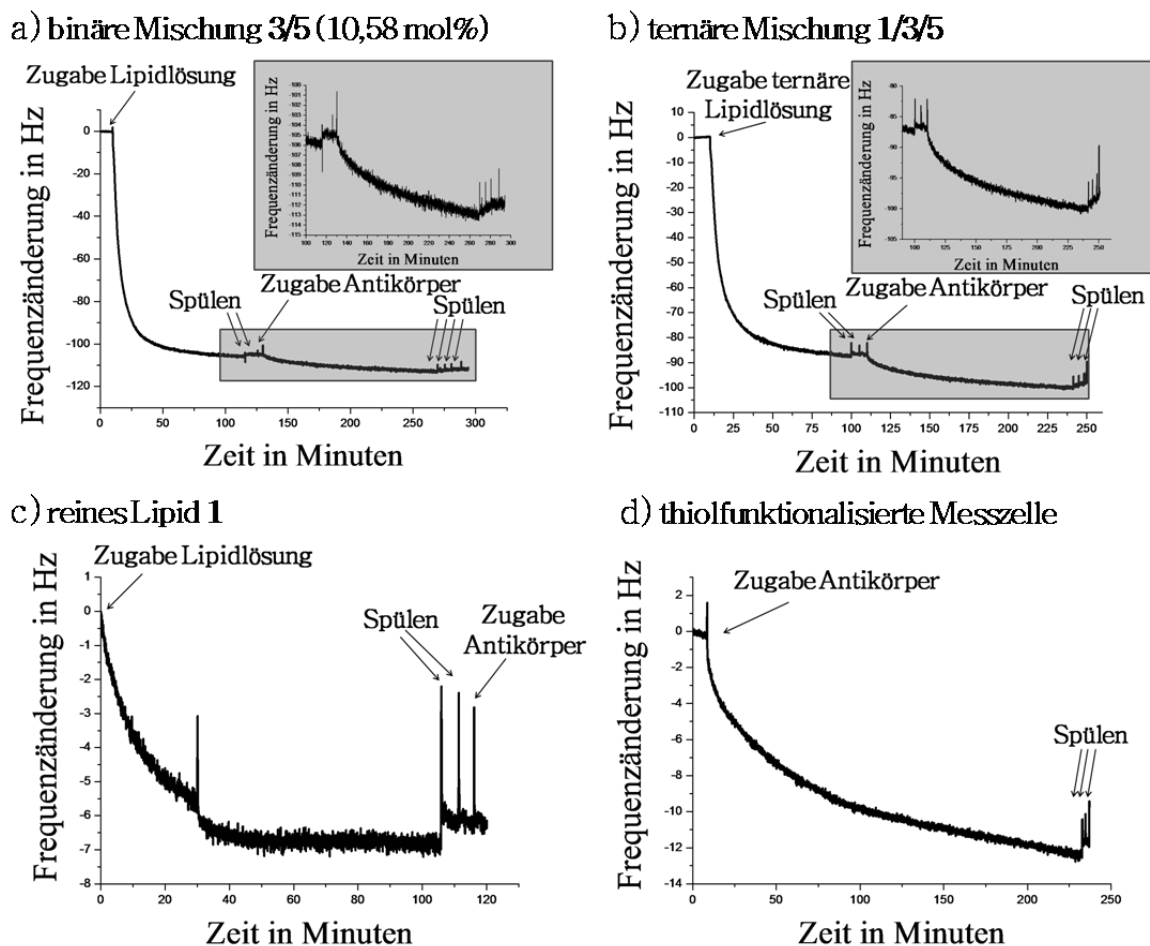
Trägt man die gefundenen Frequenzänderungen gegen den molaren Anteil an Vakzinlipid 5 auf (Abbildung 61), so zeigt sich ein nichtlinearer Verlauf. Es handelt sich vielmehr um eine Sättigungskurve, da mit einem molaren Anteil an Lipid 5 von 40 mol% die gefundene Frequenzänderung beinahe so groß ist wie mit dem reinen Lipid 5. Dies ist dadurch zu erklären, dass das reine Lipid 5 aufgrund der voluminösen Kopfgruppe nicht dicht packen kann und eine Erkennungsreaktion deshalb für das reine Lipid sterisch gehindert ist. Das bedeutet, dass sich eine binäre Mischung 3/5 durch das fluorierte Matrixlipid 3 stabilisieren lässt und die Antigen-Antikörper Erkennung trotzdem sehr effektiv ist.



**Abbildung 61:** Frequenzänderung während der Antigen-Antikörper Erkennung in Abhängigkeit des molaren Anteils an Lipid 5.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die ternären Mischungen und hier besonders das System **1/3/5**. Denn neben der Möglichkeit diese Mischungen durch photochemische Polymerisation zu stabilisieren, sollte die aufgrund der Domänenbildung des Lipids **1** erzwungene Strukturbildung der fluorierten Lipide einen positiven Einfluss auf die Antigen-Antikörper Erkennungsreaktion haben. Die Abbildung 62 vergleicht die beiden Mischungen bei denen das Verhältnis der fluorierten Lipide zueinander jeweils etwa 10:1 war, wobei das Matrixlipid **3** die Hauptkomponente ist. In der Abbildung 62a ist die binäre Mischung **3/5** (10,58 mol%) gezeigt und in der Abbildung 62b die ternäre Mischung **1/3/5** (43,14 mol%, 52,37 mol%, 4,5 mol%). Das bedeutet, dass der effektive Anteil an Vakzinlipid **5** im Fall der ternären Mischung nur halb so groß war wie im Fall der binären Mischung. Man findet, dass die Frequenzänderung im Fall der binären Mischung bei 8,14 Hz liegt und im Fall der ternären Mischung bei 12,24 Hz. Das bedeutet, dass im Fall der ternären Mischung die Antigen-Antikörper Erkennungsreaktion trotz des geringeren absoluten Anteils an Lipid **5** effektiver ist, als im Fall der binären Mischung. Verantwortlich hierfür kann nur die aufgrund der Domänenbildung des Lipids **1** erzwungene Strukturbildung der fluorierten Lipide sein.

Man kann vermuten, dass die hier auftretende Domänenbildung, ähnlich den „lipid rafts“ in natürlichen Membranen, Bereiche schafft in denen das fluorierte Vakzinlipid **5** aggregiert ist und dadurch effektiver mit dem Antikörper reagieren kann.



**Abbildung 62:** QCM Messungen der Erkennungsreaktion des MUC1 SM3 Antikörpers mit dem binären System 3/5 (10,58 mol%) und dem ternären System 1/3/5 (43,14 mol%, 52,37 mol%, 4,5 mol%).

Um hier nichtspezifische Wechselwirkungen auszuschließen wurden auch Messungen mit dem reinen Lipid **1** und der thiofunktionalisierten Messzelle durchgeführt. Im Fall des reinen Lipids **1** (Abbildung 62c) findet man keine unspezifische Adsorption des Antikörpers, so dass die höhere Massenzunahme im Fall der ternären Mischung nicht auf eine Adsorption des Antikörpers auf dem Lipid **1** zurückgeführt werden kann. Die thiofunktionalisierte Messzelle (Abbildung 62d) hingegen, also ohne eine Lipidschicht, zeigt eine unspezifische Reaktion mit dem Antikörper. Der Grund hierfür ist vermutlich die hydrophobe Oberfläche, die eine unspezifische Reaktion mit der peptidischen Kopfgruppe zulässt.

