

Biomimese biologischer Membranen: Konzeptionierung, Synthese und biophysikalische Charakterisierung einer Hierarchie festkörpergestützter Mimikry biologischer Membranen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

(Doctor rerum naturalium)



am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von

Stefan Schiller

geboren in Wiesbaden

Mainz

„Wenn die Wissenschaft den Menschen dazu bringt, nur Stückwerk zu schauen,
dann eignet sie sich nicht“

Plato

Groß sind die Werke des HERRN;
wer sie erforscht,
der hat Freude daran.

(Psalm 111:2)

“In bunten Bildern wenig Klarheit,
viel Irrtum und ein Fünkchen Wahrheit”

Goethe, Faust 1. Teil
Prolog im Theater, Lustige Person

„Das Außerordentliche
geschieht nicht
auf glattem,
gewöhnlichem Wege.“

Goethe

O, der Einfall war kindisch aber göttlich schön

Friedrich Schiller, Don Karlos

„Wunder stehen nicht im Widerspruch zur Natur,
sondern im Widerspruch zu unserem Wissen von der Nature.“

Augustinus von Hippo (Aurelius Augustinus)

„Wer nicht an Wunder glaubt, ist kein Realist.“

David Ben Gurion

Mens agitat molem (Der Geist bewegt die Materie.)

Vergil, Aeneis 6, 727

Alle Dinge, egal wie groß oder klein,
haben ihre Zeit,
erfüllen ihre Aufgabe,
und gehen vorüber

Adalbert Stifter

Denn es ist nichts verdeckt, was nicht aufgedeckt,
und nichts verborgen, was nicht erkannt werden wird.

Matthäus 10, 26

„Vergiss nicht - man benötigt nur wenig um ein glückliches Leben zu führen.“

Mark Aurel

Pensiamo in secoli (wir denken in Jahrhunderten)

Sichtweise aus dem Vatikan

*Dreifach ist des Raumes Maß,
Rastlos fort ohn Unterlaß
Strebt die L ä n g e , fort ins Weite
Endlos gießet sich die B r e i t e ,
Grundlos senkt die T i e f e sich.*

*Dir ein Bild sind sie gegeben,
Rastlos vorwärts mußt du streben,
Nie ermüdet stillesteh'n,
Willst du die Vollendung sehn,
Mußt ins Weite dich entfalten,
Soll sich dir die Welt gestalten,
In die Tiefe mußt du steigen,
Soll sich dir das Wesen zeigen,*

*Nur Beharrung führt zum Ziel,
Nur die Fülle führt zur Klarheit,
Und im Abgrund wohnt die Wahrheit*

*Friedrich Schiller über Erkenntnis:
Aus dem Gedicht "Spruch des Konfuzius"*

„All dies wurde schon vormals gesagt - aber da niemand zuhörte, muß es erneut gesagt werden.“

André Gide

*Für Heike, Julius, Lukas, meine Eltern
und meinen Bruder Thomas*

Liste der Publikationen

Die vorliegende Dissertation basiert auf den unten aufgeführten Publikationen. Sie sind in den Kapiteln 5 - 7 mit römischen Zahlen indiziert.

- I) **Schiller, S. M.**, Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H. and Knoll, W. „*Archaea-analoge Thiolipide für gestützte Lipiddoppelschichtmembranen auf ultraglaten Goldoberflächen*“ *Angew. Chem.* **2003**, 115, 219-222 („*Novel Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultra Flat Gold Surfaces*“ *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 208-211)
- II) Naumann, R., **Schiller, S. M.**, Gieß, F., Grohe, B., Hartman, K. B., Kärcher, I., Köper, I., Lübber, J., Vasilev, K., Knoll, W. „*Tethered Lipid Bilayers on Ultra Flat Gold Surfaces*“ *Langmuir* **2003**, 19, 5435-5443
- III) **Schiller, S.**, Naumann, R., Knoll, W. „*Biomimetische Systeme aus Lipidmembranen, gebunden an ein Substrat*“ / „*biomimetic systems consisting of lipid membranes bound to a substrate*“ „*Eur. Pat. Appl.* (**2003**) 19 pp. EP 1364948; DE 102 22 588.5; EP 03 011 554.7(1 364 948 A2); US-2004-0023304-A1
- IV) Naumann, R., Walz, D., **Schiller, S. M.**, Knoll, W. „*Kinetics of valinomycin-mediated K⁺ Ion transport through tethered bilayer lipid membranes*“ *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 550-551, 241-252
- V) Vitovič, P., Kresák, S., **Schiller, S.M.**, Naumann, R., Lewis, R.N.A.H. McElhaney, R.N., Hianik, T. „*The study of the interaction of a model α -helical peptide with lipid bilayers and monolayers*“ *Bioelectrochemistry*, **2004**, 63, 169
- VI) Moncelli, M. R., Becucci, L., **Schiller, S. M.** „*Tethered bilayer lipid membranes self-assembled on mercury electrodes*“ *Bioelectrochemistry*, **2004**, 63, 161-167
- VII) He, L. H., Robertson, J. W. F., Li, J., Karcher, I., **Schiller, S. M.**, Knoll, W., Naumann, R. „*Tethered bilayer lipid membranes based on monolayers of thiolipids mixed with a complementary dilution molecule. 1. Incorporation of channel peptides*“ *Langmuir* **2005**, 21, 11666-11172
- VIII) Kunze, J., Leitch, J., Schwan, A. L., Faragher, R. J., Naumann, R., **Schiller, S.**, Knoll, W., Dutcher, J. R., Lipkowski, J. „*New Method to Measure Packing Densities of Self-Assembled Thiolipid Monolayers*“ *Langmuir*, **2006**, 22, 5509-5519
- IX) Götz, H., Harth, E., **Schiller, S. M.**, Frank, C. W., Knoll, W., Hawker, C. J. „*Synthesis of Lipo-Glycopolymer Amphiphiles by Nitroxide Mediated Living Free-Radical Polymerization*“ *J. Pol. Sci. Pol. Chem.* **2002**, 40, 3379-3391
- X) **Schiller S. M.**, Reisinger-Friebis A., Naumann R. and Knoll, W. „*Novel Biomimetic Lipo-Glycopolymer Membranes: Photochemical Attachment of Highly Insulating Supramolecular tBLM-Architectures*” submitted
- XI) **Schiller, S.**, Hu, J., Jenkins, A.T.A., Timmons, R.B., Sanchez-Estrada, F. S., Knoll, W., Foerch, R. „*Chemical Structure and Properties of Plasma-Polymerized Maleic Anhydride Films*“ *Chem. Mater.* **2002**, 14, 235-242 (*)
- XII) **Schiller, S.**, Kambhampati, D., Knoll, W. „*Method for manufacturing a biosensor via electrophilic polymer layer's*“ *Eur. Pat. Appl.* (**2004**), 14 pp. EP 1435262

- XIII) **Schiller, S. M.**, Kambhampati, D., Stengel, G. Nielsen, P. E., Förch, R., Knoll, W. *“Plastic Trash” as Biosensor: Rapid Fabrication of Highly Reliable Biosensors utilizing Pulsed Plasma Polymerization of Electrophilic Polymer Films*, submitted
- XIV) Jenkins, A.T.A., Hu, J., Wang, Y. Z., **Schiller, S.**, Foerch, R., Knoll, W. *„Pulsed Plasma Deposited Maleic Anhydride Thin Films as Supports for Lipid Bilayers”* Langmuir **2000**, 16, 6381-6384
- XV) Bender, K., Fraser, S. Förch, R., Jenkins, A.T.A., Köper, I., Naumann, R., **Schiller, S.M.** Knoll, W. *„Plasma Polymer supported Lipid bilayers“* in *„Plasma Polymers & Related Materials”*, Edited by: M. Mutlu, G. Dinescu, R. Förch, J. M. Martin-Martinez and J. Vyskocil, Hacettepe, University Press **2005**, pp 32-42, (ISBN: 975-491-194-0)

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Modelle zur funktionellen Mimikrie biologischer Membranen im Bereich der Bionanotechnologie entwickelt. Um den Rahmen der notwendigen Faktoren und Komponenten für biomimetische Membranmodelle abzustecken, wurde das biologische Vorbild im Bezug auf Zusammensetzung, Organisation und Funktion analysiert. Die daraus abgeleiteten Erkenntnisse erlauben das Erreichen von biologisch relevanten Membranwiderständen im Bereich von mehreren $M\Omega \text{ cm}^2$ und eine gute lokale Fluidität. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Hierarchie unterschiedlich stark von der Festkörperoberfläche entkoppelter Membranen zur Vergrößerung des submembranen Raumes. Diese Ziele konnten realisiert werden. Das auf archaealen Etherlipiden basierende DPTL-System wurde analog dem biologischen Vorbild stereoselektiv synthetisiert und ist in der Lage die Membran bei maximaler Elongation des TEG-Spacers mit mehr als 2 nm von der Oberfläche zu entkoppeln. Die erzielten Widerstände liegen im hohen ein- bis zweistelligen $M\Omega$ -Bereich, die Kapazität entspricht mit $0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$ ebenfalls dem Wert biologischer Membranen. Die Membraneigenschaften wurden mit Hilfe von SPS, EIS, IR-Spektroskopie, QCM, AFM und Kontaktwinkelmessungen charakterisiert. Die Funktionalität und lokale Fluidität der DPTL-Membran konnte anhand des Valinomycin vermittelten K^+ -Transports über die Membran gezeigt werden. Fluide Elektroden oder laterale Verdünnung mit TEGL erlauben den Einbau größerer Ionenkanäle. Lipo-Glycopolymere (LGP) mit unterschiedlichen Kettenlängen wurden mit Hilfe der kontrollierten radikalischen Polymerisation mit einer $PD < 1.2$ synthetisiert. Es zeigte sich, daß die Vororientierung der LGPs auf dem LB-Trog, gefolgt von einem LB-Übertrag auf einen funktionalisierten Träger mit photoreaktivem SAM, nach Belichten des Systems zu einer verlässlichen kovalenten Anbindung der supramolekularen LGP-Architektur führt. Da die Lipo-Glycopolymereketten am Glycopolymertminus nur mit oberflächennahen Repetiereinheiten an die photoaktivierte Oberfläche binden, sind sie in der Lage Oberflächenrauigkeiten des Festkörpersubstrates auszugleichen. Die photochemische Immobilisierung von funktionell orientierten supramolekularen LGP-Architekturen auf Goldoberflächen resultiert in tBLMs mit großen vertikalen Enkopplungen der Membran von der Festkörperoberfläche ($>8 \text{ nm}$). Der funktionelle Ionentransport von Kaliumionen durch Valinomycin zeigt eine ausreichende lokale Fluidität der Membran die mit einem guten Membranwiderstand (mehrere $M\Omega$) kombiniert ist. Große Membran-Oberflächenentkopplungen konnten mit Hilfe plasmopolymerisierter elektrophiler Polymere erreicht werden. Filmdicken von 50 nm sind mit homogener Oberfläche und Rauigkeiten im Bereich von Nanometern möglich. Das System zeigt interessante fluide Eigenschaften mit guten Erholungsraten bei FRAP-Experimenten (Diffusionskonstanten von etwa $17 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$). Die elektrischen Eigenschaften liegen mit Widerständen von wenigen $\text{k}\Omega$ unterhalb der für gute Membranmimikrie notwendigen Werte. Erstmals konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe dieser Methode inerte Polymere/Plastikträger (zum Beispiel Polypropylen und TOPAS) in effizienter Weise kovalent mit reaktiven Polymeroberflächen modifiziert werden können (Anwendung als DNA-Chip ist beschrieben).

Abstract

This thesis comprises the development of three new models aiming to mimic the biological cytoplasmic membrane in the field of bionanotechnology. In order to define the parameters necessary to design the appropriate building blocks and preparation methods for biomimetic membranes an extended analysis of the literature was conducted. The resulting membranes resulted in bioequivalent membranes with a membrane impedance of several $M\Omega\text{ cm}^2$ capacities below $1\ \mu\text{F cm}^{-2}$ and good local fluidity. Further hierarchical models (in terms of the surface decoupling distance) were developed. First an archaea based isoprenoidic lipid (DPTL) was synthesized and allowed membrane-solid substrate surface decoupling of 2 nm. The resulting impedances were above $10\ M\Omega\text{ cm}^2$ while the capacity was $0,5\ \mu\text{F cm}^{-2}$ equivalent to biological membranes. Functional studies with valinomycin as ion carrier showed excellent membrane properties and local fluidity. The system was characterized using SPS, EIS, IR-Spectroscopy, QCM-D, AFM and contact angle measurements. The lateral dilution with TEGL spacer molecules or the use of fluid metal electrodes allowed the incorporation of larger membrane proteins. Lipo-Glycopolymers (LGP) with different chain length were synthesized using controlled radical polymerization with $PD < 1.2$. Orienting LGPs at the air-water interface using an LB-trough, followed by LB-transfer onto a photoreactive SAMs allowed efficient covalent immobilization of the supramolecular architecture. This method allowed to level out uneven surface morphologies yielding large and stable membrane-surface decoupling ($>8\text{ nm}$). The functional potassium ion transport facilitated by valinomycin showed sufficient local fluidity and good membrane impedance of several $M\Omega\text{ cm}^2$. Large membrane-surface decoupling was achieved via plasmopolymerized electrophilic polymers. Homogeneous film thicknesses of more than 50 nm could be realized. The resulting tBLM systems showed good fluidity analyzed by FRAP experiments (diffusion constant $17\ \mu\text{m}^2\text{ s}^{-1}$). The electrical properties were limited to several $\text{k}\Omega\text{ cm}^2$ below the values of insulating biological membranes. For the first time it was shown that pulsed plasma polymerization can be used to functionalize otherwise inert polymer/plastic samples with reactive (electrophilic) functional polymeric add layers (on polypropylene and TOPAS as substrate). Applications of these modified substrates as DNA-Chip/sensor are described.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 ZIELE & STRATEGIE DER ARBEIT	9
3 BIOLOGISCHE & BIOMIMETISCHE MEMBRANEN – GRUNDLAGEN	15
3.1 STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE VORAUSSETZUNGEN BIOLOGISCHER MEMBRANEN	17
3.1.1 EXTRAZELLULÄRE MATRIX/ZELLHÜLLEN – GLYCOLALIX	19
3.1.2 CYTOPLASMAMEMBRAN	22
3.1.3 CYTOSKELETT	92
3.2 BIOMIMETISCHE MEMBRANEN - AUFGABEN, EIGENSCHAFTEN UND AUFBAU	97
ÜBERSICHT ÜBER DIE BEHANDELTEN THEMEN:	98
3.2.1 MEMBRANFUNKTIONEN	100
3.2.2 EINTEILUNG DER MODELLSYSTEME BIOLOGISCHER MEMBRANEN	104
3.2.3 WICHTIGE PARAMETER BIOMIMETISCHER MEMBRANEN	119
3.3 SCHLUßFOLGERUNGEN & DEFINITION NEUER MEMBRANKOMPONENTEN	140
3.3.1 MEMBRANKONZEPT	140
3.3.2 EXTRAZELLULÄRE MATRIX/GLYCOLALIX ALS STABILISIERENDE SCHICHTEN ODER SPACER FÜR TBLMS	142
3.3.3 CYTOPLASMAMEMBRAN – LIPIDMOTIVE FÜR TBLMS	144
3.3.4 CYTOSKELETT/CYTOSOL – SPACERARCHITEKTUREN FÜR TBLMS	159
4 METHODEN DER GRENZFLÄCHENANALYTIK	165
GRENZFLÄCHENANALYTIK	165
4.1 KONTAKTWINKELGONIOMETRIE	166
4.2 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	168
4.3 PROFILOMETER (“ALPHA-STEPPER”)	172
4.4 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	173
4.5 MASENBESTIMMUNGEN MIT DER QUARTZKRISTALLMIKROWAAGE (QCM)	174
4.6 SPONTANE-DESORPTION-FLUGZEIT-MASSENSPEKTROMETRIE	179
4.7 RÖNTGEN-PHOTOELEKTRONEN-SPEKTROSKOPIE	183
4.8 ELEKTROCHEMISCHE IMPEDANZSPEKTROSKOPIE & CYCLOVOLTAMETRIE	186
4.9 OBERFLÄCHEN-PLASMONEN-(RESONANZ)-SPEKTROSKOPIE	205
4.10 FT-INTRAROTSPEKTROSKOPIE UNTER STREIFENDEM EINFALL	223
4.11 BREWSTERWINKELMIKROSKOPIE	230
4.12 FLUORESZENZMIKROSKOPIE UND FLUORESZENZERHOLUNG NACH PHOTBLEICHUNG	232
4.13 ELEKTROPHORETISCHE METHODEN	239
4.14 FILMWAAGE, DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERMEN & MONOMOLEKULARE SCHICHTEN	245

4.15 NEUTRONENREFLEKTOMETRIE	250
4.16 DIFFERENTIAL SCANNING KALORIMETRIE (DSC)	287
<u>PRÄSENTIERTE UNTERSUCHUNGEN</u>	291
<u>5 ARCHAEA-ANALOGUE THIOLIPIDE MIT TETRAETHYLENGLYKOL-SPACER (DPTL)</u>	293
5.1 ERWARTETE VORTEILE DES DPTL-MOTIVS AUF GRUNDLAGE DER DATEN IN KAPITEL 3:	295
5.2 SYNTHESESTRATEGIE DES 2,3-DI-O-PHYTANYL-SN-GLYCERIN-1-TETRAETHYLENGLYKOL-D,L- α -LIPONSÄUREESTERS (DPTL) UND DES TETRAETHYLENGLYKOL-D,L- α -LIPONSÄUREESTERS (TEGL)	297
5.3 BIOMIMETISCHE MEMBRANEN BASIEREND AUF DPTL	303
<u>6 LIPO-GLYCOPOLYMER GESTÜTZTE TBLM</u>	329
6.1 DESIGN UND ERWARTETE VORTEILE DES LIPO-GLYCOPOLYMER-MOTIVS BASIEREND AUF DER LITERATURANALYSE IN KAPITEL 3 UND 6	331
6.2 SYNTHESE DER LIPO-GLYCOPOLYMERE (LGP) UND ANKERSYSTEME	333
6.3 BIOMIMETISCHE MEMBRANEN BASIEREND AUF LIPOGLYCOPOLYMEREN (LGP)	341
<u>7 PLASMAPOLYMERE ALS SPACER FÜR TBLMS</u>	353
7.1 PLASMACHEMISCHE STOFFUMWANDLUNGEN – DEFINIERTE ARCHITEKTUREN	353
7.2 BIOMIMETISCHE MEMBRANEN (TBLMS) AUF DER BASIS VON PLASMAPOLYMERISIERTEM MALEINSÄUREANHYDRID	355
<u>8 DISKUSSION & ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN</u>	367

Abkürzungen

$[\alpha]_D$	optischer Drehwert
γ	Grenzflächenspannung
δ	chemische Verschiebung
Δ	erhitzen (thermische Energiezufuhr)
$\varepsilon (\varepsilon', \varepsilon'')$	Dielektrizitätskonstante (Realteil, Imaginärteil)
ε_0	Dielektrizitätskonstante im Vakuum/elektrische Feldkonstante $8,854187817 \cdot 10^{-12} [\text{C}^2 \text{J}^{-1} \text{m}^{-1}]$
λ	Wellenlänge
μ	chemisches Potential
ν	Frequenz
π	Lateraldruck
ρ	Dichte oder Nichtidealitätsfaktor
θ	Phasenwinkel oder Bedeckungsgrad
ω	Kreisfrequenz
Ω	Widerstand [Ohm]
\AA	Angström oder Ampere
a	axial
A	Fläche (<i>engl. Area</i>)
ABP	Actinbindendes Protein (<i>engl. Actin-Binding Protein</i>)
absol.	Absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIBN	Azoisobuttersäurenitril
AFM	Atomare Kraftmikroskopie (<i>engl. Atomic Force Microscopy</i>)
Äquiv.	Äquivalente
Ar	Aryl
arom.	aromatisch
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	verstärkte Totalreflektion (<i>engl. Attenuated Total Reflection</i>)

Au(111)	Gold in kristalliner Anordnung (Kristallfläche 111)
Ausb.	Ausbeute
b	Streulänge
BAM	Bresterwinkelmikroskopie (<i>engl. Brester Angle Microscopy</i>)
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>engl. Blood Brain Barrier</i>)
BLM	Schwarze Membran (<i>engl. Black Lipid Membrane oder Bilayer Lipid Membrane</i>)
c	Konzentration oder Lichtgeschwindigkeit
C	Kapazität (<i>engl. Capacitance</i>)
CD	Zelloberflächenmarker (<i>engl. Cluster of Differentiation</i>)
CHF	Hypertrophie des Herzens Herzversagen (<i>engl. Cardiac Hypertrophy and Failure</i>)
CL	Cardiolipin
CMC	kritische Micellbildungskonzentration (<i>engl. Critical Micelle Concentration</i>)
CoA	Coenzym A
c _q	quartäres-C
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten
CV	Zyklovoltametrie (Zyklovoltamogramm) (<i>engl. Cyclic Voltammetry</i>)
d	Schichtdicke oder Dublett
D	Diffusionskonstante oder Tag
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	doppeltes Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(<i>N,N'</i> -Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPE	Dimyristoylphosphatidylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. Desoxy Ribonucleic Acid</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure

DODA	Diocetylamin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPG	2,3-Di- <i>O</i> -phytanyl- <i>sn</i> -glycerin
DPhyPC	Diphytanyl/oil-Phosphatidylcholin
DPPA	Dipalmitoylphosphatidsäure (<i>engl. DiPalmitoylPhosphatidic Acid</i>)
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylserin
DPTL	2,3-Di- <i>O</i> -phytanyl- <i>sn</i> -glycerin-1-tetraethylenglycol-liponsäureester
DSC	Differenz Scanning Kalorimetrie (<i>engl. Differential Scanning Calorimetry</i>)
e	äquatorial
EC	extrazellulär
E (E _{ox} , E _{red})	elektrochemisches Potential (Oxidationspotential, Redoxpotential)
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EiPC	Lipidmischung, isoliert aus Hühnereiern; PC reich (<i>engl. als eggPC bezeichnet</i>)
EIT	Elektrische Impedanz Tomographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCA	Elektronenspektroskopie für chemische Anwendungen (<i>engl. Electron Spectroscopy for Chemical Application</i>) (ursprünglich: Analysis) – siehe XPS
E-Seite	extraplasmatische Seite
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
F	Faradaykonstante $9,6485309 \cdot 10^4$ [C mol ⁻¹]
Fa.	Firma
FAB	Fast Atom Bombardment
FD-MS	Feld-Desorption Massenspektrometrie
FRAP	Fluoreszenzerholung nach Photobleichung (<i>engl. Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)

FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
FtsY	<i>Escherichia coli</i> -Homologe der eukaryotischen "signal recognition particle receptor α " - Untereinheit
g	Gramm
Gal	Galactose
γ -IFN	Gamma-Interferon
GDGT	Glycerindialkylglycerintetraether
Gef.	Gefunden
gem	geminal
ges.	gesättigt
GeV	Gigaelektronenvolt
GLP	Glyco-Lipopolymer
Gluc	Glucose
gp	Glyco-Protein (<i>engl. glycoprotein</i>)
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (<i>engl. G-Protein Coupled Receptors</i>)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HIV	humanes Immunschwäche Virus (<i>engl. Human Immunodeficiency Virus</i>)
HDL	Lipoproteine mit hoher Dichte (<i>engl. High-Density Lipoprotein</i>)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>engl. High Pressure Liquid Chromatographie</i>)
HTS	Hochdurchsatz Analysenverfahren (<i>engl. High Throughput Screening</i>)
I (I_{ox} , I_{red})	Strom (Oxidationsstrom, Reduktionsstrom)
I_c	nicht-faraday'scher Ladestrom
IR	Infraroter Bereich des elektromagnetischen Spektrums
IS	Impedanz-Spektroskopie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>engl. Isothermal Titration Calorimetry</i>)
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
k	Boltzmannkonstante oder Wellenvektor

Kdo	3-Deoxy-D-manno-2-octulosonsäure
keV	Kiloelektronenvolt
KPG	Kerngezogenes Präzessions-Gerät
LANSCE	Los Alamos Neutron Scattering Center
LB(K)	Langmuir-Blodgett-(Kuhn)
LDL	Lipoprotein geringer dichte (<i>engl. Low-Density Lipoprotein</i>)
LEED	Diffraktion (Beugung) von Elektronen niedriger Energie (<i>engl. Low Energy Electron Diffraction</i>)
Lit.	Literatur
LLA	Lysolecithin-Analoga
LMV	große, multilamellare Vesikel (<i>engl. Large Multilammellar Vesicle</i>)
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Lichtstreuung <i>oder</i> Langmuir-Schäfer
Lsg.	Lösungsmittel
Lsgm.	Plural für Lösungsmittel
LSV	Lineare Voltametrie (<i>engl. Linear Sweep Voltammetry</i>)
LTA	Lysophosphatidsäure (<i>engl. Lysophosphatidic acid</i>)
LUV	große, unilamellare Vesikel (<i>engl. Large Unilammellar Vesicle</i>)
m	Masse oder Multipllett
M	Molekulargewicht oder Molarität
MALDI	Matrixunterstützte Laser Desorption (<i>engl. Matrix-Assisted Laser Desorption</i>)
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein (<i>engl. Microtubule-Associated Protein</i>)
MASA	Maleinsäureanhydrid
MCP-1	chemotaktisches Monocytenprotein-1 (<i>engl. Monocyte Chemotactic Protein-1</i>)
Me	Methyl-
meV	Millielektronenvolt
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Min	Minute
MS	Massenspektrum

n	Stoffmenge
n _D	Brechungsindex
N _A	Avogadro Zahl (früher Loschmidtsche Zahl) $6,0221367 \cdot 10^{23}$ [mol ⁻¹]
NBS	N-Bromsuccinimid
NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
NMR	Magnetische Kernresonanz (<i>engl. Nuclear Magnetic Resonance</i>)
nsf	N-Ethylmaleinimid sensitiver Faktor
OD	Optische Dichte
OEG	Oligoethylenglykol
OP	Oberflächenplasmon
OPS	Oberflächenplasmonenspektroskopie
PA	Phosphatidsäure (<i>engl. Phosphatidic Acid</i>)
PAF	Thrombocyten-aktivierende Faktor (<i>engl. Platelet-Activating Factor</i>)
PAMPA	paralleler Permeabilitäts-Assay an artifiziellen Membranen für die Untersuchung der Wirkstoffaufnahme (<i>engl. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>)
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl. PBS = Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PC-TP	PC-spezifisches Transportprotein
PDGFR	Thrombozyten Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>engl. Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phosphatidylethanolamin oder Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PES	Photoelektronenspektroskopie
PESIS	Photoelektronenspektroskopie der Inneren Schale (<i>engl. Photoelektron Spectroscopy of the Inner Shell</i>)
PG	Phosphatidylglycerin
pH	$-\log[H^+]$; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia Hydrogenii</i>)
Ph	Phenyl

PNA	Peptidnukleinsäure (<i>engl. Peptide Nucleic Acid</i>)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
PP	Plasma Polymerisation
PPP	Polymerisation mit Hilfe eines gepulsten Plasmas (<i>engl. Pulsed Plasma Polymerization</i>)
ppm	chemische Verschiebung in „parts per million“
PPMASA	Pulsed Plasma Polymerized Maleic Anhydride (durch ein gepulstes Plasma polymerisiertes Maleinsäureanhydrid)
PS	Phosphatidyl-L-serin
P-Seite	plasmatische Seite
PSM	Membran aus Alkylthiol-SAM und freien Lipiden (<i>engl. Painted Supported Membrane</i>)
PSP	Oberflächenplasmon (<i>engl. Plasmon Surface Polariton</i>)
PSR	Protonenspeicherring (<i>engl. Proton Storage Ring</i>)
PUFA	polyungesättigte Fettsäuren (<i>engl. PolyUnsaturated Fatty Acids</i>)
q	Quartett
q,Q	Ladung
Q	Streuquerschnitt
QCM	Quartzkristallmikrowaage (<i>engl. Quartz Crystal Microbalance</i>)
quant.	quantitativ
R	Widerstand (<i>engl. Resistance</i>), oder Reflektivität, oder allgemeine Gaskonstante $8,31451 \text{ [J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}]$
Raumtemp.	Raumtemperatur
rho-DPPE	Rhodamin-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
R_f	<i>Ratio of fronts</i>
RHEED	Diffraktion (Beugung) von Elektronen hoher Energie (<i>engl. Reflection High Energy Electron Diffraction</i>)
RP	Reversed Phase
R_t	Retentionszeit
s	Singulett
s_b	breites Singulett
SA	Selbstorganisation (<i>engl. Self Assembly</i>)
SAM	Selbstorganisierte Monoschicht (<i>engl. Self-Assembled Monolayer</i>)

S _b	breites Singulett
sBLM	Festkörpergestützte Membranen (<i>engl. supported Bilayer Lipid Membrane</i>)
Sdp.	Siedepunkt
SECM	Elektrochemische Rasterkraftmikroskopie (<i>engl. Scanning Electrochemical Microscopy</i>)
SFA	Gerät zur Messung der Kräfte zwischen Oberflächen (<i>engl. Surface Force Apparatus</i>)
SG	Schutzgruppe
SM	Sphingomyelin
Smp.	Schmelzpunkt
sn	stereospezifische Numerierung für chirale Glycerinderivate
SNAP	lösliches nsf-bindendes Protein (<i>engl. Soluble nsf Attachment Protein</i>)
SNARE-Protein	SNAP-Rezeptoren (<i>engl. SNAP receptors = "Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Protein receptor"</i>)
SPM	Oberflächenplasmonenmikroskopie (<i>engl. Surface Plasmon Microscopy</i>) oder Sphingomyelin
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>engl. Surface Plasmon Resonance</i>)
SPS	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>engl. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy</i>)
SPSF	Oberflächenplasmonen verstärkte Fluoreszenzspektroskopie (<i>engl. Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Spectroscopy</i>)
src-Family-Protein	(<i>engl. Short Consensus Repeat</i>), auch als Sushi Domäne und control protein (CCP) repeat bekannt
SSUr-RNA	Ur-RNA-Molekül in der kleinen Untereinheit der Ribosomen (<i>engl. Small Subunit of Ribosomes</i>)
STM	Rastertunnelmikroskopie (<i>engl. Scanning Tunneling Microscopy</i>)
SUV	kleine, unilamellare Vesikel (<i>engl. Small Unilamellar Vesicle</i>)
t	Zeit (<i>engl. time</i>) oder Triplet
T	Temperatur
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
tBLM	Spacergestützte Lipiddoppelschichtmembranen (<i>engl. tethered Bilayer Lipid Membrane</i>)

TetraMyrGluc	1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -myristoyl- β -D-glucose
tert.	Tertiär
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFN	Tumornekrosefaktor (<i>engl. Tumour Necrosis Factor</i>)
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLR's	Toll-artige Rezeptoren (<i>engl. Toll Like Receptors</i>)
T _m	Hauptphasenübergangstemperatur (gel * flüssig-kristallin)
TMG	1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -myristoyl- β -D-glucose
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure
TOF	Time of Flight
Tos	4-Toluolsulfonyl-
TRAP	Tetrapropylammoniumper Ruthenat
Trt	Trityl
UV	Ultravioletter Bereich des elektromagnetischen Spektrums
V	Volumen
vic.	Vivinal
VIP	vasoaktive Intestinal-Polypeptide
VIS	sichtbarer Bereich des elektromagnetische Spektrums (<i>engl. visible</i>)
VLDL	Lipoprotein mit sehr geringer Dichte (<i>engl. Very Low-Density Lipoprotein</i>)
X	Molenbruch
XPES	Röntgen-Photoemissionsspektroskopie (<i>engl. X-ray Photoemission Spectroscopy</i>)
XPS	Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (<i>engl. X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
Y	Admittanz
Z	Impedanz
Zers.	Zersetzung
ZNS	zentrales Nervensystem

**„Es ist schon Teil des findens,
wenn Du weißt, daß Du zu
suchen hast“**

Augustinus von Hippo

**„Es ist ein Gott im Himmel,
der kann Geheimnisse
offenbaren.“ *Daniel 2,28***

1 Einleitung

Die mannigfaltigen Erscheinungsformen und Entwicklungen des Lebens zu verstehen, das heißt ein Verständnis für die Natur und ihre Wechselwirkungsvielfalt zu entwickeln, ist seit jeher Ziel menschlichen Strebens. Die Entwicklung der Naturwissenschaften bettete dieses Bestreben in ein methodisch – logisches Gedankengebäude, das es dem menschlichen Geist erlaubt die Vorgänge in der Natur mit dem ihm innewohnenden Potential zu erforschen und sich selbst zu ihnen in Bezug zu setzen. Gerade die letzte Dekade des vorangegangenen Jahrhunderts brachte die drei großen Gebiete der Naturwissenschaft – Physik, Chemie und Biologie – unter Ausbildung neuer interdisziplinärer Forschungsgebiete in eine engere Beziehung mit stark überlappenden Forschungsinteressen wie es am Beispiel der biomimetischen Membranen deutlich wird.

Es ist das enorme Potential für den Fortschritt in nahezu allen naturwissenschaftlichen Disziplinen, das Bioorganiker und Biophysiker dazu inspiriert Biopolymere, ihre monomeren Bausteine und andere Naturstoffe auf molekularer Ebene zu erforschen. Das Interesse an den molekularen Zusammenhängen biologischer Systeme führte schon früh zu einer engen Verbindung der Chemie mit der Biologie und der Identifizierung der ihr zu Grunde liegenden Bausteine für die Erforschung komplexer biologischer Prozesse.

Zu diesen vier Bausteinen des Lebens werden im Allgemeinen die Nukleinsäuren, Peptide/Proteine, Kohlenhydrate und Lipide gezählt. Das Verständnis der Chemie dieser Bausteine stellt demnach eine Grundvoraussetzung für das Verständnis der Natur und ihrer komplexen Erscheinungsformen dar. Neben anderen Naturstoffen ist besonders die Chemie der Kohlenhydrate^[1-3] und Aminosäuren/Peptide^[4, 5] eng mit dem Namen EMIL FISCHERS verbunden.^[6] Sein Interesse an Biomolekülen führte zu fundamentalen Arbeiten im Bereich der Kohlenhydrat- und Peptidchemie. Damit legte er das Fundament der modernen bioorganischen Chemie und wurde 1902 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Erst das Verständnis der molekularen Eigenschaften dieser Verbindungen ermöglichte die Aufklärung vieler biologischer Vorgänge und führte zu der ebenfalls von FISCHER 1894 postulierten Schlüssel-Schloß-Theorie der Enzymwirkung. Neben den niedermolekularen Verbindungen sind makromolekulare Moleküle zum Beispiel DNA, Proteine und Polysaccharide wichtige biologische Funktionsträger.

Einer weiteren großen Persönlichkeit der organischen Chemie – HERMANN STAUDINGER, ist es zu verdanken, durch die Entwicklung der Theorie der Makromoleküle und deren

eindrucksvollen experimentellen Bestätigung, ein wegweisendes Konzept zum Verständnis dieser in der Natur und Technik sehr wichtigen Verbindungen etabliert zu haben. Die enorme Bedeutung der Makromolekularen und Supramolekularen Chemie als Bindeglieder zwischen organischer Chemie, Material- und Biowissenschaften wird am Ende des Nobelpreisvortrags von H. STAUDINGER 1953 deutlich, den er mit den folgenden Worten schloß: „*Im Licht dieser neuen Erkenntnisse der Makromolekularen Chemie zeigt sich das Wunder des Lebens von seiner chemischen Seite her in unerhörter Mannigfaltigkeit und meisterhaften molekularen Architektonik der lebenden Materie.*“ [7]

Neben dem Verständnis der molekularen Struktur und der Eigenschaften biologischer Systeme liefert ein Verständnis biopolymerer Grundlagen aus physikalischer Sicht nicht nur eine bessere Einsicht in biologische Prozesse, sondern erlaubt auch den Materialwissenschaften biologische Makromoleküle zu neuen Materialien und Systemen zu kombinieren. Um biologische Komponenten funktionsfähig integrieren zu können sind biomimetische Umgebungen notwendig, die durch genau die Selbstorganisationsprozesse geschaffen werden können, die von der Natur benutzt werden.

Ein Beispiel für ein biologisches System, das durch Selbstorganisationsprozesse niedermolekularer Verbindungen und der funktionellen Einbettung makromolekularer Verbindungen entsteht, ist die biologische Membran. Der Aufbau eines biomimetischen Membransystems, das bezüglich seiner funktionellen Eigenschaften der biologischen Membran entspricht, bedarf der Kombination verschiedener Disziplinen. Erst sie ermöglichen die Bereitstellung der notwendigen funktionellen Verbindungen (Organische Chemie und Makromolekulare Chemie), den optimalen architektonischen Aufbau (Supramolekulare Chemie, Grenzflächenchemie und Materialwissenschaften) und die Verifikation des Aufbaus und der Eigenschaften der biomimetischen Membranen (Biophysik), siehe Abbildung 1.

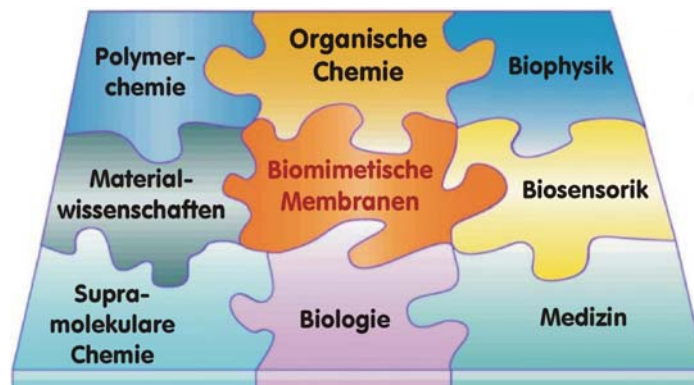


Abbildung 1 Das interdisziplinäre Gebiet der biomimetischen Membranen, bzw. der biologischen Modellmembranen ist mit einer Vielzahl unterschiedlicher Disziplinen eng verbunden.

Die elementare Bedeutung von Membranen wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß alle Zellen von einer Membran umgeben sind. An diese sind wichtige Zellfunktionen wie Erkennung, Signalaufnahme und Signalleitung, Abgrenzung und Barriere, Energiespeicherung und Energiekonversion, Transportfunktionen, Motilität und Biosynthese gebunden. Alle Membranen der Zelle setzen sich aus Lipiden, Glycolipiden, Proteinen und Glycoproteinen zusammen. Bei ersteren handelt es sich vorwiegend um Phospholipide wie Lecithine und Kephaline sowie Sphingomyeline. Im wässrigen Medium bilden diese Verbindungen spontan supramolekulare Strukturen in Form von Lipiddoppelschichten aus, vergleichbar der smektischen Phase flüssiger Kristalle.^[8] Als Membranlipide können zusätzlich Cholesterin, Lipopolysaccharide, Glycolipide und andere Verbindungen auftreten.^[9]

Viele Komponenten der Membran sind dabei in einem dynamisch-fluiden Zustand, in dem sich einzelne Bereiche schneller verändern als andere, was zu einer mosaikartigen Struktur führt.^[10, 11] Diese Eigenschaft ist neben einer starken Asymmetrie der beiden Lipidschichten eine wesentliche Voraussetzung für die Funktion der Membran. Die Struktur und der Aufbau der biologischen Membran sind in Abbildung 2 schematisch gezeigt.

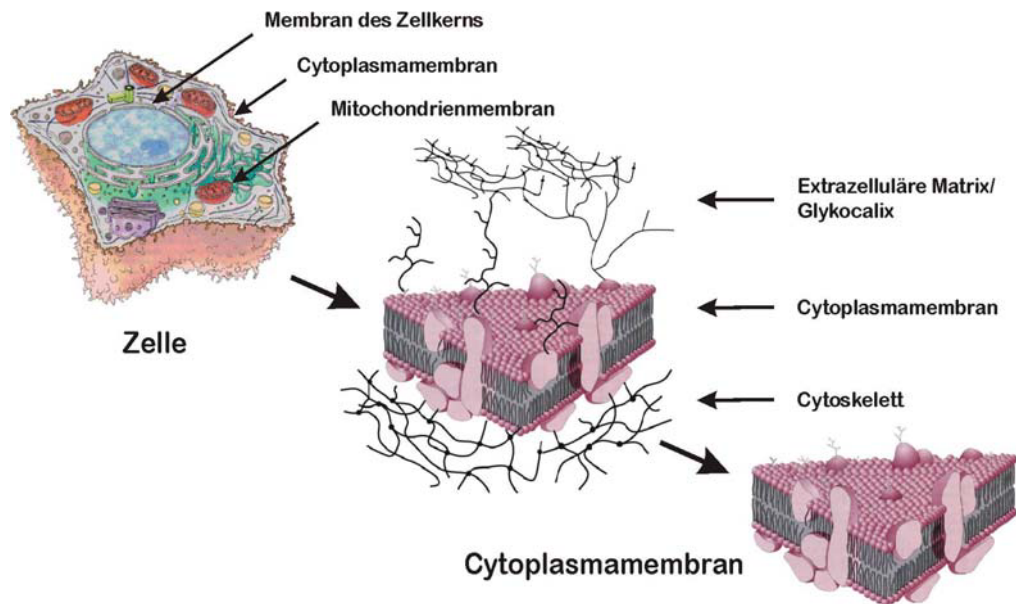


Abbildung 2 Aufbau der Zelle (adaptiert von^[12]) mit ihren membranumgebenen Organellen. Die Cytoplasmamembran ist auf der plasmatischen Seite teilweise über Membranproteine an das Cytoskelett gebunden und extrazellulär mit einer proximalen Schicht an lipid- oder peptidgebundenen Kohlenhydraten funktionalisiert. Die funktionelle Einheit der biologischen Membran ist die Lipiddoppelschicht, unten rechts zusammen mit Glycolipiden/peptiden und Membranproteinen dargestellt.

Die enorme Vielfalt der essentiellen Membranfunktionen macht die Bedeutung von Membranmodellen und deren potentiellen Anwendungen deutlich. Sie sollen anhand der folgenden Beispiele illustriert werden.