Zusammenfassend kann man also für die ternäre Mischung festhalten, dass die dominante Strukturbildung durch das polymerisierbare Lipid **1** weiterhin auftritt. Dies war zu erwarten, da dies auch schon im binären System **1/3** der Fall war und Lipid **5** aufgrund der voluminösen Kopfgruppe eine deutlich ausgeprägtere flüssiganaloge Phase hat, so dass hier, wie im Fall des Lipids **3**, keine Kristallisation zu erwarten war. Desweiteren zeigte sich, dass die binäre Mischung **3/5** sich nicht ideal verhält. Allerdings zeigte die Auswertung nach dem Additivitätsgesetz für geringe Anteile an Lipid **5** einen linearen Verlauf, so dass sich die Flächenbedarfe der beiden Lipide hier additiv verhalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Strukturbildung im ternären System einen Einfluss auf die Antigen-Antikörper Erkennungsreaktion hat, ähnlich wie das im Rahmen des „lipid raft“ Modells auch für die nativen Membranen postuliert wird.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die ausgewählten Lipide anhand ihrer  $\pi$ -A Isothermen charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die flüssiganaloge Phase umso ausgeprägter ist, je größer die hydrophile Kopfgruppe des jeweiligen Lipids ist, so dass diese schon bei sehr großen Flächen miteinander wechselwirken. Dies bedeutet gleichzeitig aber auch, dass eine dichte Packung der Lipide nicht mehr möglich ist, was sich in abnehmenden Kollapsdrücken zeigte. Außerdem wurde das Mischungsverhalten und die Domänenbildung binärer und ternärer Mischungen untersucht. Dabei konnte im Fall der binären Mischungen der polymerisierbaren Lipide **1** und **2** mit dem perfluorierten Lipid **3** eine Phasenseparation beobachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Form als auch die Größe der Domänen durch zwei Faktoren kontrolliert werden konnte, nämlich zum einen durch den Lateraldruck und zum anderen durch die molare Zusammensetzung der binären Mischung. Es zeigte sich aber auch, dass im Fall der binären Mischung **1/3** eine partielle Mischbarkeit vorlag. Dies war unerwartet, denn die Lipide wurden ja aufgrund ihrer zu erwartenden starken Entmischungstendenz ausgewählt. Bei niedrigen Lateraldrücken (10 mN/m) waren fluorierte und nichtfluorierte Lipide in der homogenen flüssiganalogen Phase vollständig mischbar. Bei sehr hohen Lateraldrücken (30 mN/m) lag eine nahezu vollständige Entmischung vor, da das Lipid **1** hier schon vollständig auskristallisiert war. Im Fall der binären Mischung **2/3** konnte ein solches Verhalten nicht beobachtet werden, was an dem Phasenverhalten des Lipids **2** liegt. Denn dieses verfügt nur über zwei Phasen, die gasanaloge und die kristallanaloge Phase, so dass sich das Diacetylen bereits bei sehr niedrigen Lateraldrücken aus der flüssiganalogen Matrix ausscheidet. Aber auch hier lies sich die Domänenbildung sowohl über den Lateraldruck als auch über die Komposition der binären Mischung kontrollieren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Monoschichten dieser beiden binären Mischungen durch photochemische Polymerisation stabilisiert werden können. Dies wurde in beiden Fällen anhand der  $\pi$ -A Isothermen der betreffenden Mischungen, vor und nach der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, nachgewiesen. Im Falle der binären Mischung **1/3** (11,6 mol%) konnte die Stabilisierung bzw. das „Einfrieren“ der Domänen außerdem zweifelsfrei mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden. Denn nach der Polymerisation, bei einem Lateraldruck von 30 mN/m, ließen sich auch bei niedrigen Lateraldrücken (10 mN/m) die „eingefrorenen“ Domänen nachweisen, obwohl zuvor keinerlei Domänenbildung bei derart niedrigen Lateraldrücken beobachtet werden konnte.

Der Einfluss des Fluorierungsgrades auf das Phasenseparationsverhalten wurde anhand der binären Mischungen **1/6** und **1/8** untersucht. Es zeigte sich hier, wie schon für die beiden binären Mischungen mit Lipid **3**, dass sich in beiden Fällen die Domänenbildung sowohl über den Lateraldruck als auch über die Komposition der Mischung steuern lässt. Ein Vergleich der gefundenen Strukturen belegte darüber hinaus klare Unterschiede zwischen dem fluorierten und teilfluorierten Lipid. Denn in der binären Mischung **1/8** (perfluoriertes Lipid) konnte die hexagonale Grundstruktur, die zuvor schon in der binären Mischung **1/3** gefunden wurde, beobachtet werden. Demgegenüber hatten die kristallinen Domänen, die in der binären Mischung **1/6** (teilfluoriertes Lipid) beobachtet wurden, die hexagonale Grundform verloren. Hier wurden rundliche unförmige Domänen gefunden, die zudem deutlich kleiner waren als die bei der Mischung mit dem perfluorierten Lipid gefundenen Domänen. Die partielle Mischbarkeit der Lipide **1** und **6** beeinflusst also das Phasenseparationsverhalten und die damit verbundene Kristallisation der Domänen des polymerisierbaren Lipids deutlich.

In den ternären Mischungen der Lipide **1** und **3** zum einen mit Lipid **4** und zum anderen mit dem Vakzinlipid **5** zeigte sich, dass diese ternären Mischungen eine ähnliche Phasenseparation zeigten wie die binäre Mischung **1/3**. Die hier auftretenden kristallanalogen Domänen bestanden aus Lipid **1**, wobei die umgebende flüssiganaloge Matrix die beiden fluorierten Lipide enthielt. Deswegen war es von besonderer Bedeutung wie sich die beiden fluorierten Verbindungen untereinander verhalten würden. Dazu wurden die  $\pi$ -A Isothermen der binären Mischung **3/5** ausgewertet und dabei zeigte sich, dass es sich um kein ideales System handelt. Allerdings konnte für geringe Anteile an Lipid **5** ( $\leq 60$  mol%) ein linearer Verlauf im Additivitätsgesetz gefunden werden. Die Flächenbedarfe der beiden Lipide verhielten sich hier also additiv. Das und die Beobachtung einer homogenen flüssiganalogen Phase bedeutet, dass sich das Vakzinlipid, sofern der Anteil nicht höher ist als der des fluorierten Matrixlipides, in idealer Weise mit diesem mischt.

Eine Untersuchung der Antigen-Antikörper Erkennung der binären Mischungen **3/5** zeigte, dass die Reaktion mit dem Antikörper umso effektiver war, je größer der Anteil des Vakzinlipids **5** war. Allerdings konnte hier kein linearer Zusammenhang gefunden werden. Stattdessen handelte es sich um eine Sättigungskurve, da bereits ein Anteil an Lipid **5** von 42,2 mol% eine nur geringfügig schwächere Antikörperanbindung zeigte, als das reine Vakzinlipid.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Geräte

#### 5.1.1 Langmuir-Blodgett Trog

Die Langmuir-Blodgett Experimente wurden auf einem Trog der Firma NIMA durchgeführt (Modell 611). Der gesamte Aufbau war in einer Kammer aus Acrylglas, um eine Kontamination durch Staub so gering wie möglich zu halten. Außerdem ruhte der Trog auf Marmorplatten, welche durch Schaumstoffmatten gedämpft wurden, um etwaige Vibrationen zu vermeiden. Die Gesamtfläche des Trogs betrug  $200 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  und das Gesamtvolumen betrug rund 100 ml. Die effektive Wasseroberfläche wurde durch zwei abhängige hydrophobe Barrieren aus Teflon kontrolliert, die den gespreiteten Film symmetrisch mit einer Rate von  $5 \text{ cm}^2/\text{min}$  komprimierten. Eine Temperaturkontrolle zwischen  $5^\circ\text{C}$  und  $45^\circ\text{C}$  war möglich, wobei die Temperatur im Regelfall  $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$  betrug. Eine Auswertung der Isothermen erfolgte mit der mitgelieferten Software NIMATR516 und dem Programm Origin 8.