Die Beantwortung biologisch-medizinischer Fragestellungen ist in Zeiten des rasanten Fortschritts der Erforschung der biologischen Signal- und Informationsweiterleitung nicht nur im Bereich der Entschlüsselung des Erbguts komplexer Lebewesen (Genomic) an limitierende Faktoren gestoßen. Die Lücke zwischen unserem Verständnis des Genoms und den physiologischen Vorgängen in der Zelle wird besonders durch dynamische Rückkopplungsmechanismen kompliziert. Dadurch wird die Konzeption neuer Methoden für die Untersuchung dieser Funktionszusammenhänge notwendig. Die durch das Genom und dynamische posttranslationale Prozesse kontrollierten Synthesen, beispielsweise von Glycopeptiden/Lipiden, erfordern die Entwicklung spezieller Arbeitsfelder wie der Proteomic,^[13, 14] Glycomics^[15, 16] und Lipidomics^[17, 18]. Diese haben die Erfassung der vielfältigen Wechselwirkungen der verschiedenen Naturstoffklassen in der Zelle zum Ziel. Da viele dieser Wechselwirkungen membranvermittelt ablaufen, stellen Modellmembransysteme wertvolle Hilfsmittel bei der Untersuchung solcher Wechselwirkungen dar. Ein Beispiel membranvermittelter Erkennungsprozesse ist die Zell-Zell-Wechselwirkung. Zu deren Studium sind nicht nur die elektrischen Eigenschaften der biologischen Modellmembransysteme von Bedeutung, sondern ihre Fluidität und chemische Beschaffenheit. Dies spiegelt sich in Zell-Zell-Wechselwirkungen und (neuro)degenerativen Zellveränderungen durch veränderte Glycolipidstrukturen,^[19] oder Glycopeptidstrukturen (z.B. bei Mucinen)^[20-24] auf der Zelloberfläche wieder.

In der Erforschung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und Membranproteinen ist man im wachsenden Maß auf leistungsfähige Modellsysteme angewiesen. Deren Analyse ist in nativer Umgebung oft nur unter schwierigen Bedingungen möglich, z.B. mit Methoden wie der Patch-Clamp Technik für Messungen an Ionenkanälen,^[25-27] die sich für einen Einsatz im größeren Umfang (HTS (high throughput screening)^[28-30] und Biosensoren^[31-37]) oft nicht eignen.

Die große Bedeutung der membrangekoppelten Signalaufnahme und Signalweiterleitung für die Medizin motiviert die Biomembranmimese zur Etablierung leistungsfähiger Modelle. Eine wesentliche Rolle spielen hier aus pharmakologischer Sicht membrangebundene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR).^[38-40] Deren Bedeutung für pathologische Prozesse wird deutlich, wenn man bedenkt, daß über 50 % der auf dem Markt befindlichen Pharmaka diese Rezeptoren als Angriffspunkt besitzen.^[41] Um solche Membranproteine, aber auch Transportpeptide wie das in der Krebstherapie verwendete Valinomycin^[42, 43] gezielt, das heißt ohne Einfluß von interagierenden sekundären Effektoren untersuchen zu können, ist es

notwendig funktionelle Biomoleküle in der chemisch und physikalisch definierten Umgebung der biomimetischen Membran zu untersuchen.

Die Suche nach biomimetischen Systemen die sich für die Erforschung solcher Wechselwirkungen eignen und den Einsatz in der Analytik erlauben, stellt hohe Anforderungen an das verwendete Modellsystem. Eine Grundanforderung ist die größtmögliche Übereinstimmung von natürlichem Vorbild und biomimetischen Modell, das in der Lage sein muß, das natürliche Vorbild in seinen für die entsprechende Fragestellung wesentlichen Eigenschaften nachzuahmen.

Zwei besonders wichtige Eigenschaften biologischer Modellmembranen sind die elektrische Dichtigkeit der Lipiddoppelschicht und deren Fluidität. Die Dichtigkeit, bzw. Diffusionsbarriere für ungeladene Moleküle ist von gleichrangiger Bedeutung. Architekturen und Zusammensetzungen bekannter Membranmodelle decken ein weites Spektrum an Ansätzen ab und sollen diesen Anforderungen Rechnung tragen. Daher wird in Kapitel 3 auf die Grundlagen dieser Systeme näher eingegangen. Durch die reduktionistische Verifikation von Membranfunktionen verschiedener Organismen im Hinblick auf ihre elementaren chemischen Funktionsträger werden Membranfunktionen im chemischen Kontext funktionell definiert. Daraus ergeben sich molekulare Grundlagen für die funktionelle und geometrische Adaption der Membran an die biomimetischen Rahmenbedingungen.

Ein für die oben angeführten Anwendungen interessantes Modellmembransystem, ist die über einen hydrophilen Spacer kovalent an eine makroskopische Oberfläche gebundene Membran, wie sie in Abbildung 3 gezeigt ist.^[44, 45] Diese Membranarchitektur, auch als tBLM (engl. tethered Bilayer Lipid Membrane) bezeichnet,^[46] vereinigt zwei wesentliche Vorteile gegenüber anderen Membranmodellen in sich. Zum einen ist die in Abbildung 3 gezeigte Analogie von Cytoskelett (linke Seite) und Spacer (rechte Seite) zu nennen, zum anderen der dadurch mögliche stabile Membranaufbau an einer festen Oberfläche, der die Robustheit der Membran mit einer räumlichen Lokalisierung der Wechselwirkungsprozesse verbindet. Die Anbindung an ein elektrisch leitendes, planares Substrat, ermöglicht die Untersuchung von membranassoziierten und transmembranen Biomolekülen (z.B. die H⁺-ATPsynthase,^[47] die Cytochromoxidase^[48] oder Ionencarrier^[49]) die in elektrische Prozesse involviert sind, beziehungsweise von ihnen kontrolliert werden. Ein Vorteil dieser Testformate ist ihre elegante elektronische Datenerfassung die für die Biosensorik und das Drug Screening angestrebt wird. Durch die laterale Verdünnung der lipidmodifizierten hydrophilen Spacer mit kürzeren hydrophilen Spacermolekülen ohne Lipidfunktionalisierung, kann ein dem Cytosol analoger submembraner Raum erzeugt werden. Dieser ist sowohl für die Fluidität der freien Membranlipide, als auch für den funktionellen Einbau von Membranproteinen von Bedeutung. Der Aufbau einer biomimetischen Membran an einer planaren Festkörperoberfläche ermöglicht

und erfordert den Einsatz einer großen Anzahl oberflächenanalytischer Methoden, die in Kapitel 4 vorgestellt werden. Diese erlauben die Untersuchung molekularer Vorgänge an der Grenzfläche auch in komplexen supramolekularen Systemen, wodurch die Erforschung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene ermöglicht wird. Besondere Bedeutung kommt hierbei der simultanen Anwendung verschiedener Meßmethoden zu, die sich komplementär ergänzen oder affirmativen Charakter aufweisen.

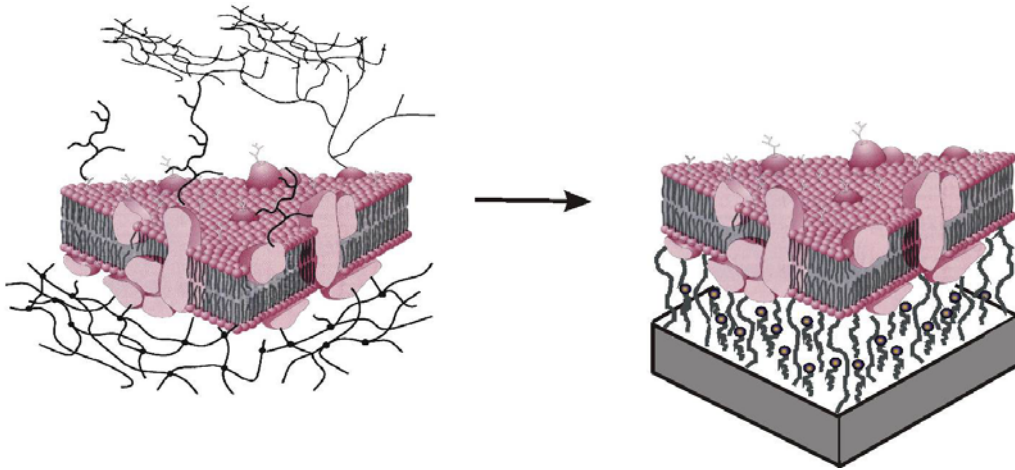


Abbildung 3 Vergleich des Aufbaus einer biologischen Membran (links) mit dem einer biomimetischen Membran (rechts), die über einen hydrophilen Spacer kovalent an ein Substrat gebunden ist. Die kugelförmig terminierten gelben Moleküle rechts symbolisieren die Kopfgruppen der lateralen Spacermoleküle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Entwicklung biomimetischer Membransysteme neue Wege für die Erforschung komplexer biologischer Zusammenhänge eröffnet. Neben der Synthese funktionalisierter Lipidkonjugate erfordert sie die detaillierte Kenntnis über den Aufbau und die Funktion des natürlichen Membranvorbilds. Dadurch sind wir erst in der Lage Methoden und Verbindungen zu entwickeln, die in der Lage sind, das biomimetische Membransystem im artifiziellen Umfeld der Meßanordnung zu konstituieren, ohne auf das reproduktive Potential und das dynamisch/autokatalytische Adaptionsvermögen der Zelle zurückgreifen zu müssen.

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus zwei wesentlichen Teilen zusammen. Im ersten Teil werden der Aufbau und die Funktion der biologischen Membran und die notwendigen Grundlagen biomimetischer Modellmembrankonzepte analysiert. Aus den gewonnenen Informationen wird die Strategie dieser Arbeit zur effektiven Biomimese der Zellmembran hergeleitet und zu anderen Ansätzen in Bezug gesetzt. Zum Abschluß des 3. Kapitels werden neue Ansätze zur Synthese und Präparation von tBLMs definiert. Die zur Charakterisierung der

biomimetischen Systeme und ihrer Zwischenstufen notwendigen Kombinationen oberflächenanalytischer Methoden werden im 4. Kapitel beschrieben.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die experimentellen Ergebnisse der neu entwickelten biomimetischen Membransysteme im Hinblick auf ihren Aufbau und ihre Eigenschaften.

Thematische Übersicht über die nachfolgenden Kapitel:

Kapitel 1 – Überblick über das Thema – Bezug zur historischen Entwicklung; Art der Einbettung in den naturwissenschaftlichen Gesamtzusammenhang der das Thema berührenden Disziplinen; Bedeutung des Themas für die Grundlagenforschung und Anwendung

Kapitel 2 – Beschreibung der Ziele der Arbeit; Definition der zu erzielenden Eigenschaften; zu beachtende Punkte bei der Entwicklung biomimetischer Systeme, Art der angestrebten biomimetischen Membranen

Kapitel 3 – Überblick und Einführung in die komplexen Grundlagen biologischer und biomimetischer Membranen; Identifizierung essentieller Strukturelemente biologischer Membranen auf der Grundlage einer umfassender Literaturanalyse; welche neuen Struktur motive lassen sich an Hand der biologischen Beispiele sinnvoll adaptieren? Einbeziehung der Eigenschaften, des Einflusses und der zu erwartenden biologischen, chemischen und physikalischen Effekte der artifiziellen Umgebung auf biomimetische Membranen; grenzflächenchemische Eigenschaften und Voraussetzungen für den Aufbau biomimetischer Membranen; Stand der derzeitigen Membranmodelle sowie deren Vor- und Nachteile, Definition sinnvoller Biomembranmimikrie und deren Komponenten anhand der aus der Literatur abgeleiteten Eigenschaften und Bedingungen.

Es sind die Grundlagen der Komplexität der biologischen Membran, die in diesem Kapitel in Auszügen, aber dennoch als zusammenhängendes Bild, dargestellt werden sollen. Diese dienen für die vorliegende Arbeit als Grundlage für die Konzeptionierung der einzelnen Modellsysteme und die hierfür synthetisierten und angewandten Verbindungen.

Die Definition interessanter Lipimotive für tBLMs wird anhand von Literaturdaten und eigener experimenteller Befunde getroffen.

Kapitel 4 – Durch den engen Bezug zwischen Struktur und Funktion komplexer supramolekularer Systeme sind die Grundlagen der Methoden für die Charakterisierung von molekularen Monoschichten und biomimetischer Membranen an Grenzflächen neben

Präparationsmethoden und Strukturierungsmöglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit von essentieller Bedeutung. Die Notwendigkeit der Kombination ergänzender oder komplementärer Analysemethoden wird deutlich gemacht.

Kapitel 5-7 – Darstellung der drei entwickelten tBLM-Systeme – **5.** archaeales Diphytanylglycerinotetraethylglycoliponsäureester-Lipid (DPTL) erlaubt biomimetische Membranen mit einer cytoplasmaanalogen Substratankopplung von bis zu 5 nm und elektrischen Eigenschaften vergleichbar mit biologischen Membranen. **6.** artifizielles Aminolipid (DODA) mit Glycopolymerspacer (LGP) und einer cytoplasmaanalogen Substratankopplung von 5-10 nm mit guten elektrischen Eigenschaften. **7.** Plasmapolymersierte, elektrophile Polymernetzwerke funktionalisiert mit einfachen hydrophoben Ketten, und mit einer cytoplasmaanalogen Substratankopplung von 10-50 nm.

Kapitel 8 – Diskussion & zukünftige Perspektiven

2 Ziele & Strategie der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Modellsysteme der biologischen Membran zu etablieren, um die Forschungsanstrengungen darauf zu konzentrieren, die faszinierenden Vorgänge der biologischen Steuerungen nicht nur in ihrer Schrittfolge zu beschreiben, sondern sie auch auf molekularer Ebene mechanistisch zu verstehen.

Das Ziel der Membranbiomimese, die funktionelle und strukturelle Nachahmung biologischer Membranvorgänge, wird durch die Einbettung dieser Vorgänge in komplexe, miteinander vernetzte Regulations- und Steuerungsvorgänge der Zelle kompliziert. Hier liegt die Stärke biomimetischer Membranen. Sie erlauben es statische und dynamische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen mit definierter Zusammensetzung der interagierenden Komponenten zu studieren. Um die facettenreichen biologischen Vorgänge an Hand von Modellsystemen zu mimikrieren, ist es notwendig das Wechselspiel der einzelnen Komponenten der biologischen Membran mit ihren räumlich, strukturell und funktionell angrenzenden Kompartimenten besser zu verstehen. Durch den hohen Grad an Komplexität biologischer Systeme, der in seiner Gesamtheit von einzelnen Modellen nicht hinreichend beschrieben werden kann, ist es für die Entwicklung biomimetischer Modelle notwendig, die Komplexität des biologischen Vorbilds zu reduzieren. Eine Reduktion der Komponenten der biomimetischen Membran erlaubt den definierten dreidimensionalen Aufbau des Modellsystems und dessen spezifische biophysikalische Beschreibung. Es ist aber zwingend notwendig sich zu vergegenwärtigen, daß jeder reduktionistische Ansatz die Aussagekraft eines Modells stark beeinflussen kann.

Für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten biomimetischen Membranen ergeben sich eine Reihe von Parametern, die erfüllt sein müssen, um den Grundfunktionen der natürlichen Lipiddoppelschicht zu entsprechen. In erster Linie sind dies die Semipermeabilität, die elektrische Dichtigkeit und die Fluidität der Membran. Zusätzlich sollen die biomimetischen Membranen modular aufbaubar sein um Variationen, zum Beispiel die Änderung der Lipidzusammensetzung und die Vergrößerung oder Verkleinerung des submembranen Raumes

durch Variation der Spacerchemie, zu erlauben. Ein adäquates Modellmembrankonzept, das in der Lage ist die Anforderungen für eine flexible Gestaltung des intrazellulären und extrazellulären Raums zu erfüllen, ist die gestützte, teilweise über Spacermoleküle kovalent an das Festkörpersubstrat gebundene Lipiddoppelschichtmembran (*engl. tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM)*).

Die Vorteile von tBLMs, also kovalent an Sensoroberflächen (bevorzugt Gold) angebundene Lipidmembranen, liegen in deren Langzeitstabilität, Kompatibilität mit oberflächenanalytischen Meßmethoden und Reproduzierbarkeit biologischer Membraneigenschaften.^[45, 50-54]

Der Spacer hat die Aufgabe die Membran von der Oberfläche zu entkoppeln. Die Notwendigkeit der Entkopplung ergibt sich aus einer Reihe biologischer und biophysikalischer Anforderungen. Als Beispiele sind die Ausbildung einer cytosol-/cytoskelettanalogen hydrophilen Schicht zwischen Membran und Substrat,^[45] die Verminderung des hydrophoben Einflusses der Metalloberfläche^[55], der funktionellen Einbau von Membranproteinen,^[48] die Reduktion des Förster-Energietransfers^[56] und die Kompensation von nanoskopischen Oberflächenrauigkeiten^[57] zu nennen.

Die Arbeit mit biomimetischen Modellen natürlicher Systeme bedarf der zusätzlichen Berücksichtigung der biologischen Hierarchieebene in die das natürliche Funktionselement/Teilsystem eingebettet ist. Nur so können durch funktionelle Äquivalenz des Modells zum biologischen Vorbild aussagekräftige Analogieschlüsse gezogen werden.^[58] Durch die Etablierung einer Hierarchie biomimetischer Modelle^[59] soll es ermöglicht werden die Parameter des einen Modells auf der Basis der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Modelle höherer und niederer Komplexität/Hierarchie zu verstehen.^[60] Ein Beispiel für eine Variation innerhalb der verschiedenen denkbaren Hierarchieebenen biomimetischer Membranen ist die Bereitstellung sowohl chemisch, als auch strukturell adaptierbarer Submembranräume (Distanz und damit submembranes Volumen zwischen Membran und Substrat). Solche Modelle sind für zukünftige Studien von membranabhängigen Mehrkomponentenreaktionen/Membranproteinen im cytosolanalogen Phasenraum von grundlegender Bedeutung.

Idealerweise definieren die an einem Modellsystem gewonnen Erkenntnisse die Rahmenbedingungen für biomimetische Systeme einer höheren oder niederen Hierarchieebene. Die vorgestellten Konzepte sind die konstitutionelle Voraussetzung zur Initiation von Synergieeffekten und komplementären Informationen über die Grenzen des definierten Einzelsystems hinaus. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit ein hierarchisches Konzept für tBLMs mit unterschiedlichem Entkopplungsgrad vom Substrat entwickelt werden.

Neben der vertikalen Membrankopplung bilden die Entwicklung des hydrophoben Lipidstrukturelements und der Kopfgruppe neuer tBLM-Lipide Schwerpunkte dieser Arbeit.

Da die hydrophoben Wechselwirkungen der Lipidketten in übergeordneter Weise für die Ausbildung und Eigenschaften einer supramolekularen Doppelschicht der Amphiphile verantwortlich sind, ist die Definition und die Synthese eines geeigneten Lipidmotivs für die Entwicklung einer biomimetischen Membran von grundlegender Bedeutung.^[61] Die Eigenschaften des hydrophoben Lipidteils determinieren im entscheidenden Maße die Stabilität, die Fluidität und (verbunden mit der Chemie der polaren Kopfgruppe) die elektrischen Eigenschaften. Kopfgruppen bestimmen durch ihre Wechselwirkung mit Ionen deren Transporteffizienz durch die Membran.^[62, 63] Ihre primäre Aufgabe ist die Abschirmung der hydrophoben Ketten von der wässrigen Phase und die damit einhergehende Orientierung der Lipide.^[61]

Die Betonung der Notwendigkeit guter elektrischer Membraneigenschaften leitet sich aus der unmittelbaren, für Zellen lebensnotwendigen, Ausbildung elektrochemischer Gradienten für die Energiegewinnung und die Signalweiterleitung ab. Zusätzlich ist die mechanische Krafteinwirkung durch den osmotischen Druck in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration auf beiden Seiten der Membran zu berücksichtigen. Für eine Vielzahl an Membranprozessen können größere Zugeständnisse an die fluiden Eigenschaften der Membran in makroskopischen Dimensionen gemacht werden. Da eine makroskopische Fluidität und eine homogene Lipidmembran (wie sie zum Beispiel mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden kann) kein Indiz für eine elektrisch dichte Membran ist,^[64] definieren sich die Anforderungen bezüglich der makroskopischen Fluidität in erster Linie an den Erfordernissen einzelner biologischer Vorgänge. Solange die dynamische Bewegung der hydrophoben Ketten temporär auftretende Defekte unterhalb der zum Durchtritt von Ladungen durch die Membran notwendigen Zeitspanne wieder ausheilt, und die Beweglichkeit des hydrophoben Membranbereichs die Funktion von Transportmolekülen (z.B. Valinomycin) und Membranproteinen erlaubt, ist den biomimetischen Ansprüchen für die im Rahmen dieser Arbeit definierten Ziele genüge getan.

Die molekularen Voraussetzungen für solche Modellsysteme und die Wahl der Lipide sollen durch die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen des biologischen Membransystems an Hand unterschiedlicher Organismen (zum Beispiel Extremophile) definiert werden. Analogien zwischen der Adaption verschiedener Zellen und den daraus resultierenden Möglichkeiten für biomimetische Membranen stellen vielversprechende Ansätze dar. Darauf aufbauend sollen maßgeschneiderte Verbindungen synthetisiert, mit Hilfe grenzflächenchemischer Methoden zu

supramolekularen Membranarchitekturen angeordnet, und mit oberflächensensitiven Analysemethoden auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

Natürliche Membranen besitzen eine vom Organismus und der Funktion der Zelle abhängige Zusammensetzung. Auf Grund von biologischen und medizinischen Überlegungen sind besonders die Membranen von Säugerzellen ein wichtiges Objekt für biomimetische Ansätze. Folglich konzentrieren sich die meisten in der Literatur beschriebenen Membranmodelle an der Zusammensetzung dieses Vorbildes.

Das in der natürlichen Membran vorhandene Lipidgemisch weist durch die Verwendung ungesättigter Phospholipide gegenüber reinen gesättigten Phospholipiden eine vergrößerte Fluidität auf. Ungesättigte Phospholipide sind aber anfällig für oxidative Veränderungen und unterliegen einer zeitlichen Änderung ihrer Eigenschaften. Aus diesem Grund, und dem Wunsch die Zahl der für eine kovalente Anbindung an das Festkörpersubstrat zu synthetisierenden Verbindungen zu minimieren, werden zum Aufbau nahezu aller literaturbekannten tBLMs Diacylphospholipide verwendet. Überwiegend findet das Dimyristoylphosphatidylmotiv als Hauptbestandteil der meisten Säugerzellmembranen^[65] Anwendung, erreicht aber kaum den Widerstandswert natürlicher Membranen. Da solche Membranen gegenüber destruktiven Einflüssen instabil sind, wurde versucht, durch kovalente Anbindung der Lipide an polare Spacermoleküle die Stabilisierung durch das Cytoskelett nachzuahmen.

Viele literaturbeschriebene Ansätze richten folglich ihre Aufmerksamkeit in erster Linie auf die Stabilisierung dieser Lipidmotive durch die Anpassung des cytosol-/cytoskelettanalogen wäßrigen Phasenraums. Hierzu finden eine Vielfalt polarer niedermolekularer und polymerer Verbindungen Anwendung. Beispiele hierfür sind polare Peptide^[66, 67] und verschiedene Oligomere^[68] oder Polymere^[46, 69-72]. Besonders poly- oder oligomere Spacermoleküle auf der Basis von Poly- oder Oligoethylenglycol, die in den meisten Fällen mit Diacyllipiden modifiziert werden, sind beschrieben.^[73, 74] Die auf dieser Basis aufgebauten tBLMs weisen Kapazitäten von $0,5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ bis $0,7 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Impedanzen zwischen $0,01 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ und $0,1 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf.^[68, 69, 75, 76] Im Bezug auf die Impedanzwerte unzureichend im Vergleich zu den elektrischen Eigenschaften der biologischen Membran.

Das Modellsystem, das die elektrischen Eigenschaften der biologischen Membran am besten widerspiegelt ist die „Lipiddoppelschichtmembran“, auch „schwarze Membran“ genannt (engl. Black Lipid Membrane or Bilayer Lipid Membrane (BLM)). BLMs erreichen Kapazitäten von etwa $0,5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Impedanzen von $\geq 10 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$.^[77] Bezüglich einiger Übersichtsartikel sei auf folgende Literaturstellen und Kapitel 3 verwiesen.^[50, 78, 79] tBLMs mit guten elektrischen Isolationseigenschaften, wurden von Cornell et al.^[80] präsentiert. Sie werden aus einem

Multikomponenten-System aufgebaut, das neben Monophytanoyl-Spacer-Lipiden auch transmembrane Lipide verwendet und in einem Schritt aus ethanolischer Lösung aufgebaut wird, wodurch der simultane Einbau von empfindlichen Membranproteinen nicht möglich ist. Weitere Nachteile dieses Membranaufbaus sind Lipidkomponenten mit Carboxylverknüpfungen im Kopfgruppenbereich (siehe unten) und die zum Membranaufbau verwendete Mehrkomponentenmischung die eine exakte biophysikalische Beschreibung erschwert. Nach Kahlweit ist das Phasenverhalten von Systemen mit mehr als drei Komponenten nur schwer mathematisch zu beschreiben,^[81] daher werden tBLMs mit weniger als vier Komponenten angestrebt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, eine biomimetische Membran zu entwickeln, die nur eine Verbindung zur Ausbildung der substratgebundenen proximalen Membranschicht benötigt. Vorteile einer solchen Monoschicht sind die große Stabilität, gute Reproduzierbarkeit, ein definierter Aufbau und die Ausbildung einer hydrophoben Monoschicht zur nachfolgenden Vesikelfusion. Der zusätzliche Einbau von lateralen Spacermolekülen ist als weitere Option vorgesehen. Durch die Wahl eines geeigneten Verhältnisses zwischen dem Raumbedarf des hydrophoben und des hydrophilen Molekülteils, sollte es möglich sein, eine dichte Membran zu erzeugen und eine effiziente Ionenleitung im polaren Submembranraum zu erzielen.

Für die Entwicklung, die Synthese und den Aufbau biomimetischer Membranen im Format der tBLM sind für die Verwirklichung der oben definierten Eigenschaften folgende Ziele/Schritte zu definieren:

Ziele

- A) Entwicklung eines neuen biomimetischen Membranmodells, im Format der tBLM, mit fluiden und elektrischen Eigenschaften die der biologischen Membran entsprechen. Biologische Membranen weisen typischerweise Diffusionskoeffizienten (als Maß der Fluidität) von 0,1 bis zu mehreren $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für die Lipidkomponenten auf.^[82] Die elektrischen Eigenschaften der Membran lassen sich durch die Kapazität und die Impedanz beschreiben. Typische Werte sind Kapazitäten von 0,5-1 μF und Impedanzen von mehreren $\text{M}\Omega$.^[83] Je nach Zusammensetzung der entsprechenden Membrandomäne können diese Werte aber stark schwanken.

- B) Entwicklung neuer Ansätze zum Aufbau einer Serie von Modellmembranen mit definiertem Submembranvolumen – die Distanz der Membran zur Oberfläche soll im Bereich von 1 – 50 nm variiert werden können.
- C) Demonstration biomimetischer tBLM-Funktionen und Feststellung der Güte der tBLMs durch die biophysikalische Charakterisierung membranabhängiger Prozesse.

Notwendige Schritte

- 1) Analyse biologischer Membransysteme zur Identifizierung erfolgversprechender Lipidmotive, Spacermoleküle und Rahmenbedingungen (Messanordnung/Umgebungsbedingungen der Membran) für den Aufbau von tBLMs (Kapitel 3)
- 2) Synthese der Lipide, Adaption der synthetischen Methoden zum kovalenten Aufbau von Cytoskelettmimikrie (Spacermoleküle) an Festkörperoberflächen mit einer effektiven Entkopplung der Membran im Bereich von 1-50 nm und der Entwicklung oberflächenreaktiver Anker-moleküle (Kapitel 5 & 7)
- 3) Präparation der tBLMs mit Hilfe grenzflächenchemischer Methoden (Kapitel 5-7)
 - a) Untersuchung des Substrateinflusses (Morphologie) und der Präparationsmethoden auf die Ausbildung und Güte von tBLMs
 - b) Entwicklung spezieller Anbindungs- und Ankerstrategien für die unter Punkt 2 beschriebene Variationsbreite unterschiedlicher Lipid-Spacer-Systeme.
- 4) Charakterisierung der tBLMs (Präparationsschritte, Studium biomimetischer Prozesse an einem repräsentativen Beispiel)

3 Biologische & biomimetische Membranen – Grundlagen

Biologische Systeme, im besonderen die Zellmembranen und ihre Komponenten, sind durch ihren komplexen Aufbau, die multifunktionellen Bausteine und ihre dynamischen Struktur-Funktionsbeziehungen anspruchsvolle Vorbilder für die Entwicklung biomimetischer Modellsysteme. (Abbildung 4) Ihre essentielle Bedeutung für alle bekannten Lebensformen unterstreicht die besondere Stellung von Membranmodellen für die biologisch/medizinische Grundlagenforschung und kommerzielle biosensorische Applikationen.

Aus den hohen Anforderungen die an Membranmimikrie gestellt werden müssen, um den Begriff “biomimetisch” zu rechtfertigen, folgt die Notwendigkeit das supramolekulare biologische System auf makroskopischer und molekularer Ebene zu verstehen. Nur so ist eine strukturelle und funktionelle Adaption der biologischen Membran an das artifizielle Umfeld der Meßanordnung möglich. Die dazu erforderlichen Grundlagen werden in diesem Kapitel dargestellt und beschrieben.

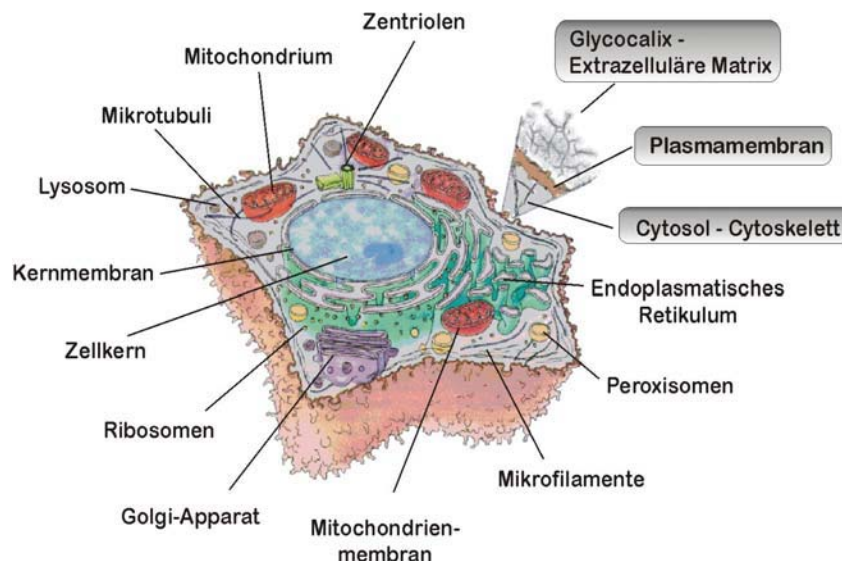


Abbildung 4 Aufbau und Kompartimente einer Eucyte (modifizierte Abbildung aus^[12]). Verschiedene intrazelluläre Membranen sind hervorgehoben. Die Cytoplasmamembran und die an sie angrenzenden plasmatischen (Cytosol, Cytoskelett) und extraplasmatischen Bereiche (Glycocalix, extrazelluläre Matrix) sind grau unterlegt.

Der Schwerpunkt der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten biomimetischen Membranen liegt auf der funktionellen Nachahmung biologischer Membranprozesse. Die Nachbildung der molekularen Vielfalt des biologischen Vorbilds ist nur in Ausnahmefällen notwendig. Hierarchische Elemente komplexer biologischer Systeme können in der Reihenfolge – Organismus → Organ → Zelle → Kompartiment (z.B. Zellmembran) → Funktionseinheit (z.B. Protein) – in funktionelle Einzelsysteme unterteilt werden. In dieser Hierarchie spielt die Zellmembran durch ihre mannigfaltigen Funktionen und Wechselwirkungen als kompartimentierende Einheit und Träger funktioneller Moleküle eine zentrale Rolle. Durch die Kompartimentierung von Reaktionsräumen sorgt sie einerseits für die Aufrechterhaltung von Potential- und Konzentrationsgradienten und andererseits für die funktionelle Lokalisierung von Membranproteinen, Rezeptoren und Liganden.

Neben dem in Kapitel 2 näher ausgeführten hierarchischen Aspekt, erschwert der Vielteilchencharakter biologischer Systeme die Entwicklung biomimetischer Modellsysteme. Da es sich bei biomimetischen Membranen um komplexe Systeme zeitlicher und örtlicher Organisationszustände handelt, ist es wichtig zu berücksichtigen, daß sich die Eigenschaften von Systemen mit dem Komplexitätsniveau einer biologischen Membran grundlegend von den Eigenschaften und dem Verhalten ihrer isolierten Bestandteile unterscheiden. Eine einfache Extrapolation der Eigenschaften auf der Basis weniger Teilchen ist bei tBLMs nicht möglich.^[84] Augenscheinlich inkompatible Anforderungen an die tBLM und deren Komponenten, wie exakte Position und freie Fluktuation, hohe Hydratisierung des Submembranraumes und Langzeitstabilität, große Membranoberfläche und perfekte Membraneigenschaften, definierte Strukturen und asymmetrische Lipidzusammensetzung der Membranhälften sowie mechanische Stabilität ohne das Vorhandensein von Lösungsmitteln bzw. amphiphilen Verbindungen erfordern die Entwicklung neuer Membrankomponenten zum Aufbau definierter biomimetischer Membranen.

Ziel dieses Kapitels ist die Identifizierung der molekularen Voraussetzungen für den Aufbau von tBLMs die in ihren elektrischen und fluiden Eigenschaften der biologischen Membran entsprechen. Durch die Analyse und Auswertung der literaturbeschriebenen Charakteristika biologischer Membranen in Kapitel 3.1 werden die dazu notwendigen molekularen Grundlagen herausgearbeitet. In Kombination mit der Analyse der veröffentlichten Aufbauprinzipien, Eigenschaften und Verbindungen biomimetischer Membranen in Kapitel 3.2 sollen limitierende Faktoren und Probleme eliminiert, und die Eigenschaften der angestrebten tBLM optimiert werden. Die Ergebnisse/Schlußfolgerungen werden in Kapitel 3.3 beschrieben.

3. 1 Strukturelle und funktionelle Voraussetzungen biologischer Membranen

Biologische Membranen, wie die Cytoplasmamembran in Abbildung 4, verdanken ihre Eigenschaften nicht nur ihren molekularen Komponenten. Vor allem die Wechselwirkung mit den Komponenten der benachbarten Phasenräume, des Cytosols/Cytoskeletts und der Glycocalix/Extrazellulären Matrix, üben einen großen Einfluß auf die Membran aus. Die Beschreibung des Aufbaus der biologischen Membran mit ihrer angrenzenden Kompartimente und deren Funktionsanalyse besitzt daher essentielle Bedeutung für die Entwicklung von Membranmimikrie. Biologische Membranen weisen eine große Bandbreite unterschiedlicher Zusammensetzungen und Aufbauvarianten auf. Da diese maßgeblichen Einfluß auf die Membranstabilität und -funktionalität besitzen, ist es sinnvoll die biologisch vorkommenden Membranen hinsichtlich solcher Zusammenhänge zu untersuchen, um Membrantypen zu finden, die im biomimetischen Modell erfolgreich angewandt werden können. Zur Realisierung der Ziele dieser Arbeit wird die synthetische Adaption natürlicher Membranstrukturelemente von Organismen mit großem Adaptionsvermögen und hoher Stabilität für die Entwicklung neuer Verbindungen in den Vordergrund gestellt.

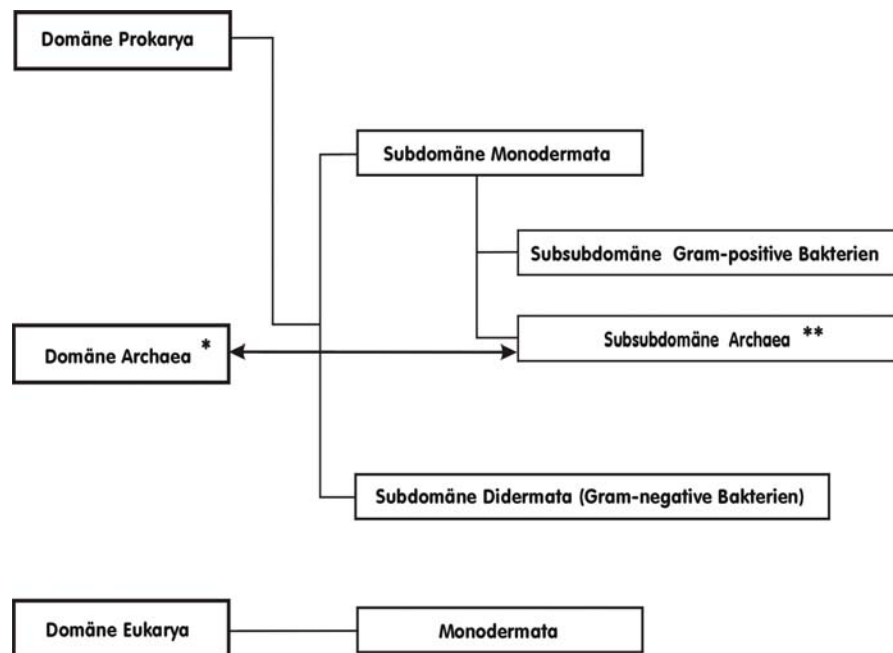


Abbildung 5 Zusammenhang zwischen den Membranaufbauformen (einfache und doppelte Membranen) und den dazugehörigen biologischen Domänen (Reiche) der entsprechenden Organismen. Bezüglich ihres Membranaufbaus können die Archaea unter der Subdomäne der Monodermata geführt werden*^[85] wogegen sie allgemein nach WOESE^[86, 87] als eigene Domäne** klassifiziert werden.

Die mit dem Aufbau der Membrantypen in Abbildung 5 zusammenhängenden Eigenschaften werden in den Kapiteln 3.1.1-3.1.3 behandelt.

Abbildung 6 stellt den Funktionskomplex aus extraplasmatischem Bereich (extrazelluläre Matrix, Glycocalix, evtl. Zellwand), Cytoplasmamembran und plasmatischem Bereich (Cytosol, Cytoskelett) schematisch dar. Einzelne Komponenten dieser Bereiche sind interessante Vorbilder für potentielle chemische Strukturen zur Unterstützung der Membran durch artifizielle Spacer. Aus diesem Grund stehen deren chemischen und physikalischen Eigenschaften bei den nachfolgenden Betrachtungen neben den Membranlipiden im Blickpunkt.

Umgebung der Membran und deren Funktionen

<p>(1) Extrazelluläre Komponenten und Membranoberfläche - Extrazelluläre Matrix – Glycocalix</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mechanische und chemische Stabilität • Barrierenfunktion • Erkennungsprozesse, Signaltransduktion 	Extrazelluläre Komp.
<p>(2) Lipiddoppelschicht – Cytoplasmamembran:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abgrenzung einzelner Organellen (Kompartimentierung) & Aufbau des elektrischen und chemischen Potentials • Transport durch Membranproteine und freie Transportmoleküle • Synthese von Speicher-, Struktur- und Signalverbindungen • Wechselwirkungen: Liganden mit Rezeptoren, Signaltransduktion 	
<p>(3) Cytoskelett-Cytosol:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stabilisierung der Zellstruktur auch unter dynamischen Bedingungen • Anbindung von Membranproteinen • Transport z. B. entlang der Mikrotubuli mittels Kinesin • Verantwortlich für amöboide Fortbewegung • Wässriger Phasenraum (andere Mobilitäten als unter (1)) 	Cytoskelett

Abbildung 6 Umgebung der Membran und deren Funktionen

3.1.1 Extrazelluläre Matrix/Zellhüllen – Glycocalix

Alle Zellen stehen mit ihrer Umwelt im Informations- und Stoffaustausch, einem grundlegenden Merkmal aller Lebensformen. Gerade die äußere Grenze der Membran ist dabei zum Teil extremen Belastungen von Druck, Temperatur und chemischen Einflüssen ausgesetzt. Daher besitzen fast alle ein- und mehrzelligen Organismen neben der Lipiddoppelschicht zusätzliche Biopolymerschichten auf ihrer Oberfläche. Sie schützen die Membran und ermöglichen zusätzliche Wechselwirkungen mit anderen Zellen und der Umwelt.

Die **extrazelluläre Matrix** umfaßt diejenigen Makromoleküle, die die Interzellularräume zwischen den höherer Zellen ausfüllen. Die Moleküle der extrazellulären Matrix bestehen aus Proteinen, Glycoproteinen und Proteoglycanen.^[88] Sie dienen vorwiegend der mechanischen Verankerung der Zellen, die in ihrer Plasmamembran Rezeptoren (z.B. Integrine - Mechanosensoren^[89, 90], Cadherine^[91] und Selektine^[92]) für extrazelluläre Matrixmoleküle wie zum Beispiel Kollagen aufweisen.^[93, 94] Daneben ist die extrazelluläre Matrix in der Lage Diffusionsbarrieren zwischen den Zellen zu bilden.^[95]

Zur extrazellulären Matrix gehören spezielle Glycosaminoglycane (Mucopolysaccharide) und Proteoglycane, welche die gelartige „Grundsubstanz“ bilden. In dieser können Nährstoffe, Metaboliten und Hormone eingeschränkt diffundieren.^[96] Darin eingebettet sind die Fasern der Kollagene und des Elastins, die zur Versteifung bzw. der elastischen Vernetzung der Matrix dienen.^[97-99] Fibronectin^[100] bei Fibroblasten und anderen Bindegewebszellen, Laminin^[101] bei Epithelzellen und Vitronectin^[102, 103] sind adhäsive Proteine die der Anheftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix dienen. Verschiedene Proteine der extrazelluläre Matrix wie Laminin,^[104, 105] Tenascin^[106, 107] und Thrombospondin^[108, 109] tragen dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Sequenzabschnitte, weshalb vermutet wird, daß diese Domänen ortsgebundene Signale zur Zell-Vermehrung und -Differenzierung darstellen. An gewissen Stellen der Plasmamembran von Fibroblasten (siehe Kapitel 3.1.2 - Cytoplasma und Cytoskelett), den „focal contacts“, stehen die Actinfilamente des Cytoskeletts über bestimmte Proteine (z.B. Talin,^[110, 111] Vinculin,^[112] Integrin^[113] und Fibronectin^[114]) mit der extrazellulären Matrix in Verbindung und können Zugkräfte gegen sie ausüben.

Der extrazellulären Matrix tierischer Zellen vergleichbare Strukturen sind die Pflanzen- und Bakterien-**Zellwände**, die Kutikeln der Insekten und Würmer sowie die Schalen der Mollusken. Zellwände haben die Aufgabe die Struktur der Zellen zu stabilisieren, vor äußeren Noxen zu schützen und die osmotische Druckdifferenz abzufangen.^[115, 116] Während nur Spezialisten unter den Prokaryonten wie zum Beispiel Mycoplasmen und das Archaeum *Thermoplasma acidophilum* ohne Zellwand auskommen,^[9] benötigen die meisten Prokaryonten diese als Schutz in einer hochkompetitiven Umwelt. Um ohne Zellwand bei hohen

Temperaturen lebensfähig zu sein, benötigt das Archaeum offensichtlich eine Membran mit besonderen Eigenschaften. Deren für die tBLM wichtigen Struktur-Funktionsbeziehungen werden in Kapitel 3.1.2 eingehend beschrieben.