#### 5.1.2 Brewsterwinkelmikroskop

Die Brewsterwinkelmessungen wurden an einem EP3 BAM Instrument (Nanofilm, Göttingen, Deutschland), welches an einem Nima Langmuir-Blodgett Trog (Nima Ltd, Coventry, Typ 601 BAM) angebracht war, durchgeführt. Der gesamte instrumentelle Aufbau war in einer roten Acrylglasbox, welche sowohl als Staubschutz als auch als Laserschutz diente. Außerdem ruhte die gesamte Apparatur auf einem vibrationsresistenten Marmortisch. Die Troggesamtfläche betrug  $700 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  und das Troggesamtvolumen betrug rund 400 ml. Die effektive Trogfläche wurde durch zwei hydrophobe Barrieren kontrolliert, die den gespreiteten Film symmetrisch mit einer Rate von  $5 \text{ cm}^2/\text{min}$  komprimierten. Das Mikroskop war mit einem 50 mW starken Laser ausgerüstet, wobei die Wellenlänge bei 532 nm lag und der Laserstrahl in einem Winkel von  $53,1^\circ$  (Brewsterwinkel) auf die Wasseroberfläche auftraf. Die Software war EP<sup>3</sup>View V2.33 und BAMTools V1.01 (jeweils von Nanofilm). Die

räumliche Auflösung des BAMs betrug etwa 2  $\mu\text{m}$  mit einer Bildgröße von  $500 \times 400 \mu\text{m}$  (bei Verwendung eines 10 $\times$  Objektivs der Firma Nikon).

### **5.1.3 Rasterkraftmikroskopie**

Die AFM-Messungen wurden entweder mit dem MFP-3D microscope der Firma Asylum Research oder Nanoscope III multimode AFM der Firma Digital Research durchgeführt. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte in beiden Fällen mit der Software SPIP.

### **5.1.4 Quarzmikrowaage**

Die Messungen mittels QCM wurden auf einer Quarzmikrowaage QCM-D (QSX 301) der Firma Q-Sense durchgeführt. Verwendet wurden Schwingquarze mit AT-Cut, einer Frequenz von  $4,95 \pm 50 \text{ Hz}$ , einem Durchmesser von 14 mm und einer Dicke von 0,3 mm, die zudem in allen Fällen mit einem perfluorierten Thiol funktionalisiert waren. Zur Auswertung der Daten wurde Origin 8 verwendet.

### **5.1.5 Kernresonanzspektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzspektren wurden bei Raumtemperatur mit dem Gerät Bruker AC 300 für 300 MHz durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die gemessenen NMR-Spektren wurden alle mit der Software ACD 1D NMR Manager aus der Serie ACDLabs6.0 ausgewertet.

### **5.1.6 FT-IR-Spektroskopie**

Es wurde das Gerät Vector 22 der Firma Bruker benutzt. Zur Auswertung wurde die Software OPUS verwendet.

### 5.1.7 Reinstwasser

Reinstwasser wurde durch eine Reinstwasseranlage Milli-Q 3 der Firma Millipore erhalten.

## 5.2 Verwendete Chemikalien und Verbindungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht im Kapitel 5.2.2 oder 5.7 aufgeführt, kommerziell erworben (Sigma Aldrich, Fluka, Acros) und falls nicht ausdrücklich angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle verwendeten Lösungsmittel hatten den Reinheitsgrad pure analysis (p.a.), wobei THF und Dichlormethan für die Synthese getrocknet und destilliert wurden. Das für die Lösungen und zur Reinigung des Langmuir-Blodgett Trogs verwendete Chloroform wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die Chromatographieplatten stammten von der Firma Merck. Zur Säulenchromatographischen Aufreinigung wurde Silica-Gel der Firma Macherey-Nagel verwendet.

### 5.2.1 Antikörper für die QCM-Messungen

Der spezifische Antikörper für die nicht vollständig glykosylierte MUC1-Sequenz (SM3) wurde über die Firma Abcam bezogen und ist Tumor spezifisch. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper, welcher im Eisfach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerstabil ist. Die im Rahmen der QCM Messungen verwendeten Lösungen wurden in der Konzentration  $2\ \mu\text{g/ml}$  im Puffer (PBS,  $\text{pH} = 7,2$ ,  $0,2\ \mu\text{m}$ ) angesetzt.

### 5.2.2 PDA, fluorierte und teilfluorierte Lipide

Die Pentacosadiinsäure (PDA) wurde über die Firma Fluka bezogen. Vor Gebrauch wurde die Diacetylsäure in Chloroform (p.a.) gelöst und filtriert, um bereits polymerisiertes Monomer abzutrennen. Das Filtrat wurde anschließend im Dunkeln unter Vakuum getrocknet und war dann in Lösung bei  $-4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank stabil.

Die Lipid **3,4** und **5** wurden im Rahmen einer Kooperation von Jerome Schönhentz, die Lipide **6,7,8** und **9** von Tobias Platen aus der Arbeitsgruppe von Frau Jr. Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder synthetisiert.

### 5.3 Langmuir-Blodgett Experimente

Die Langmuir-Blodgett Experimente wurden auf dem bereits beschriebenen Trog der Firma NIMA durchgeführt (Modell 611). Deionisiertes Wasser wurde mit einer MilliQ Anlage (Millipore) bei  $18,2 \text{ M}\Omega - \text{cm}$  Widerstand gewonnen und in allen Fällen als Subphase verwendet, wobei es jeweils frisch gewonnen wurde. In den meisten Experimenten betrug die Temperatur der Subphase  $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  (15 min Wartezeit nach dem Einfüllen des Wassers und vor dem Spreiten der Lösung), wobei eine Temperaturkontrolle im Bereich von  $5^\circ\text{C}$  bis  $45^\circ\text{C}$  möglich war. Vor jedem Gebrauch wurde die Wasseroberfläche gereinigt, also Staubpartikel und ähnliches abgesaugt, so dass der gemessene Lateraldruck während eines vollständigen Kompressionszyklus kleiner als  $0,1 \text{ mN/m}$  blieb. Die Langmuir-Blodgett Komponenten wurde vor jedem Gebrauch mit absolutem Chloroform gereinigt. Der Lateraldruck wurde mit einem Wilhelmyplättchen ( $20 \times 10 \text{ mm}$ ) aus Filterpapier gemessen, welches vor jedem Gebrauch mehrfach mit Chloroform gespült wurde, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Lösungen der Lipidmischungen wurden mit einer Mikrospritze von Kloehn aufgegeben. In einem typischen Experiment wurden  $20 - 40 \text{ }\mu\text{l}$  der Lösung in kleinen Portionen (etwa  $2 \text{ }\mu\text{l}$  pro Tropfen) an verschiedenen Stellen der Wasseroberfläche aufgegeben. In allen Experimenten verging eine 15 minütige Wartezeit zwischen dem Spreiten und dem Beginn der Messung, um ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels zu gewährleisten. Ein Übertrag mittels Langmuir-Blodgett oder Langmuir-Schäfer Transfer erfolgte mit dem Dipper, der eine Tauchgeschwindigkeit von  $1 \text{ mm pro Minute}$  bis zu  $5 \text{ mm pro Minute}$  hatte.

### 5.4 AFM-Messungen

Die AFM-Messungen zur Untersuchung der Mischsysteme wurden im tapping mode nach Langmuir-Blodgett Übertrag der Monoschicht auf frisch gereinigte Glimmerblättchen durchgeführt. Die Messungen wurden am MFP-3D Mikroskop der Firma Asylum Research bzw. am Nanoscope III multimode AFM der Firma Digital Research durchgeführt. Die

verwendeten cantilever (Federbalken) der Firma Olympus waren aus Silizium und hatten entweder eine Federkonstante von 42 N/m (Dicke = 4,6  $\mu\text{m}$ , Resonanzfrequenz = 300 kHz) oder von 2 N/m (Dicke = 2,7  $\mu\text{m}$ , Resonanzfrequenz = 70 kHz). Um Irritationen durch Vibrationen zu vermeiden waren die Mikroskope in vibrationsresistenten Gehäusen aufgebaut und befanden sich außerdem auf aktiv gedämpften Tischen. Jede Abbildung wurde aus 512 Zeilen für beide Richtungen (XY-Scanrichtung) aufgebaut. Jede Probe wurde mehrere Male an verschiedenen Stellen des Substrats vermessen, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. In allen Fällen wurden die Aufnahmen des Langmuir-Blodgett Films weit weg vom Rand des Glimmerplättchen gemacht, um den Einfluss störender Effekte, die durch Meniskuseffekte oder Oberflächenturbulenzen während des Übertrags verursacht wurden, zu unterbinden.

### 5.5 BAM Messungen

Die Brewster-Winkel Messungen wurden an dem zuvor beschriebenen EP3 BAM Instrument der Firma Nanofilm, welches an einem Nima Langmuir-Blodgett Trog (Typ 601 BAM) angebracht war, durchgeführt. Deionisiertes Wasser wurde mit einer MilliQ Anlage (Millipore) bei 18,2 M $\Omega$  – cm Widerstand gewonnen und in allen Fällen als Subphase verwendet, wobei es jeweils frisch gewonnen wurde. In allen Experimenten betrug die Temperatur der Subphase  $25 \pm 0,1$  °C (15 min Wartezeit nach dem Einfüllen des Wassers und vor dem Spreiten der Lösung). Vor jedem Gebrauch wurde die Wasseroberfläche gereinigt, also Staubpartikel und ähnliches abgesaugt, so dass der gemessene Lateraldruck während eines vollständigen Kompressionszyklus kleiner als 0,1 mN/m blieb. Die LB Komponenten wurde vor jedem Gebrauch mit absolutem Chloroform gereinigt. Der Lateraldruck wurde mit einem Wilhelmyplättchen (20  $\times$  10 mm) aus Filterpapier gemessen, welches vor jedem Gebrauch mehrfach mit Chloroform gespült wurde, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Lösungen der Lipidmischungen wurden mit einer Mikrospritze von Kloehn aufgegeben. In einem typischen Experiment wurden 50 – 100  $\mu\text{l}$  der Lösung in kleinen Portionen (etwa 2  $\mu\text{l}$  pro Tropfen) an verschiedenen Stellen der Wasseroberfläche aufgegeben. In allen Experimenten verging eine 15 minütige Wartezeit zwischen dem Spreiten und dem Beginn der Messung, um ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels zu gewährleisten. Das Mikroskop war mit einem 50 mW starken Laser ausgerüstet, wobei die Wellenlänge bei 532 nm lag und der Laserstrahl in einem Winkel von 53,1° (Brewsterwinkel) auf die

Wasseroberfläche auftraf. Die Software war EP<sup>3</sup>View V2.33 und BAMTools V1.01 (jeweils von Nanofilm). Die räumliche Auflösung des BAMs betrug etwa 2 µm mit einer Bildgröße von 500 × 400 µm (bei Verwendung eines 10× Objektivs der Firma Nikon).

### 5.6 QCM-Messungen

Die QCM Messzelle und die Schläuche wurden vor jedem Gebrauch gereinigt. Dazu wurde die gesamte Apparatur mit 80 bis 100 ml 2%iger Hellmanexlösung gewaschen, wobei sowohl die Schleife als auch die Messzelle mit dieser Menge gespült wurden. Anschließend wurde jeweils mit 100 ml Reinstwasser nachgespült und die QCM konnte verwendet werden. Die Schwingquarze wurden bei der Firma QSense gekauft und waren goldbeschichtet, wobei die Schichtdicke rund 100 nm betrug. Zur Reinigung wurden diese zunächst mit Ethanol gewaschen, getrocknet und für 60 Sekunden im Argonplasma behandelt. Anschließend für 5 Minuten mit basischer Piranhalösung (H<sub>2</sub>O : NH<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O 5:1:1) behandelt und nochmals mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Sensoren für 12 Stunden in eine ethanolische Lösung des Thiols (1H,1H,2H,2H – Perfluorodecanthiol) gegeben (EtOH/ Thiol = 3/1). Nachdem die Schwingquarze mit Ethanol und MilliQ-Wasser gewaschen worden waren, konnten sie verwendet werden. Nach Einbau in die QCM Messzelle, wurde diese zunächst mit Pufferlösung (PBS, pH = 7,2, 0,2 µm) gespült (Schleife und Messzelle, bei einer Flussrate von 450 µl/min) Während des gesamten Experiments wurden die Änderungen der Frequenz bei 5, 15, 30 und 35 MHz und deren Dissipationsfaktoren in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Temperatur betrug in allen Fällen 20,5 °C. Nach einer Einschwingzeit von 30 bis 60 Minuten konnte die jeweilige Lipidlösung aufgegeben werden, wobei deren Konzentration in allen Fällen bei etwa 0,1 mg/ml lag. Nach einer gewissen Zeit hatte sich eine Sättigung der funktionalisierten Goldoberfläche eingestellt, da die fluorierten Lipide diese vollständig oder sogar mehrschichtig belegt hatten. Daraufhin wurde solange mit Pufferlösung gespült (2-5 ml pro Spülung) bis keine Massenabnahme mehr detektierbar war und die Frequenz konstant blieb. Daraufhin konnte die Antikörperlösung aufgegeben werden, deren Konzentration 2 µg/ml betrug. Nachdem auch bei der Antikörperanlagerung eine Sättigung eingesetzt hatte, wurde wiederum solange mit Puffer gespült bis keine Massenabnahme mehr detektierbar war. Die Frequenzen bzw. Dissipationen wurden mit Origin 8 analysiert.

## 5.7 Vesikelpräparation

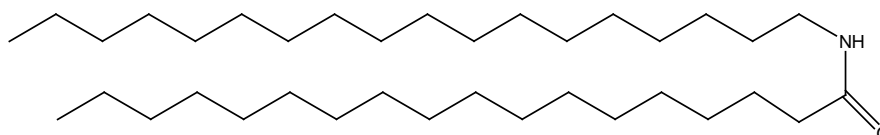
In dieser Arbeit werden Lipid **1** mit einem molaren Gewicht von 749,65 g/mol und die perfluorierten Lipide **3** und **5** in verschiedenen Mischungen benutzt. Von den Lipidsystemen werden Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in Chloroform bzw. Chloroform/ Methanol hergestellt, entsprechende Mengen der Stammlösungen in zuvor mit Chloroform gespülte Schnappdeckelgläser 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, wobei in allen Fällen die Temperatur 70°C betrug, da dies über den Phasenumwandlungstemperaturen der fluorierten Lipide liegt. Verbliebene Lösungsmittel werden durch anschließendes Trocknen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur (also bei 70°C) unter Vakuum entfernt. Der so erhaltene Lipidfilm ist mehrere Wochen im Kühlschrank lagerbar.