Die zellwandkonstituierenden Polysaccharid-, Glycoprotein- oder Proteinschichten sind unterschiedlich ausgeprägt. Deren parakristalline Anordnung mit meist hexagonaler Symmetrie wird auch als S-Layer (S = surface) bezeichnet.^[117, 118] Ihre Bedeutung als simple Form der Membran im Verlauf der Evolution^[119-121] macht sie für die Anwendung als Substrat gestützter Membranen interessant^[122] (siehe Kapitel 3.2).

Die Bedeutung der Zellwand steht in engem Zusammenhang mit der Ausbildung monodermateller und didermateller Strukturen (Abbildung 5). Allen Eubakterien ist das Peptidoglycan oder Murein gemeinsam.^[115] Bei Gram-positiven Zellen ist das Peptidoglycan die mengenmäßig dominierende Wandsubstanz und umgibt eine einfache Membran. Gram-negative Bakterien, z. B. *E. coli*, besitzen dagegen nur eine dünne Peptidoglycanschicht. Sie ist nach außen hin von der sogenannten äußeren Membran, mit Lipopolysaccharid (LPS)^[123] als terminaler Struktur, umgeben (Didermata).^[124]

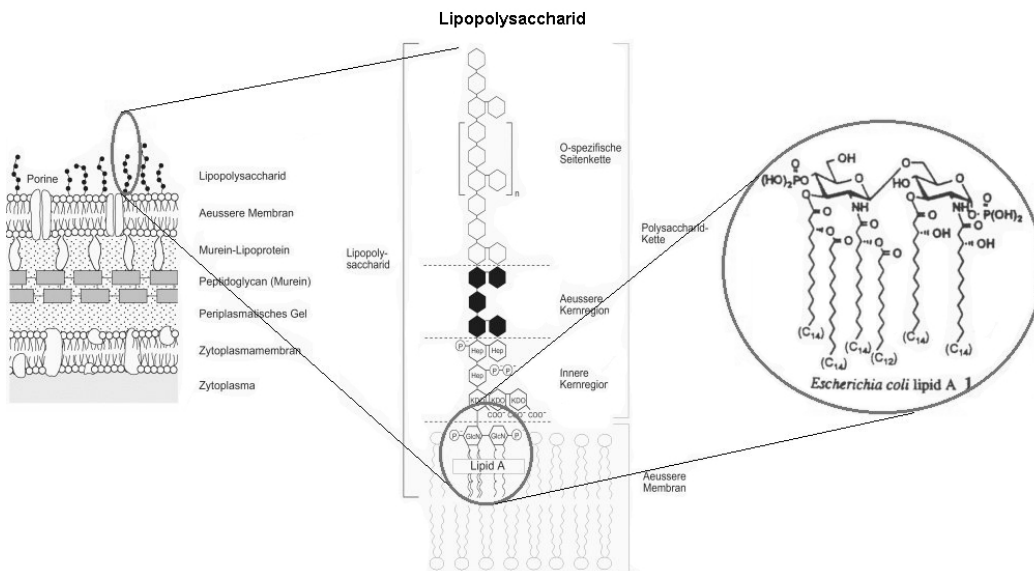


Abbildung 7 Membranaufbau der Gram-negativen Bakterien; eine wichtige Verbindung der äußeren Membran ist das Lipopolysaccharid. Es verleiht der Membran Stabilität und dient als Signalstruktur. (Die Abbildung ist modifizierten Elementen aus^[9, 115, 125] nachempfunden.)

LPS gehören zu den O-antigenen Kohlenhydratoberflächenstrukturen der Gram-negativen Bakterien. Ihre Biosynthese findet, wie die aller Glycolipide, auf der cytoplasmatischen Seite der Membran statt.^[126] Von dort werden sie über verschiedene Translokatoren zum

Bestimmungsort transportiert.^[127] Sie zeichnen sich durch eine Reihe von Kohlenhydraten aus, die für LPS charakteristisch sind: 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonsäure (Kdo), L-Glycerin-D-manno-heptose (Hep)^[128, 129] und anomer über Phosphodiester gebundene Oligosaccharidstrukturen.^[128] Diese werden von LPS-bindenden Proteinen und Rezeptoren selektiv erkannt.^[130]

Gram-negative Bakterien sind durch den differenzierten Schichtaufbau (Abbildung 7) stabiler und weniger anfällig für Noxen und chemische Einflüsse.^[131, 132] Der Einfluß des Lipopolysaccharids auf die Membran und die mögliche Anwendung seiner Strukturelemente zum Aufbau von tBLMs werden in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Neben seiner pathologischen Bedeutung (LPS ist für ca. 50.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich)^[133] sind LPS durch ihre membranstabilisierenden Eigenschaften interessante Vorbilder neuer tBLM-Lipidmotive. Auf Grund seines chemischen Aufbaus und seiner Lokalisierung in der äußeren Membran steht es in engem funktionellem Zusammenhang mit der Glycocalix von Eucyten.

Im Besonderen Plasmamembranen von Tierzellen enthalten integrale Glycoproteine und Glycolipide deren Oligosaccharidketten ausschließlich auf der E-Seite (extraplasmatisch) der Cytoplasmamembran exponiert sind. Die Gesamtheit aller Zuckermoleküle die an Oberflächenproteine und -phospholipide in der äußeren Seite der Zellmembran gekoppelt sind, werden als **Glycocalix** (engl. cell surface coat), zusammengefaßt.^[134] Die Kohlenhydratkomponente der Glycoproteine spielt eine essentielle Rolle in der Zellfunktion^[135, 136] und dient der Modifizierung höherer Organismen bei denen nahezu alle Blutserumproteine und Zelloberflächen glycosyliert sind.^[137, 138] Der Aufbau der Glycocalix ist zellspezifisch und Voraussetzung zur Bildung von Geweben. In der Entwicklung erkennen sich gleichartig differenzierte Zellen an ihrem Oberflächenglycosidmuster und schließen sich zu Verbänden, den Geweben zusammen.^[139] Die Glycocalix wird durch die Neubildung von Glycoproteinen und Glycolipiden regeneriert: Im rauen endoplasmatischen Retikulum werden die Proteine gebildet und in den Golgi-Apparat transportiert, wo sie mit Zuckermolekülen modifiziert werden. Die Glycolipide werden im Golgi-Apparat synthetisiert. Beide Moleküle gelangen in die Membranen der Golgi-Vesikel und werden beim Verschmelzen der Vesikel mit der Zellmembran in diese integriert.^[9] Die Glycocalix verleiht den Zellen Antigen- und Blutgruppeneigenschaften und ist somit für Immunreaktionen wichtig (z.B. bei der Transplantatabstoßung).^[140, 141] An der Oberfläche der Mikrovilli des Darmepithels ist im Vergleich zu den übrigen Körperzellen eine sehr hohe und dichte Glycocalix aus miteinander vernetzten Glycoproteinen zu erkennen. Sie schützt die Membran vor chemischem Abbau und verleiht ihr mechanische Stabilität. Die wesentlichen Zucker der Glycocalix sind Glucose, Galactose, Fucose, N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Galactosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure.

Das Interesse an Analoga der Glycocalix bezog sich bisher vorwiegend auf die prinzipielle Oberflächenmodifizierung von Membranmimikrie mit Polysaccharidstrukturen^[9] oder dem Einbau von Glycolipiden wie zum Beispiel Gangliosiden^[142]. Die Anwendung von Teilmotiven natürlicher Glycolipide als Spacer-Lipid-Komponente zum Aufbau von tBLMs stellt eine neue interessante Alternative zu den bisher als submembranen Unterbau verwendeten Peptiden, Proteinen, Polysacchariden (Cellulose^[143, 144], Dextran^[145] und Chitosan^[64, 146, 147]) und polaren artifiziellen Polymeren dar. Das Polaritätskonzept für die Verwendung saccharidischer Strukturen als Spacer für biomimetische Membranen innerhalb dieser Arbeit, stellt eine Inversion der Lokalisierung der Glycolipide im Gegensatz zur natürlichen Membran dar.

3.1.2 Cytoplasmamembran

Cytoplasmamembranen (Abbildung 8) sind komplexe, supramolekulare Strukturen die in verschiedenen Ausprägungen in allen natürlichen Zellen vorkommen.^[148] Durch ihre generelle Konstitution in Form einer amphiphilen Doppelschicht^[149] ähneln sie sich in Aufbau (Abbildung 4 und Abbildung 5), Funktion und Eigenschaften über weite Bereiche. Ihr individueller Aufbau und ihre chemische Zusammensetzung hängen von der Art des biologischen Organismus, dem Zelltyp, dem Kompartiment/Organell und der Funktion/dem Funktionszustand der Zelle bzw. Membran ab.

Unter den Membrantypen/membranumschlossenen Kompartimenten sind die Plasmalemma (Plasmamembran), die Tonoplasten, die Kernmembran, Membranen des endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates (Dictyosomen), der Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxysomen, Endosomen, Glyoxysomen und andere Vesikel zu nennen.

Zum besseren Verständnis der Lipideigenschaften/Funktionen, deren Bedeutung und sinnvollen Anwendung für den Aufbau biomimetischer Membranen, werden die Lipide nachfolgend unter biologisch-chemischen (Kapitel 3.1.2.3) und biophysikalisch-chemischen (Kapitel 3.1.2.4) Gesichtspunkten geordnet und beschrieben. Hierzu wird in Kapitel 3.1.2.3 die individuelle biologisch/chemische Bedeutung der Lipidklassen verstärkt hervorgehoben und auf die spezifischen biophysikalischen Eigenschaften der jeweiligen Lipidklasse verwiesen. Kapitel 3.1.2.4 ordnet die Lipide nach physikalischen Merkmalen und geht anschließend auf die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften der Lipide und ihrer Aggregate ein. Die daraus resultierenden dynamischen Eigenschaften und Formen der supramolekularen Membran- bzw. Lipidarchitekturen lassen sich durch eine Reihe nichtkovalenter Wechselwirkungen und geometrischer Faktoren erklären (Kapitel 3.1.2.4).

3.1.2.1 Biologische Membranen: *In vivo* Konstitution und Regulation

Biomembranen können nicht *de novo* im Cytoplasma der Zelle konstituiert werden.^[9] Ort der Synthese von Membranbausteinen ist im Allgemeinen die Membran selbst – in Prokaryoten die Plasmamembran (Innenseite), in Eucyten das ER (äußere Membranseite). Proteine werden oft an membrangebundenen Polysomen im *statu nascendi* in die Membran eingebaut. Da die Lipidsynthese seitenspezifisch auf einer Membranseite erfolgt, ist ein Transport der Lipide auf die andere Membranseite notwendig.^[150] Vesikulation und Fusion, sorgen als Membranfluß für die Verteilung der Verbindungen an die übrigen Membranen einer Zelle und zur Vermehrung bestimmter Membranen durch Vesikel.^[9] Die beiden semiautonomen Organellen, Mitochondrien und Plastide, synthetisieren ihre Lipide und einen Teil ihrer Membranproteine, die im organelleigenen Genom codiert sind, selbst. Regeneriert wird die Plasmamembran aus dem Endomembransystem durch Vesikelfluß.^[151] Auf diesem Weg – als Exocytose bezeichnet – gelangen auch Exportproteine und andere extrazelluläre Makromoleküle nach außen.^[9] Aufbau, Zusammensetzung und Funktion der biologischen Membran unterliegen durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Wechselwirkungen einem ständigen Wandel. In Abhängigkeit von zellulären Funktionszuständen^[152] sowie äußeren^[153-156] (zum Beispiel der Temperatur)^[157, 158] und inneren^[159] Umgebungsbedingungen, paßt sich die Membran durch die Änderung ihrer Zusammensetzung,^[153, 160] ihrer Eigenschaften^[161] und ihrer Struktur^[162] dynamisch an. Zusätzlich üben auch Membranproteine in Abhängigkeit von ihrem Funktionszustand einen Einfluß auf die Fluidität der Membran aus.^[163]

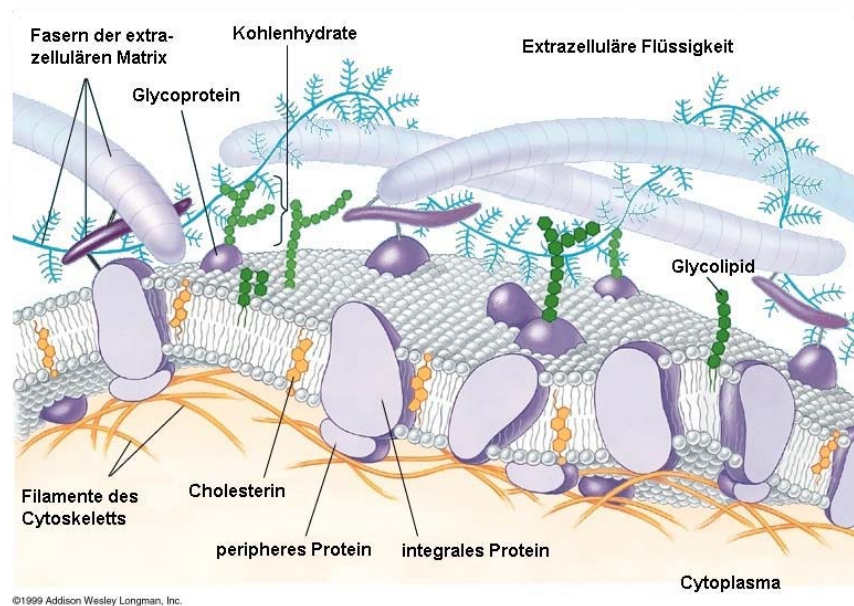


Abbildung 8 Biologische Membran - komplexe asymmetrische Membranhälften (modifizierte Abbildung aus ^[164])

Biomimetische Membranen verfügen nicht über dieses Potential. Der Aufbau und die Konstituierung der verschiedenen Modellmembranen können nicht auf die Vielzahl biologischer Reproduktionsmechanismen und den zielortspezifischen vesikulären Lipidaustausch zurückgreifen. Die Einschränkung, nicht auf diese Mechanismen zurückgreifen zu können eröffnet gleichzeitig die Freiheit nicht an chemische Zusammensetzungen, Aufbau- und Austauschmechanismen natürlicher Membranen gebunden zu sein. Dadurch ist es möglich eine große Variationsbreite an Lipidmotiven und nicht im natürlichen System realisierbare Lipidzusammensetzungen zum Aufbau biomimetischer Membranen anzuwenden.

Die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten biomimetischen Membranen sollen vor allem für die Untersuchung von Membranproteinen einsetzbar sein. Daher unterliegt ihr Aufbau verschiedenen Anforderungen. Zur funktionellen Einbettung von Membranproteinen ist beispielsweise eine fluide Membran notwendig. Neben der Bereitstellung einer fluiden und elektrisch dichten Lipiddoppelschicht, die ganz oder teilweise kovalent an ein Festkörpersubstrat gebunden ist, soll sich die biomimetische Membran bezüglich ihrer Komponenten neutral verhalten. Das heißt, daß keine Lipide oder Struktur motive verwendet werden sollen, die einen Signal- oder Botenstoffcharakter besitzen oder leicht zu solchen metabolisiert werden können. Nur so ist die Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen ohne den Einfluß sekundärer Effektoren möglich. Sekundäreffekte der Lipide und möglicherweise unerwünschte Wechselwirkungen werden anhand der biologischen-chemischen Eigenschaften in Kapitel 3.1.2.3.2 diskutiert.

3.1.2.2 Biologische Membranen: Historische Entwicklung des Membranverständnisses

Der Aufbau und die Bedeutung der biologischen Membranen wurden schon früh erkannt.^[165] OVERTON war der erste der 1895 auf Grund der Verteilungskoeffizienten kleiner Moleküle in Pflanzenzellen auf den Lipidcharakter der Membran schloß.^[166]

GORTER und GREDEL schlugen 1925 vor, daß die Lipide in Erythrozytenmembranen in Form einer bimolekularen Schicht oder Lipiddoppelschicht angeordnet sind.^[167]

Nachdem schrittweise weitere Membraneigenschaften entdeckt wurden, formulierten SINGER und NICOLSON das Fluid-Mosaik-Modell der biologischen Membran.^[10, 11] Das von ihnen vorgeschlagene Modell postuliert eine flüssig-analoge Lipiddoppelschicht, in welcher die integralen Membranproteine frei diffundieren können.

Die Wechselwirkungen mit dem extrazellulären Bereich^[89, 93] und dem Cytoskelett,^[168] aber auch das Vorkommen von „kristallinen“ Lipidarealen/-“Flößen“ (*engl. rafts*),^[169, 170] legen den Schluß nahe, daß es sich bei der Membranarchitektur nicht um eine statistische Verteilung frei

diffundierende Membranproteine handeln kann.^[171] Das Fluid-Mosaik-Modell kann also dahingehend modifiziert werden, daß die Membran über große Bereiche sehr wohl strukturiert ist und zeitlich und räumlich spezifische Wechselwirkungen und Verteilungen von Lipiden und Membranproteinen vorliegen.^[172-175]

3.1.2.3 Lipide: Systematik, Eigenschaften und Funktion aus biologisch/chemischer Sicht

Lipide (griech. *lipos* = Öl, Fett) sind in nahezu allen Membranen sowohl strukturell, funktionell als auch quantitativ die bedeutendsten Komponenten.^[176] Abgesehen von Beispielen wie der Mitochondrienmembran, die zu 60-70 % Membranproteine enthält. Ihre besonderen Eigenschaften verdanken Lipide ihrer amphiphilen chemischen Struktur, der Voraussetzung für ihre Assemblierung zu supramolekularen Doppelschichtstrukturen, den Membranen.

Die Rolle der einzelnen Lipidklassen, die biologische Wirkung der Lipide selbst und ihrer Metaboliten, ist komplex. Unter der Berücksichtigung der Erfordernisse biomimetischer Membranen werden folgend die Bedeutung der Lipideigenschaften im Zusammenhang von Struktur und Funktion beschrieben. Dabei wird auf die Vor- und Nachteile der in biologischen Membranen vorkommenden Lipide verwiesen.

Auf den Einfluß der Kopfgruppe, der hydrophoben Ketten und die Bedeutung des geometrischen Verhältnisses zwischen der Kopfgruppe und den hydrophoben Ketten wird in Kapitel 3.1.2.4 zusammen mit dem daraus resultierenden Lipidverhalten in supramolekularen Molekülphasen eingegangen.

Lipide wurden lange Zeit nur als molekulare Energiespeicher und struktureller Bestandteil der Zellmembran betrachtet. Darüber hinaus sind sie an regulatorischen Stoffwechsel-^[177, 178] und Signaltransduktionsvorgängen^[179] beteiligt. Dazu gehören beispielsweise:

- die spezifische Wechselwirkung mit Transmembranproteinen^[180] (periphere Lipide werden meist schnell ausgetauscht; Lipide, die zwischen α -helikalen Elementen der Membranproteine gebunden sind in der Regel nicht oder nur langsam^[181])
- der Einfluß auf die Struktur und die Funktion von Ionenkanälen^[182]
- eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung^[183]
- die Regulation des Zellzyklus^[184]

- die lipidabhängige Apoptose^[185]
- die Biosynthese von Prostaglandinen^[186]
- die lipidabhängige Synthese von Oligosacchariden^[187-191]
- die G-Protein vermittelte Genexpression in Krebszellen nach Bindung von LTA (*engl. Lysophosphatidic acid*)^[192] und
- die Initiierung von Immunreaktionen^[193-195]

Die Einteilung der Lipide ist in Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigt. Auf Grund ihres besonderen Bauprinzips aus Isopreneinheiten (Isoprenoide) werden die Terpene und Steroide oft getrennt behandelt. Ihre Bedeutung für die Ausbildung von Membranen legt aber eine gemeinsame Betrachtung, zusammen mit den als Lipiden im engeren Sinn bezeichneten Stoffklassen (Biosyntheseweg über Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, siehe Abbildung 9), nahe.

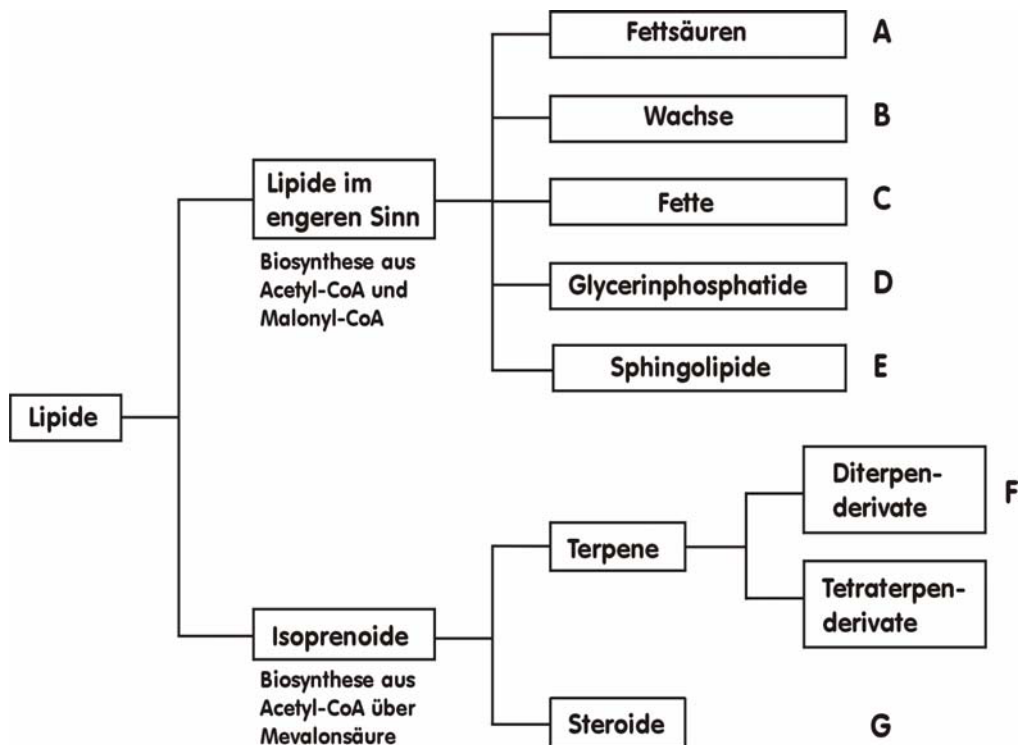


Abbildung 9 Klassifizierung der Lipide an Hand ihrer Biosynthese und chemischen Struktur

Übersicht wichtiger Lipidstrukturen

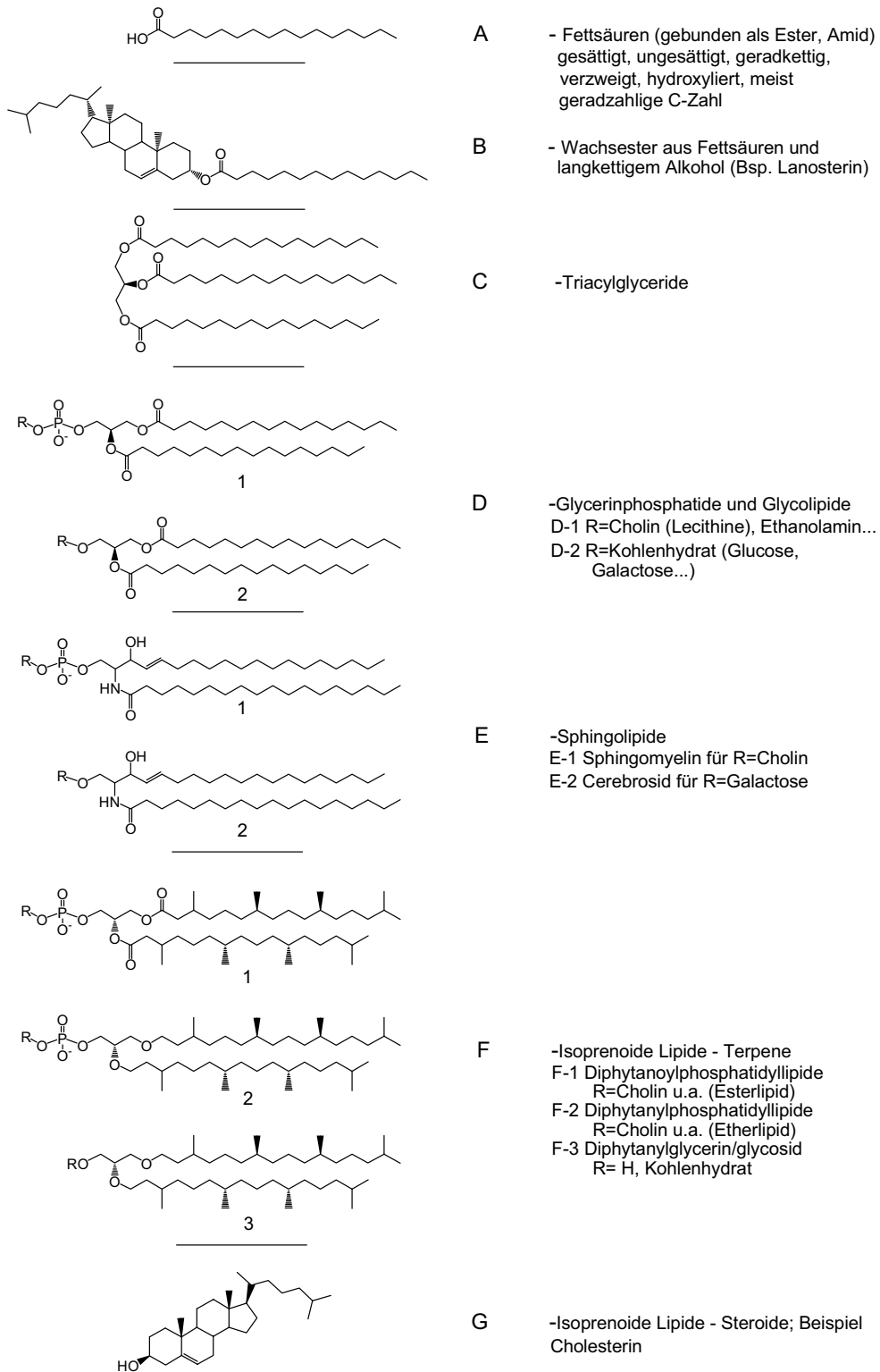


Abbildung 10 Strukturformeln wichtiger Lipidklassen

Die Lipidklassen der **Fettsäuren, Wachse und Fette** (Abbildung 9 A-C) werden auf Grund ihrer Eigenschaften zwar zu den Lipiden gezählt, kommen aber selten in freier Form (Fettsäuren (A) fast ausschließlich gebunden an Glycerin oder Sphingosin) in der Membran vor. Da Fettsäuren in Zellregulationsmechanismen eingebunden sind und als Abbauprodukt vieler Lipidmoleküle die Eigenschaften der Membran beeinflussen, kann ihr Einfluß auf das zelluläre System und die biologischen Eigenschaften von biomimetischen Membranen nicht vernachlässigt werden. Beispielsweise erhöhen Tumorzellen, die von cytotoxischen-T-Lymphozyten (CTL) angegriffen werden, ihre Produktion freier Fettsäuren wodurch die cytotoxische Wirkung von CTLs unterdrückt,^[196, 197] und das Verhalten der Membran verändert wird^[198]. Lipide mit schwer metabolisierbaren Bindungen zwischen den hydrophoben Gruppen und der Kopfgruppe sind von Vorteil um Störungen zu vermeiden.

Phosphatide (Phospholipide), Glycolipide und Aminolipide, in Abbildung 9 und Abbildung 10 unter D und E gezeigt, bilden die biologisch bedeutsamsten Lipidklassen höherer Zellen. Die meisten Verbindungen dieser Lipidklassen besitzen zwei esterartig an Glycerin/Sphingosin gebundene Fettsäurereste (Acylreste), sowie einen weiteren polaren, Rest. Die häufig (meist aber für Fette) verwendete Bezeichnung „Triglyceride“ sollte nicht verwendet werden,^[199] da sie die Anwesenheit von drei Glycerinresten impliziert, was nur bei Cardiolipin zutrifft. Die einzelnen Klassen und Subklassen der Lipide werden nachfolgend einzeln beschrieben, wobei die **Glycolipide** als Stoffklasse mit einer alternativen Kopfgruppe innerhalb der anderen Subklassen und nicht getrennt behandelt werden.

Aminolipide (in Abbildung 9 und Abbildung 10 nicht gezeigt) sind geladen und besitzen anstelle des dreiwertigen Alkohols Glycerin den mit einer basischen Aminosäure (z.B. L-Ornithin) und einer Fettsäure veresterten zweiwertigen Alkohol Ethylenglycol.^[200]

3.1.2.3.1 Nomenklatur chiraler Glycerinbausteine^[201]

Die mannigfaltige Natur der Membranlipide, mit mehr als 2000 verschiedenen Lipiden in Säugerzellmembranen,^[173] macht es notwendig sich deren Nomenklatur^[199] zuzuwenden. In der Lipid-Nomenklatur hat sich für asymmetrische Glycerinderivate die sogenannte stereospezifische Nummerierung (Abkürzung: *sn*-, nach IUPAC/IUB-Regel Lip-1.13)^[202] als nützlich erwiesen. Hierbei wird in der Fischerprojektion die (freie oder substituierte) Hydroxygruppe in Position 2 des Glycerin-Teils nach links weisend, das geminale Wasserstoff-Atom nach rechts weisend gezeichnet und als über die Papierebene ragend gedacht, woraufhin das Kohlenstoff-Atom 1 des Glycerin-Teils nach oben, Kohlenstoff-Atom 3 jedoch nach unten gerichtet ist. (Abbildung 11)

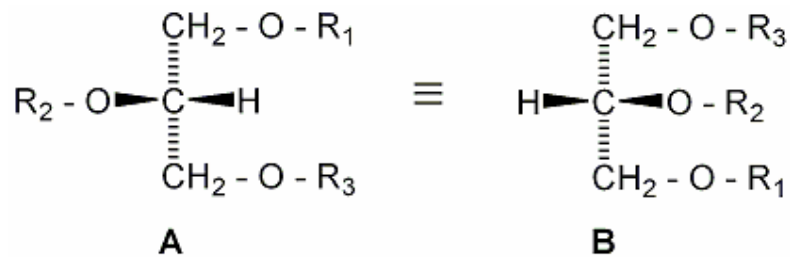


Abbildung 11 Stereospezifische Nomenklatur zur Bestimmung der Konfiguration von Glycerinderivaten. Für $\text{R}_3 = \text{PO}_3\text{H}_2$ A: sn-Glycerin 3-phosphat B: Zweimalige Inversion führt zu stereochemischer Retention.

Phosphatidsäuren und deren Derivate (Abbildung 9 D und Abbildung 10 D) sind Glycerinderivate, die in 1-*sn*- und 2-*sn*-Stellung des Glycerins mit Fettsäuren (1-*sn*-Position: meist gesättigt, 2-Position: meist ein- oder mehrfach ungesättigt) derivatisiert sind. An Atom 3-*sn* sind sie mit Phosphorsäure verestert, wobei die Phosphorsäure selbst meist mit einem weiteren polaren Molekül derivatisiert ist (Abkürzungen: R_1 , $\text{R}_2 = \text{Acyl}$, $\text{R}_3 = \text{Phosphoryl}$).

3.1.2.3.2 Eigenschaften der einzelnen Membranlipide - kritische Faktoren für tBLMs

Membranlipide wirken als intakte Moleküle und in Form ihrer Abbauprodukte durch eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer, biologischer und biophysikalischer Eigenschaften. In der Wechselwirkung mit zellulären Regulationsmechanismen spielen Lipide und ihre Abbauprodukte durch ihre chemische Signalwirkung und die Beeinflussung biophysikalischer Zellzustände eine bisher nur wenig untersuchte Rolle.

Bei der Auswahl der Lipide für biomimetische Membranen sind nach Kapitel 3.1.2.1 die potentiellen Einflüsse der Membrankomponenten und ihrer Abbauprodukte auf Membranfunktionen und Membranproteine zu berücksichtigen da tBLMs meist nur sehr kleine „submembrane“ Volumina aufweisen. Innerhalb dieser kleinen Volumina können schon geringe Mengen an Lipidabbauprodukten zu physiologisch wirksamen Konzentrationen führen die Membranprozesse beeinflussen. Aus diesem Grund werden nun die Eigenschaften und möglichen Effekte der Lipide aufgezeigt, um chemisch stabile Lipide zu entwickeln und kritische Strukturelemente zu vermeiden, bzw. zu substituieren.

Phosphatidsäuren werden aus Phosphatidylestern unter der Einwirkung von Phosphodiesterase D (EC 3.1.4.4.) freigesetzt (Vorkommen in Karotten, Kohl, Spinat, Zuckerrübenblättern, Gerstenmalz, Weizenkeimen...). Phosphatidsäuren selbst werden nur in kleinen Konzentrationen im Gewebe gefunden.^[201] Sie zählen zusammen mit den hydrophoben Lipidbestandteilen zu den Lipidabbauprodukten.

Der Phosphat-Rest der Phosphatidsäuren ist meist mit Aminoalkoholen wie Cholin (Lecithin = 3-*sn*-Phosphatidylcholin), 2-Aminoethanol (Ethanolamin) oder L-Serin (Kephalin = 3-*sn*-Phosphatidylethanolamin (Colaminkephalin) bzw. Phosphatidyl-L-serin (Serinkephalin)) verestert (Abbildung 9 D 1 und Abbildung 10 D 1). Sie stellen die Hauptkomponenten der Säugerzellmembranen dar. Letztere beiden befinden sich bei nichtapoptotischen Zellen überwiegend auf der cytoplasmatischen Seite. Die Asymmetrie wird durch spezielle Translokasen aufrechterhalten.^[203] Da die Esterbindungen der Phospholipide hydrolyseempfindlich sind, besitzen diese nur eine begrenzte Lebensdauer.^[204]

Zusätzlich sind hydrophobe Abbauprodukte von Phospholipiden wie die γ -Linolensäure in Regulationsmechanismen eingebunden. γ -Linolensäure (*engl. gamma-linolenic acid (GLA)*) bewirkt eine Erniedrigung von γ -Interferon (IFN-gamma; γ -IFN), dem chemotaktischen Monocytenprotein-1 (*engl. monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)*) und eine Erhöhung der Konzentration des Tumornekrosefaktors (*engl. tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)*).^[205] Daneben ist ein deutlich reduzierter Lipidspiegel polyungesättigter Fettsäuren (*engl. PUFA: polyunsaturated fatty acids*) bei autistischen Menschen festgestellt worden.^[206] Im Zuge dieser Erkenntnisse wird die Erforschung der Zusammenhänge zwischen Nervenzellmembraneigenschaften und höheren Gehirnfunktion auf molekularer Ebene neu motiviert.^[206]

Phosphatidylcholine (PC) bilden die Hauptlipidkomponenten der meisten Säugerzellmembranen.^[207] Die wichtigste Biosyntheseroute verläuft über Glycerinphosphat zur Phosphatidsäure die mit CDP-Cholin zum Endprodukt derivatisiert wird. Eine geringere Bedeutung besitzt die Methylierung von PE. Neben ihrer strukturellen Funktion besitzen PC Signalmolekülcharakter.^[208] Die Störung der PC-Homeostase führt zu Wachstumsstillstand oder Zelltod.^[209] Das Phospholipid-Analogon Hexadecylphosphocholin besitzt durch die Induktion der ceramidvermittelten Apoptose Antitumorwirkung.^[210] Weiterhin ist PC an der Biosynthese von Ceramid und Sphingomyelin beteiligt.^[207]

Ei PC (*engl. egg PC*) ist eine Mischung von PC-Lipiden. Es enthält etwa 90 % gesättigte Lipide, davon 67 % Dipalmitoyl und 23 % Stearoyllipide, sowie 10 % ungesättigte Lipide (6 %

Oleoyl-, 2 % Palmitoleoyl, 1 % linoleoyl) und 1 % andere PC-Lipide. Die Zusammensetzung kann aber schwanken. Durch den Anteil ungesättigter Lipide ändern sich die chemischen und damit auch die biophysikalischen Eigenschaften schon innerhalb eines Tages. Für Säugerzellen stellt dies kein Problem dar, da sich ihre Cytoplasmamembranen durch Vesikelfluß prozentual gesehen am Tag mehrfach erneuern.

Phosphatidylethanolamine (PE) stellen neben PC und PS die bedeutendsten Membrankomponenten dar. In Mischungen mit PC erhöhen PE die Stabilität von PC-Membranen.^[211] Untersuchungen zeigen, daß PE bei einem Protonierungsgrad von 90 % Aggregationen zwischen Membranen unterstützt.^[212] Darüber hinaus sind PE als Bestandteil der inneren *E. coli* Membran durch die selektive Wechselwirkung mit FtsY wichtige Wechselwirkungspartner beim kontrollierten Transport polytopter Proteine zur inneren *E. coli* Membran (FtsY ist das *Escherichia coli*-Homologe der eukaryontischen “signal recognition particle receptor α ” - Untereinheit).^[213] In Säugerzellen sind Phosphatidylethanolamine an der Regulation der Aktivität von adenylylcyklasesystemsensitiven hormonellen Effekten beteiligt.^[214]

Phosphatidyl-L-serin (PS) übt durch seine negative Ladung, wie das unten beschriebene Cardiolipin, eine wichtige Funktion bei regulativen Prozessen wie der Apoptose und der Koagulation aus.^[215-217] Während des apoptotischen Prozesses reichert sich PS in der äußeren Membranschicht an. Calciumvermittelte Wechselwirkung mit Annexin^[218, 219] führt zur Ausbildung von spannungsabhängigen^[220] hydrophilen^[221] Calciumionenkanälen die zum Zusammenbruch des Ionengradienten der Zelle führen. Die Wechselwirkung der Lipidmembran mit Annexin steht in Zusammenhang mit dem unter Cardiolipin beschriebenen Antiphospholipid-Syndrom.^[222]

Im Gehirn ist es als wichtigstes saures Phospholipid essentiell.^[223, 224] PS schützt Zellen des Nervensystems vor alkoholabhängiger Apoptose.^[225] Nachgewiesen sind die Auswirkungen einer oralen PS-Supplementation auf die neuronalen Membranen, auf den Zellstoffwechsel und auf spezifische Neurotransmittersysteme, darunter das Acetylcholin-, das Noradrenalin-, das Serotonin- und das Dopaminsystem.^[226]

Phosphoinositole (PI) bzw. 1-(3-*sn*-Phosphatidyl)-D-myo-inosit, sind am Phosphatrest mit myo-Inosit konjugiert. Sie sind häufig in Geweben vorhanden,^[227] regulieren das Actincytoskelett^[228] und dienen als Membrananker für membrangebundenen Proteine^[229]. In glycosylierter Form hat es als Glycosylphosphatidylinositol (GPI) zahlreiche Signalfunktionen in einer Vielzahl an Organismen^[230, 231] und dient für die Anbindung von

Proteinen an die Cytoplasmamembran^[232-240]. Das zelluläre Prionprotein PrPc ist über den GPI-Anker in der Plasmamembran verankert und in Lipid-Rafts lokalisiert.^[241] Nach enzymatischer Spaltung durch Phospholipase C^[242] setzen letztere wichtige intrazelluläre Botenstoffe frei.^[243] Neurotransmittereigenschaften sind unter anderem in der Schmerzmodulation beschrieben.^[244] Fehlende Spaltbarkeit des PI-Ankers, z.B. bei pathogenen Prionen, beeinflusst wichtige Schritte der Proteinwechselwirkung.^[245] Komplexe Wechselwirkungen mit PI als Vermittler von Zellkernprozessen sind beschrieben.^[246]

Ist der Phosphatrest mit einem weiteren Glycerinmolekül verestert erhält man die negativ geladenen **Phosphatidylglycerine (PG)**. Das Phasenverhalten der PGs hängt stark von der Ionenkonzentration ab. Unterhalb von einem molaren Verhältnis von 1:7 (Ca^{2+} /DMPG) liegt die Phasenumwandlungstemperatur bei 17 °C, oberhalb dieses Verhältnisses bei 32 °C.^[247] PG üben wie die anderen Phospholipide eine Vielzahl biologischer Funktionen aus, beispielweise beim Protein-Export aus gramnegativen Bakterien.^[201] Es wird als Schlüsselkomponente der Phospholipid-Ablagerungskrankheit betrachtet^[248]. Phosphatidylglycerine sind in vielen Kompartimenten (z.B. im Fruchtwasser) vorhanden.

Lysophospholipide erhält man, wenn aus Phospholipiden ein Acyl-(Fettsäure-) Rest durch Hydrolyse oder Phospholipase A abgespalten wird (A_1 spaltet an der Position *sn*-1, A_2 an der Position *sn*-2). Lysophospholipide sind oberflächenaktive Abbauprodukte von Phospholipiden, die durch Lyse der Zellmembran von Erythrozyten für den Austritt von Hämoglobin^[200] und die Störung der Surfactantenfunktion bei Lungenentzündung^[249] verantwortlich sind (daher der Name: *Lyo...*(griech. *lyein* = lösen) und Hämolyse).

Phosphatasen und Phosphodiesterasen wie die Phospholipasen C und D spalten Phospholipide demgegenüber an den Phosphat-Bindungen (C zwischen Glycerin und Phosphat, D zwischen Phosphat und endständiger Gruppe, z.B. Cholin). Die Lysophospholipide können durch Lysophospholipasen (z.B. EC 3.1.1.5)* deacyliert oder durch Acyltransferasen (EC 2.3.1.23) wieder zu den entsprechenden Phospholipiden aufgebaut werden; durch Acylmutasen (EC 5.4.1.1) werden sie isomerisiert. Auf analoge Weise entstehen andere Lysophosphatide, also Ester der Lysophosphatidsäuren, die Signalfunktionen innerhalb der Zelle ausüben.^[250, 251] Aus Kephalingen entstehen so beispielsweise die Lysokephaline (Lysophosphatidylethanolamine und Lysophosphatidylserine).

Neben der enzymatischen Hydrolyse der Acylposition 1 und 2 unterliegt besonders die β -, bzw. die 2-Position der verstärkten Hydrolyse.^[204] Zusätzlich zu den Lysophosphatiden kennt man

* die EC Nr. ist die Abkürzung für die Klassifizierungsnummer für Enzyme nach der Enzyme Commission der IUB

auch Lysolecithin-Analoga (LLA), die anstatt der Ester- eine Ether-Bindung haben (Plasmalogenderivate) und als Immunstimulantien in der Tumorthherapie diskutiert werden. Lysophospholipide sind an einer Vielzahl biologischer und biophysikalischer Wechselwirkungen beteiligt. Regelmechanismen, die zum Überleben oder zur Apoptose führen, werden durch die Wechselwirkung mit Lysophospholipiden gesteuert.^[252] Die Wechselwirkung von LysoPC mit dem Endothel besitzt wahrscheinlich vasodilatatorische Wirkung.^[253]

Tabelle 1 (Kapitel 3.1.2.4) zeigt die starke Temperaturerniedrigung der Phasenübergangstemperatur für LysoPC. Durch die größere Polarität besitzen Lysophospholipide eine größere Löslichkeit im wässrigen Medium. Daraus resultiert eine geringere Stabilität der Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche^[254] und der Lipidmembran^[255]. Ungesättigte PE-Membranen und kleine Vesikel (SUV) werden allerdings stabilisiert, wobei die Umwandlung zu Phosphatidsäure die negative Krümmungstendenz der Membran verstärken bzw. destabilisieren kann.^[256] LysoPC reichert sich durch seinen im Vergleich zu DiacylPC größeren positiven Krümmungsradius bevorzugt in der äußeren Membranhälfte an^[257] und unterdrückt die Fusion sphärischer Membranen^[258]. Schon Spuren von Lysophospholipiden (2 %) führen zu einer Erniedrigung des Membranwiderstands um den Faktor 100!^[259] Die zum Teil beobachtbare Instabilität von EiPC Monoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche kann auf die Bildung von Lysophospholipiden zurückgeführt werden.

Zu den Phospholipiden rechnet man ferner die **Plasmalogene**, in denen statt einer Fettsäure in 1-Stellung ein Aldehyd (in Form eines Enolethers) gebunden ist. Plasmalogene sind Beispiele für Lipide welche eine Ester- und eine Etherbindung besitzen. Die den Phosphatidylcholinen entsprechenden O-1-*sn*-Alkenyl-Verbindungen heißen Phosphatidalcholine. Vom Namen Plasmalogen leitet sich die Sammelbezeichnung Plasmensäuren für Phospholipide mit einer Enolether-Gruppierung in 1-, einer (ungesättigten) Acyl-Gruppe in 2- und einer Phosphorsäure-Gruppe in 3-Stellung her. Die entsprechenden 1-Alkylether-Derivate heißen Plasmensäuren und deacylierte Derivate beispielsweise Lysoplasmenylserin. Ein weiteres Plasmalogen ist der Thrombocyten-aktivierende Faktor (platelet-activating factor, PAF mit R1 = Octadecyl, R2 = Acetyl u. R3 = Phosphorylcholin), einem Vermittler des Endotoxin-Schocks.^[260] Sie werden besonders bei der Verletzung von Zellen im Zuge der dabei generell auftretenden Lipidperoxidation^[261] an ihrer Enoletherbindung epoxidiert.^[262] Auch in Lipid-Rafts wurden sie detektiert.^[263]

In Ciliaten-Membranen wurden **Phosphonolipide**^[264, 265] entdeckt, deren Funktion möglicherweise darin besteht, ein Überleben in Anwesenheit von selbst sezernierten Phospholipasen zu ermöglichen.^[201] Phosphonolipide konnten ebenfalls in einer Reihe von Säugerzellen (Ziege, Schaf, Rind und Huhn)^[266-269], aber auch in Schnecken^[270] und Pflanzensamen^[271] nachgewiesen werden. Ihr Vorkommen in der Natur scheint größer zu sein als bislang vermutet.^[265]

Etherphospholipide sind mit den oben beschriebenen Lipiden verwandt, die Esterbindungen der Acylketten sind aber gegen Etherbindungen substituiert. Durch die Etherbindung besteht keine Hydrolysegefahr für die Bindungen zwischen Glycerin und den hydrophoben Ketten, was sich günstig auf die Membranlebensdauer auswirkt. Ihre Neigung zur Ausbildung inverser hexagonaler Phasen, denen eine besondere Bedeutung bei der Membranfusion zugeschrieben wird (siehe unten - Phasenzustände der Lipide/Membran -), macht sie für das Studium von Membranfusionsprozessen interessant.^[272] Etherphospholipide wurden als Bestandteil kristalliner bzw. gelatinaloger Membranareale (im englischen als „Raft“ bezeichnet) nachgewiesen.^[273, 274] Sie besitzen eine 4-8 mal langsamere transmembrane Diffusionsgeschwindigkeit (Diffusion von der einen auf die andere Membranseite) als Esterlipide (gemessen in Erythrozytenmembranen, wodurch sich die Frage nach der Substratspezifität und damit der Effizienz der die Diffusion vermittelnden Translokase stellt).^[275] Ihre Phasenübergangstemperatur ist gegenüber den entsprechenden Acyllipiden erhöht.^[65]

Phosphosphingolipide (Abbildung 9 E und Abbildung 10 E) sind eine Hauptklasse von Phospholipiden eukaryontischer Zellen und stellen zusammen mit den Phosphatidylcholinen mehr als 50 % der Membranphospholipide. Sie leiten sich von Sphingosin ab, einem ungesättigten C₁₈-modifizierten Aminoalkohol. Das N-Acylderivat des Sphingosins wird als Ceramid bezeichnet (lat cerebrum = Gehirn).^[276] Phosphosphingolipide tragen die gleichen polaren Reste wie Phospholipide: Cholin, Ethanolamin, aber auch Kohlenhydrate (Sphingoglycolipide werden als Cerebroside bezeichnet und besitzen häufig antifungische Eigenschaften). Ist der Ceramidrest mit sialinsäurehaltigen Oligosaccharidstrukturen funktionalisiert, bezeichnet man diese Glycolipide als Ganglioside. Am häufigsten findet man Sphingomyelin (Cholin-Rest; SM). Zusammen mit Phosphatidylcholin kommt es hauptsächlich in der proximalen Membranhälfte vor.^[277] Sphingomyelin und PC sind zusammen mit der an der Membrannenseite von Lysosomen/Endosomen gefundenen Sphingomyelinase^[149] an der Cholesterinhomöostase^[278] beteiligt. Sphingosin, insbesondere Sphingosin-1-phosphat greift zusammen mit Ceramid in die Kontrolle der Zellproliferation und Apoptose ein.^[279] Ceramid

und sein Metabolit Sphingosin wirken als negative Regulatoren der Zellproliferation und Promotoren der Apoptose. Kontroverser Weise wirkt Sphingosin-1-phosphat dagegen als Stimulant des Zellwachstums und inhibiert die Apoptose.^[280, 281] Die Signaltransduktion durch den sogenannten SM-Ceramid-Pfad erscheint als ubiquitäres, evolutionäres System zur Signaltransduktion, analog den konventionellen Systemen wie dem Phosphoinositidsystem.^[282] Sphingomyelin ist in eine Vielzahl von Signaltransduktionsvorgängen eingebunden,^[283, 284] Bestandteil der Lung Surfactants^[285-287] und wird mit der Bildung von Prionen in Zusammenhang gebracht^[288]. Die Rolle der Sphingolipide bei der Bildung von Lipidflößen wird im Zusammenhang mit den Membranphasen weiter unten beschrieben.

Ganglioside sind Sphingoglycolipide die im Unterschied zu den Cerebrosiden mehrere Monosaccharideinheiten (teilweise Galactosamin) und Neuraminsäure enthalten. Sie besitzen in Säugern ein ubiquitäres Verteilungsmuster, kommen aber am häufigsten im ZNS vor.^[289] Ihr Name leitet sich von Ganglion = Nervenknötchen und -osid von Glucosid ab. Ganglioside fungieren oft als Rezeptoren für Toxine, z.B. Ricin^[290], Tetanus-^[291] und Cholera-Toxin^[292], und sind an der Apoptose beteiligt^[293].

Cardiolipine (1,3-Bisphosphatidylglycerine;CL) sind meist aus Mitochondrienmembranen des Herzmuskels isolierte Phospholipide mit zwei über Glycerin verknüpften Phosphatidsäuren. Durch die negative Ladung ist Cardiolipin, wie auch PS und PG, an einer Reihe essentieller Stoffwechselfunktionen als Struktur- und Funktionselement beteiligt. Das besondere Bauprinzip mit 4 teilweise unterschiedlichen Acylketten und der negativen Nettoladung führt bei Cardiolipinen zu spezifischen biophysikalischen und biologischen Wechselwirkungen. So formt Cardiolipin keine Lipiddoppelschichten^[294] und zeigt als Monoschicht auf dem LB-Trog eine deutliche Flächenkontraktion bei der Zugabe zweiwertiger Ionen.^[295]

Cardiolipin ist ein essentielles Phospholipid und nimmt im eukaryontischen Energiestoffwechsel eine Schlüsselrolle für die Mitochondrienstruktur und -funktion ein.^[296] Es ist für die Funktion der Cytochrom-Oxidase und der Adenin-Nukleotid-Translokase essentiell; ein Lipidverlust durch Alterung oder Abbau führt zum Verlust der Proteinfunktion.^[296] Seine Wechselwirkung mit Cytochrom C wird durch zwitterionische Lipide moduliert. NMR-Messungen zeigen, daß Cytochrom C spezifische Wechselwirkungen mit CL eingeht und so weit in die Membran inseriert, daß die dynamische Struktur des Glycerinrückgrats gestört wird.^[297]

Auch mit Arzneistoffen wie Doxorubicin geht Cardiolipin Wechselwirkungen ein und scheint dadurch für dessen cardiotoxischen Effekte mitverantwortlich zu sein.^[298] Antikörper gegen CL sind verantwortlich für das Antiphospholipid-Syndrom.^[299] Sie werden bei verschiedenen

Erkrankungen nachgewiesen (z.B. Arteriosklerose)^[300] und führen zu Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes^[301] und Hochrisikoschwangerschaften verbunden mit früher Eklampsie^[217] und arterieller Thrombose.^[299]

Lipopolysaccharide (LPS) (siehe auch Kapitel 3.1.1): Eine Verbindungsklasse, die neben den Glycolipiden und Phospholipiden formal zu den Membranlipiden gezählt wird, sind die Lipopolysaccharide. LPS bilden die Hauptmembrankomponente der äußeren Zellmembranen Gram-negativer Bakterien^[302] und sind für deren Stabilität verantwortlich^[132]. Sie besitzen eine Poly- oder Oligosaccharidregion (siehe Kapitel 3.1.1) die in der äußeren Zellmembran über ein spezielles Glycolipid, dem „Lipid A“, in der Membran verankert ist. Lipid A besitzt hydrophobe Ketten (Acyl-, Acyloxy-Ester und Amide),^[303] die an eine polare „Kopfgruppe“ gebunden sind, die sich von einem phosphorylierten Disaccharid ableitet. Es sorgt für die Ausbildung der niedrigen Membranpermeabilität und die Resistenz gegen hydrophobe Agenzien.^[304]

Organismen mit LPS-haltigen Membranen zeigen eine erhöhte Resistenz gegen kationische antimikrobielle Peptide.^[305, 306] Sein stabilisierender Einfluß auf die Membran macht das Lipid A-Motiv als Vorbild für tBLM-Lipide interessant.

Das Studium einiger biophysikalischer Eigenschaften wurde an LPS-haltigen *Salmonella typhimurium*-1195 Membranen durchgeführt. Die LPS-Moleküle besitzen bei einer gleichmäßigen Verteilung in der Membran einen intermolekularen Abstand von 3 - 4 nm und einen lateralen Diffusionskoeffizienten von $3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.^[307] Die niedrigen Diffusionskoeffizienten sind wahrscheinlich auf die ausgedehnten Polysaccharidstrukturen am Kopfgruppenende und den Oligoacyllipidcharakter zurückzuführen. Die Fluidität der LPS hängt im Gegensatz zu den Phospholipiden stark vom Proteingehalt der Membran (zwischen 0-60% sinkt sie um das 10 fache auf $< 10^{-4} \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$), und der Temperatur ab. Durch einen Temperaturanstieg von 24 °C auf 37 °C verdoppelt sich die Diffusionskonstante, während sie sich für die Phospholipide in diesem Temperaturbereich kaum ändert.^[308] Messungen von Mühlradt et al. zeigen, daß LPS bei 0 °C überwiegend in Clustern vorliegen und sich bei Temperaturerhöhung auf 37 °C homogen in der Membran verteilen. Ihr Anteil beträgt etwa 10-25 % in der Bakterienmembran was dem oben beschriebenen Abstand von 3-4 nm zwischen zwei LPS-Molekülen entspricht.^[307]

LPS besitzen eine bedeutsame Bioaktivität in pathologischen Prozessen. So sind sie für die toxische Wirkung der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien verantwortlich. Sie können beispielsweise einen septischen Schock verursachen,^[309, 310] aber auch durch die Induktion des Tumornekrosefaktors (TNF) zur Aktivierung von Makrophagen beitragen.^[311]

LPS bzw. Lipid A induzieren verschiedene Transkriptionsfaktoren über intrazelluläre Signalkaskaden die durch CD14-TLR4 Rezeptoren^[312-316] zusammen mit MD2^[317] aber auch CD14-unabhängig^[318] vermittelt werden. Sie beeinflussen die Aktivierung von Makrophagen^[319, 320], Monocyten und Neutrophilen^[321]. Die Expression einer Reihe von Genen in CD14(+) Monocyten/Makrophagen aber auch in CD14(-) Fibroblasten und Endothelzellen besitzt hohe Spezifität.^[322] Deren Aktivierung führt zur Synthese von Cytokinen welche entweder direkt cytotoxisch wirken oder das Immunsystem stimulieren.^[323] Die stimulierende Wirkung auf das Immunsystems macht die Applikation von Lipid A Derivaten für die Krebsbehandlung interessant.^[323]

Lipid A ist für die toxischen Effekte der LPS^[324, 325] und die Produktion multipler inflammatorischer Mediatoren, den Cytokinen (z.B. Tumornekrosefaktor TNF α , Interleukin-6 (IL-6),^[326] Interleukin-1 α und β), verantwortlich^[327]. Die Variabilität in den Acylketten des Lipid A scheint einen großen Einfluß auf die Immunogenität von Phagozyten auszuüben.^[328] Der starke endotoxische Effekt von *C. testosteroni* Lipid A zeigt, daß die Zusammensetzung der 3-Hydroxydecansäure nicht für die niedrige Endotoxizität verantwortlich ist, die bei einigen Mitgliedern des Genus *Rhodopseudomonas* beobachtet wird. Weiterhin hat das Fehlen einer zweiten Acylierung der an der 3'-Position befindlichen 3-Hydroxyfettsäure und die Substitution der Hydroxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure an 2-Position keinen Effekt bezüglich der Manifestation der endotoxischen Aktivität oder Speziesspezifität.^[329]

Es wird angenommen, daß die geometrische Diversität der LPS-Motive einen steuernden Einfluß auf die Rezeptorspezifität besitzt. LPS mit konischer Struktur (z.B. von *Escherichia coli*) induziert die Produktion von Cytokinen durch Aktivierung des Toll-artigen Rezeptors 4 (TLR4)^[330-332], wohingegen LPS mit stärker ausgeprägter zylindrischer Struktur (z. B. von *Porphyromonas gingivalis*) einen anderen Satz an Cytokinen durch die Wechselwirkung mit TLR2 aktiviert.^[333] Streng zylindrische LPS-Moleküle (z.B. der Lipid A-Vorläufer Ia oder Varianten von *Rhodobacter sphaeroides*) zeigen dagegen auf der Stufe der TLRs antagonistische Wirkung.^[333, 334] Die Varianz der geometrischen Strukturen läßt auf die Induktion verschiedener Krümmungsradien der äußeren Membran schließen, die sich auch auf die biophysikalischen Membraneigenschaften auswirken.

Bedenken, Lipid A analoge Strukturen für biologische Modellmembranen zu verwenden, die für Wechselwirkungsstudien mit intakten bzw. lebenden Zellen in Betracht kommen, lassen sich durch rationales Design weitgehend ausräumen. Untersuchungen zeigen, daß vor allem der Oligosaccharidteil der Lipopolysaccharide^[335] und die Phosphatgruppe in 4'-Position^[336] zu toxischen Effekte führen.^[337] LPS die in Liposomen inkorporiert sind zeigen eine stark verminderte Aktivität.^[337] Die pathogenen Eigenschaften von Lipid A und seiner Analoga hängen eng mit einem strikten Satz an Strukturmerkmalen zusammen. Im einzelnen sind dies

der $\beta(1-6)$ -verknüpfte Glucosamindisaccharidrest, Biphosphorylierung an der anomeren und der C-4'-Position und eine geeignete Anzahl und Position langer 3-Acyloxyacylgruppen am Disaccharid.^[338, 339] Zusätzlich wurde festgestellt, daß mit zunehmender Alkylkettenlänge der Acylgruppen die Toxizität abnimmt^[340, 341], ebenso bei einer symmetrischen Verteilung gleich langer Acylketten.^[125] Das Fehlen der zweiten Acylierung der 3-Hydroxyfettsäuren an der 3'-Position und die Substitution der Hydroxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure an der Position 2 verändert nicht die Manifestation der endotoxischen Aktivität oder Spezifität.^[329] Besonders die Anwesenheit der beiden Phosphatgruppen scheint für die Steuerung der Signalkaskade zur Produktion von TNF wesentlich zu sein.^[125]

Isoprenoide Lipide

Eine besondere Lipidklasse sind hinsichtlich ihrer Biosynthese und ihrer Eigenschaften die in Abbildung 9 F & G und Abbildung 10 F & G dargestellten isoprenoiden Lipide aus den Verbindungsklassen der **Terpene (I) und Steroide (II)**. Beide Stoffklassen werden in sich geschlossen abgehandelt um ihre Bedeutung hervorzuheben. Alle zu den Terpenen (hier Diphytanylglycerinderivate) gehörenden Punkte sind mit (I) gekennzeichnet, die dazugehörigen Überschriften einzelner Absätze eingerückt. Bei den Steroiden (II) wurde auf gleiche Weise verfahren.

Terpenoidkomponenten sind ubiquitär in großer Vielfalt in biologischen Membranen vorhanden: Beispielsweise archaeale Lipide, Hopanoide, Carotinoide, Steroide, Dolichole und Ubiquinonabkömmlinge. Ihre überragende Bedeutung für biologische und artifizielle Membranen kann nicht überschätzt werden!

(I) Terpenoide Lipide, basierend auf Diphytanylglycerin

Das Bestreben des ersten Teils dieses Kapitels, ein Verständnis für die notwendigen und möglichen (extremen) Umgebungsbedingungen isoprenoidhaltiger biologischer Membranen zu entwickeln, und optimale Lipidmotive für die Anbindung an Festkörperoberflächen zur Präparation von elektrisch dichten, stabilen und fluiden tBLMs aufzufinden, orientiert sich an natürlichen Vorbildern. Die Motivation dieses Vorgehens wird verständlich, wenn diese Verbindungsklassen in einen Zusammenhang zwischen der Entwicklungsgeschichte der Lipiddoppelschichtmembran, deren chemischen Aufbau und ihren Umweltbedingungen gestellt werden.

(I) Entwicklungsgeschichtliche Charakteristika: Wichtige Hinweise auf Organismen mit geeigneten Lipidmotiven für tBLMs

Identifiziert man aus dem breiten Spektrum der heute vorkommenden Lebensformen diejenigen, die schon unter den extremen urzeitlichen Umweltbedingungen ökologische Nischen als Habitat bevölkerten und den phylogenetisch ältesten Ursprung aufweisen, findet man Lebensformen die mit großer Effizienz einen Milliarden Jahre alten Selektionsprozess überlebt haben. Lebensformen die dieses Qualitätsmerkmal besitzen, weisen unter anderem äußerst stabile und anpassungsfähige Membranen auf, die den Anforderungen an tBLM-Lipide in besonderer Weise entsprechen könnten.

Die ältesten Membranfunde sind durch das Auffinden von Fossilien belegt. Mikrofossilien und möglicherweise subzelluläre Kompartimente können mehrere Milliarden Jahre strukturell konserviert werden.^[342] Das Auffinden von viroiden Fossilien bedingt auch bei diesen das Vorhandensein von weiteren membranumhüllten Organismen, da, falls nicht das Viruskapsid (das Kapsid ist aus Kapsomeren aufgebaut)^[115] die Mineralisation erzeugte, alle Virushüllen von zellulären Membranen abstammen. Die eindeutigsten Hinweise auf fossile Membranfunde sind die nur durch membranabhängige Biomineralisation erklärbaren speziellen Magnetitkristallformen, die auch in den heutigen magnetischen Bakterien^[343, 344] gefunden werden.^[345] Ihr Alter läßt sich teilweise auf mehr als 2 Milliarden Jahre zurückdatieren.^[346-348] Eine chemische Analyse der Membranbestandteile ist oft nicht möglich. Die Beteiligung von Terpenoiden an den Membrantemplaten der Fossilien scheint evident.^[349]

Da alle bekannten Lebewesen das „Erfolgskonzept“ der Lipiddoppelschichtmembran^[350, 351] seit mehr als 3,6^[352] bis 3,8 Milliarden Jahre^[353] als strukturelles Konzept unverändert beibehalten haben (es wird vermutet, daß erste Membranen schon vor 4,3 Milliarden existierten),^[353] ist die Analyse des biologischen Stammbaums für das Auffinden von besonders stabilen Membranen hilfreich. Ob der erste allgemeine Urahn aller heutigen Zellen eine Membran hatte oder nicht, konnte noch nicht abschließend beantwortet werden.^[354]

Mit dem mikrobiellen Leben auf der vor 3,8 Milliarden noch heißen, sauerstofflosen Erde sind von den heute noch lebenden Organismen die abstammungsgeschichtlich sehr ursprünglichen Hyperthermophilen am besten zu vergleichen (Abbildung 12).

Erst in den 70er Jahren wurden die Archaea (extremophile Organismen die unter extremen Umweltbedingungen wie hoher Temperatur, niedrigen pH Werten usw. leben) von Carl R. WOESE an Hand ihrer ribosomalen RNA Sequenz als eigenes Reich identifiziert.^[86, 355] Zuvor wurden sie zu den hyperthermophilen Bakterien gerechnet, von denen sie sich aber neben ihrer RNA-Sequenz auch bezüglich ihrer Lipidzusammensetzung der Membran stark unterscheiden.^[160, 356]

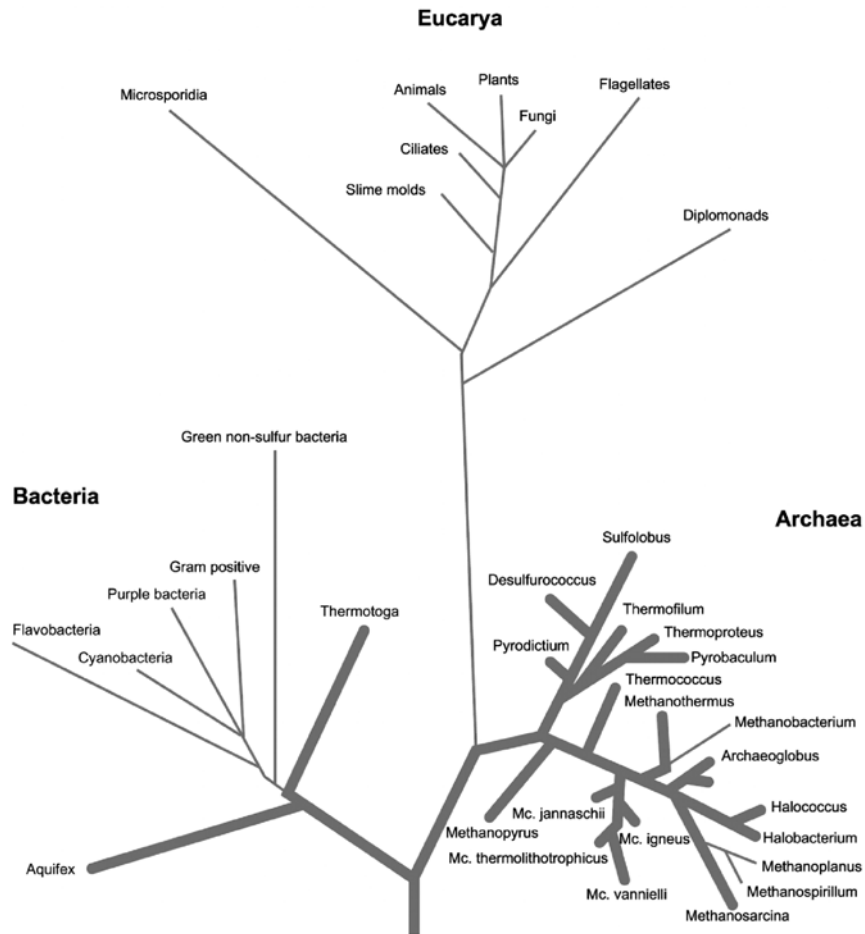


Abbildung 12 Klassischer SSUrRNA Abstands-Stammbaum, dicke Linien entsprechen den hyperthermophilen Organismen.^[357, 358] Die Ordnung leitet sich von der vergleichenden Analyse der Nukleotidsequenz einer universellen Komponente aller lebenden Organismen ab, einem RNA-Molekül in der kleinen Untereinheit der Ribosomen, der SSUr-RNA (SSUr-RNA = small subunit of ribosomes), bei Prokaryonten und Archaea ist dies die 16 S rRNA.

Neben ihrer Anpassung an extreme Umweltbedingungen weist vor allem ihre Stellung im phylogenetischen Stammbaum, der auf dem Konservierungsgrad der 16 S rRNA basiert, interessante Merkmale auf (das S bedeutet Svedberg Einheiten und bezieht sich auf den Sedimentationskoeffizienten mit dem das Molekulargewicht korreliert ist, hier 16 kD). Als Maß für das Alter und den Evolutionsgrad sind einerseits die Entfernung vom Ursprung des Stammbaums und andererseits der Abstand der Äste untereinander sowie deren Länge maßgeblich. Sie entsprechen Abweichungen in der Nukleotidsequenz. Abbildung 12 zeigt eine Darstellung des phylogenetischen Stammbaums. Es ist erkennbar, daß die Hyperthermophilen, vor allem die Archaea ausnahmslos alle kurzen, tief abzweigenden Äste repräsentieren, so daß

sie als sehr ursprünglich und entwicklungsgeschichtlich sehr alt anzusehen sind. An Hand des phylogenetischen Stammbaums werden die Archaea innerhalb der extremophilen Organismen als Urformen der zellulären Organismen betrachtet.^[359] Archaea und Eukarya teilten sich zwar für kurze Zeit einen Zweig des phylogenetischen Stammbaumes,^[355, 360] unterscheiden sich aber bezüglich ihres strukturellen Aufbaus (siehe auch Abbildung 5), in dem die Archaea den grampositiven Bakterien am ähnlichsten sind.^[85]

(I) Extreme Habitate - Extreme Lebensbedingungen

Neben ihrem evolutionären Erfolg, halten Extremophile aus dem Reich der Archaea alle bekannten „Weltrekorde“ für extreme Lebensbedingungen. Heute ist mikrobielles Leben (Archaea) bei 113 °C,^[358] pH Werten von beinahe 0^[361] (Thermoacidophile), Drucken von einigen Tausend Atmosphären^[362] (Barophilie) und gesättigten Salzlösungen bekannt (extreme Halophile)^[363]!! Die maximale Wachstumstemperatur bei welcher mikrobielles Leben existiert, wird mit 113 bis 150 °C angegeben.^[364] Auch kalte Habitate wie die Antarktis mit Wachstumstemperaturen um 0 °C^[157, 365] werden von Archaeen bevölkert (Psychrophilie).^[365] Blöcher et al. zeigten, daß alle Lipidkomponenten eines Extrakts von *Thermoplasma acidophilum* (bei 59 °C und pH 2 kultiviert) Phasenumwandlungstemperaturen zwischen -50 °C und -95 °C aufweisen.^[366] Alle isolierten Lipidkomponenten sind also schon weit unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser im flüssigkristallinen Zustand, der essentiellen Voraussetzung für stoffwechselfreibende und sich vermehrende Organismen.

(I) Welche Strukturmerkmale und Eigenschaften erlauben es diesen Organismen Lebensräume mit extremen Umweltbedingungen zu bevölkern? - Merkmale & Nomenklatur

Aus der Gruppe der Extremophile sind es sicher die Thermoacidophilen deren Lebensraum am meisten von den gewöhnlichen Umweltbedingungen (etwa 0-40 °C und pH Werte von 5,5 – 7,5) abweicht. Die Adaption erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Durch einen hohen Anteil an stabileren G-C Basenpaaren und kovalente Modifikationen erhält die RNA höhere Stabilität, während die DNA durch I-DNA-Topoisomerase in stabiler gefaltete Superstrukturen überführt wird.^[364] Für die Funktion von Proteinen, beispielsweise Enzyme, sind bei erhöhter Temperatur vor allem die Konzentrationserhöhung der Hitzeschockproteine wesentlich. Der Gehalt von Chaperonen kann bei hohen Temperaturen auf über 80 % aller löslichen Proteine steigen.^[364] Auf der Ebene der Zellmembran sind es die schon erwähnten terpenoiden Lipide, die für die besondere Stabilität der Membran verantwortlich sind.

Archaeale Zellmembranen besitzen ein einzigartiges Lipidmuster. Als einzige Organismen weisen sie Membranen auf, die aus Diphytanylglycerindiether- und Dibiphytanylglycerintetraetherlipiden aufgebaut sind.^[367] Die verzweigten Phytanylketten kann

man sich aus 4 Isopreneinheiten abgeleitet vorstellen. Ihre Biosynthese verläuft in extremen Halophilen über ein komplexes membrangebundenes Mevalonat-Enzymsystem, dessen Funktionalität von einem extrem hohem Salzgehalt (4 M NaCl) abhängt. Die vollständige Inhibierung der Fettsäuresynthase (FAS von *engl. fatty acid synthase*) bei dieser NaCl-Konzentration bietet einen Ansatz die entwicklungsgeschichtliche Unterdrückung der Acyllipidsynthese zu erklären.^[368]

Ein weiteres Indiz für eine präferentielle Verwendung von Polyprenyllipiden für entwicklungsgeschichtlich alte zelluläre Systeme, findet man beim Vergleich der Syntheserouten von Acyl- und Polyprenylphosphaten. Betrachtet man die zur Synthese notwendigen Schritte, wird deutlich, daß zur Acyllipidsynthese der Bakterien sehr komplexe sequentielle Schritte notwendig sind - in einer primitiven Umgebung nur schwer zu realisieren.^[369] Die Synthese der Polyprenyllipide kann dagegen durch eine Reihe einfacher Reaktionen realisiert werden.^[370] Die C₅-Einheit (Isopentenol) kann aus Formaldehyd und Isobuten durch eine säurekatalysierte Prinsreaktion beschrieben werden. Deren Reaktion zu Polyprenylgerüsten durch anschließende säurekatalysierte Kondensation. Für den Aufbau einfacher Amphiphile ist eine Einschrittphosphorylierung denkbar.^[369]

Die komplexen Dietherlipide setzen sich dagegen aus Phospholipiden, Glycolipiden, Sulfoglycolipiden und Sulfophospholipiden zusammen.^[371] Tetraetherlipidderivate schließen Phospholipid-, Phosphoglycolipid, Glycolipid- und Sulfoglycolipidkopfguppen mit ein.^[372] Die in methanogenen Archaeen nachgewiesenen Lipide besitzen eine Reihe verschiedener Phospholipide die mit Ethanolamin, Serin, Inositol, N-Acetylglucosamin, Dimethyl- und Trimethylaminopentantetrol und Glucosamininositol derivatisiert sind.^[373] Die Existenz einer solchen Vielfalt ungewöhnlicher Lipidstrukturen läßt auf besondere Funktionen und evolutionäre Beziehungen schließen (siehe oben).

In Abbildung 10 F sind Beispiele für die Hauptlipidkomponenten vieler Archaea gezeigt. Lipide mit Esterbindungen (Phytanoyllipide Abbildung 10 F1) werden häufig für Modellstudien verwendet. Natürliche Beispiele sind aber nicht beschrieben. Phytanoyllipide sind als oberflächengebundene Lipidkomponente für tBLMs problematisch. Im Gegensatz zu den mobilen Lipiden, können sie bei Langzeitexperimenten nicht ausgetauscht werden (z.B. über transvesikulären Lipidaustausch).^[374] Kommt es zur Hydrolyse dieser Verbindungen, entsteht Phytansäure, die über noch nicht im Detail geklärte Prozesse *in vivo* zu neurologischen Schäden, Taubheit und dem Tod führen kann.^[375] Ein Signalcharakter der Phytansäure mit eventueller Wirkung auf Membranproteine kann daher vermutet werden. Zusätzlich führt die Freisetzung von Phytansäure zu einer gesteigerten Protonenleitfähigkeit der Membran und einer unerwünschten Erniedrigung des elektrischen Widerstands.^[376] Auch wenn die

Phosphoresterbindung unter sauren und alkalischen Bedingungen stabiler ist, als die entsprechende Carboesterbindung, sind diese im Gegensatz zum reinen 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerinlipid chemisch instabil.^[377]

Ein starker Einfluß des Hydratationsgrades der Kopfgruppe auf die Packungsgeometrie von Diphytanoylphosphatidylcholin^[378] macht Experimente in Lösungen mit hoher Ionenkonzentration neben generellen Stabilitätsbedenken problematisch. Allerdings scheint dies die Permeabilität für Protonen nicht wesentlich zu beeinflussen.^[379]

Ähnlich den Hauptlipidkomponenten der meisten Säugerzellen, den 1,2-Diacyl-*sn*-glycerinphospholipiden (Abbildung 10 D1), besitzen archaeale Membranen Lipide, die analog den Diacylphospholipiden nur die Hälfte der Membran durchspannen (Diphytanyldiether-Lipide: C₂₀, C₂₅, und 3-Hydroxyderivate), zusätzlich aber je nach Gruppenzugehörigkeit des Organismus auch transmembrane Lipide (Dibisphytanylglycerintetraether-Lipide).

Nach einem Vorschlag von NISHIHARA et al. werden halbmembrandurchspannende archaeale Lipide (Diphytanyldiether-Lipide, Abbildung 10 F 2 und 3) im Englischen als „archaeol“, transmembrane Lipide (Tetraether-Lipide) als „caldarchaeol“ und Nonitolderivate entsprechend als „nonitolcaldarchaeol“ usw. bezeichnet.^[380] Die Stereochemie am Glycerinrest (siehe Abbildung 11) ist bei Archaea-Lipiden invertiert, das heißt, die beiden isoprenoiden Ketten sind an die Positionen 2 und 3 des Glycerins gebunden während sich der Phosphatrest bzw. die verbleibende Hydroxylgruppe an der Position 1 befinden.^[381] Das 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin ist das Hauptlipidmotiv aller archaealen Membranen.^[382]

(I) Zusammenhang zwischen Taxonomie, Lipidklassen und Membranfunktion

Archaea lassen sich auf Grund ihrer Habitate, der damit zusammenhängenden Lipidzusammensetzung, ihrer 16 rRNA-Sequenz und ihrer Zellwandstruktur innerhalb ihres Reiches in taxonomische Gruppen einteilen. Man unterscheidet extreme Halophile (enthalten ausschließlich „archaeol“ Lipide), Methanogene (enthalten „archaeol“ und „caldarchaeol“ Lipide in einem relativen Verhältnis von 2:1 bis 1:1) und Thermoacidophile (enthalten überwiegend „caldarchaeol“ und „nonitolcaldarchaeol“ Lipide mit einem Maximum von 1-10% „archaeol“ Lipiden (Thermoacidophile mit mehr als 99,9 % Tetraetherlipide sind bekannt^[383])).^[367] Zur Anpassung an extrem hohe und niedrige Temperaturen können die Tetraetherlipide mit 0 bis 4 Cyclopentan-^[384] seltener auch Cyclohexanmotiven (Ringschluß zwischen den Methylverzweigungen und der Hauptkette) modifiziert sein.^[385] Trotz einer stärkeren Verdrehung der Ketten werden die Packungsdichte und die Wechselwirkungsenergie erhöht. Dadurch wird die Membran elektrochemisch noch dichter, behält aber gleichzeitig ihre Fluidität auch bei tiefen Temperaturen bei (Beispiel Psychrophile).^[386]

Thermophile Bakterien scheinen demgegenüber ihre Stabilität in erster Line durch langkettige Alkyletherlipide zu gewinnen. Diese weisen aber keine hinreichende Fluidität bei mittleren und tiefen Temperaturen auf!^[357] Außerdem sind sie nicht wie die Thermoacidophilen in der Lage, auch bei hohen Temperaturen ihren Protonengradienten zur Energiegewinnung aufrecht zu halten, wodurch sie gezwungen sind die elektromotorische Kraft der weniger permeablen Natriumionen^[387] als Energiequelle zu nutzen.^[388] Die geringere Temperaturabhängigkeit der Natriumionenpermeabilität und deren weitgehende Lipidunabhängigkeit wirken sich günstig aus.^[389]

Die Tatsache, daß alle archaealen Lipide aus dem gleichen 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-Motiv oder dessen Dimeren aufgebaut sind, legt den Schluß nahe, daß dieses Strukturelement spezielle Funktionen besitzt, die für alle Archaea charakteristisch sind:

- Etherverknüpfungen zwischen Phytanylrest und Glycerin sorgen für eine große chemische Stabilität gegen Hydrolyse bei hohen Temperaturen und einem großen pH Bereich
- Sättigung der terpenoiden Ketten schützt diese vor Oxidation, besonders in extremen Halophilen die dem Luftsauerstoff und der UV-Strahlung ausgesetzt sind
- Kettenverzweigungen verhindern die kristalline Packung der Lipide und stellen sicher, daß sich die Lipide über den ganzen physiologischen Temperaturbereich im flüssigkristallinen Zustand befinden
- Verknüpfung von 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin zu Dimeren und gleichzeitige Einführung von Cyclopentanstrukturen in die hydrophoben Ketten sorgen für eine konstante Fluidität über einen weiten Temperaturbereich
- Die „unnatürliche“ *sn*-1 Konfiguration des Glycerins (Phytanylketten gebunden an Position 2 und 3) verhindert den Abbau der Lipide durch Phospholipasen die durch andere Organismen sezerniert werden

(I) Einfluß der Lipidkopfgruppen und der Kettenbeweglichkeit auf die Ionenpermeabilität

Von besonderer Bedeutung ist aber der Einfluß der verschiedenen Lipidkopfgruppen auf die Ionenpermeabilität der Membran. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß *Thermoplasma acidophilum* nur eine „nackte“ Membran und keine Zellwand besitzt.^[9] Die Membran vermittelt hierbei neben der Diffusionsbarriere auch die mechanische Stabilität der Zelle. Diese Leistung ist um so erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß diese Membranen nicht in reiner Form existieren, sondern zusätzlich Membranproteine zum Beispiel H⁺-ATPasen

enthalten.^[390] Trotz der extrem großen Ionengradienten unterbinden diese Membranen den passiven Ionenfluß weitgehend.

Die Rolle einzelner funktioneller Gruppen innerhalb der Lipidmoleküle wurde an Modellsystemen in Form von Vesikeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß in extremen Halophilen die Lipide mit Sulfatkopfgruppen ausschließlich in der Membranoberfläche vorkommen und für die Weiterleitung und den Transport von Protonen durch die äußere Oberfläche der Purpormembranen (*engl. „purple membrane“*, nach ihrer durch Bakteriorhodopsin gefärbten Membran bezeichnet) verantwortlich sind, wohingegen die Lipide mit Phosphatgruppen beim inneren Transport eine Rolle spielen.^[367]

Liposomen die aus Archaealipiden (makrozyklische Diether- und Tetraetherlipide) präpariert werden, zeigen gegenüber Diphytanoylphosphatidylcholin-Liposomen eine um den Faktor 6-120fach verminderte Permeabilität für Wasser, Ammonium, Harnstoff und Glycerin.^[63] Eine starke Verminderung der Permeabilität konnte auch an Phospholipidmembranen mit hohem Sphingomyelin- und Cholesteringehalt festgestellt werden.^[391] Vergleichende Untersuchungen an Dialkylphospholipiden und 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin zeigen, daß die Wasserpermeabilität praktisch unverändert bleibt und somit keine Änderung beim Austausch der Estergruppe gegen eine Ethergruppe auftritt.^[63] Permeabilitätsstudien belegten, daß die Region der hydrophoben Ketten um die Kopfgruppe einen großen Einfluß auf die Permeabilität für Wasser und gelöste Stoffe besitzt.^[63] Die Region in der Mitte der Membran, an welcher sich die distalen Enden der hydrophoben Ketten befinden, weist die höchste Mobilität auf, weshalb dort eine erhöhte Permeabilität zu erwarten ist. Verwendet man makrozyklische Dietherlipide (*Methanobrevibacter jannaschii*) anstelle der offenkettigen Variante, erniedrigt sich die Permeabilität für Wasser erwartungsgemäß (um den Faktor 5).^[63] Die limitierte Beweglichkeit in der mittleren Kohlenwasserstoffschicht der aus makrozyklischen Diether- und Tetraetherlipiden gebildeten Membranen und der daraus resultierenden reduzierten Permeabilitätseigenschaften dieser Lipidmembranen erklärt diesen Effekt zufriedenstellend.

Die Permeation von Wasser wird allgemein durch die "Mobile-Kink-Theorie" beschrieben, die eine rasche Diffusion kleiner, leerer Taschen durch die Membran postuliert.^[392] Dazu ist die Ausbildung von gauche-trans-gauche Übergängen und deren schnellen lateralen Weiterleitung durch die Membran notwendig. Eine große Reduktion der Permeabilität für Wasser kann daher beim Übergang von DPPC vom flüssigkristallinen in den Gelzustand beobachtet werden. Ein Effekt der durch eine Verminderung der Gauchekonformationen erklärt wird.^[393-396]

Der Einfluß der etherverknüpften Phytanylketten ist für die Reduktion der Ionenpermeabilität von großer Bedeutung. Diphytanoyl-PC-Liposomen weisen eine um den Faktor 3 höhere Protonenpermeabilität auf als die entsprechenden 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-Liposomen, eine attraktive Wechselwirkung von Carbonylgruppen und Protonen wird als Ursache

diskutiert.^[63] Die Gegenwart der makrozyklischen Diether- und Tetraetherstrukturen reduzierte die Protonenpermeabilität auf ein dreizehntel.^[63] Makrozyklische Dietherlipid-Liposomen (isoliert aus *Methanobrevibacter jannaschii*) zeigen gegenüber E. coli-Lipidliposomen eine 35-fach geringere Protonenpermeabilität.^[63] Die Protonenleitfähigkeit über die Membran wird nur schwach von der Fluidität beeinflusst.^[397, 398] Im Gegensatz dazu führt eine Versteifung der äußeren Membran beispielsweise mit Praseodym bei DPPC-Liposomen zu einer signifikanten Reduktion der Protonenpermeabilität.^[393] Die gängigste Theorie zum Protonentransport verwendet daher ein Modell das den Transport der Protonen mit Hilfe von Wasserstoffbrücken verbundenen Clustern von Wassermolekülen (Wasserdrähte) beschreibt, die im hydrophoben Kern der Membran „gelöst“ sind.^[399] Protonen gelangen also über einen „Protonendraht“ durch die Membran für den Wasser in geordneter Struktur vorliegen muß.^[400] Bewegliche Lipide unterbinden solche Strukturen und erhöhen dadurch den Widerstand. Es wird angenommen, daß die Ethergruppen das Wasserstoffbrückennetzwerk zusätzlich stören und dadurch eine Barriere der Protonendiffusion erzeugen.^[63]

Dolichol ist ein langkettiger, aus 20 Isopreneinheiten bestehender Isoprenoidalkohol (ungesättigt).^[401-403] Er kann mit einer Reihe von Sacchariden konjugiert werden.^[404, 405] Durch die Bedeutung der Glyco-Konjugation für die Proteinstruktur hat Dolichol einen wichtigen Einfluß auf die Proteinfunktion.^[191, 406] Dolichol ist für den Schlüsselschritt der N-Glycosylierung verantwortlich, indem es in Form des Oligosaccharid-pyrophosphodolichols (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol)^[407] das Tetradasaccharid auf Asparagin überträgt.^[408, 409] Es fungiert hierbei als membrangebundener Träger des Oligosaccharids^[410] und ist für den transmembranen Transport des Oligosaccharids über die Membran verantwortlich.^[187, 411] Die Steuerung der Synthese und die Funktion des Dolichols sind für viele Organismen essentiell. Störungen in diesen Bereichen sind mit gravierenden pathologischen Zuständen verbunden.^[412-417] Eine weitere wichtige Funktion des Dolichols ist die Aufrechterhaltung des für die zelluläre Energiegewinnung wichtigen transmembranen Ionengradienten.^[418] Durch das Vorhandensein des Dolichols kommt es zu einer Erhöhung der Membrandichtigkeit verschiedener Zellarten.^[418] Im Allgemeinen wird der membranbiophysikalische Einfluß von Dolichol auf Grund seiner geringen Membrankonzentration als gering angesehen.^[370] Neben anderen Polyprenolen kommt Dolichol auch in Pflanzen vor,^[419] da diese N-Glycoside, wie bei den meisten Eukaryonten, über den Dolicholpfad synthetisieren.^[402, 420-423] N-Glycoproteine nehmen in Pflanzen eine Reihe wichtiger Funktionen wahr,^[424-428] die auf diese Weise eng an die Eigenschaften der Lipidmembran geknüpft sind.