Zur Vesikelpräparation wird der Lipidfilm in der entsprechenden Pufferlösung (PBS, pH = 7,2, 0,2 µm) und der benötigten Konzentration gelöst. Dazu wird der Film mittels eines Wärmebades auf 70°C erhitzt und für 1 Stunde quellen gelassen. Nach einer Behandlung mit dem Vortexer für 30 Sekunden wurde die Lösung milchig, da sich die Lipide unter Bildung von multilamellaren Vesikeln lösten. Durch anschließende Behandlung im Ultraschallbad, wiederum bei 70°C, wurden die multilamellaren in unilamellare Vesikel umgewandelt, so dass die Lösung wieder klarer wurde (15 Minuten Beschallungszeit). Die so gewonnenen unilamellaren Vesikel können bis zu 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.

## 5.8 Synthese

### 5.8.1 Synthese des Dioctadecylamin (DODA)

#### a) Darstellung des Amids



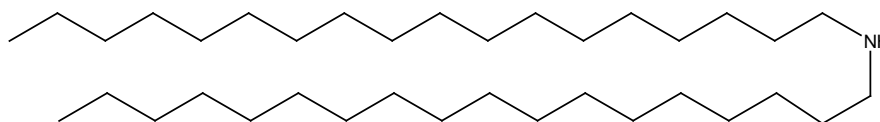
Die Stearinsäure (0,02 mol) wird in 25 ml  $\text{CHCl}_3$  (Chloroform p.a.) gelöst und dann langsam 3,24 g (0,02 mol) 1,1'-Carbonyldiimidazol zugegeben. Man rührt 30 Minuten weiter und wartet die Kohlendioxidentwicklung ab. Anschließend werden 0,02 mol des Octadecylamins zugegeben. Nach 3 weiteren Stunden wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, die verbleibende Lösung eingeeengt, der dabei anfallende Niederschlag wird ebenfalls abgesaugt und mit ersterem vereinigt. Je nach Reinheit kann aus Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 61% der Theorie

FT-IR (ATR):

$\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]=3317.9, 2954.6, 2915.9, 2871.4, 2848.2, 1638.7 (Amid I), 1631.4 (Amid I), 1563.4 (Amid II), 1472.4, 1462.13

#### b) Darstellung des Dioctadecylamins



In einer Extraktionshülse werden 11,7 mmol des Amids vorgelegt. Zu 250 ml trockenem THF werden 0,353 g (9,3 mmol)  $\text{LiAlH}_4$  gegeben und die Lösung wird für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung wird anschließend Wasser zugetropft, um nicht umgesetztes  $\text{LiAlH}_4$  zu vernichten. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und mit

heißem THF ausgewaschen. Die THF-Lösungen werden gegen  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt und anschließend einrotiert. Es kann anschließend aus Ethanol umkristallisiert werden.

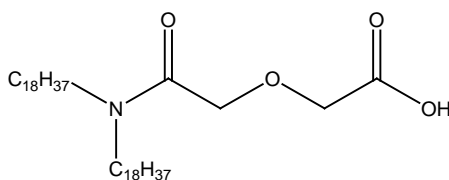
Ausbeute: 38% der Theorie

FT-IR (ATR):

$\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]=2955.1, 2915.2, 2881.5, 2847.6, 2360.8, 2339.6, 1472.2, 1461.5, 1377.8, 1128.7, 776.6, 729.7, 719.1

### 5.8.2 Synthese des Lipid 1 (DODAMA)

a) Darstellung von Dioctadecylcarbamoylmethoxy-essigsäure

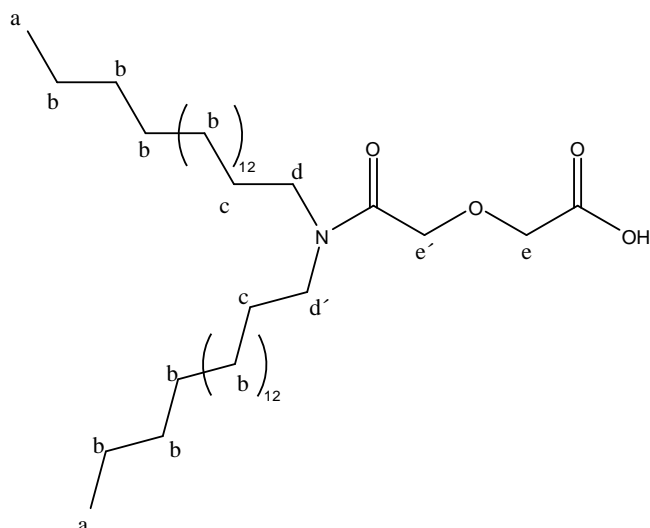


8,33 g (16 mmol) Dioctadecylamin werden in 150 ml Dichlormethan (getrocknet über  $\text{MgCl}_2$ ) gelöst. Nach Zugabe von 3,71 g (32 mmol) 2,6-Dioxodioxan (Glycolsäureanhydrid) und 2,55 g (32 mmol) Pyridin wird für 8 Stunden am Rückfluss gekocht und über Nacht nachreagieren gelassen. Das Produkt wird mit 2n Salzsäure, mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und einrotiert. Das erhaltene Produkt (weiße Kristalle, Schmelzpunkt  $74,5^\circ\text{C}$ ) kann direkt weiter umgesetzt werden.

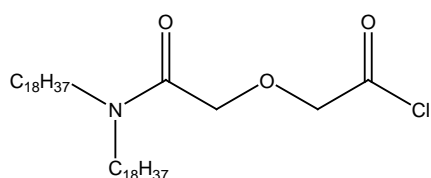
Ausbeute: 79% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 0.85 (t, 6 H,  $\text{H}_a$ ,  $J = 6,6$  Hz), 1.22 (m, 60 H,  $\text{H}_b$ ), 1.51 (s, 4 H,  $\text{H}_c$ ), 3.15 (t, 2 H,  $\text{H}_d$ ,  $J = 7,9$  Hz), 3.26 (t, 2 H, t,  $\text{H}_d'$ ,  $J = 7,2$  Hz), 4.25 (s, 2 H,  $\text{H}_e$ ), 4.38 (s, 2 H,  $\text{H}_e'$ )

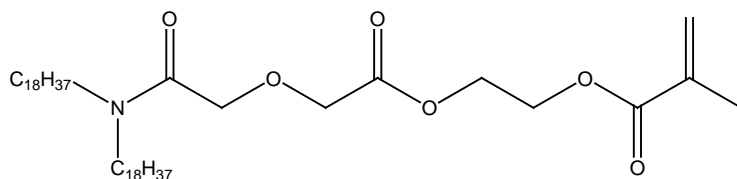


b) Darstellung von Dioctadecylcarbamoylmethoxy-essigsäurechlorid



1,3 g (2 mmol) Dioctadecylcarbamoylmethoxy-essigsäure werden in 25 ml trockenem Dichlormethan (über  $CaCl_2$  getrocknet) gelöst und auf  $0^\circ C$  gekühlt. Nach Zugabe von 0,52 g (4 mmol) Oxalylchlorid wird 1,5 Stunden im Eisbad reagieren gelassen und nochmals 1 Stunde bei Raumtemperatur nachreagieren gelassen. Anschließend wird die Reaktionslösung einrotiert, in Benzol wieder gelöst und erneut einrotiert. Das erhaltene Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

c) Darstellung des 2-Methyl-essigsäure-2-(2-dioctadecylcarbamoylmethoxy-acetoxy)-ethylester