Carotinoide gehören zu den isoprenoiden Lipiden. Sie reichern sich in der fluiden Phase an, nicht in der Cholesterinphase^[173]. Ähnlich wie Cholesterin sind sie in der Lage die Membran zu stabilisieren.^[429]

Hopanoide sind pentazyklische Triterpene deren Biosynthese über die Protonierung von Squalen verläuft. Sie sind Bestandteil vielen Mikroorganismen, nicht aber der Archaea. Hopanderivate, die an den Kohlenstoffatomen 32-35 hydroxyliert sind, können in Bakterienzellwänden Cholesterin ersetzen.^[370]

(II) Steroide

Im Rahmen der steroiden Zellmembrankomponenten ist in erster Linie das Cholesterin von Bedeutung.

Durch ihre besonderen biologischen Funktionen z. B. bei der Verdauung, dem Transport von Fettsäuren und ihrem Potential verschiedene, biophysikalisch und biologisch bedeutsame Membranformen (Mizellen und Vesikel) auszubilden, werden hier Gallensäuren ebenfalls beschrieben.

Cholesterin^[430] ist ein essentieller Bestandteil von Säugerzellen und das für die Membranfunktion wichtigste Steroid. Gewöhnlich wird es in Bakterien- oder Pflanzenmembranen nicht oder in bedeutend geringeren Mengen als in Säugerzellen gefunden. Sein Vorkommen ist aber für Mycoplasmen,^[431] der einfachsten Form von Bakterien ohne Zellwand, belegt. Mycoplasmen synthetisieren Cholesterin nicht selbst, sondern beziehen es aus ihrer Umwelt (Wirt).^[432, 433] Als eine der Hauptkomponenten der Membran spielt es eine wichtige Rolle beim Aufbau der Membran und ihrer Permeabilität.^[434] Wichtige Membraneigenschaften die vom Cholesteringehalt der Membran beeinflusst werden^[435] sind im folgenden aufgeführt:

1. Permeabilität der Membran^[434]
2. Phospholipid-Acyllkettenbeweglichkeit^[436]
3. laterale Packungsdichte der Phospholipide (in Monoschichten ermittelt)^[437]
4. laterale Phasenseparation^[438]
5. das effektive freie Volumen von Membranen^[439].

Die letzten beiden Eigenschaften stehen in direktem Zusammenhang mit der Flexibilität von Membranproteinen und daher deren Funktion in Membranen.

Cholesterin fehlt in den meisten Prokaryonten.^[418] Unter der Sammelbezeichnung Phytosterole werden Sterine (Steroide) zusammengefaßt, die aus Pflanzen und Hefen (Mykosterine) isoliert werden können. Sie unterscheiden sich von Steroiden tierischen Ursprungs durch eine Doppelbindung an C-22 und C1- oder C2-Substituenten an C-24. Beispiele für Phytosterole sind: Ergosterin, Stigmasterol, Sitosterol, Fucosterol, Brassicasterol, Fungisterol, Campesterol und Zymosterol.^[201]

Ein weiteres Sterolderivat, dessen Funktion in vielen Lebewesen essentiell ist, ist das Ergosterol. Es konnte gezeigt werden, daß Ergosterol in Hefe für die Aufnahme von Tryptophan notwendig ist. Unterbindet man dessen Biosynthese, wird der Sortierungsprozess innerhalb des sekretorischen Membransystems empfindlich gestört und die Tryptophan Permease Tat2p nichtmehr in die richtigen Kompartimente transportiert.^[440]

Biophysikalisch interessant ist die Ersetzbarkeit von Cholesterin durch Cycloartenol aber nicht durch Lanosterin, die sich nur geringfügig in ihrer Struktur unterscheiden.^[370, 441] Die Methylgruppe an Position 14 scheint im Cycloartenol durch die gebogene Konformation des Gerüsts abgeschirmt zu sein, wodurch eine bessere Packung in der Membran erreicht werden kann.^[442] Andererseits ist beschrieben, daß Cholesterin und Lanosterin beide in der Lage sind, verschiedene Membranphasen zu stabilisieren und eine kollektive Ordnung zu erzeugen. Ihr Einfluß auf die Bildung von Lipidaggregaten bzw. Membrandomänen wird später ausführlich behandelt.^[443]

Daß Cholesterin und Phospholipide unter Flächenkontraktion miteinander wechselwirken ist seit mehr als 75 Jahren bekannt.^[444] Cholesterin zeigt ein stark von der Konzentration und der Membranphase abhängiges Verhalten.^[445] Die Wechselwirkung des Cholesterins mit den übrigen Membranlipiden wird durch die abstoßende Fernwechselwirkung, hervorgerufen durch die von Cholesterin verursachte Störung der hexagonalen Packung der Membranlipide durch die voluminöse Steroidringstruktur, bestimmt. Auf kurze Entfernung ist die attraktive Wechselwirkung von Cholesterin mit den Phospholipid-Acyllketten entscheidend. Cholesterin paßt sich der Membranstruktur hervorragend an und ist in der Lage Membranzwischenräume auszufüllen. Messungen zeigen, daß der A-Ring des Cholesterins bei Temperaturen zwischen 10 °C und 50 °C 1,5 nm bis 1,6 nm vom Zentrum der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist.^[446] Das bedeutet, daß Cholesterin eine Membranhälfte komplett durchspannt. Die Lokalisation des Cholesterins hängt vom Grad der Anzahl der Doppelbindungen und deren Verteilung in den beiden Ketten ab. In Membranen aus 16:0-18:1 PC, 18:1-18:1 PC und 18:0-20:4 PC ist die OH-

Guppe etwa 1,6 nm von der Membranmitte entfernt.^[447] Die Schwankungen für die Lokalisation des Cholesterins liegen für die angegebenen drei Lipide bei etwa 0,05 nm und die Hydroxylgruppe des Cholesterins kommt in diesen Fällen in der hydrophob/hydrophilen Grenzfläche zu liegen. Der Steroidrest des Cholesterins rotiert schnell entlang der molekularen Achse und präzediert dabei mit leicht schwankenden Winkeln relativ zur Doppelschichtnormalen.^[448] In 20:4-20:4 PC Lipiddoppelschichten kommt es aufgrund der hohen Unordnung der Acylketten zu einer Abnahme der Membrandicke^[449] die eine senkrechte Orientierung des Cholesterins ohne Störung (Insertion) der gegenüberliegenden Membranhälfte ausschließt. Neutronenstreuexperimente legen die Vermutung nahe, daß sich die Hydroxylgruppe in der Membranmitte (zwischen den beiden Membranhälften) befindet, und das ganze Molekül flach in diesem Bereich zu liegen kommt.^[447] Es führt zu einer dichteren Membranpackung und erniedrigt dadurch die passive elektrische Leitfähigkeit und die Wasserpermeabilität.^[450] Der damit in Zusammenhang stehende Einfluß auf die Fluidität der Membran hängt von der Lipidzusammensetzung ab. So erhöht sich die Fluidität für Phosphatidylethanolamin, während sie für Phosphatidylcholin abnimmt.^[451] Das Löslichkeitslimit für Cholesterin liegt in PC-Membranen bei 66 %, in PE-Membranen bei 51 %.^[452] In gemischten PC/PE-Membranen besitzt es eine höhere Affinität für PC.^[453]

Die einzelnen Schritte der notwendigen Translokation des Cholesterins für den Einbau in Membranen sind nicht beschrieben. Der überwiegende Stoffwechseltransport findet über Lipoproteinaggregate (Chylomikronen, VLDL, LDL und HDL) statt. In biologischen Systemen sind auch ABC1-Transporterproteine am Transport von Cholesterin beteiligt.^[454]

Gallensäuren, die zur Gruppe der Steroide gehören, besitzen als C-24-Carbonsäuren ein gesättigtes Cyclopentanophenanthren-Grundgerüst. Die A/B Ringe sind cis-verknüpft, die Ringverknüpfungen zwischen den B/C und den C/D Ringen weisen trans-Konfiguration auf. Daher gehören die Gallsäuren wie auch die Cholesterinderivate zu der Klasse der 5 β -Cholestane.^[455] Gallsäuren sind Hydroxyderivate der nicht natürlich vorkommenden Cholansäure mit ein bis drei Hydroxylgruppen an den Positionen C-3, C-7 und C-12. Die beiden Methylgruppen an den C-10 und C-13 Positionen sowie die Seitenkette an der C-17 Position sind β -ständig.^[456]

Auf Grund ihrer polyzyklischen Struktur und der besonderen Verteilung der Carboxyl- und Hydroxylfunktionen (diese bilden auf einer Seite des Ringsystems eine hydrophile Oberfläche aus) besitzen Gallensäuren interessante Grenzflächeneigenschaften die eine Reihe besonderer Phasenumwandlungen verschiedener Membranformen erlauben (siehe unten).

Den Gallensäuren kommt eine zentrale Rolle bei der Fettverdauung zu. Sie vermitteln die Dispergierung, enzymatische Spaltung und den Transport der Fette und deren Abbauprodukte.

Durch die Rückresorption aus dem enterohepatischen Kreislauf müssen täglich nur ca. 0,5 g der im menschlichen Körper vorhandenen 3-5 g Gallensäure durch *de-novo*-Synthese in den Hepatozyten aus Cholesterin synthetisiert werden.^[457]

Obwohl die wesentliche Bedeutung der Gallsäuren auf der Fettverdauung liegt, ist ihre Erwähnung bei der Betrachtung von Lipidmembranen von Bedeutung. Da sie in der Lage sind Lipidmembranstrukturen auszubilden, die den in Kapitel 3.2 beschriebenen Bicells ähnlich sind, stellen sie eine interessante natürliche Lipidvariante für natürliche und artifizielle Membransysteme dar.

3.1.2.4 Biophysikalische Eigenschaften der Lipide und der resultierenden Membranen

Die in Kapitel 3.1.2.3 vorgenommene Einteilung der Lipide, die auf ihrem chemischen Aufbau, der biosynthetischen Verwandtschaft und den daraus folgenden biologischen Eigenschaften beruht, erlaubte es den Bezug zwischen den chemischen Eigenschaften der Lipide, ihrer Synthese, biologischen Funktion und dem jeweiligen Organ(nell) bzw. Organismus herzustellen. Für die Funktion der Zelle sind zusätzlich die physikalisch-chemische und die stereochemische Korrelation der Lipideigenschaften der Schlüssel für das Verständnis des biophysikalischen Lipidverhaltens. Deren Kenntnis ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer verbesserter Membranmimikrie.

Entsprechend ihrer molekularen Vielfalt und Multifunktionalität üben Lipide nicht nur auf die zellulären Regulationsmechanismen, sondern auch aufeinander und die aus ihnen aufgebauten supramolekularen Lipidaggregate/Membranen vielfältige Wechselwirkungen aus. Diese sind im wesentlichen von den hydrophoben Ketten und der polaren Kopfgruppe – also dem amphiphilen Charakter– und dem geometrischen Verhältnis der beiden Molekülteile bestimmt.

Der aus dem Griechischen abgeleitete Begriff „*amphiphil*“ steht nach HARTLEY^[458] für Substanzen, die sowohl lipophile Kohlenwasserstoffgruppen als auch polare, hydrophile Molekülgruppen ionischen oder nichtionischen Charakters tragen.^[459]

SMALL^[460, 461] und CAREY^[462] teilten die heterogene Klasse der Lipide auf Grund ihrer Polarität sowie ihres Löslichkeits- und Quellverhalten in Wasser wie folgt ein:

Biophysikalische Lipideinteilung

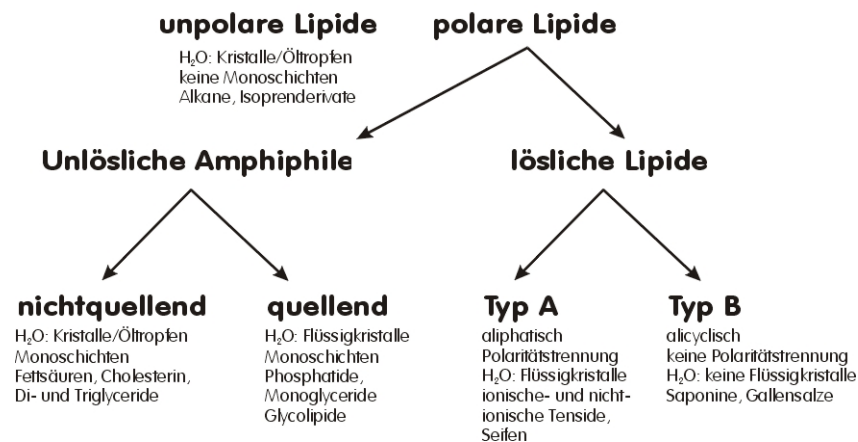


Abbildung 13 Einteilung der Lipide nach SMALL und CAREY^[461, 463]

Der Transfer von Lipiden in ein wässriges Medium führt zu einer energetisch ungünstigen Entropieabnahme und einer positiven Enthalpie.^[464]

Die Fähigkeit der Amphiphile untereinander stabile dreidimensionale Superstrukturen durch nichtkovalente Wechselwirkungen einzugehen (auch supramolekulare Verbindungen genannt), macht es notwendig sich mit deren Eigenschaften und Verhalten zu beschäftigen, um biomimetische Membranen im tBLM-Format zu konstituieren. In Abhängigkeit vom umgebenden Lösungsmittel kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher zwei- und dreidimensionaler Strukturen. Hierbei wird die Grenzflächenenergie minimiert, wobei sterische und elektrostatische Effekte neben der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen die Aggregatbildung beeinflussen. Neben den Wechselwirkungen der Amphiphile untereinander ist die strukturelle Änderung des Solvensgitters um die einzelnen aggregierenden Moleküle und die finalen Aggregate für die Änderung der freien Enthalpie des Gesamtsystems zu berücksichtigen.

Wasser, das die biologischen Amphiphile am häufigsten umgebende Medium, bildet ein molekulares Netzwerk mit Tetraederstruktur aus. In der Umgebung der Lipidmoleküle wird es zu einer Umorientierung mit einer geringstmöglichen Einbuße an Wasserstoffbrückenbindungen gezwungen. Dies ist notwendig, da es mit dem hydrophoben Molekülteil der Amphiphile nicht unter einer Energieminimierung wechselwirken kann, wie

dies bei der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerks mit anderen Wassermolekülen der Fall ist.^[465] Bei Raumtemperatur ist der Entropiegewinn als dominante Größe der freien Enthalpie die treibende Kraft der Selbstaggregation da die Enthalpie nahezu null ist. Erhöht sich die Temperatur tritt hingegen der Enthalpieterm in den Vordergrund,^[466] ein Phänomen, das als „hydrophober Effekt“ bezeichnet wird.^[467, 468] Ein Alkan mit n Kohlenstoffatomen kann sein chemisches Potential um einen Betrag von

$$\Delta\mu \approx 10,2 + 3,7 \cdot n \text{ kJ Mol}^{-1}$$

erniedrigen, wenn es von der wässrigen in die organische Phase gelangt.^[468] Zur Energieminimierung richten sich die Amphiphile an der Wasser-Luft-Grenzfläche aus um dieser Entropieabnahme entgegenzuwirken.^[468] Dies führt zu einer Anreicherung der Amphiphile an der Grenzfläche. Dabei bilden sich Monoschichten mit maximaler Packungsdichte aus.

Wird die Konzentrationserhöhung über eine für jedes Amphiphil charakteristischen Konzentration hinaus erhöht, führt dies zu dessen Selbstaggregation.^[469] Die treibende Kraft ist die Minimierung der freien Energie die durch die Abschirmung der hydrophoben Molekülstrukturen der Amphiphile vom Wasser erzielt wird. Dabei treten entgegengesetzte Kräfte mit unterschiedlichen Reichweiten auf:^[470]

<i>van der Waals</i> -Anziehung	(~150 Å)
Elektrostatische Abstoßung	(~25 Å)
Hydrophile abstoßende Solvatationskräfte	(~30 Å)
Hydrophobe anziehende Solvatationskräfte	(~60 Å)

Zusammen sorgen die genannten Kräfte für die Ausbildung von Assoziaten wie Vesikeln, Membranen, Mizellen und Monoschichten. Die zur Ausbildung der verschiedenen Lipidaggregate wichtigen Faktoren werden im folgendem beschrieben.

3.1.2.4.1 Biophysikalische Eigenschaften der Membran - Molekülgeometrie

Die Art der Packung von Amphiphilen übt einen großen Einfluß auf die Eigenschaften von Lipiddoppelschichten aus.^[275] Durch die Anordnungsmöglichkeiten der Lipide sind vielfältige

supramolekulare Aggregate möglich, die im wesentlichen von der geometrischen Struktur der Amphiphile, deren funktionellen Gruppen und der Art, der Konzentration und der Temperatur des Lösungsmittels abhängen. Die membranartige Lipidanordnung entspricht bezüglich ihrer Struktur der smektischen Phase der Flüssigkristalle.^[471] Grundlegend können membran- und mizellenbildende Amphiphile unterschieden werden.

Die Aggregatstruktur wird durch die folgenden geometrischen Größen parametrisiert: Die Länge l und das Volumen V des lipophilen Molekülteils sowie die Querschnittsfläche A der hydrophilen Kopfgruppe. ISRAELACHVILI definierte aus diesen Größen den Packungsparameter PP:^[472]

$$PP = \frac{V}{A \cdot l}$$

Gleichung 1

Die geometrische Packung der Amphiphile ist von deren molekularem Aufbau und der damit verbundenen spontanen Krümmung abhängig (Abbildung 14).^[472] Tragen die Amphiphile ionische Gruppen wird die Struktur und der Phasenzustand zusätzlich von deren Ladung beeinflusst.^[473]

Amphiphile die sphärische und zylindrische (stäbchenförmige Röhren) Mizellen bilden sind durch verhältnismäßig große voluminöse Kopfgruppen im Verhältnis zum lipophilen Molekülteil gekennzeichnet. Sie weisen einen Packungsparameter PP von kleiner $\frac{1}{3}$ auf. In erster Linie bilden sie sphärische und zylindrische Aggregate mit kleinen Krümmungsradien.^[474] Beispiele für Lipide die in reiner Form auf Grund ihrer inversen Kegelgeometrie bevorzugt sphärische und zylindrische Mizellen bilden sind Lysophospholipide (z.B. LPC, LPE u. a.), freie Fettsäuren (z.B. Ölsäure und Stearinsäure) und Detergenzien (z. B. SDS).

Membranbildende Amphiphile haben hingegen PP die zwischen $\frac{1}{2}$ und 1 liegen und eine zylinderförmige Gestalt aufweisen. Ihr PP ist für die Ausbildung von Mizellen zu groß. Es werden planare Doppelschichten ausgebildet, die sich zur Vermeidung der Exposition energetisch ungünstiger hydrophober Kanten zu Vesikeln mit großem Krümmungsradius zusammenschließen. Zwei Einteilungen können vorgenommen werden: 1. Lipide die einen PP aufweisen der kleiner als 1 ist (0,5-1). 2. Lipide deren PP nahezu 1 ist.

Erstere bilden bevorzugt flexible Lipiddoppelschichten aus. Beispiele sind doppelkettige Lipide mit großer Kopfgruppenfläche und fluiden Ketten (z. B. PC, PS, PG, PI, PA, SPM). Lipide mit einem PP von 1 bilden planare Lipiddoppelschichten aus. Zu dieser Gruppe gehören doppelkettige Lipide mit kleiner Kopfgruppenfläche und fluiden Ketten, und anionische Lipide mit gesättigten Ketten: PE, PS+Ca²⁺.

In einem gewissen Rahmen können sich Lipide allerdings an die geometrischen Gegebenheiten der Membran anpassen. Durch Krümmung der Membrane, wie sie bei Vesikeln auftritt, ergeben sich für die Lipide beträchtliche Änderungen ihres Platzangebotes. Durch die sphärische Form eines Vesikel mit 198 Å Durchmesser liegt die asymmetrische Fläche, die für die Kopf- und Schwanzgruppe von EiPC-Lipid in der äußeren Membran zur Verfügung steht, für den Lipidkopf bei durchschnittlich 74 Å² und für das hydrophobe Ende bei 46 Å². In der inneren Membran nimmt die Lipidkopfgruppe eine Fläche von 61 Å² und das hydrophobe Ende eine Fläche von 97 Å² ! ein.^[475]

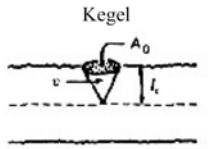



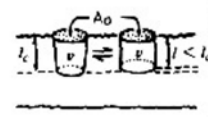
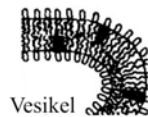
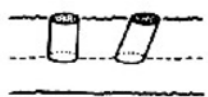
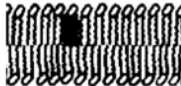
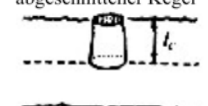

Packungsparameter	Packungsform	Aggregatstruktur
$PP < 1/3$	Kegel 	sphärische Mizellen 
$1/3 < PP < 1/2$	abgeschnittener Kegel 	zylindrische Mizellen 
$1/2 < PP < 1$	abgeschnittener Kegel 	flexible Bilayer Vesikel 
$PP \sim 1$	Zylinder 	planare Bilayer 
$PP > 1$	umgekehrter abgeschnittener Kegel 	inverse Mizellen 

Abbildung 14 Packungsformen in Abhängigkeit vom Packungsparameter mit Darstellung der geometrischen Aggregatstruktur (adaptiert nach^[61])

Interessanter Weise reichen auch scheinbar kleine strukturelle Variationen wie endständige Verzweigungen aus, um die strukturelle Anpassung zu verändern und die thermische Stabilität der Membran drastisch zu erhöhen.^[476]

PE ist im ungesättigten Zustand konisch geformt (der Lipidteil ist größer als die Kopfgruppe) und destabilisiert planare oder sphärische Lipiddoppelschichten während PC durch eine nahezu zylindrische Form besonders die Bildung planarer Membranen fördert.^[477] Lipide mit konischer Geometrie (abgeschnittener Kegel) findet man unter den doppelkettigen Lipiden mit kleiner Kopfgruppenfläche und fluiden Ketten, nichtionischen Lipiden und Lipiden mit polyungesättigten Ketten: PE (ungesättigt), PA+Ca²⁺, PS (pH<4) und Cholesterin.^[474] Sie bilden bevorzugt inverse Mizellen aus.

Die durch die Geometrie der einzelnen Lipide bedingte Aggregatstruktur kann sich bei der Verwendung von Lipidmischungen stark ändern. Untersuchungen haben gezeigt, das der Packungsparameter additiv ist.^[478] Das bedeutet, daß sich verschiedene Kopfgruppengeometrien in Abhängigkeit von ihrem Anteil in der Mischung ausgleichen können. So ist es möglich durch mischen von LysoPC, und Cholesterin oder PE, bei stöchiometrischer Mischung Lipiddoppelschichtstrukturen zu erhalten.^[479-482]

Diacylcholine mit einem PP von < 0,74 bilden keine Lipiddoppelschichten aus. Mit einer Kettenlänge von 8 Kohlenstoffatomen bildet DiacylPC nur Mizellen. Homologe mit einem PP > 0,74 (Kohlenstoffketten mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen) bilden Lipiddoppelschichten aus.^[483-485]

Für eine Anwendung in biomimetischen Membranformaten darf der Packungsparameter definierte Bereiche nicht verlassen, und die Phasenübergangstemperatur der Lipide (Übergang vom gelanalogen zum flüssigkristallinen Zustand) muß unterhalb der Arbeitstemperatur liegen. Der flüssigkristalline Zustand, in dem sich die Membrankomponenten im fluiden Zustand befinden, ist notwendig um Defekte auszuheilen,^[486] die Vesikelfusion und die laterale Diffusion zu ermöglichen, und Membranproteine funktionell einbauen zu können.

Für spacermodifizierte Lipide ist das geometrische Verhältnis des hydrophoben Molekülteils zum hydrophilen Kopfgruppen- bzw. Spacerteil eine wichtige Größe. Im Gegensatz zu Vesikeln ist hier der formgebende Einfluß nicht zwangsweise durch das geometrische Verhältnis vorgegeben da die Ankerdichte auf dem Substrat die molekularen Abstände mitbestimmt. Das Verhältnis des hydrophoben Molekülteils zum hydrophilen Kopfgruppen- bzw. Spacerteil definiert zusammen mit der Ankerdichte den nicht durch Tether bzw. Spacer eingenommenen Submembranraum.

3.1.2.4.2 Einfluß und Eigenschaften der hydrophoben Ketten

Neben der Geometrie des Amphiphils, der Kopfgruppe, und der Natur der chemischen Bindung zwischen der Kopfgruppe und den hydrophoben Ketten, bestimmen insbesondere die Länge sowie Art und Anzahl der funktionellen Gruppen innerhalb des hydrophoben Molekülteils die Temperatur des Phasenübergangs und damit die Membraneigenschaften.

In natürlichen Membranen kommen nur definierte Lipidkettenlängen vor. Da die Fettsäuresynthese enzymatisch verläuft, liegt ihr eine große Spezifität in der Synthese unterschiedlich langer Fettsäuren zugrunde. Verschiedene Organismen besitzen Synthasen die gezielt C₁₆- oder C₁₈-Ketten aufbauen.^[487] Ab C₁₂ tritt mit wachsender Konzentration verstärkt Substratinhibition ein. Die Freisetzung der Fettsäuren verläuft unter der Beteiligung der über einen Linker kovalent an die Fettsäuresynthase gebundenen Thioesterase.^[488] Am effektivsten verläuft die Fettsäuresynthese der humanen Fettsäuresynthase für Kettenlängen mit C₁₄₋₁₆. Eine optimale Spezifität wird für C₁₆ erreicht.^[489] In vielen onkologischen Befunden wird eine verstärkte Expression der humanen Fettsäuresynthase in dem entsprechenden Gewebe festgestellt.^[489]

Fettsäuren/Diacyllipide mit einer Kettenlänge von mehr als 22/24 Kohlenstoffatomen (Behensäure (C_{22:0}, Smp. 80 °C) und Lignocerinsäure (C_{24:0}, Smp. 84 °C)), besitzen in biologischen Systemen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Membraneigenschaften eine untergeordnete Bedeutung. Jedoch sind für langkettige isoprenoide Verbindungen, wie z.B. Dolichol, bedeutende physiologische und membranbiophysikalische Funktionen bekannt (siehe oben). Fettsäuren/Diacyllipide mit weniger als 10 Kohlenstoffatomen Kettenlänge besitzen ebenfalls eine untergeordnete Rolle für den Aufbau biologischer Membranen.^[490] Nach DEAMER müssen die Kohlenwasserstoffketten von Lipiden mindestens 10 Kohlenstoffatome lang sein, um Membranen ausbilden zu können.^[491] Für kürzere Ketten ist der Energiegewinn durch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Ketten zu gering, um eine stabile Lipiddoppelschicht auszubilden. Betrachtet man den Zusammenhang zwischen den Membrangeometrien und dem Packungsparameter, wird deutlich, daß die Bildung von Lipiddoppelschichten mit kurzen Alkylketten aus geometrischen Gründen nicht auftritt.

Ausbildung von Membranen reiner Fettsäuren und Fettsäure/Alkohol-Mischungen

Obwohl der in der Lipiddoppelschicht der biologischen Membran vorhandene Anteil an einkettigen, hydrophoben Membranbestandteilen gering erscheint, ist es für das Verständnis des Membranverhalten hilfreich, die Fähigkeit reiner Fettsäuren in Hinblick auf die Ausbildung von Membranaggregaten zu betrachten. Hierzu ist es hilfreich in Analogie zur CMC die CBC (kritische Doppelschichtkonzentration, engl. *Critical Bilayer Concentration*) einzuführen, um

die Konzentration an Amphiphilen zu definieren, bei der Doppelschichtvesikel gebildet werden. Oberhalb der CBC bilden Fettsäuren mit Kettenlängen von C₈-C₁₈ mit unterschiedlicher Zahl an Doppelbindungen spontan Vesikel, wenn die Fettsäuren im wässrigen Medium bei pH Werten nahe ihres pK_a Wertes suspendiert sind.^[492] Die Strukturen sind dabei durch Wasserstoffbrücken zwischen protonierten und deprotonierten Carboxylgruppen stabilisiert,^[493-495] und im dynamischen Gleichgewicht mit einzelnen Molekülen und Mizellen. Der Zusatz weiterer grenzflächenaktiver Verbindungen ändert die physikalischen Eigenschaften dieser Membranen.^[496, 497] Werden *n*-Acylcarboxylate mit *n*-Alkoholen der gleichen Kettenlänge gemischt, wird die CBC erniedrigt, und der pH Bereich innerhalb dessen Doppelschichten unter alkalischen Bedingungen stabil sind erweitert. Der Alkoholeffekt wird nur innerhalb eines schmalen Bereiches für das Molverhältnis zwischen Fettalkohol und Fettsäure beobachtet (für C₈-C₁₁ etwa 1:10).^[492] Unterhalb dieses Wertes wird der stabilisierende Effekt des Alkohols zu gering, während sich oberhalb dieses Wertes Tröpfchen des Alkohols bilden.

Tabellarische Auflistung der Lipidübergangstemperaturen der „homologen Reihe der Fettsäuren und ihrer Acyllipide“

In

Tabelle 1 wird die Abhängigkeit der Phasenumwandlungstemperatur und des Schmelzpunktes von der Kettenlänge und der Anzahl der in der hydrophoben Kette vorhandenen Doppelbindungen (Zahl nach dem Doppelpunkt unter der Spalte „*Kurzform*“ C_{X:Y}) sowie der Kopfgruppenchemie in einer systematischen Auflistung gezeigt.

Die Aufstellung beginnt mit der biologisch interessanten Laurylserie (C₁₂) und erstreckt sich bis zu einer Kettenlänge von C₂₀. Die biologisch seltenen Acylketten mit ungerader Kettenlänge sind zum Vergleich angegeben, wo sie verfügbar waren. Sie zeigen den von der homologen Reihe der Alkane bekannten Temperaturverlauf in qualitativ vergleichbarer Weise. Die Schmelz- und Phasenumwandlungstemperaturen liegen für diese unterhalb der Werte ihres geradzahligem Vorgängerhomologes.

Die Phytanyl/oyl-Derivate sind in Tabelle 1 auf Grund fehlender Literaturdaten für vergleichbare Motive nicht in dieser Tabelle aufgeführt. Für die meisten dieser Amphiphile liegt die Phasenumwandlungstemperatur weit unter -40 °C. Auf die in besonderer Weise die Membran stabilisierenden, und Fluidität vermittelnden Diphytanylglycerin-Lipide, wird in diesem Zusammenhang in Kapitel 3.1.2.3.2 eingegangen.

<i>Trivial/name des Acylrests</i>	Kurzform	Smp. [°C] d. freien Säure	Tg [°C] PC-Derivat	Tg [°C] PE-Derivat	Tg [°C] LysoPC
<i>Lauroyl-</i>	C _{12:0}	44,2 ^[65]	-1,8 ^[498] bis 0 ^[453]	29,0 ^[453] bis 30,5 ^[499]	-
Tridecanoyl	C _{13:0}	41,5 ^[65]	-	-	-
<i>Myristoyl-</i>	C _{14:0}	53,9 ^[65]	23 ^[453] bis 24 ^[500]	47,5 ^[453] bis 49,9 ^[500]	-
Pentadecanoyl-	C _{15:0}	52,3 ^[65]	33,7 ^[501] bis 34,2 ^[502]	-	-
<i>Palmitoyl-</i>	C _{16:0}	63,1 ^[65]	41,2 ^[501] bis 41,6 ^[503]	60 ^[453] bis 69 ^[504]	3,0 ^[505] bis 3,4 ^[506]
<i>Palmitoleoyl-</i>	C _{16:1(9c)}	-0,5 ^[65] bis 0,5 ^[65]	-36 ^[453]	-33,5 ^[453]	-
<i>Margaroyl-</i>	C _{17:0}	61,3 ^[65]	47,8 ^[507] bis 48,6 ^[502]	-	-
<i>Stearoyl-</i>	C _{18:0}	69,6 ^[65]	53,7 ^[508] bis 58,24 ^[509]	74 ^[510] bis 75,5 ^[511]	26 ^[512] bis 27 ^[513]
<i>α-Oleoyl-</i>	C _{18:1(9c)}	13,4 ^[65]	-22 ^[514] bis - 14 ^[453]	-16 ^[453]	-
<i>Linoleoyl-</i>	C _{18:2(9c, 12c)} C _{18:2(9t, 12t)}	-5 ^[65] 28-29 ^[200]	-	-	-
<i>Linolenoyl-</i>	C _{18:3(9c, 12c, 15c)}	-14 ^[200]	-	-	-
<i>Arachinoyl-</i>	C _{20:0}	76,5 ^[65]	64,1 ^[500] bis 64,8 ^[515]	81,1 ^[500] bis 82,5 ^[510]	-
<i>Arachidonoyl-</i>	C _{20:4(5c, 8c, 11c, 14c)}	-49,5 ^[516]	-	-	-

Tabelle 1

Tabelle der Phasenumwandlungstemperaturen verschiedener Acylgruppen (bzw. deren freien Säuren) der Membranphospholipide pro- und eukaryontischer Zellen: Phasenumwandlungstemperaturen von Fettsäuren und ihren 1,2-Diacyl-sn-glycerin-3-(X)-Derivaten^[65] (mit X=PC, PE oder LysoPC (1-Acyl-2-Lyso-sn-glycerin-3-PC)). Ist mehr als ein Zahlenwert angegeben, findet man in der Literatur variierende Zahlenwerte. In diesem Fall sind die niedrigsten und höchsten Werte angegeben.

Vergleicht man DialkyletherPE-Lipide in

Tabelle 1 mit den entsprechenden Acylverbindungen, stellt man fest, daß Art der Bindung zwischen hydrophoben und hydrophilen Molekülteil ebenfalls einen Einfluß auf die Phasenübergangstemperatur besitzt. Die Etherderivate mit den Kettenlängen C12 und C14 besitzen im Gegensatz zu den Acylderivaten eine um ca. 5 °C höhere Phasenumwandlungstemperatur.^[65]

Tabelle 1 zeigt, daß nicht nur Acylgruppen, sondern auch Lipide mit einer ungeraden Zahl an Kohlenstoffatomen im Verhältnis zu Lipiden mit einer geraden Zahl an Kohlenstoffatomen eine niedrigere Phasenumwandlungstemperatur aufweisen.

Die Anwesenheit von Doppelbindungen innerhalb der Ketten erniedrigt die Phasenumwandlungstemperatur stark. Am Beispiel der Linolsäure wird deutlich, daß der große sterische Platzbedarf und die schlechteren Packungsmöglichkeiten der hydrophoben Ketten mit cis-Doppelbindungen ($C_{18:2(9c, 12c)}$), im Gegensatz zum trans-Derivat ($C_{18:2(9t, 12t)}$), zu einer Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperatur von mehr als 20 °C führt. Trotz dieser vorteilhaften Eigenschaft (niedrige Phasenumwandlungstemperaturen ermöglichen fluide Membranen bei tieferen Temperaturen) eignen sich Lipide mit ungesättigten Acylketten nicht für den Aufbau von langzeitstabilen tBLMs. Ungesättigte Acylketten unterliegen der chemischen Veränderung durch Oxidation und Polymerisation (letztere bei hoher Konzentration an ungesättigten Acylketten), wodurch sich die Membraneigenschaften in einer nicht vorhersagbaren Weise ändern können.^[200, 294] Zusätzlich sind Abbauprodukte von Phospholipiden wie γ -Linolensäure in Regulationsmechanismen eingebunden. γ -Linolensäure (engl. *gamma-linolenic acid (GLA)*) bewirkt eine Erniedrigung von γ -Interferon (IFN-gamma; γ -IFN), dem chemotaktischen Monocytenprotein-1 (engl. *monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)*) und eine Erhöhung der Konzentration des Tumornekrosefaktors (engl. *tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)*).^[205] Daneben ist ein deutlich reduzierter Lipidspiegel polyungesättigter Fettsäuren (engl. *PUFA: polyunsaturated fatty acids*) bei autistischen Menschen festgestellt worden.^[206] Im Zuge dieser Erkenntnisse wird die Erforschung der Zusammenhänge zwischen Nervenzellmembraneigenschaften und höheren Gehirnfunktion auf molekularer Ebene neu motiviert.^[206]

Die Geometrie bzw. die Stereochemie der hydrophoben Ketten ist neben den Eigenschaften der Kopfgruppe bei der Vermittlung der Fluidität ein entscheidender Parameter.

Im fluiden flüssigkristallinen Membranzustand sind die Lipide mobil, das heißt die Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Ketten ist gegenüber dem gelanalogen Zustand verringert. Im gelanalogen Zustand liegen die Alkylketten der Lipide in der energetisch

Unter den Membranlipiden findet man ungeladene und geladene Lipide. Im biologischen Milieu tragen fast alle Phospholipide an ihrer Phosphatidylgruppe eine negative Ladung. Ausnahmen bilden hinreichend saure Milieus und modifizierte Phospholipide. Archaea besitzen neben Phospholipiden auch ungeladene Etherlipide ohne Phosphatfunktionalität. Das kopfgruppeninduzierte Verhalten von PC und PE besitzt durch deren Rolle als Hauptkomponenten der Säugermembranen großes Interesse. Das Studium der Mischbarkeit unterschiedlich langer PE zeigt, daß PE durch die geringere Wechselwirkungsenergie einen kleineren Nichtidealitätsfaktor ρ besitzen als PC.^[520] Der „Nichtidealitätsfaktor“ ρ ist ein Maß für die bei der Paarwechselwirkung der Lipidkopfgruppen hydratisierter Membranen freiwerdende Energie. Er steigt in der Reihenfolge Phosphatidsäure (PA) < Phosphatidylethanolamin (PE) < Phosphatidylcholin (PC) \approx Phosphatidylglycerin (PG).^[521] Große Unterschiede gibt es beim sterischen Platzbedarf der Lipidkopfgruppen. Sie reichen von $71,7 \text{ \AA}^2$ für PC und LysoPC, 42 \AA^2 für PE bis zu 19 \AA^2 für Cholesterin.^[522, 523]

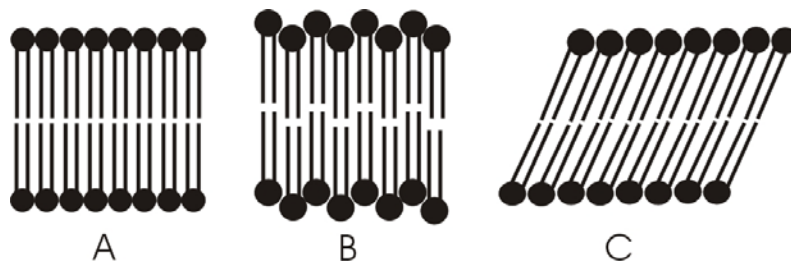


Abbildung 17 Verschiedene Packungsadaptionen in den lamellaren Mesophasen

Der Einfluß der Kopfgruppengröße auf die molekulare Anordnung der Lipide ist in Abbildung 17 gezeigt. Am Beispiel von PE und PC wird der Einfluß einer kleinen Kopfgruppe (PE) und einer großen Kopfgruppe (PC) ersichtlich. Thermotrophe Phasenumwandlungen der Lipidspezies (siehe Kapitel 3.1.2.4.4) verlaufen auf Grund der verschiedenen großen Kopfgruppen unterschiedlich. PE erlaubt durch seine geringe Kopfgruppengröße eine dichtere Packung (Abbildung 17 A). Dagegen verlangt eine vergleichbare Packungsdichte der PC-Acyllketten die Delokalisierung der Lipide. Durch versetzte Anordnung der Lipide, die der in Kapitel 3.1.2.4.4 als „gerippten“ Phase bezeichneten Anordnung entspricht (Abbildung 17 B), können die Acylyketten trotz der großen Kopfgruppe intensiv miteinander wechselwirken. Eine andere Alternative die Acylyketten trotz der großen PC-Kopfgruppe in engeren Kontakt zu bringen, ist in Abbildung 17 C gezeigt. Hier wird durch die Neigung der Lipidketten eine dichtere Packung der Acylyketten erzielt.

Neben PC und PE sind die beiden negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerin in eukaryontischen Membranen für die Funktionalität vieler Membranen

(insbesondere der Nervenzellen) entscheidend. Es sind vor allem die negativ geladenen Lipide die plasmamembrangebundene Phospholipase C aktivieren.^[524] Die Ladung spielt auch für die Translokalisierung von Phosphatidylserin auf die extraplasmatische Membranseite zur Eliminierung apoptotischer Zellen durch die Vermittlung von sogenannten Scramblasen eine Rolle.^[525] Dies gilt ebenfalls für die Wechselwirkung von Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerin mit Transportproteinen. Auf Grund struktureller Unterschiede und der unterschiedlichen Ladungsverteilung ist die Wechselwirkung der beiden Moleküle mit dem Transporter nicht gleichstark ausgeprägt.^[526] PG selbst ist in der AcetylCoA-Synthaseaktivierung involviert.^[527] Schließlich ergeben sich auch für die Verteilung der Lipide in der Membran Unterschiede. Die Mischbarkeit von Phospholipiden mit identischen Kopfgruppen, aber Kettenlängenunterschieden von nur zwei Methylengruppen, hängt bereits stark von der Kopfgruppenstruktur und Ladung ab.^[520]

3.1.2.4.4 Biophysikalische Eigenschaften der Membran – Phasenzustände

Die Art der Packung von Amphiphilen übt einen großen Einfluß auf die Eigenschaften von Lipiddoppelschichten aus.^[275] Durch die speziellen Anordnungsmöglichkeiten der Lipide und deren dynamisches Verhalten sind vielfältige Strukturen möglich, die von der geometrischen Struktur der Lipide, deren funktionellen Gruppen und der Art, Konzentration und Temperatur des Lösungsmittels abhängen. Die membranartige Lipidanordnung entspricht bezüglich der Struktur ihrer Lipidanordnung den smektischen Phasen der Flüssigkristalle.^[471] Den fluiden Membranzustand der Lipiddoppelschicht bezeichnet man als flüssigkristallin (smektische Phase hoher Beweglichkeit), während man den festanalogen Zustand der Membran, bei dem die Beweglichkeit der hydrophoben Lipidketten stark eingeschränkt ist, als gelanalog bezeichnet.

Auch wenn viele der folgenden Beobachtungen an definierten Lipidmischungen vorgenommen wurden die nicht zwangsweise in dieser einfachen Form in komplexen biologischen Membranen auftreten, ist es sinnvoll diese im Rahmen der biologischen Membranen zu behandeln. Da sie einen Zugang zu den zu erwartenden Eigenschaften komplexer biologischer Membranen und deren Ausbildungsformen erlauben, stellen sie ein wichtiges Hilfsmittel zum Verständnis der Membraneigenschaften dar.

Eine besondere Eigenschaft der Membranlipide ist das Auftreten von thermotroper und lyotroper Mesomorphie. Die Phasenübergänge finden nicht direkt statt, sondern durchlaufen auf dem Weg von der kristallinen zur flüssigkristallinen Phase diverse Temperatur- bzw. lösungsmittelinduzierte Zwischenzustände, die Mesophasen. Mesophasen weisen eine Kombination der Eigenschaften von Kristallen und Flüssigkeiten, aber auch Gitterordnung und Fließfähigkeit auf, weshalb sie nach LEHMANN als „Flüssigkristalle“ bezeichnet ^[528, 529]

Abkürzung der Phase	Phase
<i>Fernordnung</i>	
L	Lamellar (eindimensional)
H	Hexagonal (zweidimensional)
P	schräg oder zentriert (zweidimensional)
Q	Kubisch (auch 'viskos isotropisch' genannt)
R	Rhomboedrisch
C	Kristallin (dreidimensional)
M	Mizellar (ungeordnet)
<i>Nahordnung</i>	
α	ungeordnet (fluider Zustand)
β	Teilweise geordnet, nicht geneigt (gelanalog)
β'	Teilweise geordnet, geneigt
Δ	Teilweise geordnet, helikal
I	Paraffin-in-Wasser Typ
II	Wasser-in-Paraffin Typ

Tabelle 2 IUPAC Nomenklatur der Lipid-Wasserphasen nach MARSH^[65]

Das mesomorphe Verhalten kann entweder einer Temperaturänderung oder einer Änderung des Hydratationszustandes zugeordnet werden. Wenn die Wärmezufuhr zu einem „Schmelzen“ der Ketten führt kommt es zu einer Transformation der Alkylketten in einen weniger geordneten Zustand. Der neue Zustand ist durch das Auftreten der oben beschriebenen gauche-trans-gauche-Rotationen um die Einfachbindungen der Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen und den damit einhergehenden wachsenden Platzbedarf der einzelnen Lipide gekennzeichnet (thermotroper Phasenübergang).

Die Variation des Hydratationszustandes der Kopfgruppen ändert deren relativen Raumanforderungen und kann zu einer Packungsänderung führen (lyotroper Phasenübergang).

Die resultierenden Mesophasen werden gemäß der in Tabelle 2 beschriebenen IUPAC-Nomenklatur mit den dort aufgeführten Abkürzungen bezeichnet, welche die Fern- und Nahordnung der Lipid-Wasser-Phasen beschreiben. Die Nomenklatur wurde wesentlich von LUZATTI geprägt.^[530]

Die folgenden Phasen werden in Lipid-Wasser-Systemen am häufigsten beobachtet:

a) Lamellar-flüssig-krisalline Phase (L_{α})

Die Moleküle sind in einem zweidimensionalen Ordnungszustand lokalisiert, aber die Acylkettenregion zeigt einen hohen Grad an Unordnung (fluiden Zustand). Diese Phase repräsentiert den häufigsten Zustand der Phospholipide in biologischen Membranen.

b) Lamellare Gelphase (L_{β})

Bei tiefen Temperaturen packen die Moleküle dichter und die Acylketten zeigen einen höheren Grad an Ordnung (all-trans). Lipide mit großen Kopfgruppen zeigen häufig eine geneigte/schräge Orientierung der Acylketten. Dieser Zustand wird mit einem Apostroph („‘“) indiziert. Die Dichte der Gel-Phase ist größer verglichen mit der flüssigkristallinen Phase.

c) Hexagonal I Phase (H_I)

Lipide sind in der Form eines Zylinders organisiert, wobei die polaren Kopfgruppen nach außen zur wässrigen Phase zeigen. Die Zylinder selbst sind in Form eines hexagonalen Gitters gepackt.

d) Hexagonal II Phase (H_{II})

In dieser Phase zeigen die Acylketten zur Außenseite des Packungszyinders, während die polaren Gruppen nach innen gewandt sind und eine kontinuierliche Wasserröhre umschließen.

e) Kubisch I Phase (Q_I)

Diskontinuierliche Phase die aus sphärischen Mizellen besteht wobei die Kopfgruppen einer kontinuierlichen Wasserphase an der Außenseite zugewandt sind.

f) Kubisch II Phase (Q_{II})

Bikontinuierliche Phase die einen Zwischenzustand zwischen lamellarer und hexagonaler Phase repräsentiert.

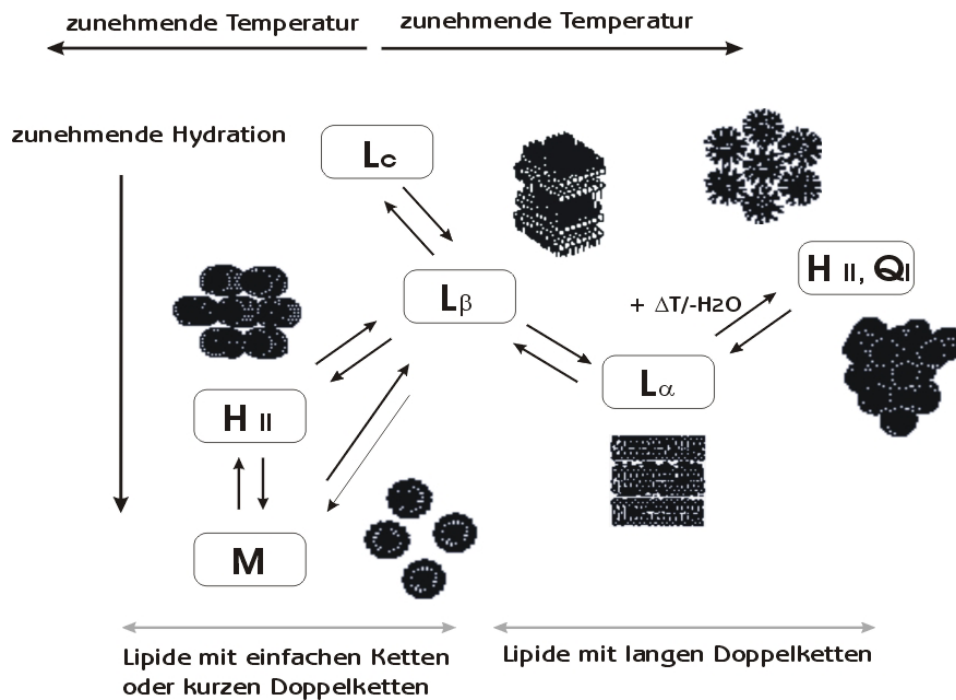


Abbildung 18 Abhängigkeit des Phasenübergangs von Lipid/Wasser-Mischungen von der Hydratation und Temperatur (in Anlehnung an BROWN und WOLKER^[531], GENNIS^[474] und MARSH^[65])

Abbildung 18 zeigt verschiedenen Präferenzen im Phasenverhalten, die in Abhängigkeit von Substitution und Temperatur auftreten. Sie weisen in der Regel einen reversiblen Charakter auf. Es muß jedoch betont werden, daß die „thermische Vorgeschichte“ des Lipids eine Rolle spielt, welche Phasenübergänge auftreten. Gleichmaßen sind in Lipid-Wassermischungen thermotrope und lyotrope Phasenübergänge zu beobachten.

Das Phasenverhalten der Lipide wird am praktischsten und quantitativ in der Form eines Gleichgewichts Temperatur-Zusammensetzungs-Phasendiagramms ($T-C$) beschrieben. Das einfachste Phasendiagramm ist ein Zweikomponenten-Phasendiagramm, das zum Beispiel aus einem Lipid und Wasser besteht. Es wird als Funktion der Wasserkonzentration und der Temperatur aufgetragen. Um ein Bild von der schon für ein einfaches Lipid-Wasser-Gemisch

recht komplexen Vielfalt der auftretenden Phasenübergänge zu erhalten, wird das reine DPPC-Wasser-Phasendiagramm in Abbildung 19 betrachtet.

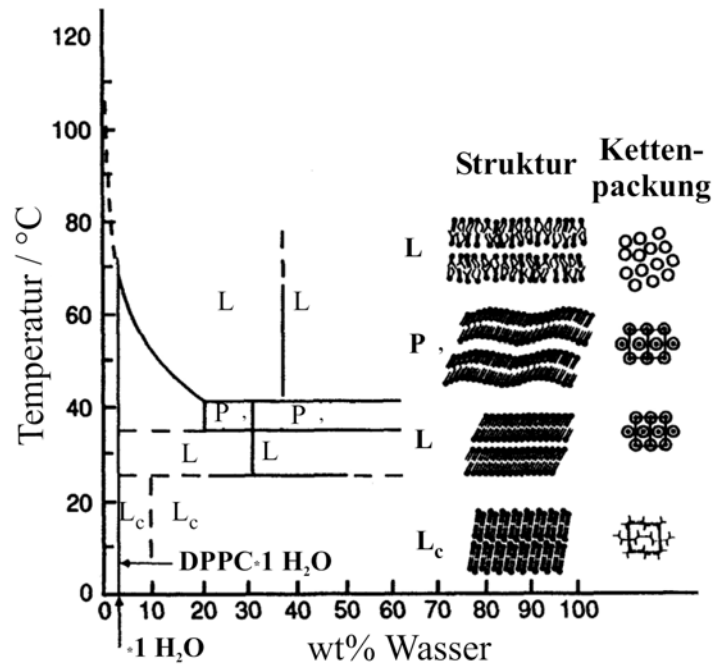


Abbildung 19 Phasendiagramm einer DPPC-Wasser-Mischung.^[65, 530]

Das Phasenverhalten von DPPC wird durch die Eigenschaften der Acylketten wie Länge, Sättigungsgrad und Asymmetrie, der Kopfgruppen wie Polarität, Protonierungsgrad, Substitution und Größe, sowie durch Änderungen von Druck, Temperatur, pH Wert, Elektrolytkonzentration und Hydratation beeinflusst.^[530] Bei einem Wassergehalt von 15-45 % bildet DPPC bevorzugt lamellare Phasen wie sie in Abbildung 19 dargestellt sind. Im rechten Teil der Abbildung sind die strukturellen, beziehungsweise geometrischen Anordnungen der Lipidmoleküle dargestellt. Bei Temperaturen unterhalb der Subumwandlungstemperatur $T_s = 25^\circ$ liegt DPPC im kristallinen, lamellaren Phasenzustand vor (L_c -Phase). In dieser Phase bilden die Lipide echte Kristalle mit hoher Nah- und Fernordnung.^[532] Die Bewegung der hydrophoben Ketten ist eingefroren. Laterale Diffusion findet nicht mehr statt. Wird die Subumwandlungstemperatur T_s erreicht, findet die Transformation in die Gelphase L_β statt. Die Gelphase ist durch eine stärkere Hydratation und eine beschleunigte Alkylkettenrotation gekennzeichnet. Die Neigung der Lipide verschafft den großen PC-Kopfgruppen zusätzlich Platz, wodurch Packungsfehlpassungen vermindert werden. Nach LAGGNER und KRIECHBAUM gehört diese Umwandlung zu den homogenen Phasenumwandlungen bei denen sich unter

Beibehaltung der Symmetrie nur die Gitterdimensionen ändern.^[533] Wird die Temperatur weiter erhöht, so erfolgt bei $T_p = 36 \text{ °C}$ die Vorumwandlung in die gerippte P_β -Phase. Diese Rippelestruktur steigert die Kopfgruppenfluidität, wobei die Kettenordnung erhalten bleibt. Dadurch tritt eine erhöhte Kopfgruppenrotation ein. Man beobachtet die Rippelephase nur bei Phospholipiden mit hydrophilen, hydratisierten Kopfgruppen (z.B. PC und PG) und Alkylkettenlängen von 12-22 Kohlenstoffatomen.^[530] Schließlich kommt es bei $41,4 \text{ °C}$ zur Hauptphasenumwandlung, einem Vorgang, der auch als „Kettenschmelzen“ bezeichnet wird. Es kommt zu einer heterologen Umwandlung sowie einer Änderung von Symmetrie und Gitterdimensionen.^[533] Zusätzlich kommt es zur Ausbildung der flüssigkristallinen L_α -Phase mit den in den Monoschichten frei beweglichen Molekülen.^[534] Die Initiation dieses Zustands erfolgt durch die trans-gauche-Isomerisierungen, dem oben beschriebenen Abknicken der Alkylketten an verschiedenen Stellen, die 10^{-12} - 10^{-10} s dauern und sich in der Membranebene fortsetzen. Die Isomerisierungen führen zur lateralen Expansion, einer Änderung der Fluiditäts- und Mobilitätssteigerung der Lipide, sowie einer Änderung der Packung. Infolge dessen nimmt die Membrandicke ab während das Volumen und die Wasserdicke zunehmen.^[535]

Sinkt der Wassergehalt unter 15 % kann die Ausbildung kubischer Phasen beobachtet werden. Kubische Phasen sind optisch isotrop, hochviskos und bikontinuierlich mit periodisch minimierten Oberflächen oder mizellarer Struktur durch die kubische Packung verschiedener Mizelltypen.^[530] Normale H_I und inverse H_{II} hexagonale Phasen kommen insbesondere bei PL mit kleinen, kaum hydratisierten Kopfgruppen und Anziehungskräften im Kopfgruppenbereich vor, z.B. bei Phosphatidylethanolaminen. Steigt der Wassergehalt über 45% resultiert dies in der Separation einer H_2O -Phase, oberhalb von 70% H_2O entstehen Myelinstrukturen.^[536]

Phospholipide bilden in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Wasseranteil Phasen aus, die sich schon für ähnlich aufgebaute Lipide deutlich voneinander unterscheiden können. Der für PC beobachtbare Phasenzustand der Rippelephase, der intermediär zwischen gelanalogen und flüssigkristallinen Phasenzustand auftritt, wird für PE nicht beobachtet.^[474]

Andere Unterschiede im Phasenverhalten sind auf den Einfluß der Kopfgruppe und die Anzahl der Acylgruppen zurückzuführen. PE L_α -Phasen konvertieren zu H_{II} -Phasen wenn die Temperatur erhöht wird. In diesem Phasenzustand bilden die Lipide lange wassergefüllte Röhren die sich zu einem zweidimensionalen Gitter anordnen. Die gegenteilige Situation wird für einkettige Phosphatidylcholine beobachtet, bei denen Lipidröhren (röhrenförmige Mizellen) gebildet werden die von Wasser umgeben sind.^[537] Der Einfluß der Lipidgeometrie auf diese Phasen ist evident.

Ein Faktor, der die Ausbildung der H_{II} -Phase unterdrückt, ist die Vergrößerung der effektiven Kopfgruppengröße. L_α -Phasen konvertieren bei deutlich höheren Temperaturen zu H_{II} -Phasen

wie am Beispiel von Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) gezeigt wurde. DOPE hat eine $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ -Phasenumwandlungstemperatur von 10 °C. Vergrößert man die Kopfgruppe durch Methylierung des Ethanolamins, steigt sich die Phasenumwandlungstemperatur auf mehr als 50 °C.^[538] Durch sukzessive Methylierung bleibt das Lipid auch noch bei Temperaturen um 885 °C in der L_{α} -Phase.^[537]

Etherlipide begünstigen die Interdigitation zur L_{β} -Phase. Bei genügend großer Hydratation bleibt die L_{β} -Phase bis zu einem kritischen Wert bestehen. Unter Zugabe von Esterlipid verschwindet diese Phase ab einer bestimmten Konzentration unter der Ausbildung einer nichtinterdigitierten L_{β} -Phase^[539, 540]

Bei niedriger Temperatur und geringer Hydratation kommt es bei gemischten Ether/Ester-Lipiden (wie bei reinen Alkyletherlipiden) zur Ausbildung interdigitierender Phasen.^[541] Interessanterweise führt auch die Konzentrationszunahme an ethanolaminterminiertem Etherlipid ab einer von der Art des Lipids abhängigen Konzentration zur Aufhebung der interdigitierten Phase. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß sich ab einer bestimmten Konzentration die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Ethanolaminkopfgruppen besser ausbilden können und zur Energieminimierung beitragen.^[542]

Die häufig gemäß der Größe und/oder Ladung der Kopfgruppe vorgenommenen Einteilung der Phospholipide wird in drei Gruppen vorgenommen: Cholin-Phospholipide (Phosphatidylcholine und Sphingomyelin), saure Phospholipide (z. B. Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol) und Phosphatidylethanolamin. Die Einteilung berücksichtigt einerseits die unterschiedliche Größe und andererseits die unterschiedliche Ladung der Kopfgruppen. Sie erleichtert das systematische Verständnis des Phasenverhaltens der Lipide und macht Vorhersagen möglich.

Tabelle 3 stellt in übersichtlicher Form die unter physiologischen Bedingungen bevorzugt eingenommenen Phasenzustände der verschiedenen Lipidklassen dar. Hierbei spielt der saure Charakter von PS und PG unter physiologischen Bedingungen offenbar keine signifikante Rolle. Phosphatidylcholine bilden hier auf Grund ihrer kleinen Kopfgruppen neben einigen Glycolipiden die einzige Ausnahme. Liegen verschiedene Lipidgruppen gleichzeitig in fluiden Lipidmembranen vor wie dies in biologischen Systemen der Fall ist, können sie bei spezifischen Molenbrüchen supergitteranaloge Strukturen ausbilden.^[543-545]

Lipid	physiologische Zustände	andere Zustände
Phosphatidylcholin	L	H _{II} -Phase bei geringer Hydratation und hohen Temperaturen
Sphingomyelin	L	
Phosphatidylethanolamin	H _{II}	L-Phase bei pH ≥ 8,5
Phosphatidylserin	L	H _{II} -Phase bei pH ≤ 3,5
Phosphatidylglycerin	L	H _{II} -Phase bei hohen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen
Phosphatidylinositol	L	
Cardiolipin	L	H _{II} -Phase bei bivalenten Kationen, pH ≤ 3,5 und hohen Salzkonzentrationen
Phosphatidsäure	L	
Monoglucosyldiglyceride	H _{II}	
Diglucosyldiglyceride	L	
Monogalactosyldiglyceride	H _{II}	
Cerebroside	L	
Cerebroside-sulfate	L	
Ganglioside	M	
Lysophosphatidylcholine	M	
Cholesterin		induziert die H _{II} -Phase in Lipidmischungen
ungesättigte Fettsäuren		induziert die H _{II} -Phase

Tabelle 3 Polymorphe Phasenpräferenz einiger Lipide (nach GRUNER, CULLIS, HOPE & TILCOCK)^[537]

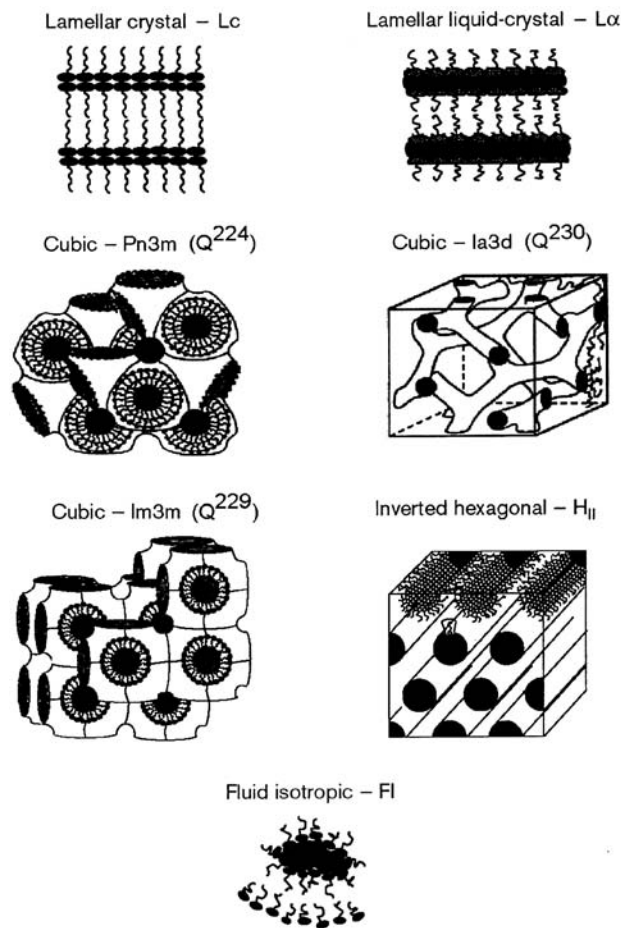


Abbildung 20 Vielfalt dreidimensionaler Lipidphasen^[546]

Abbildung 20 zeigt verschiedene fest Phasen (lamellar kristalline Phasen); die Mesophase (lamellar flüssigkristalline Phase); die kubische-*Pn3m*-Phase (Raumgruppennummer 224); die kubische-*Ia3d*-Phase (Raumgruppennummer 230); die kubische-*Im3m*-Phase (Raumgruppennummer 229); die inverse hexagonale Phase und die flüssige (flüssig isotrope) Phase die von Lipiden eingenommen werden können. Individuelle Lipide sind als Stäbchen dargestellt (rundes Ende = polare Kopfgruppe) die schattierten Flächen repräsentieren das Wasser. Neben diesen Strukturen gibt es auch „verzahnte“, „ineinanderdringende“ Lipidphasen (engl. *interdigitated phases, L β*). Sie treten bevorzugt bei Störungen der Membran durch hohen hydrostatischen Druck oder kleine amphiphile Moleküle, wie zum Beispiel Ethanol, Glycerin, Ethylenglycol oder auch Anästhetika auf.^[547]

Lipide wie Phosphatide, Cardiolipine und Phosphatidylserine, welche die hexagonale Phase (*H-II*) bevorzugen, bilden spezielle molekulare Lipiddoppelschicht-Anordnungen. Die nicht-planaren Membranoberflächen besitzen eine hohe Immunogenität.^[548] Auf welche bedeutende

Weise Membranoberflächen in immunologische Prozesse eingebunden sind wird ebenfalls deutlich, wenn man die schon bei der Beschreibung der einzelnen Lipideigenschaften angesprochenen spezifischen Wechselwirkungen der negativ geladenen Lipide bedenkt. Vergleichende Untersuchungen an Membranen und ihren einzelnen Komponenten sind nicht beschrieben, so daß der zusätzliche Einfluß der Membranomorphologie nicht exakt beschrieben werden kann.

Die für die Membranfusion wichtigen Phasenübergänge zwischen hexagonalen und lamellaren Phasen existieren auch für Diphtanoyllipide und werden in Kapitel 3.1.2.4.7 beschrieben.

Die beschriebenen Phasenzustände werden nicht nur in isolierten Lipid-Wassermischungen beobachtet. Sie treten auch in verschiedenen Lipidaggregaten auf die selbst die Ausbildung verschiedener Phasenzustände beeinflussen.

3.1.2.4.5 Biophysikalische Eigenschaften der Membran – Aggregatstrukturen

Die Ausbildung von Lipidaggregaten in Form von spezifischen, dreidimensionalen Strukturen hebt die geometrischen und Phasenbetrachtungen der Lipide auf eine höhere Hierarchieebene. Die dreidimensionalen Strukturen können dabei eine Vielzahl geometrischer Formen einzunehmen. Als Beispiele können scheibenförmige Strukturen, tubuläre Formen und Vesikel genannt werden.^[468] Eine Variante der Klassifizierung besteht in der Einteilung in membranartige Strukturen, zu denen klassisch die Vesikel und Lipidmembranen gehören, und die mizellartigen Strukturen. Da die verschiedenen Aggregate ineinander transformierbar sind, ist eine strenge Einteilung nicht immer sinnvoll. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt Membranen, Vesikel und Mizellen zusammenhängend behandelt.

Phospholipide gehören zu den wichtigsten Vertretern der lipidaggregatbildenden Verbindungen. Sie gehören nach Kapitel 3.1.2.4 zur Gruppe der quellenden, unlöslichen Amphiphile. Mizellenformende Amphiphile und membranformende Amphiphile unterscheiden sich bezüglich ihrer Wasserlöslichkeit stark. Erstere zeigen eine vergleichsweise hohe Wasserlöslichkeit (cmc etwa $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ – cmc kommt aus dem Englischen und steht für critical micell concentration) während membranformende Amphiphile (zum Beispiel Phospholipide) eine sehr viel niedrigere Wasserlöslichkeit aufweisen (cmc etwa $10^{-10} - 10^{-8} \text{ Mol L}^{-1}$).^[549] Phospholipide sind daher in Wasser fast nicht löslich, können aber durch Quellung Wasser im begrenzten Umfang aufnehmen. Durch die Selbstaggregation der Phospholipide in Wasser kommt es zur Ausbildung von Vesikeln, die auch als Liposomen bezeichnet werden.^[550] Es handelt sich hierbei um sphärische, konzentrisch angeordnete, geschlossene, lamellare Lipiddoppelschichten mit unterschiedlicher Größe und Lamellenzahl, sowie einem wässrigen Innenraum. Die folgende Klassifizierung der Vesikel beruht auf der

Grundlage dieser Merkmale und wurde durch die „New York Academy of Science“ im Jahre 1970 eingeführt.

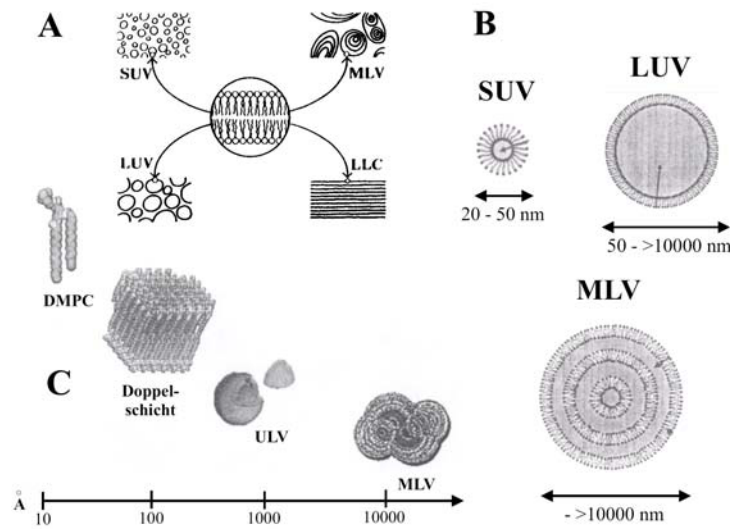


Abbildung 21 A) Aggregation von Phospholipiddoppelschichten in SUV, LUV, MLV, LLC (lamellare Flüssigkristalle)^[551]; B) Darstellung von SUV, LUV, und MLV mit Größenangaben^[552]; C) Größenverhältnisse vom PL-Einzelmolekül über Doppelschichten und ULV (unilamellare Vesikel) bis zu MLV in Å^[551]

Die in Abbildung 21 gezeigten Vesikeltypen besitzen Größen von einigen nm bis zu vielen Mikrometern. Sie differieren hinsichtlich ihrer spontanen Krümmung, der Bindungsstarrheit und des Einschlussvolumens.^[553]

Die verschiedenen Liposomentypen besitzen folgende Merkmale:^[552]

SUV „kleine unilamellare Vesikel“ (*engl. small unilamellar vesicles*)
eine Doppelschicht, $\varnothing = 20-50$ nm, starke Krümmung, metastabiler Zustand

LUV „große unilamellare Vesikel“ (*engl. large unilamellar vesicles*)
eine Doppelschicht, $\varnothing = 50-10000$ nm, geringe Krümmung, stabiler Zustand

MLV „multilamellare Vesikel“ (*engl. multi lamellar vesicles*)
Einige bis viele Doppelschichten, $\varnothing = >10000$ nm, stabiler Zustand

GUV „riesen unilamellare Vesikel (*engl. giant unilamellar vesicles*) eine Doppelschicht, $\emptyset = > 10000$ nm, geringe Krümmung, stabiler Zustand

MLV mit wenigen Doppelschichten werden in der Literatur auch als „oligolamellare Vesikel“ (OLV) bezeichnet. Zusammenschlüsse mehrerer Vesikel führen zu den sogenannten „multivesikulären Liposomen“ (MVL). GUV entsprechen in ihrer Größe zusammen mit LUVs der oberen Skala von Säugerzellen. Daher finden sie als Zellmodell,^[486, 554] für Zytoskelettstrukturstudien^[555] und als Modellsystem für die Zelladhäsion^[556] Anwendung. Ihre Eigenschaften und laterale Strukturierbarkeit^[557-560] erlauben das Studium biophysikalischer Effekte und Prozesse wie der Grenzflächenspannung,^[561] der Knospung und Fusion,^[562-564] der transmembranen Asymmetrie^[565] und des transmembranen Transports^[566] unter zellanalogen Bedingungen. Sie lassen sich gut manipulieren,^[567, 568] in ihrer Form mit Hilfe polymerer Zusätze verändern^[569, 570] und sind insbesondere für optische^[571] und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, z. B. von Phasenphänomenen,^[572, 573] geeignet. Herstellen lassen sie sich durch Elektroformation^[574-577] oder „Gentle Dry Methods“. Im Bereich der Nanobiotechnologie finden sie als Template für Nanostrukturen^[578], Nanoreaktoren^[579] und in der zellanalogen GUV-Feldeffekttransistor-Kupplung^[580] Anwendung.

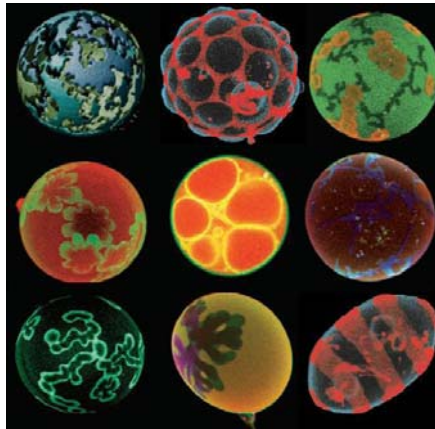


Abbildung 22 GUV können vielfältige Formen und Phasenseparationsmuster aufweisen^[572, 581]

Der Begriff „Mizelle“ wurde 1913 von MCBAIN geprägt.^[582] Unter diesem Begriff werden kolloidale Aggregate verstanden, die sich spontan und ohne Energieaufwand aus Detergenzmolekülen in Lösungen bilden und thermodynamisch stabil sind.^[583]

Die Selbstaggregation ist stark von der Detergenzkonzentration abhängig. Sie erfolgt nur oberhalb einer detergenzspezifischen Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (cmc),

und oberhalb einer bestimmten Temperatur, der kritischen Mizelltemperatur (cmt).^[462] Temperaturen unterhalb der cmt führen zu trüben, kristallinen Suspensionen, Konzentrationen unterhalb der cmc führen zu Lösungen von Detergenzmonomeren. Die cmc zeichnet sich durch eine Änderung der kolligativen Eigenschaften der Lösung aus. Hierzu gehören z.B. der osmotische Druck, die Leitfähigkeit und die Grenzflächenspannung.^[584] Das Erreichen der cmt ist an der Klärung der vormaligen Suspension zu erkennen. Die verschiedenen Bereiche sind in Abbildung 23 dargestellt.

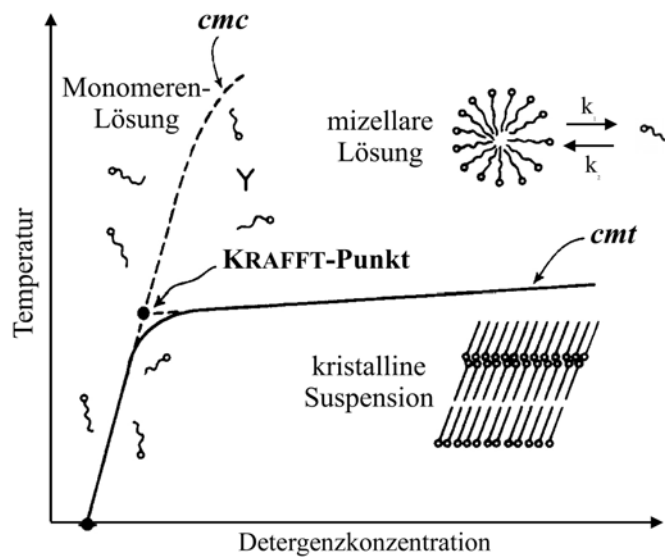


Abbildung 23 Abhängigkeit der Mizellbildung von der Detergenzkonzentration und der Temperatur

Der Schnittpunkt der cmc-Kurve mit der cmt-Kurve wird als „KRAFFT-Punkt“ bezeichnet.^[582]

Durch die Aggregation kommt es zu einer Anordnung der Amphiphile, bei der sich die durch *van der Waals*-Kräfte zusammengehaltenen hydrophoben Teile vom Wasser abgeschirmt im Mizellkern befinden, während die polaren Kopfgruppen an der Mizelloberfläche lokalisiert sind. Die Form der Mizellen wird zum einen von der Eigenschaft des Detergenz, z. B. Kettenlänge, Kopfgruppe und Ladung, dessen Konzentration und den äußeren Einflußgrößen z.B. Temperatur, pH Wert, Ionenstärke und der Dielektrizitätskonstanten des Mediums bestimmt.^[585] Der limitierende Faktor bei der Mizellbildung ist meist die Packungsdichte der Kopfgruppen, die durch große Hydratation bzw. bei ionischen Detergenzien durch die elektrostatische Abstoßung gegeben ist.^[586]

Lyotrope Mesomorphien werden auch an Mizellen beobachtet. Die biologisch für die Resorption von Nahrungsmittelbestandteilen wichtigen Gallensäuren zeigen beispielsweise die Existenz von flüssigkristallinen Phasen mit hexagonaler Struktur.^[587]

Eine besondere Form der Mizellen sind die sogenannten „**Bizellen**“. Bei dieser auch als „**Disk**“-Modell bezeichneten **Scheibchenform** der Mizellen wird eine membranartige Lipidstruktur an ihren hydrophoben Phasengrenzen durch nieder- oder makromolekulare Moleküle stabilisiert. Ein biologisches Beispiel für diese besondere Membranaggregatform könnten Gallensalzaggregate sein (Abbildung 24 linkes Beispiel). Neuere Experimente stützen allerdings die Stäbchenform (Abbildung 24 rechtes Beispiel) für gallensalzmodifizierte Aggregate (Abbildung 24).

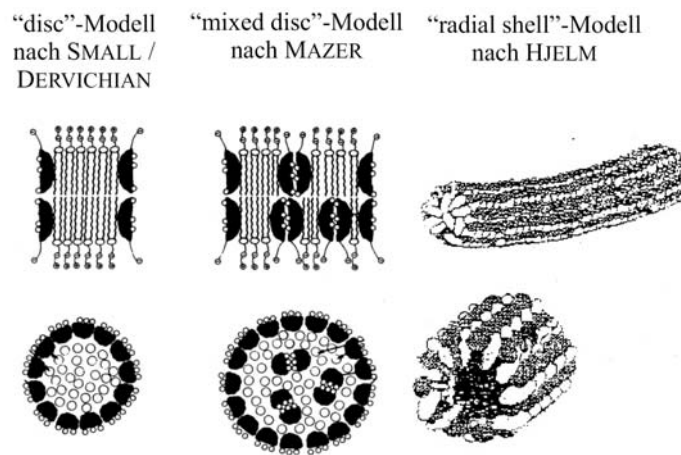


Abbildung 24 Modellvorstellungen von Gallensalzaggregaten, Bizellen sind in den beiden linken Abbildungen dargestellt - SMALL^[588], DERVICHIAN^[589], HJELM^[590] und MAZER^[591]

Im Bizellmodell wird davon ausgegangen, daß sich die Phospholipide im Inneren zueinander orientieren und die Gallensalmoleküle einen Ring um die Peripherie bilden. Da Beispiele von Lipid-Proteinpartikeln von SLIGAR und Mitarbeitern beschrieben sind,^[592] in denen Peptide in der Lage sind vergleichbare Aggregate zu stabilisieren, ist die von der Modellvorstellung beschriebene strukturelle Anordnung für diese ungewöhnliche Membranform auch für Gallensalze wahrscheinlich. Es ist anzunehmen, daß je nach Zusammensetzung und Umgebungsbedingungen verschiedene Aggregate auftreten.

Peptid oder Proteingerüste um Bizellen sind nur eine Variante der Bizellenarchitektur. Reine, mizellartige Bizellen die sich nur aus Lipiden/Detergenzien zusammensetzen, sind ebenfalls bekannt.^{[593] [594-596]} Für weitere Details sei auf Kapitel 3.2 verwiesen.

Bei der Betrachtung von Lipidaggregaten läßt sich eine Analogie zwischen verschiedenen Aggregatstrukturen herstellen. Stellt man sich die großen sphärischen Zellmembranen als LUV vor, so kann ein kleiner Ausschnitt dieser Membran als nahezu ebenes Membranfragment

aufgefaßt werden, das einer planaren, lamellaren Bizellmembran entsprechen würde. Diese stellt ihrerseits wiederum eine mizellare Struktur dar!

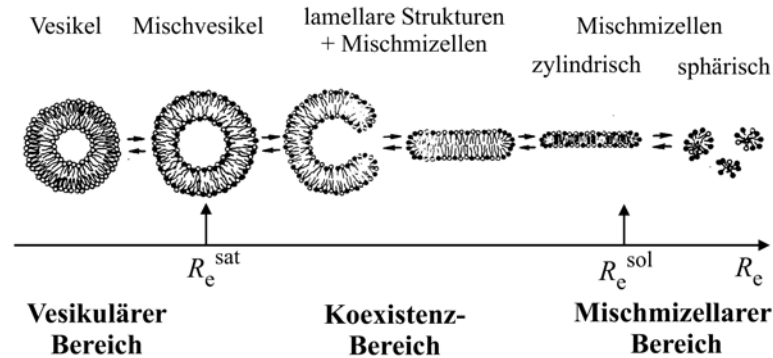


Abbildung 25 Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung nach LICHTENBERG^[597] mit Vesikel-, Koexistenz- und Mischmizellenbereich

Die phänomenologisch assoziierbare strukturelle Äquivalenz der Phasensegmente hat aber gewöhnlich andere Ursachen und ist mit dem Begriff der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung, auch unter dem Begriff „Membransolubilisierung“ bekannt. Diese beschreibt den Übergang von Lipid-Doppelschichten in Detergenz/Lipid-Mischmizellen durch Detergenzien.

Nach HELENIUS und SIMONS^[598] wird er in drei Abschnitte unterteilt: Im ersten Abschnitt werden die Detergenzmoleküle in die Doppelschicht eingebaut und es entstehen Mischvesikel (MV). Im zweiten Abschnitt erfolgt die Umwandlung der MV in Mischmizellen (MM), im dritten Abschnitt ist die Phasenumwandlung beendet und die MM werden kleiner. LASCH führte einen vierten Abschnitt ein, der zwischen lipidreichen MM im dritten Abschnitt und detergenzreichen kleineren MM im vierten Abschnitt unterscheidet.^[599]

Der Prozess läuft wie folgt ab: Vesikel nehmen Detergenzmoleküle auf, bis sie bei einem kritischen molaren Detergenz/Lipid-Verhältnis R_e^{sat} vollständig gesättigt sind. Oberhalb der Grenze, der Sättigungsphasengrenze D_t^{sat} zerfallen die MV unter der Bildung von MM. Wird das zweite kritische molare Detergenz/Lipid-Verhältnis R_e^{sol} der Solubilisierungsphasengrenze D_t^{sol} überschritten, liegen nur noch MM vor. Die Solubilisierung ist abgeschlossen und durch weiteren Detergenzzusatz ändern sich die Zusammensetzung, die Größe und die Form der MM von zylindrischen zu sphärischen Aggregaten. Im Koexistenzbereich zwischen beiden Phasengrenzen liegen MV der Zusammensetzung R_e^{sat} und MM der Zusammensetzung R_e^{sol} nebeneinander vor.^[599-602]

Die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung beruht auf den Differenzen der spontanen Krümmung der Detergenz- und der Lipidmoleküle, das heißt, auf den Unterschieden in der freien Energie der Aggregation der beiden Komponenten, in welche die Mischungsentropie und die Krümmungsenergie eingehen.^[601, 602] Infolge des Detergenzeinbaus in die Vesikel wird die Ordnung der Acylketten in den PL-Doppelschichten reduziert.^[603] Dadurch kommt es zu einer Fluidisierung und elastischen Ausdehnung der Vesikel.^[604] Die resultierende Permeabilität der Vesikel ist darauf zurückzuführen.^[605] Die einzige bekannte Ausnahme bildet Triton X-100, das bei solubilisierenden Konzentrationen die Packung der Vesikel optimiert.^[606]

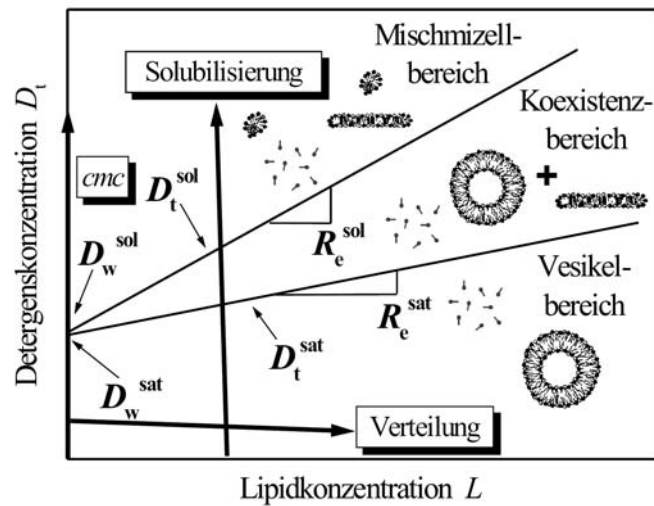


Abbildung 26 Phasendiagramm der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung nach Lichtenberg^[597]

Eine detaillierte Beschreibung der Vesikel-Mizell-Umwandlung nach Lichtenberg ist in Abbildung 26 abgebildet. Die Phasengrenzen der Sättigung der Vesikel mit Detergenz D_t^{sat} und die vollständige Solubilisierung D_t^{sol} definieren drei Bereiche: 1. Den Bereich der Vesikel in dem MV und Detergenzmonomere vorliegen, 2. der Koexistenzbereich mit MV, MM und Detergenzmonomeren und 3. den Mischmizellenbereich in dem nur MM und Detergenzmonomere vorhanden sind. Die beiden Geraden werden aus den folgenden Gleichungen erhalten:

$$D_t^{\text{sat}} = R_e^{\text{sat}} \cdot L + D_w^{\text{sat}}$$

Gleichung 2

$$D_t^{\text{sol}} = R_e^{\text{sol}} \cdot L + D_w^{\text{sol}}$$

Gleichung 3

Die R-Werte stellen die Steigung der Geraden dar und die D-Werte die Ordinaten Schnittpunkte.