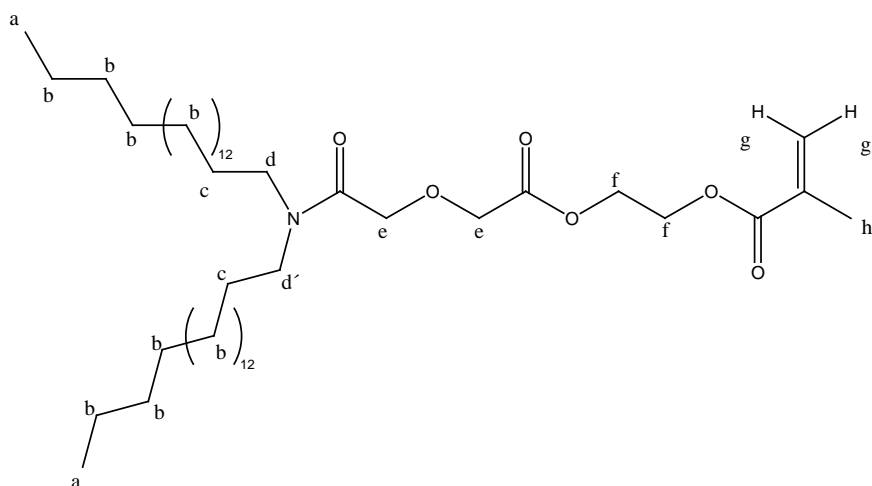
Dioctadecylcarbamoylmethoxy-essigsäurechlorid aus der letzten Stufe wird erneut in 25 ml trockenem Dichlormethan (über  $CaCl_2$  getrocknet) gelöst und im Eisbad auf  $0^\circ C$  gekühlt.

## Experimenteller Teil

Nach Zugabe von 0,53 g (4 mmol) 2-Hydroxyethyl-methacrylat und einer Spatelspitze 2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol (als Inhibitor) wird 2 Stunden in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die Reaktionslösung wird anschließend mehrmals gegen Wasser ausgeschüttelt, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Das reine Produkt wird durch säulenchromatographische Trennung mit einem Laufmittel aus n-Hexan/ Essigsäureethylester im Verhältnis 4:1 erhalten. Nach Gefriertrocknen im Hochvakuum wird eine weiße wachsartige Substanz erhalten (Schmelzpunkt 34°C, Zersetzungstemperatur 374°C).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ[ppm] = 0.82 (t, 6 H, H<sub>a</sub>, J = 6.65 Hz), 1.25 (m, 60 H, H<sub>b</sub>), 1.50 (s, 4 H, H<sub>c</sub>), 1.92 (s, 3 H, H<sub>h</sub>), 3.13 (t, 2 H, H<sub>d</sub>, J = 7.7 Hz), 3.27 (t, 2 H, H<sub>d'</sub>, J = 7.7 Hz), 4.23 (s, 4 H, H<sub>e</sub>), 4.37 (m, 4 H, H<sub>f</sub>), 5.57 (s, 1 H, H<sub>g</sub>), 6.10 (s, 1 H, H<sub>g'</sub>)



FT-IR (ATR):

$\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2917.7, 2850.3, 1757.9, 1725.5, 1650.6, 1466.8, 1377.7, 1296.9, 1129.8, 940.9, 880.8, 813.3, 755.9, 721.0

Elementaranalyse:

Kalkuliert für C<sub>46</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>6</sub>: C, 73.65; H, 11.69; N, 1.87 Gefunden: C, 73.36; H, 11.72; N, 1.87 (alle Angaben in Prozent)

Massenspektrum (FD):

Berechnet für C<sub>46</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>6</sub>: 750,2 Gefunden: 751,4 (100,00%) DODAMA+H<sup>+</sup>, 750,4 (14,94%) DODAMA, 523,0 (14,71%) DODA+H

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
BAM	Brewster angle microscopy (Brewsterwinkelmikroskopie)
DODAMA	2-Methyl-essigsäure-2-(2-dioctadecyl-carbamoylmethoxy-acetoxy)-ethylester
DODA	Dioctadecylamin
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schäfer
PDA	10,12-Pentacosadiinsäure
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TR	tandem repeat
VNTR	variable number of tandem repeats

## 7. Publikationen

Scheibe, P.; Barz, M.; Hemmelmann, M.; Zentel, R. Langmuir-Blodgett Films of Biocompatible Poly(HPMA)-block-poly(lauryl methacrylate) and Poly(HPMA)-random-poly(lauryl methacrylate): Influence of Polymer Structure on Membrane Formation and Stability *Langmuir* **2010**, 26(8), 5661-5669.

Scheibe, P.; Schoenhentz, J.; Platen, T.; Hoffmann-Roeder, A.; Zentel, R. Langmuir-Blodgett Films of Fluorinated Glycolipids and Polymerizable Lipids and Their Phase Separating Behavior *Langmuir* **2010**, 26(23), 18246-18255

## 8. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung aller nun folgenden Menschen nicht zustande gekommen und sicher auch weniger erfolgreich verlaufen. Daher bin ich allen zu großem Dank verpflichtet:

Mein besonderer Dank gilt dabei zuallererst **Prof. Dr. [REDACTED]** für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis und die hervorragende Betreuung.

Außerdem möchte ich mich natürlich bei Jr. Prof. Dr. [REDACTED] und ihrer Gruppe bedanken, hier namentlich [REDACTED] und [REDACTED]. Ohne die im Rahmen unserer Kooperation zur Verfügung gestellten Verbindungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Ein herzlicher Dank auch an den Arbeitskreis von Prof. [REDACTED] und [REDACTED] (AK [REDACTED]), da ich ohne den Zugang zu den Rasterkraftmikroskopen diese Arbeit in der vorliegenden Form sicher nicht hätte machen können. Außerdem habe ich dort stets Hilfe erfahren, wenn sie denn mal nötig war.

Für die Brewsterwinkelmessungen bin ich [REDACTED] vom MPIP zu großem Dank verpflichtet. Denn ohne den einfachen Zugang zu dem Mikroskop wären die BAM Aufnahmen wohl nicht möglich gewesen. Hier sollen auch [REDACTED] und [REDACTED] nicht unerwähnt bleiben.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle dem AK [REDACTED] danken. Ich habe mich während meiner ganzen Zeit hier sehr wohl gefühlt. Wir hatten immer - und ihr werdet das sicher auch in Zukunft haben - ein sehr herzliches Klima. Mir standen während meiner Arbeit viele von euch mit Rat und Tat zur Seite, was mir sehr geholfen hat. Und ich möchte hier auch schon vorwegnehmen, dass sich hier jeder von euch angesprochen fühlen darf, auch wenn er oder sie im Folgenden nicht namentlich erwähnt werden wird. Danke euch allen!