R_e^{sat} entspricht der maximalen Zusammensetzung bei der MV vorhanden sind und R_e^{sol} der entsprechenden minimalen Zusammensetzung bei der MM auftreten können. R_e^{sat} ist daneben ein Maß für die Vesikelstabilität und R_e^{sol} für die Solubilisierungseffizienz des Detergenz.^[607] Die D_w -Werte geben die hypothetische Detergenzkonzentration bei der Sättigung und Solubilisierung in Gegenwart von Lipid an.^[608]

3.1.2.4.6 Biophysikalische Eigenschaften der Lipide – Lipidaggregate/-flöße (engl.

lipid rafts) bzw. Lipiddomänen

Strukturierte Bereiche innerhalb von Lipidmembranen, bzw. koexistente Phasen sind ein in der Biophysik schon lange bekanntes Phänomen. In Abhängigkeit von der Phasenübergangstemperatur der Lipide, deren funktionellen Gruppen, der Elektrolytkonzentration und dem Einfluß von Proteinen, können gelanalogue Aggregate („Inseln“) innerhalb einer flüssigkristallinen Lipidmatrix gebildet werden.^[609] Allerdings sollte die Betrachtung von Membranen mit ungleichmäßiger Lipidverteilung von der klassischen Phasenseparation, insbesondere von einer Betrachtung als gelanalogue oder flüssigkristalline Phase, gelenkt werden. Da die klassische Einteilung Gleichgewichtszustände definiert, die oft in dieser Form nicht in den sich vergleichsweise dynamisch verändernden Domänen biologischer und einiger biomimetischer Membranen vorkommen, ist ein weiter gefaßter Begriff sinnvoll.

Da die verschiedenen Begriffe Raft/Lipidfloß, Phasen, Domänen, DIM (Detergent Insoluble Membrane) und DRM (Detergent Resistant Membrane) nicht immer mit der gleichen Bedeutung verwendet werden, sollen sie hier kurz eingeführt und für diese Arbeit festgelegt werden. Der Begriff „Domäne“ ist als der allgemeinste Begriff aufzufassen. Alle Bereiche innerhalb der Membran, die strukturell oder chemisch unterscheidbare Formen oder Zustände aufweisen, sollten unter diesem Begriff gefaßt werden. Auch der thermodynamische Zustand ist hier nicht von einschränkender Bedeutung. Der Begriff „Lipidphasen“ wird zwar zuweilen weiter gefaßt, ist aber im strengen Sinn den biophysikalischen Phasenzuständen der Lipide vorbehalten. Die im Englischen als „rafts“ bezeichneten „Lipidflöße“ werden historisch für die Beschreibung von cholesterin- und sphingolipidreichen Membranaggregaten verwendet, die durch Extraktion als Membranfraktionen erhalten wurden.^[175, 610, 611] Aus diesem Grund spricht man auch von DIM (Detergent Insoluble Membrane) und DRM (Detergent Resistant Membrane).

Die ersten Experimente zu einem Verständnis von Membranen mit Bereichen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (Domänen) wurden von JAIN und WHITE an Modellmembranen unternommen.^[612] Das Wort Domäne soll dabei einen Bereich definieren, innerhalb dem oft

kein thermodynamisches Gleichgewicht herrscht und der demzufolge eine kürzere Lebensdauer (siehe unten) besitzt, als separierte Phasen die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden.

Ein bedeutsames Indiz, daß es sich bei Membrandomänen nicht einfach um Bereiche einer anderen zeitlich stabilen Phase handelt, demonstrieren Experimente die 1992 von BROWN und ROSE durchgeführt wurden. Sie konnten zeigen, das lipidverankerte Proteine in der Tat in cholesterin- und sphingomyelinreiche Lipidareale insertieren.^[613] Dieser Prozess sollte im Falle von streng gelanalogen Phasen nicht zu beobachten sein.

Es wird angenommen, daß sich diese Mikrodomänen schon im Golgiapparat ausbilden, wo die meisten Sphingolipide synthetisiert werden und in der Plasmamembran angereichert werden.^[614] Ihre Bedeutung für eine steigende Anzahl von Prozessen schließt die Sortierung von Proteinen für selektiven intrazellulären Membrantransport ein.

Neben dem Einfluß auf die Membraneigenschaften besitzen die Domänen beziehungsweise Lipidaggregate/Rafts innerhalb biologischer Membranen essentielle Funktionen, insbesondere als Plattform der Signaltransduktion.^[175] Außer der Beteiligung an molekularen Erkennungs- und Signalprozessen an der Zelloberfläche erfüllen Mikrodomänenkomponenten wie Glycosylsphingolipide (GSL) unerwartete Funktionen auf der cytosolischen Oberfläche zellulärer Membranen.^[614]

Die überwiegend aus Cholesterin und Sphingolipiden oder Glycolipiden zusammengesetzten Rafts^[615] sind für die laterale Verteilung von Membranrezeptoren wichtig.^[616] Durch die größere Dicke der Rafts kommt es zu einer Deformierung der Membran, die auf die Größe und den lateralen Abstand der Rafts Einfluß nimmt.^[617] Ein Effekt der auch die Wechselwirkung der in sie eingebetteten Proteine modifiziert. Simulationen zeigen, daß die Membrandicke, bzw. der Unterschied zwischen den Membrandomänen, deren Stabilität und damit deren Lebensdauer maßgeblich beeinflußt.^[617]

Die Lebensdauer von Membrandomänen variiert von 10 ns für Cholesterincluster in ungesättigten Phosphatidylcholinmembranen,^[618] über Sekunden für Clathrin-Coated Pits,^[619] bis zu Stunden für Zelladhäsionsstrukturen^[620]. In Domänen die über längere Zeit stabil sind, findet ein kontinuierlicher Austausch der konstituierenden Moleküle von innen nach außen und von außen nach innen statt.^[175, 621] Die Größen der Domänen, die in biomimetischen Modellen beobachtet wurden, reichen von etwa 10 nm bis zu 30 µm.^[622, 623] Die Wechselwirkungsenergie zwischen den Domänen oszilliert und nimmt ab, wenn sich die Domänen voneinander entfernen. Es wird eine energetische Barriere aufgebaut die das nahe Zusammenkommen von Domänen verhindert.^[617]

Cholesterin-Sphingomyelin-Rafts dienen als Plattform für die Immobilisierung von lipidmodifizierten Proteinen wie Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenen Proteinen^[624] und Tyrosinkinase der src-Familie,^[625] sind aber anscheinend auch in die Signalkaskade der Alzheimer-Erkrankung miteinbezogen^[626]. Jüngste Untersuchungen zeigen, daß sphingolipid- und cholesterinreiche Membranflöße eine zentrale Rolle für den Clustereffekt, bzw. die Aggregation von Rezeptormolekülen spielen. Als Beispiele können der B-Zellrezeptor,^[627] der CD40,^[628] der TNF-Rezeptor,^[629] der PDGFR,^[630] das L-Selektin^[631] und die Integrine^[632] genannt werden. Auch bei wichtigen Krankheiten ist ihre Rolle bekannt: Spongiforme Enzephalopathien,^[633] Tumoren^[634] und Virusinfektionen^[635] z.B. HIV^[636].

Der Einfluß von Lipidflößen wird deutlich, wenn man die Effizienz der Phospholipase A₂ betrachtet, die für die Bildung von Lysophospholipiden verantwortlich ist. Liegen die Lipide in aggregierter Form vor, so zeigt sie eine um den Faktor 10.000 höhere Effizienz in Gegensatz zur Interaktion mit freien Lipiden.^[637]

Auch die Existenz von glycolipidinduzierten Membrandomänen konnte eindeutig bewiesen werden.^[170] Sie enthalten neben Glycolipiden meist auch Cholesterin und andere Funktionsträger, z. B. durch Glycosylphosphatidylinositol verankerte Proteine (siehe oben).^[170] Ein Zusammenhang mit der Anbindung an das Cytoskelett kann somit vermutet werden. Neben diesen Funktionen sind Rafts auch an der Lipidtranslokation und der Organisation des intrazellulären Transports beteiligt.^[169] Es ist von besonderem Interesse, daß einige Rezeptoren (beispielsweise der Tumornekrosefaktor (TNF), Fas und TCR) innerhalb von Rafts auch schon vor der Bindung ihrer Liganden in oligomerer Form präassembliert vorliegen.^[171] Entfernt man aus der Membran/Rafts Cholesterin, so können die TNF-Rezeptoren (TNFR) nicht mehr NF- κ B aktivieren, da sich der aktive TNFR1-Komplex außerhalb der Rafts bildet.^[638] Ein deutlicher Hinweis für die Raftabhängigkeit von Signalkaskaden.

Spezifische Wechselwirkungen unter einzelnen Lipidspezies führen zu einer Art molekularer Erkennung bei der Ausbildung von Rafts. Sphingomyelin wechselwirkt stärker mit Cholesterin als DPPC, ungesättigte Alkylreste führen sowohl beim Sphingomyelin als auch beim DPPC zu einer verringerten Stabilität von Strukturen die reich an Cholesterin sind.^[639]

Die spezifische Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin und Cholesterin besitzt daher große Bedeutung.^[278] Dem Cholesterin wird die Eigenschaft zugeschrieben, den flüssig-geordneten Phasenzustand zu fördern, der bezüglich seiner Eigenschaften zwischen dem flüssigkristallinen und dem gelanalogen Zustand liegt.

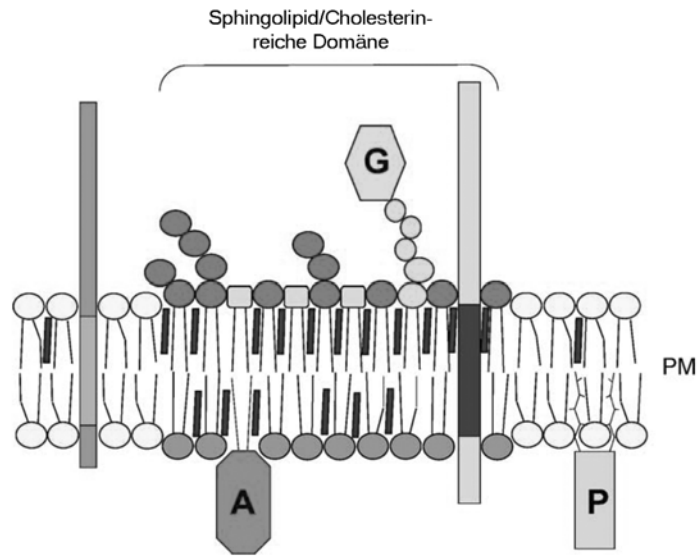


Abbildung 27 Schematisches Modell von Sphingomyelin/Cholesterin Mikrodomänen.^[614] Glycosphingolipide haben die Tendenz in einer Phospholipidumgebung auf der nichtcytosolischen Membranseite ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit Sphingomyelin und Cholesterin auszubilden. GPI-verankerte Proteine (G) sind in diesen Mikrodomänen angereichert. Die Zusammensetzung der inneren Membranhälfte dieser Domänen ist unbekannt, aber sehr wahrscheinlich speziell, da man annimmt, daß nur acylierte Protein (A) mit der cytosolischen Membranhälfte der Membrandomäne assoziieren, während pränylierte Proteine (P) ausgeschlossen werden.^[640] Proteine die zur Plasmamembran transportiert werden, besitzen im allgemeinen längere transmembrane Domänen, als Golgiproteine^[641] und assoziieren daher vermutlich lieber mit GSL-reichend Domänen die dicker sind als die typische Plasmamembran.^[642]

Ein Grund der bevorzugten Wechselwirkung des Cholesterins mit Sphingolipiden liegt in der hier möglichen starken *van der Waals* - Wechselwirkungen zwischen dem vergleichsweise planaren Cholesterinmolekül und den Acylketten des Sphingolipids. In der Lipiddoppelschicht erstreckt sich das Cholesterinringsystem etwa bis zu den Kohlenstoffatomen C₈- C₁₂, je nachdem ob man die verzweigte Alkylkette mit einbezieht. Die meisten ungesättigten hydrophoben Ketten der Glycerophospholipide haben ihre *cis*-Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen an Position 9 und 10, z.B. die Ölsäure. Eine Doppelbindung in dieser Position verursacht eine Verbiegung innerhalb der Kette die dem Cholesterin benachbart ist. Dadurch wird die *van der Waals* - Wechselwirkung zwischen dem Cholesterin und den Acylketten geschwächt.^[643] Im Gegensatz dazu enthält Sphingomyelin einen großen Anteil gesättigter Ketten und erlaubt die effiziente Wechselwirkung mit Cholesterin.

Je nach Kettenlänge der Acylgruppen sind Ceramide in der Lage Cholesterol in den Domänen zu ersetzen.^[644] Sphingolipide wechselwirken lateral durch *van der Waals* - Wechselwirkungen

und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Zuckerrest und dem Sphingosingerüst.^[288] Da sie gesättigte Acylketten aufweisen packen sie vergleichsweise dicht wodurch sich die Phasenumwandlungstemperatur erhöht.^[274] Durch eine stark asymmetrische Kettenlängenverteilung bei Sphingomyelinen bilden diese verstärkt interdigitierende Phasen aus und besitzen häufig breite Phasenumwandlungstemperaturbereiche.^[645] Diese Wechselwirkungen führen zur Separation sphingolipidreicher Domänen. Der Grad der lateralen Wechselwirkung wird durch Cholesterin weiter erhöht. Die 3- β -Hydroxylgruppe des Cholesterins geht mit der Ceramidgruppe von Sphingolipiden eine Wasserstoffbrückenbindung ein, während der steife hydrophobe Molekülteil mit den Acylketten in Wechselwirkung tritt.^[646] So füllt das Cholesterin die Lücken zwischen benachbarten Sphingolipiden auf und erhöht die lokale Steifigkeit der Membran.^[273]

Ein problematischer Punkt, der die Verwendung von Cholesterin-Lipid-Mischungen in biomimetischen Membranen erschwert, ist die Änderungen der Lipidsupergitterstrukturen, die leicht durch kleine Schwankungen im Verhältnis von Cholesterin zu Lipid auftreten.^[647]

Weitere besondere Formen von Membrandomänen sind **Caveola** und **Clathrin-Coated-Pits**. Sie stellen im Zusammenhang mit Membrandomänen ein Bindungsglied zwischen diesen und der Membranfusion dar. Caveola sind dynamische Strukturen in Form von Membraneinschnürungen. Sie sind mit Caveolin, einem cholesterinbindenden 22 kDa protein modifiziert, welches zur Ausbildung der Caceolae maßgeblich beiträgt.^[648] In ihrer Zusammensetzung sind sie mit Rafts vergleichbar^[649] und wie diese in eine Vielzahl zellulärer Funktionen einbezogen.^[648]

Clathrin-Coated-Pits sind Membraneinstülpungen die durch das Anbinden von Clathrin an Membranproteine, vor allem Epsin, zu einer positiven Membrankrümmung führen.^[650] Durch die Einschnürung kommt es zur Endocytose und den Transport von Proteinen von der Plasmamembran ins Zellinnere.^[651] Der Prozess der clathrinvermittelten Vesikelbildung gehört zum Hauptweg des synaptischen Vesikelkomponentenrecyclings, einem wichtigen Prozeß an den Nervenenden.^[652]

3.1.2.4.7 Biophysikalische Eigenschaften der Membran - Membranfusion^[653, 654]

Der Ursprung des Leben ist eng mit spontanen Prozessen wie der Selbstassemblierung und dem ineinander Überführen verschiedener dreidimensionaler Strukturen verbunden.^[655] Die Assemblierung von Amphiphilen zu Vesikeln und deren Wechselwirkung untereinander gehört zu den Voraussetzungen lebendiger Organismen.^[656, 657] Die Konzepte der Kompartimentierung und der Selbstreplikation von Vesikeln sind fundamentale Grundlagen

und Prozesse von deren dynamisch-funktionellen Verlauf nicht nur das Leben selbst, sondern auch die Präparation der biomimetischen Membranen abhängen.^[658-660]

Membran- oder Vesikelfusionen sind zentrale Vorgänge vieler zellulärer Prozesse und von großer medizinischer Bedeutung. Sie spielen beispielsweise bei immunologischen Prozessen^[661] und neuen Methoden des Wirkstofftransports eine Rolle^[662].

Biologisch wird die Fusion, zum Beispiel während der neuronalen Exocytose, von SNARE-Proteinen vermittelt. Hierbei bilden das auf dem synaptischen Vesikel befindliche Synaptobrevin, das Syntaxin und das SNAP-25 der Membran einen Komplex.^[663] Botulinum- und Tetanustoxin bauen diese drei SNAREs ab und unterbinden dadurch die Exocytose. Weitere proteinvermittelte Fusionsprozesse sind für Hämagglutinine beschrieben.^[664] Auch die spannungssensitive (mechanische) Membranfusion scheint für biologische Prozesse relevant.^[665] Ein möglicher Weg der Membranfusion könnte durch die lokale Kontraktion des Cytoskeletts bei den Membranausstülpungen während der Endocytose induziert werden (die Veränderung/Abbau des Cytoskeletts führt dann zur Knospung).^[666]

Die Bereitschaft der Lipiddoppelschicht zu fusionieren ist mit der teilweisen Dehydratisierung der Membranoberfläche, ihrer damit zusammenhängenden erhöhten Hydrophobizität, und dem Auftreten von hydrophoben Packungsdefekten der Lipide korreliert.^[667-671] Kleine Peptide (wie Valinomycin) und das 17mere Fusionspeptid des HIV-1-gp4 besitzen eine hohe Membranaffinität die Auslöser von Intermembranwechselwirkungen ist.^[672] Auch kleine Biomoleküle wie Ethanol,^[673] aber auch makromolekulare Verbindungen wie PEG^[668, 674] bewirken die Fusion von Membranen weshalb diese Substanzen auch als Fusogene bezeichnet werden.

Im artifiziellen Umfeld biologischer Membranen läuft die Membranfusion nur unter bestimmten Voraussetzungen effizient ab. Allgemein wird heute angenommen, daß der Fusionsprozeß unter Reorientierung der Lipide auf molekularer Ebene stattfindet und von Proteinen (z.B. SNARE-Proteinen)^[675] modifiziert wird.^[676] Hauptaufgabe der Proteine ist es durch die Reduktion der dazu notwendigen Zeit, der Energiebarriere und der Abstände zwischen den beiden Membranen die Spezifität zu erhöhen.^[661] Da unter den Präparationsbedingungen für tBLMs der Einsatz von Hilfsproteinen (die zusätzlich noch ATP-abhängig sind) nur schwierig möglich und nicht erwünscht ist (um keine zusätzlichen Funktionseinheiten in die Membran einzubauen), gewinnt der Einfluß inhärenter Lipideigenschaften an Bedeutung.

Bei der Fusion zweier Membranen oder der Fusion vesikulärer Membranen mit Festkörperoberflächen treten strukturelle Änderungen der Membranlipide auf (Änderung des Phasenzustands).^[677] Es wird angenommen, daß bei der Fusion von Membranen ein hexagonal-

lamellar-hexagonaler Phasenübergang stattfindet.^[678, 679] Das Auffinden von Lipiden, die einen „sanduhrenartigen“ Übergang (engl. „hourglass“ auch als „stalk“ bezeichnet) der Lipidphasen aufweisen der am besten mit einem rhomboedrigen Übergang beschrieben werden kann, würde einerseits Anhaltspunkte für den mechanistischen Ablauf der Fusion geben, und andererseits durch die Struktur-Funktionsbeziehung Einblick in die molekularen Voraussetzungen liefern.^[680] Kürzlich zeigten Yang et al., daß Diphytanoylphospholipide einen solchen Übergang (rhomboedrische Phase) als Übergangsstruktur zwischen der lamellaren (L_α) und der invertierten hexagonalen (H_{II}) Phasen zeigen.^[681]

Phasenübergänge zwischen lamellaren Phasen zu hexagonalen Phasen wurden auch bei zwei weiteren natürlich vorkommenden Lipiden gefunden; dem Lipid A Gram-negativer Bakterien^[682] und bei Cardiolipin^[683]. Allen diesen Lipiden ist ein negativer Krümmungsradius gemein, der solche Übergänge fördert.

Zusätzlich ist die Fusion stark von der Oberflächenladung abhängig. Um Vesikel auf SAMs zu fusionieren eignen sich im besondern Maße Phosphat- und Sulfatgruppen plus Ca- oder Mg-Ionen.^[684] Die Vesikelfusion von Tetraetherlipiden wird von Calciumphosphat unterstützt.^[685]

Freie Fettsäuren beschleunigen den Austausch von Cholesterin zwischen Membranen und erhöhen die Mobilität der Lipide allgemein. Dies gilt für gesättigte Fettsäuren mit C_{12} - C_{18} , und ungesättigten Fettsäuren mit C_{18} -Ketten, wohingegen kurze Alkylketten (C_8 - C_{10}) und lange Alkylketten größer C_{24} keine Wirkung zeigen.^[490]

Der Einfluß von Cholesterin auf die Bildung und die Stabilität von Membranen ist komplex und kann nicht universell angegeben werden. In niedrigen Konzentrationen von 10 % ist die Spreitgeschwindigkeit einer Lipiddoppelschicht aus DMPC/Cholesterin um den Faktor 10 gegenüber der reinen DMPC-Membran erniedrigt. Dagegen führen hohe Cholesterinkonzentrationen von 40 % zu einer Erhöhung der Spreitgeschwindigkeit und einer verstärkten Tendenz mit vorhandenen Lipidmembranen zu fusionieren.

Membranfusionen wurden mit Hilfe von AFM-^[686] und Neutronenstreutechniken^[687, 688] untersucht. Dabei konnte der Mechanismus der Vesikelfusion mit Hilfe von AFM-Aufnahmen teilweise visualisiert werden. Calcium sorgt für ein Verschwinden des Übergangszustandes, auf hydrophoben Oberflächen erscheinen die Membranränder ungleichmäßig geformt und die zuvor angebundnen Liposomen scheinen gestört zu sein.^[686]

Neutronenstreutechniken erlaubten die Visualisierung des geometrischen Verlaufs der Fusion. Es konnte der oben beschriebene „sanduhrenartige“ Übergang visualisiert werden.^[687, 688] Daß sich Lipide in Abhängigkeit ihrer Struktur und Fluidität in verschiedenen Vesikelpartien konzentrieren, zeigen die beiden Bilder in Abbildung 28. In beiden sind große unilamellare Vesikel (Sphingomyelin, DOPC und Cholesterin) in verschiedenen Formen dargestellt.

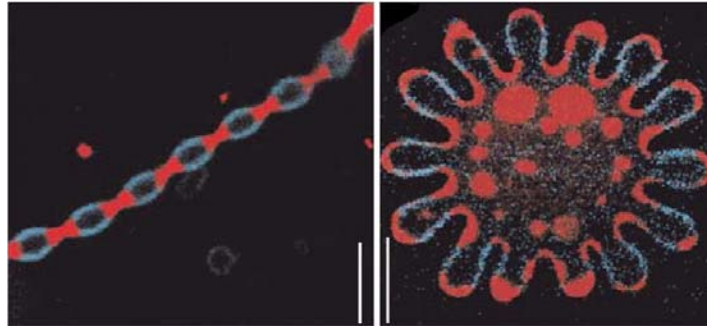


Abbildung 28 Lipide unterschiedlicher Fluidität und Geometrie bevorzugen Regionen mit verschiedenen Krümmungsradien in Abhängigkeit von der Temperatur (44 °C links und 50 °C rechts, Skalierungsbalken 5 µm)^[572]

Die roten stark gekrümmten Bereiche werden von dem in der fluiden Phase befindlichen Rhodamin-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (rho-DPPE) rot gefärbt, während die blauen Bereiche geordneten Lipidphasen entsprechen die Perylen als Fluoreszenzsonde enthalten.^[572] Bei weiterer Temperaturerhöhung entstehen neue Vesikel durch Knospung. Betrachtet man die Vesikelfusion, so kann diese auch als umgekehrter Prozess der Knospung verstanden werden. Der Verlauf der Vesikelfusion ist also von der Lipidform, den beteiligten Ionen in Lösung, dem Lösungsmittel, den thermodynamischen Größen, der Polarität der Vesikeloberfläche und der Substratoberfläche abhängig. Neben den Vesikeleigenschaften, die in erster Linie durch die Lipide selbst, in zweiter Linie durch die äußeren Einflüsse wie deren Größe und die Temperatur beeinflusst werden, sind die Eigenschaften der Festkörper- bzw. Substratoberfläche von essentieller Bedeutung. Sehr hydrophile oder sehr hydrophobe Festkörperoberflächen eignen sich für die Fusion von Vesikeln, auf Oberflächen mittlerer Polarität (Oberflächenenergie) kommt es häufig nur zur Adsorption von Vesikeln ohne deren Fusion.^[689] Einzelheiten der Oberflächeneffekte werden in Kapitel 3.2 untersucht.

3.1.2.4.8 Biophysikalische Eigenschaften der Lipide – dynamisches Verhalten

Lipide führen in biologischen Membranen eine Reihe verschiedener Bewegungsformen aus. Zu diesen gehören die laterale Diffusion der Lipide in der Membranebene, die Rotation um die Moleküllängsachse und die transmembrane Diffusion bzw. „Flip-Flop“.

Ein Maß für die laterale Fluidität der Membrankomponenten ist deren Diffusionskoeffizient. Er liegt für Phospholipide bei $10^{-1} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ wobei der höhere Wert für reine Lipidmembranen gilt. Je proteinreicher die Membran ist, desto kleiner wird gewöhnlich die Beweglichkeit der Lipide. Für integrale Membranproteine liegen die Diffusionskoeffizienten bei $0,1 - 0,01 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$

(Rhodopsin = $0,4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, Fibronectin = $1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$).^[9] Typische Diffusionskoeffizienten für die laterale Diffusion der Lipide sind in Kapitel 3.1.2.2 angegeben.

Erst eine hinreichende laterale Fluidität erlaubt die funktionelle Einbettung von Membranproteinen, die Anpassung der Membran an integrale Membranproteine während konformatorischer Strukturänderungen, die funktionelle Wechselwirkung der Proteine untereinander (siehe Kapitel 3.1.2.4.6) und die Ausheilung von Membrandefekten.

Neben der Einbettung und Wechselwirkung mit Membranproteinen sind biologische Membranen für die Separation von Reaktionsräumen verantwortlich. Die Separationsfunktion steht mit den dynamischen Eigenschaften der Membran in direktem Zusammenhang, da dichte Membranen, die biologische Funktionen ausüben, in der Regel im dynamisch-fluiden Zustand vorliegen. Um die Separation von Reaktionsräumen gewährleisten zu können müssen biologische Membranen die passive Diffusion von ungeladenen (z.B. Harnstoff und Glucose) und geladenen Teilchen (z.B. von Atom- oder Molekülonen) verhindern. Typische Permeabilitätskoeffizienten für Biomembranen liegen bei $4 - 60 \mu\text{m s}^{-1}$ für Wasser, ca. $5 \times 10^{-2} \mu\text{m s}^{-1}$ für Glycerin, ca. $10^{-3} \mu\text{m s}^{-1}$ für Glucose, ca. $10^{-4} \mu\text{m s}^{-1}$ für Chlorid und ca. $10^{-5} \mu\text{m s}^{-1}$ für Natriumionen.^[9] Im Gegensatz zu Teilchen in Lösung besitzen Gase wie Sauerstoff eine relative große Permeabilität.^[690] Die Separation von Ionen ist für die Funktion der Zelle von essentieller Bedeutung, da beispielsweise die Synthese von ATP durch die H^+ -ATPase über die Ausnutzung des Protonengradienten verläuft.^[47, 691] Biologische Membranen weisen daher einen hohen elektrischen Widerstand und eine kleine Kapazität auf. In der Literatur sind die elektrischen Größen biologischer Membranen mit einem Lipid- zu Membranprotein-Verhältnis von etwa 1:1 (Verhältnis integraler - peripherer Proteine 60:40) mit einem Widerstand von $100 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ und einer Kapazität von $0,5-1 \mu\text{F cm}^{-2}$ angegeben.^[200] Kleine Widerstände von $100 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ können an natürlichen Membranen gemessen werden die aktive Membranproteine in der Membran enthalten. Der Widerstand variiert je nach Membranzusammensetzung und Funktion (auch vom Funktionszustand der Membranproteine). Die Untersuchung der elektrischen Eigenschaften der natürlichen Lipidmembran wurde mit Hilfe von BLM-Patch-Clamp-Messungen an reinen Lipidmembranen durchgeführt. Lipidmembranen aus proteinfreier Ei-PC-Phospholipidmischung weisen Kapazitäten von $0,7 \mu\text{F cm}^{-2}$ und Widerstände von $100 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ auf.^[692, 693] Ei-PC weist gegenüber Soja-PC meist einen geringeren Anteil an ungesättigten Lipiden auf.

In eukaryontischen Zellen besitzen die Membranen der intrazellulären Organellen eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung. Zusätzlich weisen Biomembranen einzelner Kompartimente eine asymmetrische Lipidverteilung der plasmatischen und der

exoplasmatischen Membranseite auf.^[694] Da Membranlipide auf der plasmatischen Seite der Membran synthetisiert werden, muß folglich ein stofflicher Austausch zwischen beiden Membranhälften stattfinden. Die Membranlipidorganisation reflektiert je nach Membran und der in ihr vorkommenden lipidtransportierenden Proteine entweder ein dynamisches Gleichgewicht von Lipiden die über die Membran hinweg ausgetauscht werden, oder eine sehr spezifische Lokalisation von verschiedenen Lipidspezies auf den jeweiligen Membranseiten.^[695, 696] Die Asymmetrie der Membran ist aus zwei Gründen entscheidend. Zum einen sind die individuellen geometrischen und polar/hydrophoben Eigenschaften der Lipidspezies grundlegende Voraussetzung bei der Ausbildung unterschiedlicher Membranformen (siehe auch Kapitel 3.1.2.4.1, 3.1.2.4.4 und 3.1.2.4.7) und dynamischer Membranprozesse wie Knospung und Endocytose,^[697] zum anderen ist die Änderung der asymmetrischen Lipidverteilung direkt mit einer Reihe biologischer Funktionen verbunden. Die biologische Bedeutung der transmembranen Diffusion, bzw. des transmembranen Transports, ist für eine Vielzahl essentieller Zellfunktionen notwendig.

Wie kann die Asymmetrie der Membran erzeugt, aufrechterhalten, und bei Bedarf wieder geändert werden? Zur Beantwortung dieser Frage muß die Zusammensetzung der natürlichen Membranhälften analysiert werden. Die cytosolische Membranseite enthält die Aminophospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin als Hauptlipidkomponenten. Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Phosphatidylinositol befinden sich dagegen in der extraplasmatischen Membranhälfte.

Untersuchungen zeigen, daß die Geschwindigkeitsrate für die spontane transmembrane Diffusion (auch als „flip-flop“ bezeichnet) für verschiedene Lipide stark variiert. Neben der Dynamik der hydrophoben Ketten, sind vor allem die Polarität und die Ladung der Kopfgruppe für die transmembrane Diffusionseffizienz entscheidend.^[183] Phospholipide mit polaren Kopfgruppen wie PC, PE, PS und Glycolipide zeigen nur eine geringe transmembrane Diffusionsrate. Die Halbwertszeiten liegen in Abhängigkeit von der Kopfgruppengröße und der Ladung im Bereich von Stunde bis Tagen.^[698-700] Die Diffusionsgeschwindigkeit ist beim Durchführen der polaren Kopfgruppe durch die Membran aus energetischen Gründen in reinen Lipidmembranen für Lipide mit geladenen Kopfgruppen vernachlässigbar klein. Der Einfluß von fluiden, hydrophoben Resten wird anhand der Variation der Halbwertzeit für die transmembrane Diffusion von 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (26,9 h) und 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (2,9 h) deutlich.^[701] Im Gegensatz können neutrale Lipide wie Diacylglycerin, und geladene Lipide wie freie Fettsäuren, Phosphatidsäure oder Phosphatidylglycerin in ihrer protonierten Form innerhalb von Sekunden oder Minuten von einer Membranseite auf die andere diffundieren. So liegt die Halbwertszeit für ungeladene

Diacylglycerinderivate bei $< 15 \text{ sec.}$ ^[702] Cholesterin zeigt ebenfalls eine rasche transmembrane Diffusion.^[703] Etherphospholipide weisen eine 4-8 mal langsamere Diffusionsgeschwindigkeit als Esterlipide auf (Substratspezifität und Effizienz der Translokasen?).^[275] Molekulare Packungsdefekte scheinen eine Ursache für eine schnelle transmembrane Diffusion zu sein.^[704] Diese können beispielsweise von konischen PE induziert werden. Aber auch Phosphoisoprenoide (z.B. Dolichol), die als molekulare Transporter von Glycosylresten über die ER-Membran fungieren, destabilisieren die Membran und erhöhen dadurch den Flip des Lipids von der plasmatischen Membran auf die extraplasmatische Membranseite).^[403] KOL et al. zeigten, daß durch α -helikale Peptide die transmembrane Diffusion spezifischer Phospholipide stark erhöht wird.^[705] Einen entsprechenden Effekt haben auch FATTAL et al. für porenbildende Peptide wie GALA und Mellitin nachgewiesen.^[706] Durch Proteinvermittlung wird die transmembrane Diffusion also in beide Richtungen stark beschleunigt.^[707]

Die Aufrechterhaltung der transmembranen Lipidasymmetrie ist für die normale Membranfunktion essentiell und Störungen der Asymmetrie sind mit Zellaktivierung oder pathologischen Zuständen assoziiert. Die Lipidasymmetrie wird durch selektive Synthese der Lipide auf einer Membranseite eingeleitet. Da die transmembrane Diffusion nur sehr langsam ist, besitzt die Zelle eine Reihe von Proteinen die entweder die Asymmetrie aufrechterhalten, initiieren, oder für eine gleichmäßige Verteilung der Lipide über beide Membranhälften sorgen. (siehe Abbildung 29)

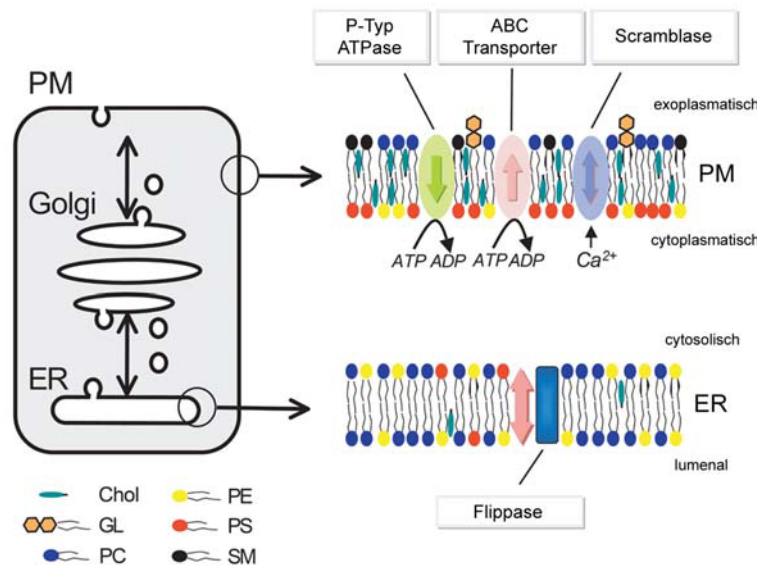


Abbildung 29 Regulation der transmembranen Lipidverteilung in zellulären Membranen. (nach POMORSKI et al.)^[477] PM=Plasmamembran, ER=Endoplasmatisches Retikulum. Die Lipidabkürzungen: Chol=Cholesterin, GL=Glycolipide, PC=Phosphatidylcholin, PE=Phosphatidylethanolamin, PS=Phosphatidylserin und SM=Sphingomyelin sind entsprechend ihrer natürlichen Verteilung dargestellt.

Der in Abbildung 29 dargestellte transmembrane Lipidtransport wird nach dem derzeitigen Kenntnisstand wie folgt beschrieben. In frühen sekretorischen Organellen, z. B. dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), unterstützen Membranproteine den schnellen Flip-Flop der Lipide zwischen den beiden Membranhälften in einem ATP-unabhängigen Prozess. Dieses System ist nicht in der Lage ein gegebenes Lipid in einer Membranhälfte zu akkumulieren, und fördert daher die symmetrische Verteilung der Lipide (zum Beispiel nach deren Synthese). Im Gegensatz dazu ist der Flip-Flop in der Plasmamembran (PM) durch die hohe Konzentration an Cholesterin und Sphingolipiden und/oder Abwesenheit von bidirektionalen Flippasen eingeschränkt. ATP-abhängige Flippasen können die asymmetrische Lipidverteilung durch das Transportieren der entsprechenden Lipide in Richtung (P-Typ ATPase Familie) oder weg von der cytosolischen Membranhälfte (ABC-Transporter) aufrechterhalten. Zelluläre Aktivierung durch cytosolisches Calcium kann zum Kollaps der Lipidasymmetrie durch die transiente Aktivität einer ATP-unabhängigen Scramblase^[708] führen.^[477]

Die in den transmembranen Transport involvierten Proteine lassen sich entsprechend in drei Hauptklassen einteilen:^[709]

- 1) cytofaciale, ATP-abhängige Transporter ("Flippasen " (z.T. auch als Floppasen bezeichnet))
- 2) exofaciale, ATP-abhängige Transporter ("Floppasen")
- 3) bidirektionale, ATP-unabhängige Transporter ("Scramblasen")

Die Begriffe Flippase und Flopase werden oft in verwirrender Weise angewandt. Zur besseren Unterscheidbarkeit sollte der in der ER-Membran vorkommende bidirektionale, ATP-unabhängige Transporter als ER-Flippase definiert werden. Die ATP-abhängige Flippase^[710] katalysiert den Transport^[711] von PE und PS entweder von der extrazellulären oder der lumenalen Membranhälfte zur cytosolischen Membranhälfte. Diese Proteine (1) scheinen P-Typ ATPasen in der Drs2p-ATPase II-Familie zu sein. Dagegen vermitteln Floppasen den entgegengesetzten Transport, der kinetisch langsamer ist und anscheinend keine Kopfgruppenspezifität besitzt, auch wenn Floppasen in erster Linie unspezifisch sind, zeigen zumindest zwei Mitglieder dieser Familie eine gewisse Selektivität.^[709] Floppasen werden den ATP-bindenden Kassetten (ABC) Transportern zugeordnet.^[712, 713]

Die biologischen Funktionen der Transporter sind vielschichtig. Spektroskopische Messungen an Modellsystemen vermitteln zusätzliche Einblicke.^[714] Die energieunabhängigen Flippasen in

den Organellen des frühen sekretorischen Systems sind für die richtige Membrankonstitutionierung verantwortlich. ATP-abhängige Flippasen sind für den Nettotransfer spezifischer Lipide auf eine Membranseite verantwortlich und regulieren daher die transmembrane Lipidanordnung der Plasmamembran und wahrscheinlich des späten Golgiapparates und der endosomalen Kompartimente.^[477] Durch die Beteiligung von Phosphatidylserin an apoptotischen Prozessen (PS wird an die Membranaußenseite transportiert und wird dort von Rezeptoren auf Phagozyten^[715] und Makrophagen^[525] erkannt) ist seine definierte Lokalisierung von essentieller Bedeutung. Die Aufrechterhaltung der Membransymmetrie durch Flippasen wird indirekt durch Lipide selbst gesteuert. Zwei hochreaktive Produkte der Lipidperoxidation 4-Hydroxynonenal (HNE) und Acrolein, die beide in erhöhter Konzentration in Alzheimer befallenen (AD) Gehirnen gefunden wurden, induzieren Apoptose durch kovalente Bindung an einen für die Funktion der Flippase kritischen Cysteinrest.^[716] Darüberhinaus spielen sie eine Rolle bei der Blutkoagulation, der Gallenflüssigkeitssauscheidung und der Spermienfunktion.^[477] Letztere ändern nach ihrer Stimulierung die transmembrane Lipidzusammensetzung um die Fusion mit der Eizelle zu erleichtern.^[717, 718] Fusion und Vesikulation sind wichtige Transportvorgänge, die durch den asymmetrischen Lipidtransport unterstützt werden können. Die ATP-abhängige Lipidtranslokation durch Flippasen könnte infolge der asymmetrischen Lipidanreicherung bezüglich der Quantität und der Lipidspezifität für diese Prozesse eine Rolle spielen. Im Fall der Endocytose nimmt die Zahl der cytoplasmatischen Membranlipide eines 60 nm Vesikels im Verlauf der Abschnürung um den Faktor 1,5 zu. Es kommt also zu einer wesentlichen Umverteilung von Lipiden. Zusätzlich zu dieser quantitativen Umverteilung könnte der Transport zu einer starken Anreicherung von Aminophospholipiden führen die bevorzugt ARF, Clathrin, Amphiphysin und Endophilin binden.^[477] Binden diese Proteine an die Membran induzieren sie eine starke Membrankrümmung, welche die Endocytose auslöst bzw. unterstützt.^[712]

Die Rotation der Lipide zeigt Unterschiede bezüglich der Kopfgruppen- Schwanzgruppen- und Gesamtmolekülrotation.^[719] Die Bedeutung der Rotation in Zellmembranen und deren geometrischen Verformungszuständen ist bisher nicht bekannt, aber durch den Einsatz neuer Methoden zugänglich.^[720]

3.1.3 Cytoskelett

Mimikry des Cytoskeletts sind Kernelemente jeder tBLM. Da die membranstützenden Spacermoleküleinheiten die Aufgabe von Cytoskelettäquivalenten übernehmen, ist die Kenntnis der biologischen Wechselwirkung zwischen Membran, Cytoskelett und extrazellulären Matrix als Vorbild für die Strategie der tBLM-Entwicklung von allgemeiner Bedeutung. (Abbildung 30)

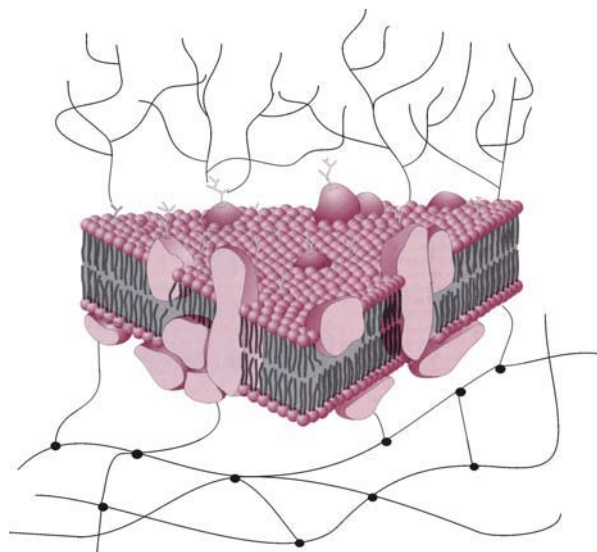


Abbildung 30 Modellhafte Darstellung der engen Wechselwirkung zwischen extrazellulärer Matrix, Membran und Cytoskelett. Verschiedene Elemente des Cytosketts sind über Membranproteine direkt mit der extrazellulären Matrix verbunden. (modifizierte Abbildung aus^[721])

Neben seiner zentralen Rolle für die Struktur der Zelle^[722] (besonders der Erythrozytenmembran)^[723] und der mechanischen Stabilität des Endothels^[724], spielt das Cytoskelett bei der Organisation intra- und interzellulärer Zellarchitekturen^[725], der Zellmigration, der Morphogenese und der fokalen Adhäsion^[726] eine Rolle. Das Cytoskelett ist entscheidend am bidirektionalen Informationsaustausch^[727] über die Membran und den Ablauf der Virus-^[728, 729] und Bakterieninfektion^[730] beteiligt. Die Regulation der Assemblierung von extrazellulärer Matrix, Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod sind weitere funktionelle Abläufe die unter Beteiligung des Cytosketts ablaufen.^[731-733]

Unabhängig vom Zelltyp ist die Regulation des Cytosketts mit vitalen biologischen Eigenschaften wie Polarität, Motilität, Zell-Zell-Kontakt, Exocytose und Proliferation

verbunden.^[9] Das Immunsystem, das auf schnelle und effiziente Wechselwirkung angewiesen ist, scheint in besonderer Weise in seinen signalverstärkenden Schritten bei der Aktivierung des T-Zellrezeptors vom Actincytoskelett und seinen Regulatoren abzuhängen.^[734, 735] Die Analyse des Cytoskeletts^[736] hat in diesem Kontext eine wesentliche Stellung in der Zellbiologie erhalten.