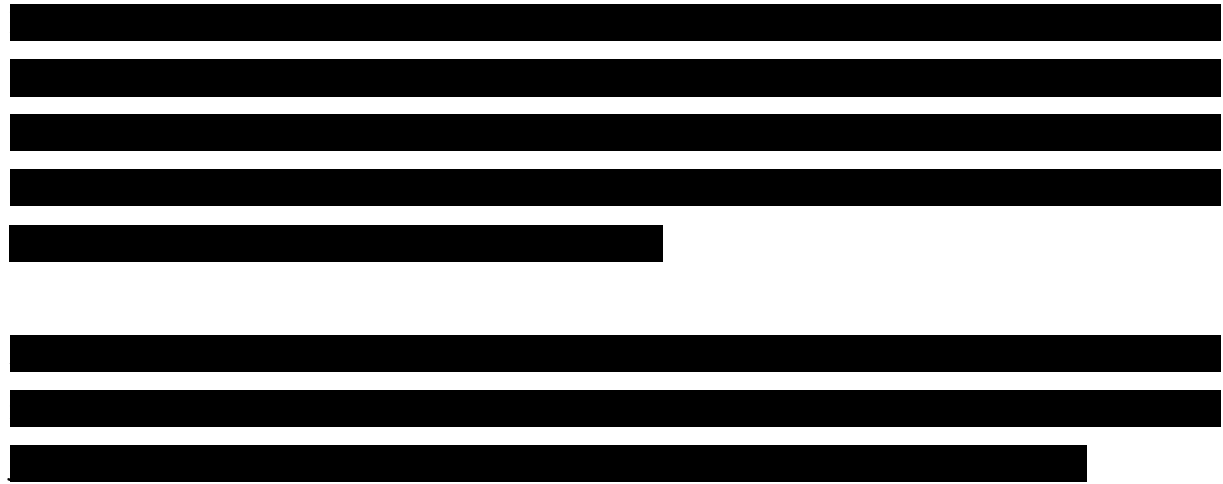
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



## 9. Curriculum Vitae

### Allgemeines

■.■.1979 in Bottrop-Kirchhellen geboren

### Ausbildung

2007 bis	<b>Promotion</b> im Fach organische Chemie (polymere
2011	Materialwissenschaften) der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
2007	<b>Diplom</b> im Fach Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
2004	Technische Universität Eindhoven
2001–2007	Grund- und Hauptstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
2000	Abitur am Goethe-Gymnasium Bad Ems

## 10. Literaturverzeichnis

- 1       www.who.int, World Health Organization, Fakten über den Krebs.
- 2       Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts, *Krebs in Deutschland - Häufigkeit und Trends 2010*
- 3       Danaei, G.; Vander Hoorn, S.; Lopez, A. D.; Murray, J. L. C.; Ezzati, M. *Lancet* **2005**, 366, 1784-1793.
- 4       Malvezzi, M.; Arfe, A.; Bertuccio, P.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E. *Annals of Oncology* **2011**, 22 (2).
- 5       Turner, N. C.; Jones, A. L. *BMJ* **2008**, 337, 107-110.
- 6       Turner, N.C.; Jones, A. L. *BMJ* **2008**, 337, 164-169.
- 7       Dermine, S.; Gilham, D. E.; Shaw, D. M.; Davidson, E. J.; Meziane, E.-K.; Armstrong, A.; Hawkins, R. E.; Stern, P. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1704, 11-35.
- 8       Koganty, R. R.; Reddish, M. A.; Longenecker, B. M. *Drug Discovery Today* **1996**, 1, 190-198.
- 9       Müller, P., Rudin, D. O., Tein, H. T., Wescott, W. C. *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, 534-535.
- 10      Boal, D. *Mechanics of the cell Cambridge University Press 2002.*
- 11      Evans, E.; Rawicz, W. *Phys. Rev. E* **1997**, 79, 122379-122382.
- 12      Springer, G. F. *Science* **1984**, 224, 1198-1206.
- 13      Hakomori, S.-I. *Ann. Rev. Immunol.* **1984**, 2, 103-126.
- 14      Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Miles, D. W.; Dalziel, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, 301-313.
- 15      Strous, G. J.; Dekker, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 27, 57-92.
- 16      Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 45-60.
- 17      Dekker, J.; Rossen, J. W. A.; Büller, H. A.; Einerhand, A. W. C. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 126-131.
- 18      Brockhausen, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 67-95.
- 19      Hanisch, F.-G.; Müller, S. *Glycobiology* **2000**, 10, 439-449.
- 20      Sorensen, A. L.; Reis, C. A.; Trap, M. A.; Mandel, U.; Ramachandran, K.; Sankarayanan, V.; Schwientek, T.; Graham, R.; Taylor-Papadimitrou, J.; Hollingsworth, M. A.; Burchell, J.; Clausen, H.; *Glycobiology* **2005**, 16, 96-107.
- 21      Müller, S.; Goletz, S.; Packer, N.; Gooley, A.; Lawson, A. M.; Hanisch, G.-G. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24780-24793.
- 22      Snudewint, F. G. M.; von Mensdorff-Pouilly, S.; Karantu-Wanamarta, A. H.; Verstaeten, A. A.; Livingston, P. O.; Hilgers, J.; Kenemans, P. *Int. J. Cancer* **2001**, 93, 97-106.
- 23      Hanisch, F.-G. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, 33, 705-708.
- 24      Swallow, D. M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Cornes, G.; Taylor-Papadimitriou, J.; Bramwell, M. E. *Nature* **1987**, 328, 82-84.
- 25      Hilkins, J.; Ligtenberg, M. J. L.; Vos, H. L.; Litvinov, S. V. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 359-363.

- 26 Burchell, J. M.; Mungul, A.; Taylor-Papadimitriou, J. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355-364.
- 27 Hanisch, F.-G.; Peter-Katalinic, J.; Egge, H.; Dabrowski, U.; Uhlenbruck, G. *Glycoconj. J.* **1990**, 7, 525-543.
- 28 Brockhausen, I.; Yang, J.-M.; Burchell, J.; Whitehouse, C.; Taylor-Papadimitriou, J. *Eur. J. Chem.* **1995**, 233, 607-617.
- 29 Keil, S.; Claus, C.; Dippold, W.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366-369.
- 30 Keil, S.; Claus, C.; Dippold, W.; Kunz, H. *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379-382.
- 31 Becker, T.; Dziadek, S.; Wittrock, S.; Kunz, H. *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491-517.
- 32 Dziadek, S.; Kunz, H. *Chem. Rec.* **2004**, 3, 308-321.
- 33 Spencer, D. I. R.; Missailidis, S.; Denton, G.; Murray, A.; Brady, K.; Matteis, C. I. D.; Searle, M. S.; Tandler, S. J. B.; Price, M. R. *Biospectroscopy* **1999**, 5, 79-91.
- 34 Karsten, U.; von Mensdorff-Puilly, S.; Goletz, S. *Tumor Biol.* **2005**, 26, 217-220.
- 35 Chan, A. K.; Lockhart, D. C.; von Bernstorff, W.; Spanjaard, R. A.; Joo, H.-G.; Eberlein, T. J. *Int. J. Cancer* **1999**, 82, 721-726.
- 36 Kim, Y. J.; Varki, A. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569-576.
- 37 Danishefsky, S. J.; Allen, L. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836-863.
- 38 Danishefsky, S. J.; Allen, L. R. *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882-912.
- 39 Dziadek, S.; Espínola, C. G.; Kunz, H. *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 519-543.
- 40 Sing, S. J.; Nicolson G. L. *Science* **1972**, 175, 720-731.
- 41 Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, 387, 569-572.
- 42 Binder, W. H.; Barragan, V.; Menger, F. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5802-5827.
- 43 Hartlova, A.; Cerveny, L.; Hubalek, M.; Krocova, Z.; Stulik, J. *Microbiol Immunol* **2010**, 54, 237-245.
- 44 Pietzsch, J. *Horizon Symposia: Living Frontier*, **2004**, 1-4.
- 45 Beisswanger, G. *Chemie in unserer Zeit* **1991**, 25(2), 97-101.
- 46 Pockels, A. *Nature* **1891**, 43, 437.
- 47 www.ksvnima.com, KSV Nima Technology - Langmuir Blodgett Troughs.
- 48 Scheibe, P.; Barz, M.; Hemmelmann, M.; Zentel, R. *Langmuir* **2010**, 26(8), 5661-5669.
- 49 Song, C.-S.; Ye, R.-Q.; Mu, B.-Z. *Colloids Surf. A* **2008**, 330, 49-54.
- 50 Nakahara, H.; Tsuji, M.; Sato, Y.; Krafft, M. P.; Shibata, O. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 337, 201-210.
- 51 Sanchez, J.; Badia, A. *Thin Solid Films* **2003**, 440, 223-239.
- 52 Schumacher, G.; Bakowsky, U.; Gege, C.; Schmidt, R. R.; Rothe, U.; Bendas, G. *Biochemistry* **2006**, 45, 2894-2903.
- 53 Ekelund, K.; Sparr, E.; Engblom, J.; Wennerstrom, H.; Engstrom S. *Langmuir* **1999**, 15, 6946-6949.
- 54 Kuramori, M., N. Uchida, et al. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2000**, 73 (4), 829-835.
- 55 Krafft, M. P.; Goldmann, M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8, 243-250.
- 56 Qaqish, S. E.; Paige, M. F. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, 325, 290-293.
- 57 Nakamura, S.; Nakahara, H.; Krafft, M. P.; Shibata, O. *Langmuir* **2007**, 23, 12634-12644.

- 58 Bakowsky, U.; Schumacher, G.; Gege, C.; Schmidt, R. R.; Rothe, U.; Bendas, G. *Biochemistry* **2002**, 41, 4704.
- 59 Riess, J. G. *J. Drug Target.* **1994**, 2, 455-468.
- 60 Krafft, M. P.; Riess, J. G. *Biochimie* **1998**, 80, 489-514.
- 61 Riess, J. G. *Tetrahedron* **2002**, 58, 4113-4131.
- 62 Dunitz, J. D. *ChemBioChem* **2004**, 5, 614-621.
- 63 Mukerjee, P. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects* **1994**, 84, 1-10.
- 64 Gao, J.; Qiao, S.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2292-2301.
- 65 Bunn, C. W.; Howells, E. R. *Nature* **1954**, 174, 549-551.
- 66 Schwickert, H.; Strobl, G. R.; Kimmig, M. *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, 2800-2808.
- 67 Binks, B. P.; Fletcher, P. D. I.; Kotsev, S. N.; Thompson, R. L. *Langmuir* **1997**, 13, 6669-6682.
- 68 Dorset, D. L. *Macromolecules* **1990**, 23, 894-901.
- 69 Lo Nostro, P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, 56, 245-287.
- 70 Santaella, C.; Vierling, P.; Riess, J. G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 567-568.
- 71 Gains, G. L. Jr. „Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces“, *Wiley-Interscience*, New York, **1966**.
- 72 Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 117-162.
- 73 Fukuda, K.; Shibasaki, Y.; Nakahara, H. *J. Macromol. Sci. Chem. A* **1981**, 15, 999.
- 74 Neumann, R.; Ringsdorf, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 487.
- 75 Fukuda, H.; Diem, T.; Stefely, J.; Kezdy, F. J.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2321.
- 76 Bader, H.; Ringsdorf, H. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1982**, 20, 1623.
- 77 Reichel, F.; Roelofsen, A. M.; Geurts, H. P. M.; van der Gaast, S. J.; Feiters, M. C.; Boons, G.-J. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3357-3366.
- 78 V.G. Bordo and H.G. Rubahn Wiley-VCH **2005** (First edition).
- 79 D. Brewster *Philos. Trans. Roy. Soc. London* **1815**, 105, 125.
- 80 Henon, S.; Meunier, J. *Review of Scientific Instruments* **1990**, 62, 4, 936-939.
- 81 Nanofilm Surface Analysis. BAM2plus - *User Manual* **2004**.
- 82 Binnig, G., Quate, C. F., Atomic force microscope, *Physical Letter* **1986**, 56 (9), 930-934.
- 83 Alexander, S.; Hellemanns, L.; Marti, O.; Schneir, J.; Elings, V.; Hansma, P. K.; Longmire, M.; Gurley, J. *J. Appl. Phys.* **1989**, 65, 164-167.
- 84 Ellings, V. *Digital Instruments Nanoscope Command Reference Manual* Santa Barbara/CA **1995**.
- 85 Benoit, M., Holstein, T., Gaub, H. E. *Eur. Biophys. J.* **1997**, 26, 283-290.
- 86 Rädler, J.; Radmacher, M.; Gaub, H. E. *Langmuir* **1994**, 10, 3111-3115.
- 87 Martins, G. V.; Merino, E. G.; Mano, J. F.; Alves, N. M. *Macromol. Biosci.* **2010**, 10, 1444-1455.
- 88 Sauerbrey, G. *Zeitschrift für Physik* **1959**, 155, 206-222.
- 89 Postinkov, I. I. *Acoustical Physics* **40** **1994**, 586-592.
- 90 Hoffmann-Röder, A.; Schoenhentz, J.; Wagner, S.; Schmitt, E. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 382-384.
- 91 Gourier, C.; Alba, M.; Braslau, A.; Daillant, J.; Goldmann, A.; Knobler, C. M.; Rieutord, F.; Zalczer, G. *Langmuir* **2001**, 17, 6496-6505.
- 92 Ma Z., Li J., Li H., Jiang L. *New J. Chem.* **2000**, 24, 313-316.

- <sup>93</sup> Sasaki D. Y., Carpick R. W., Burns A. R. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2000**, 229, 490-496.
- <sup>94</sup> Gourier C., Knobler C. M., Daillant J., Chatenay D. *Langmuir* **2002**, 18, 9434-9440.
- <sup>95</sup> Geiger, E.; Hug, P.; Keller, B. A. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203, 2422-2431.
- <sup>96</sup> Riess, J. G. *Handbook of Fluorous Chemistry*; Gladysz, J. A., Horvath, I., Curran, D. P., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weiheim **2004**, 521-573.
- <sup>97</sup> Krafft, M. P. *Handbook of Fluorous Chemistry*; Gladysz, J. A., Horvath, I., Curran, D. P., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weiheim **2004**, 478-490.
- <sup>98</sup> Broniatowski, M., Vila-Romeu N.; Nieto-Suarez M., Dynarowicz-Laütka P. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 12787-12794.
- <sup>99</sup> Krafft M.P.; Riess J.G. *Chemical Reviews*, **2009**, 109, 1714-1792.
- <sup>100</sup> Lo Nostro, P.; Chen, S.-H. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6535.
- <sup>101</sup> Randall Lee, T; Schwartz, D.K.; *Soft Matter*, **2009**, 5, 750-758.
- <sup>102</sup> Adamson, A. W.; Gast, A. P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed.; John Wiley & Sons: New York, **1997**.
- <sup>103</sup> Haro, M.; Giner, B.; Lafuente, C.; Lopez, M. C.; Royo, F. M.; Cea, P. *Langmuir* **2005**, 21, 2796.
- <sup>104</sup> Villares, A.; Martin, S.; Giner, I.; Diaz, J.; Lydon, D. P.; Low, P.; Cea, P. *Soft Matter* **2008**, 4, 1508.
- <sup>105</sup> Müller, H.; Zentel, R.; Janshoff, A.; Janke, M. *Langmuir*, **2006**, 22, 11034-11040.
- <sup>106</sup> Wang, S.; Lunn, R.; Krafft, M. P.; Leblanc, R. M. *Langmuir* **2000**, 16, 2882-2886.
- <sup>107</sup> Wang, Q.; Zhang, T. *Solid State Communications* **2010**, 150, 1009-1022. Lorthois, S.; Cassot, F. *Journal of Theoretical Biology* **2010**, 262, 614-633.
- <sup>108</sup> Volinsky, R.; Gaboriaud, F.; Berman, A.; Jelinek, R. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 9231-9236.
- <sup>109</sup> Morigaki, K.; Baumgart, T.; Jonas, U.; Offenhaeusser, A.; Knoll, W. *Langmuir* **2002**, 18, 4082-4089.