Erst die Organisation der Membranprotein-Cytoskelett-Wechselwirkungen erlaubt die Polarisierung von Zellen, einer Voraussetzung für die Kommunikation innerhalb multizellulärer Verbände.^[737] Die Integrin – Mechanotransduktion spielt hierbei eine wichtige Rolle.^[738]

Wie der Wortstamm “Skelett” ausdrückt ist das Cytoskelett die zentrale strukturgebende innere Einheit der Zelle. Das Tensegrity-Konzept^[739, 740] zeigt im Modell die Bedeutung der möglichen, cytoskelettvermittelten mechanischen Spannung zur Stabilisierung der Membran und deren Widerstand gegenüber der Kompression. In der Zelle fungieren die Mikrotubuli als Streben welche die Kompressionsbelastung aufnehmen. Die Mikrofilamente sind vergleichbar mit Spannungsträgern, während die Intermediärfilamente zusätzliche Spannungsverknüpfungen zum Zellkern herstellen.^[739, 740] Prozesse die mit zellimmanenten mechanischen Zug- und Druckverhältnissen in Verbindung stehen, beispielsweise die Migration, die Proliferation, das Wachstum, die Strukturbildung, oder die Aktivierung/Deaktivierung von mechanisch beeinflussbaren Poren und Ionenkanälen stehen mit der Membran in direktem Zusammenhang.^[741]

Der intrazelluläre Aufbau der Zelle beruht auf einer Reihe eigenständiger Strukturelemente die miteinander in enger Wechselwirkung stehen. Die wesentlichen Netzwerke sind die Actin- und Myosinfilamente,^[726] das Spektrinnetzwerk^[742], Desmin,^[743, 744] Plectin^[745] und das besonders für den intrazellulären Transport wichtige Mikrotubuli-Cytoskelett mit Tubulin, Dynein und Kinesin (siehe Abbildung 31)^[746]. Das Actincytoskelett ist ein hochdynamisches Netzwerk, aufgebaut aus polymerem Actin und einer Vielzahl assoziierter Proteine. Die Hauptfunktion des Actincytoskeletts ist die Vermittlung von Zellmobilität, die Änderung der Zellform während des Zellzyklus und die Organisation des Cytoplasmas durch den Aufbau mechanischer Kräfte in Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli.^[747]

Bei den Mikrotubuli unterscheidet man zwei Arten, das Actin-bindende Protein (*engl. actin-binding protein (ABP)*) und das Mikrotubuli-assoziierte Protein (*engl. microtubule-associated protein (MAP)*)^[748]. Desmin-Intermediärfilamente spielen für die Funktion von Mitochondrien eine Rolle.^[743] Neben diesen sind Ankyrin, Vinculin, Talin und Dystrophin separate Gruppen der membranassoziierten Proteine die dem Cytoskelett zugerechnet werden.^[749] Tubulin und Desmin sind an der Hypertrophie des Herzens und dem Herzversagen (*engl. cardiac hypertrophy and failure (CHF)*) beteiligt.^[744] Formin wirkt an der Nukleation des Actins und

bei der Bildung neuer Filamente mit. Zusätzlich bestehen Verbindungen zwischen Formin und den Mikrotubuli die zur Stabilisierung und Polarisierung der Mikrotubuli beitragen.^[750]

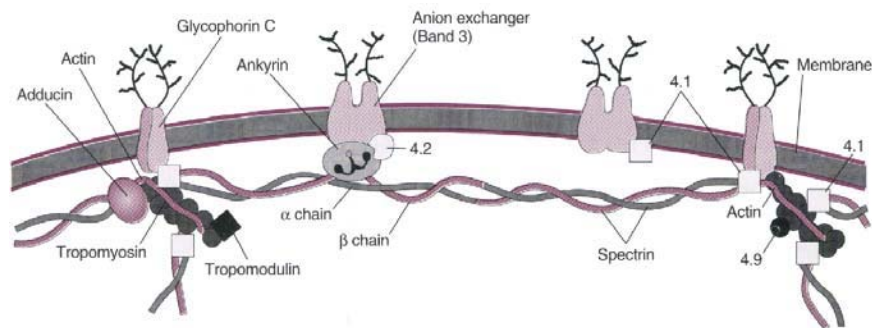


Abbildung 31 Schematische Darstellung der Cytoskelettstruktur aus^[721]

Die Funktionen und Eigenschaften des Cytoskelett und des Cytosols sind ebenfalls miteinander verknüpft. Dabei spielt die Beeinflussung der aquatischen Parameter im Zellinneren für alle physiologischen Prozesse eine zentrale Rolle. Auch extreme Bedingungen wie große Trockenheit können einige Organismen durch innere-Osmoregulation mit Hilfe von Oligosacchariden und Betainen ausgleichen.^[751] Die Hydratisierung von Cytoskelettuntereinheiten wird durch deren Polymerisation modifiziert, wodurch die osmotischen Eigenschaften der Zelle und die Hydratisierbarkeit des Polymers innerhalb des Netzwerks variiert werden.^[752] Der dynamische Charakter der Hydratisierung führt zusammen mit der negativen Oberflächenladung der Cytoskelettpolymere zu einer räumlich repetitiven Verteilung der Untereinheiten. Dadurch wird eine lokale und eine weitreichende Ordnung des Diffusionsstroms von Wasser und der darin gelösten Verbindungen innerhalb des Polymernetzwerks erreicht.^[752] Cytoskelettale Polymere bilden durch ihren Polyelektrolytcharakter eine große intrazelluläre Fläche kondensierter anionischer Ladungen. Diese übt eine Pufferfunktion für Kationen aus die an der Regulation intrazellulärer Prozesse beteiligt sind.^[752] Zusätzlich führt die spezifische Ladungsverteilung zur Assoziation cytoplasmatischer Enzyme und multimolekularer Komplexe mit dem Cytoskelett, wodurch eine Direktionalisierung metabolischer Pfade und die Lokalisierung der Komplexe in Subdomänen des Cytoplasmas eintritt. Ein Einfluß auf die Lipidverteilung wird vermutet.^[752, 753]

Um effiziente Strategien für die Nachahmung der Wechselwirkungen zwischen Membrankomponenten und Cytoskelett zu entwickeln, sind in erster Linie Informationen über die Art der Wechselwirkung und die Verknüpfung der Membranlipide mit dem Cytoskelett

wichtig. Eine wesentliche Erkenntnis der Zellbiologie ist, daß nur ein auffallend kleiner Teil der Membranlipide kovalent an das Cytoskelett gebundenen ist.^[9]

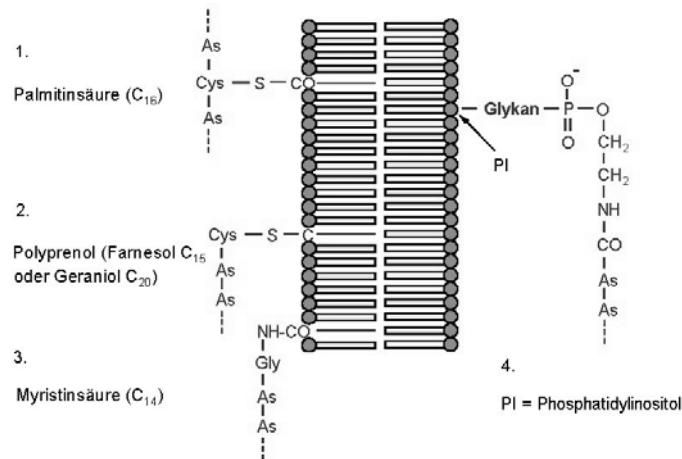


Abbildung 32 Nur ein kleiner Teil der Membranlipide ist direkt an Proteine des Cytoskeletts gebunden. (Modifizierte Abbildung nach^[9])

Wechselwirkungen von Membran und Cytoskelett besitzen für strukturelle und funktionelle Funktionen der Zelle große Bedeutung.^[754, 755] Prozesse wie Endocytose^[756] und Exocytose^[757] laufen unter Beteiligung des Cytoskeletts ab. Die Zahl der an das Cytoskelett angebotenen Lipide ist für die Entwicklung biomimetischer Systeme (vor allem tBLMs) von Bedeutung, da bei hoher Ankerdichte auf der Festkörperoberfläche die Fluidität stark eingeschränkt wird. Ein Vergleich mit dem natürlichen Vorbild soll im Zusammenhang mit den in der Natur verwendeten Lipidmotiven Aufschluß darüber geben, wann von einer mit der natürlichen Membran vergleichbaren „Ankerdichte“ gesprochen werden kann. Analysiert man die Verhältnisse in der natürlichen Membran zeigt sich, daß der Anteil der kovalent an Cytoskelettproteine gebundenen Lipide gering ist.^[9] Leider liegen keine quantitativen Daten vor.

Neben den kovalenten Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett werden elektrostatische und polare Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett ausgebildet.^[758]

Eine weitere Art der Membranstabilisierung wird durch die hydrophobe Wechselwirkung der Lipide mit transmembranen Proteinen erreicht, die mit dem Cytoskelett in Wechselwirkung stehen. Die Funktion der Membranproteine wird dabei oft durch das Cytoskelett reguliert.^[759]

Der zahlenmäßige geringe Anteil an cytoskelettgebundenen Membranlipiden und das dynamische Verhalten des Cytoskeletts erlaubt die Ausbildung von „Lipidreservoirs“ durch Membranausstülpungen, Kräuselung, Faltung und Mikrovilli.^[665]

Trotz der geringen Zahl an kovalent gebundenen Lipiden ist die Membran stabil mit dem Cytoskelett verbunden. Die Stabilität wird neben der geometrischen Struktur des von einer sphärischen Membran umschlossenen Cytoskeletts, von der Art der Wechselwirkung der gebundenen und freien Lipide vermittelt. Durch die Anbindung von Cytoskelett-Proteinen an Phosphatidylinositole tragen diese wahrscheinlich zusätzlich zur Strukturierung von Rafts durch die indirekte, kovalente Anbindung an das Cytoskelett bei.^[228] Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Vesikeltransport, Cytoskelett, Rafts und der Konzentration von Phosphatidylinositol in den Rafts.^[228, 760]

Zur Verifikation der Wechselwirkungen zwischen Membran und Cytoskelett liegen bisher nur wenige Arbeiten vor, die überwiegend an Modellsystemen durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß PA/PC-Lipide an die h-Untereinheit des erythrocytischen Ankyrins gebunden sind. Im Gegensatz dazu ist die Wechselwirkung erythrocytischen Spectrins an die Membranoberfläche nur sehr schwach ausgeprägt.^[758] Die leichte Bindung des Spectrins an die Lipidmembran zeigt sich an der verhältnismäßig großen Diffusionskonstanten von $21 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Aus diesem Grund wird nur eine geringe, durch Spectrin vermittelte, Stützwirkung auf die Membran angenommen.^[761]

Eine große Zahl strukturell unterschiedlicher Ionentransportproteine binden an das Spectri-Actin-Cytoskelett über Linkermoleküle an Ankyrin und Protein 4.1, wodurch die Cytosplasmamembran mit dem Cytoskelett/Cytoplasma verbunden wird.^[762] (Abbildung 31) Neben den schon beschriebenen Cytoskelettkomponenten wirken auch die Cytoskelettproteine Dystrophin und Utrophin an den Membran-Cytoskelett-Wechselwirkungen mit.^[763] Nähere funktionelle Zusammenhänge und ihr genauer Einfluß auf die Zellmembran sind aber noch nicht bekannt.

Die Rolle des Cytoskeletts bei der Endocytose^[756, 764] und dem intrazellulärem Vesikeltransport^[765, 766] steht im Zusammenhang mit dem Transport von Membranproteinen^[767]. Besonders spezifische Kinesin-, Dynein- und Myosin-Motorproteine vermitteln den definierten Membrantransport.^[768] Membrantransport und Strukturänderungen werden im Kontext mit der intrazellulären Signaltransduktion durch Wechselwirkung mit G-Proteinen gesteuert.^[168] Die Erforschung der Wechselwirkungen der Membran und der extrazellulären Matrix/Glycocalix mit dem Cytoskelett ist auf Grund der komplexen Zusammenhänge noch in ihren Anfängen und läßt die Entdeckung weitere wichtiger Zusammenhänge erwarten.

3.2 Biomimetische Membranen - Aufgaben, Eigenschaften und Aufbau

Warum biomimetische Membranen? - Das Interesse an biomimetischen Membranen wird verständlich, bedenkt man die fundamentale Bedeutung biologischer Membranen und die Vielzahl ihrer Funktionen, die von großem wissenschaftlichem und technischem Interesse sind.^[769] Biologische Funktionen nachzuahmen und in experimentell zugängliche, simplifizierte Formen zu bringen, ist ein bedeutsames Element zum Verständnis komplexer biologischer Membranprozesse- und Funktionen. Im Einzelnen sind dies der Aufbau von semipermeablen Barrieren, die Kompartimentierung von zellulären Funktionseinheiten (Organellen), die Wechselwirkung mit Liganden, die Insertion von molekularen Funktionseinheiten/Proteinen und Transportprozesse. Hauptmotivation und gleichzeitig anspruchsvollste Mimese der biologischen Membran sind der funktionelle Einbau und die Analyse von Membran- und Transmembranproteinen sowie von Translokatoren. (Abbildung 33)

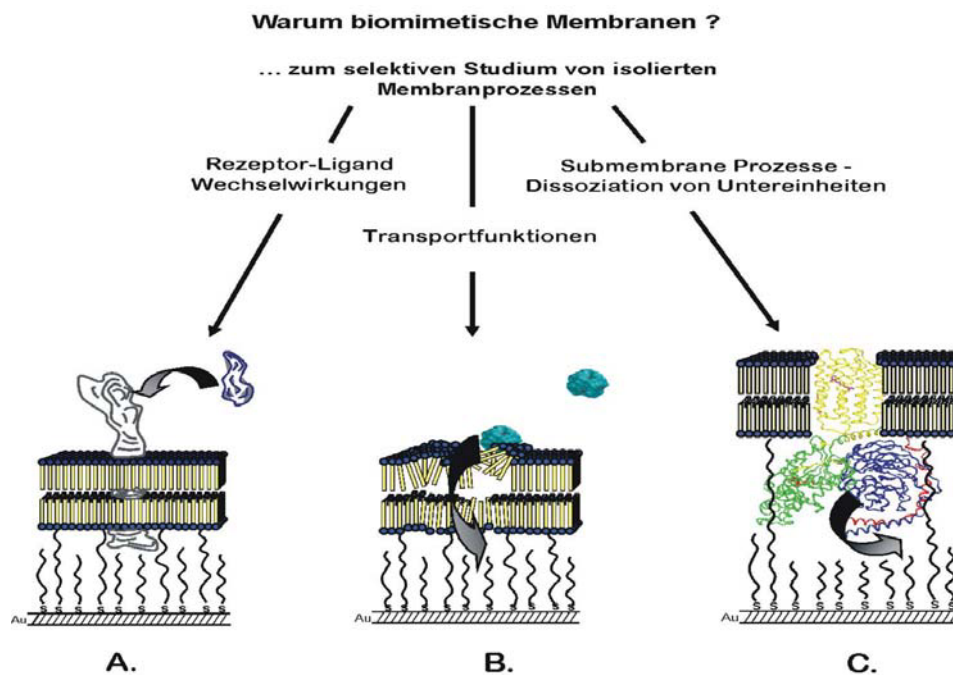


Abbildung 33 Anwendungsbeispiele für tBLMs: Die Konstitution der Membran aus einer definierten Zahl an Verbindungen und die Möglichkeit gezielt nur eine oder wenige Spezies an Membranprotein einzubauen erlaubt das Studium dieser Proteine ohne den Einfluß sekundärer Effektoren. Diese können vielmehr in definierter Anzahl und Konzentration zugesetzt werden. A.) Studium von Bindungsereignissen B.) Transportprozesse die über Translokatoren vermittelt werden (z.B. Kaliumtransport durch Valinomycin) C.) Submembrane Prozesse, z. B. Spaltung von G-Proteinuntereinheiten/Signalkaskaden.

Um biomimetische Membranen aufzubauen bedarf es der Adaption der in Kapitel 3.1 analysierten Komponenten der biologischen Membran an das Umfeld der Meßanordnung. Die gleichen Anforderungen die von der Natur an biologische Membranen gestellt werden müssen auch an die biomimetischen Membranen gestellt werden. Da die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten festkörpergestützten tBLMs nicht nur von den wäßrigen distalen und proximalen Membranräumen umgeben sind, sondern sich auch in molekularer Nachbarschaft zu einer Festkörperoberfläche befinden, ergeben sich zusätzliche Wechselwirkungen. Die Analyse der zu erwartenden Effekte und deren Einfluß auf die Membraneigenschaften sind aus diesem Grund von fundamentaler Bedeutung. Sie wird in diesem Kapitel detailliert durchgeführt und beschrieben.

Übersicht über die behandelten Themen:

- Membranfunktionen
- Einteilung der verschiedenen Modellsysteme biologischer Membranen
- Wichtige Komponenten und Parameter biomimetischer Membranen – Übersicht
 1. Festkörperoberflächen: Festkörpermorphologie und elektronische Eigenschaften
 2. Oberflächenarchitekturen: Selbstorganisierte Monoschichten (SAMs)
 3. Wechselwirkung von Wasser mit verschiedenen Grenzflächen - Einfluß auf Membranen/Vesikel; Vesikelfusion
 4. Stabilität von Membranen, äußere Einflüsse
- Schlußfolgerungen: Wahl der tBLM-Komponenten und der Präparationsmethoden für den Aufbau qualitativ hochwertiger „biomimetischer“ Membranen

Membranmimikrie sind durch komplexe strukturelle, funktionelle und architektonische (geometrische Anordnung der einzelnen Komponenten) Wechselwirkungen charakterisiert.

Im Gegensatz zur biologischen Membran kann zum Aufbau von Membranmimikrie auf eine größere Variabilität chemisch sehr verschiedener Verbindungen und Präparationsmethoden zurückgegriffen werden. Der richtigen Kombination von Methoden und Verbindungen ist dabei die größte Bedeutung beizumessen.

Neben der Auswahl der passenden Verbindungen, die von der Art des gewählten Modellsystems abhängig sind, ist der Aufbau guter Membranmimikie oft nur mit einer bestimmten Kombination von Präparationsmethoden möglich. (Abbildung 34)

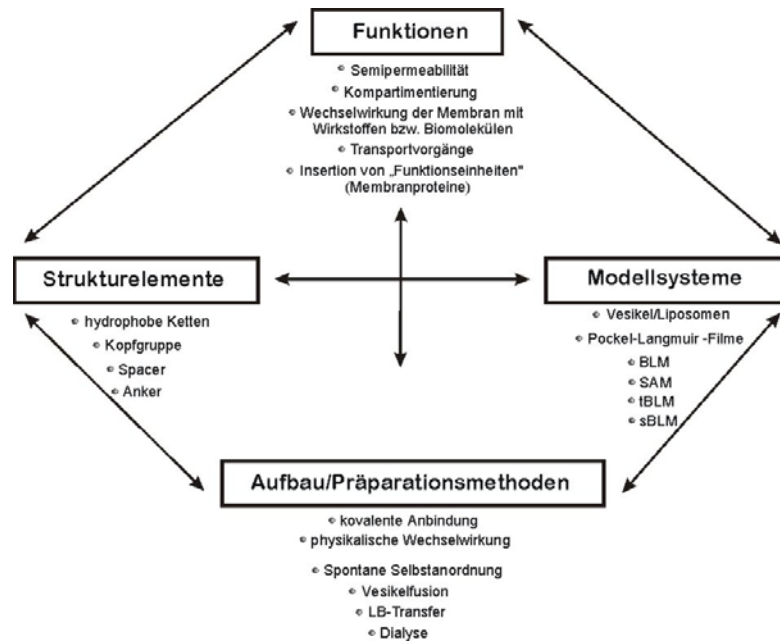


Abbildung 34 Das komplexe Wechselspiel zwischen angestrebter Funktion, Strukturelementen, Präparationsmethoden und dem Modellsystemstypus bestimmt die Eigenschaften und das Leistungsvermögen des jeweiligen Membranmodells. Von den vielen theoretisch möglichen Kombinationen erlauben nur wenige den Aufbau funktioneller biomimetischer Membranen.

Um sinnvolle Mimikrie der biologischen Membran entwickeln zu können, bedarf es der genauen Definition der zu mimikrierenden Funktion/en und den dazu notwendigen chemischen, biologischen und physikalischen Membraneigenschaften.

Alle Membranfunktionen beruhen auf der spezifischen supramolekularen Anordnung und Wechselwirkung einzelner amphiphiler Verbindungen oder deren Mischungen. Somit ist die sinnvolle Kombination der Unterpunkte in Abbildung 34 unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Analyse der Membraneigenschaften und deren Funktionen entscheidend.

Auf der Grundlage dieser Vorentscheidungen und der Definition der Aufgabenstellung leitet sich die spezifische Definition der erforderlichen Amphiphile und des Membranformats ab.

3.2.1 Membranfunktionen

Einzelne von der Membran ausgeübte Funktionen basieren oft auf Kombinationen unterschiedlicher Membranprozesse. Folgende Einteilung der Membranfunktionen kann zur Ermittlung der für die spezifischen Fragestellungen sinnvollen Membranmimikrie und ihrer Komponenten herangezogen werden:

Kompartimentierung: Die räumliche Definition und Abgrenzung von Objekten ist ein fundamentales Merkmal aller makroskopischen Objekte. Kompartimentierung ist daher auch eine wesentliche Aufgabe der verschiedenen Zellmembranen. Sie erlaubt die Abgrenzung von Reaktionsräumen auf zellulärer Ebene und den definierten Transport chemischer Verbindungen.

Erste Anwendungen von Vesikeln (kugelförmige Lipiddoppelschichten) als Nanoreaktoren mit Volumina im Femtoliterbereich sind für die Umsetzung einzelner Verbindungen und kompletter Reaktionssysteme beschrieben.^[770] Medizinisch werden Vesikel oder Liposomen als Transportsysteme für den medizinischen Wirkstofftransport^[771] und die Sensorik^[772] eingesetzt. Der Aufbau und die chemische Zusammensetzung der Vesikel kann in weiten Grenzen variieren. Man findet als Membrankomponenten zellanaloge Lipidmischungen^[773] ebenso wie Di- und Triblockcopolymeren^[774].

Eine methodisch aufwendigere Kompartimentierung ist die Präparation festkörpergebundener Lipidmembranen, die ein äußeres Kompartiment von einem inneren, zwischen Membran und Festkörper eingeschlossenes Kompartiment, abtrennt. Das dynamische Verhalten und auch die für den Einbau von Membranproteinen wichtigen geometrischen Faktoren, wie die Membrandicke, sind hier von Bedeutung. Daher muß bei biomimetischen Verbindungen darauf geachtet werden, daß diese bezüglich ihres dynamischen Verhaltens und ihrer geometrischen Eigenschaften die funktionelle Biomimese der biologischen Membran erlauben.

Semipermeable Barriere: Neben der Kompartimentierungsfunktion besitzen Lipidmembranen vor allem die Aufgabe den Austausch chemischer Verbindungen zu kontrollieren. Die eingeschränkte Permeabilität zwischen den Phasengrenzen ist für die Abgrenzung von einfachen und komplexen Funktionsräumen essentiell. Die semipermeable Lipidmembran erlaubt hierbei den selektiven Transport unterschiedlicher Stoffe in uni- oder bidirektionaler Richtung. Der Transport kann dabei passiv entlang eines Potentialgradienten oder aktiv unter Energieaufwand (meist ATP-abhängige Transportproteine) auch gegen Potentialgradienten erfolgen. Der letzte Punkt wird allerdings nicht zu den semipermeablen

Eigenschaften der Membran im klassischen Sinn gezählt, sondern gehört zum nachfolgenden Punkt „Transportprozesse“.

Die Semipermeabilität biologischer Membranen dient als Vorbild für eine Vielzahl von Anwendungen. Lipidmodifizierte technische Membranen mit hydrophobem Kern werden beispielsweise zur Untersuchung der oralen Verfügbarkeit von Wirkstoffen als Modell der semipermeablen Barrierenfunktion eingesetzt.^[775] Solche Systeme eignen sich für das Wirkstoff-Screening und als Modelle für die Blut-Hirn-Schranke, auch als BBB-Modelle bezeichnet (BBB für *engl. blood brain barrier*).^[776, 777] Für den Aufbau dieser Modelle können verschiedene Ansätze angewandt werden. Wichtig sind hier die Phasengrenzen und der hydrophil-hydrophob-hydrophile Aufbau. Genau diese Eigenschaft macht immobilisierte artifizielle Membranen aus Membranlipiden auch für die Chromatographie interessant.^[778] Die exakte strukturelle Anordnung und die absolute Dicke des Membranmodells können vergleichsweise flexibel gestaltet werden. So finden Mono- und Multischichtmembranmodelle, die auf oder in porösen Substraten zwischen zwei hydrophilen Polymerschichten präpariert werden, Verwendung.

Transportvorgänge: Quantitativ spielen Transportvorgänge auf der Ebene des oben beschriebenen passiven Stoffaustauschs über eine semipermeable Membran die Hauptrolle. Die hierbei ablaufenden strukturellen Prozesse innerhalb der Membran sind bisher nicht im Detail verstanden. Temporär auftretende polare Poren und andere Störungen innerhalb der Membranarchitektur scheinen dabei auch eine Rolle zu spielen.^[561, 779-781]

Der Stoffaustausch zwischen Zellen und intrazellulären Kompartimenten setzt ein dynamisches Verhalten der Membranen voraus. Transportvorgänge können über verschiedene Mechanismen ablaufen: Diffusion, Pinocytose^[782, 783], Endocytose^[784], aktiv durch Vermittlung von Proteinen^[664] und Transmembranproteinen^[785] und mit Hilfe von Translokatoren z.B. Valinomycin^[49, 786]. Da es sich beim Studium der Transportprozesse ebenfalls um biologische Vorgänge handelt, ist für die in diesem Zusammenhang verwendeten Membranarchitekturen eine enge Übereinstimmung mit biologischen Vorbildern sinnvoll. Als Modellsysteme finden vesikuläre Membranen^[787], BLMs^[788] und tBLMs^[49] Anwendung.

Wechselwirkung der Membran mit Wirkstoffen bzw. Biomolekülen: Eine Reihe natürlicher und synthetischer Verbindungen gehen mit biologischen Membranen selektive Wechselwirkungen ein. Da die Wechselwirkung sowohl von der Membranmorphologie, dem Phasenzustand und der chemischen Zusammensetzung abhängt (siehe Kapitel 3.1.2.3), sind verschiedene Membranmodelle in Gebrauch. Beispiele sind Wechselwirkungen von cardiotoxischen Verbindungen und membranperforierenden Proteinen, etwa die Untersuchung

der Wechselwirkung zwischen dem Antitumorwirkstoff Doxorubicin und Cardiolipin an scheibenförmigen Mizellen (im englischen auch als „bicelles“ bezeichnet) mit Hilfe von NMR-Techniken.^[298] Annexin, ein membranperforierendes Protein, wurde beispielsweise an physisorbierten Membranen^[789, 790] z.B. auf Glimmer (Meica)^[791] aber auch an Lipidmonoschichten auf dem LB-Trog^[792] (LB- = Langmuir-Blodgett-) untersucht.

Da es sich bei der Untersuchung von Wechselwirkungsprozessen mit Lipidmembranen nahezu ausschließlich um biologische oder medizinische Fragestellungen handelt, ist bei diesen Modellsystemen eine bioanaloge Zusammensetzung der Membran bzw. Lipidmonolage sinnvoll. Natürliche Membranzusammensetzungen besitzen den zusätzlichen Vorteil, daß sie die nichtspezifische Wechselwirkung von Proteinen unterdrücken.^[793, 794]

Insertion von „Funktionseinheiten“ (Membranproteine): Zum funktionellen Einbau von Membranproteinen bedarf es einer amphiphilen Doppelschicht, die einen hydrophoben Kern von etwa 3 nm und hydrophile Oberflächen von etwa 1 nm auf jeder Seite aufweist (charakteristische Geometrie biologischer Membranen). Zusätzlich muß die Membran beweglich sein (flüssig-kristalliner Zustand) damit die Proteine eingebaut und dicht von den Lipiden umschlossen werden können.

Daraus ergeben sich konkrete Anforderungen an die Geometrie (Länge der hydrophoben Ketten) und die chemische Zusammensetzung der in Frage kommenden Amphiphile und deren Anordnung (Lipiddoppelschicht, die von beiden Seiten von Wasser umgeben ist).

Zusätzliche Forderungen zum Beispiel die elektrische Dichtigkeit, keine zu hohe Ladungsdichte (um Denaturierung der Membranproteine zu vermeiden) und Langzeitstabilität fokussieren den Blickwinkel auf natürliche Komponenten oder chemisch bzw. strukturell verwandte Derivate.

Daneben bildet die Membran ein Reservoir für Signalvorgänge- und Moleküle! Obwohl auf diese biologische Funktion aus Platzgründen nicht weiter eingegangen werden kann, soll hier darauf hingewiesen werden, daß sowohl die Einbettung von Membranproteinen (deren Verteilung in der Membran in Abhängigkeit vom jeweiligen Phasenzustand der umgebenden Membran) als auch die chemischen Eigenschaften der Lipide und deren Abbauprodukte für Signalprozesse essentiell ist.

Durch die vielfältigen Diversifizierungen und Funktionen, die Membranen je nach ihrer Lokalisierung und Zusammensetzung ausüben, stellt sich die Frage, wie eine Biomimese der biologischen Membran aussehen soll, ob es gemeinsame Eigenschaften der verschiedenen Membrantypen gibt und was die biomimetische Membran leisten soll.

Für die in Abbildung 33 gezeigten membrangekoppelten Prozesse sind alle oben genannten Eigenschaften und Funktionen notwendig, um die Funktion von Membranproteinen sicherzustellen und ein den Membranverhältnissen der Zelle entsprechendes Umfeld zu schaffen:

- die Membran muß semipermeabel sein um den Austausch von Wasser zu erlauben, gleichzeitig aber Ionen zurückhalten (hoher elektrischer Widerstand, kleine Kapazität)
- die Membran muß den Submembranraum vom umgebenden wäßrigen Medium abtrennen (auf beiden Membranseiten soll sich Wasser befinden)
- die Membran muß die biophysikalischen Voraussetzungen zum Einbau von Membranproteinen bieten (Dimension der Membran, flüssig-kristalliner Zustand)
- die Membran muß die unspezifische Wechselwirkung von artifiziellen und Biomolekülen unterdrücken
- die Membran muß Transportprozesse erlauben

Es ist bis heute nur eingeschränkt möglich, die gerade bezeichneten Eigenschaften in strenger Übereinstimmung mit dem biologischen Vorbild in einer artifiziellen Meßanordnung zu konstituieren. Aus diesem Grund werden schon seit Jahrzehnten Mimikrie biologischer Membranen entwickelt, um durch verschiedene Modellansätze komplementäre Informationen über Membranprozesse und -funktionen zu erhalten.

Die ersten Cytosplasmamembran/Zellanaloga wurden in den 30'er Jahren des letzten Jahrhunderts aus Rinderhirnextrakten präpariert und dienten in erster Linie phänomenologischen Studien.^[795]

Versuche mit amphiphilen Verbindungen, die funktionelle Analogien zu Lipiden bezüglich ihrer Wechselwirkungen an der Wasser-Luft-Grenzfläche aufweisen, liegen mehr als 200 Jahre zurück. BENJAMIN FRANKLIN beschreibt als erster, daß Öle auf Wasseroberflächen einen „beruhigenden Einfluß“ ausüben und zu einer Glättung von Wellen führen.^[796] Erste systematische Untersuchungen an „Seifenfilmen“ führte AGNES POCKELS mit Hilfe einfacher, in ihrer Küche selbst gebauter Geräte durch.^[797-800] Damit legte sie den Grundstein zu Langmuirs späteren Arbeiten und dem gemeinhin als Langmuir-Trog bezeichneten Versuchsaufbau, der in Anerkennung der Verdienste POCKELS als Pockels-Langmuir-Trog bezeichnet werden sollte. Die weiteren Entwicklungen und die heute überwiegend verwendeten Membranmodelle sind in Abbildung 35 dargestellt.

3.2.2 Einteilung der Modellsysteme biologischer Membranen

Heute kennt man eine große Zahl unterschiedlicher Modellmembranen mit stark variierenden Eigenschaften. Vergleicht man die membranmimetischen Funktionen einzelner Modellsysteme, so ergibt sich oft ein komplementäres Bild ihrer funktionellen Möglichkeiten.

Biomimetische Membranen unterscheiden sich stark im Hinblick auf ihre Stabilität/Lebensdauer, die Möglichkeit Membranproteine einzubauen, die Anwendbarkeit oberflächenanalytischer Meßmethoden und die Größe der beiden wässrigen Phasen (submembrane bzw. cytoplasmaanaloge und extrazelluläre Phase). Nachfolgend werden die wichtigsten Membranmodelle unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften beschrieben.

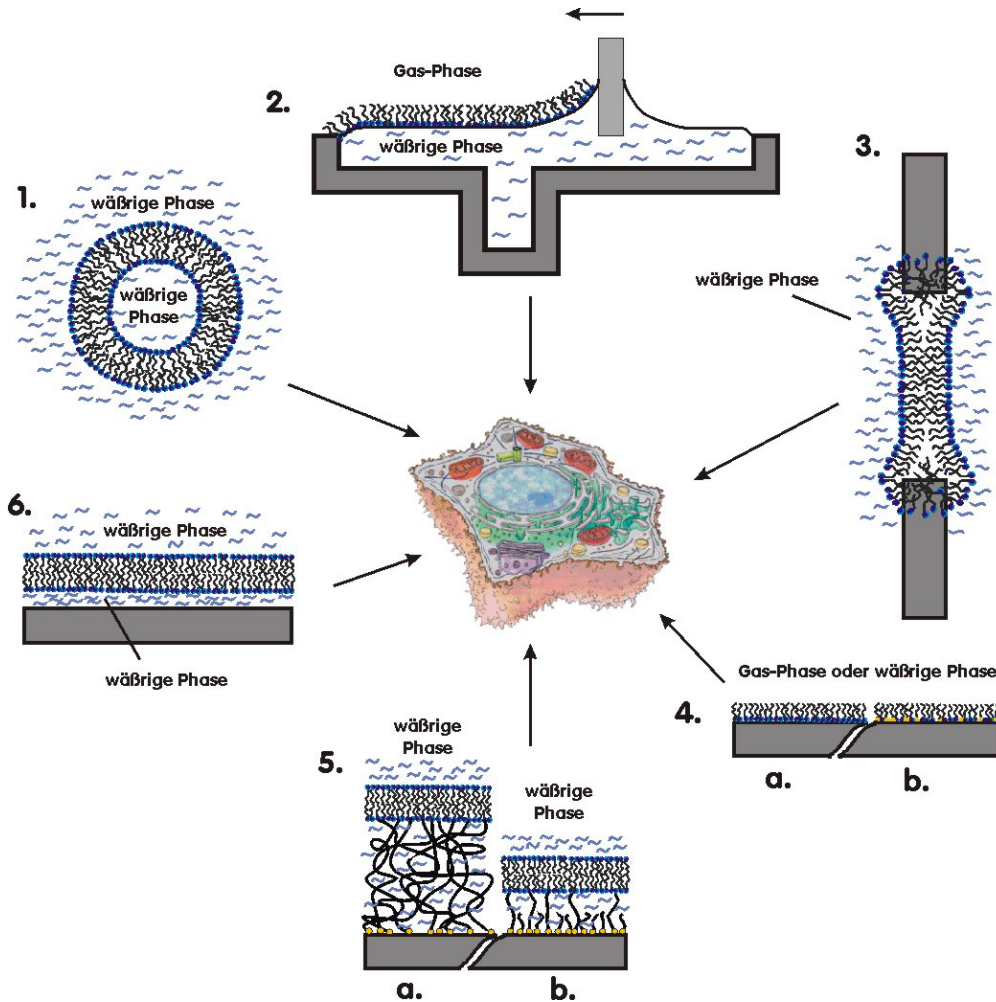
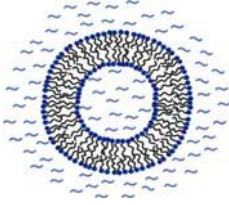


Abbildung 35 Modellsysteme biologischer Lipidmembranen (in Anlehnung an^[44]); Seifenfilme mit inverser Doppelschichtstruktur, Multischichten und Bicells sind spezielle Membranen. Diese sind in dieser Abbildung nicht abgebildet, da sie im Rahmen dieser Arbeit keine Anwendung fanden.

1. Unilamellare Vesikel/Liposomen



Vesikel, Liposomen und Proteoliposomen (Membranprotein enthaltende Liposomen) sind sphärische Lipidmembranen (Abbildung 35, 1) die beidseitig von Wasser umschlossen sind. Die Verwendung von Phospholipidvesikeln als Membranmodelle wurde erstmals 1968 von BANGHAM beschrieben.^[801] Sie eignen sich im Besonderen für:

- NMR-spektroskopische^[802-804]
- kalorimetrische (DSC, ITC)^[805]
- optische (OD, LS, Photometrie, Fluoreszenz)^[806-809] und
- Patch-Clamp Experimente^[810]

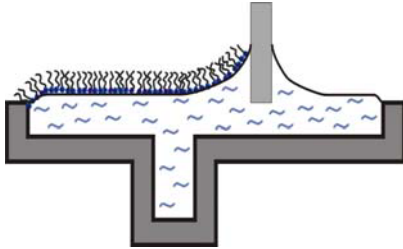
Die intakte Immobilisierung von Vesikeln auf Festkörperoberflächen erlaubt zusätzlich die Anwendung oberflächensensitiver Meßmethoden wie zum Beispiel QCM-Techniken.^[811, 812] In der Literatur sind mehrere Beispiele von biologischen Vorgängen beschrieben, die liposomenvermittelt mimikriert werden. Exemplarisch sei an dieser Stelle die Rekonstitution des enzymatischen Prozesses der Phosphatidylcholinsynthese unter Beteiligung von vier verschiedenen Enzymen^[813] genannt.

Vesikel lassen sich in unterschiedlichen Größen präparieren und eignen sich zur Untersuchung des thermotropen und lyotropen Polymorphismus sphärischer Membranen.^[814] Sie können aus einer Lipiddoppelschicht oder Multischichten aufgebaut sein. Ihre Nomenklatur ist in Kapitel 3.1 beschrieben

Sphärische Lipidmembranen eignen sich ebenfalls für den Einbau von Membranproteinen, die mit klassischen biophysikalischen Untersuchungsmethoden z.B. der Patch-Clamp-Technik untersucht werden können.^[26] Elektrochemische Messungen sind nur mit der Patch-Clamp-Technik an einzelnen Vesikeln möglich, ein großer Nachteil dieses Membranmodells. Der Widerstand wird mit Werten von 100 M Ω ^[692] bis zu 100 G Ω ^[580] angegeben, leider ohne Flächennormierung.

Vorteile sphärischer Membranen liegen in ihrer vergleichsweise einfachen Präparation, der Möglichkeit sie frei in Lösung untersuchen zu können sowie ihrer große Variabilität in Größe und Form. Eine Stabilisierung von Vesikeln ist durch verschiedene Methoden, z.B. durch die Polymerisation von geeigneten Amphiphilen, möglich.^[815]

2. Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche



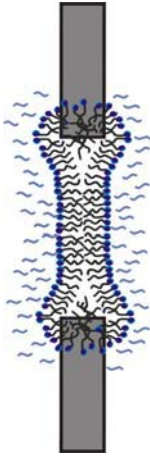
Das Spreiten amphiphiler Verbindungen an der Wasser-Luft-Grenzfläche führt zur Ausbildung von Molekülschichten mit mono- oder submolekularer Dichte (bzw. Dicke, Abbildung 35, 2).^[797, 816] Die Dichte, beziehungsweise die molekulare Packung und die Orientierung der Moleküle können durch die Änderung der Fläche variiert werden. Diese auch als Langmuir- bzw. Pockel-Langmuir-Filme bezeichneten Lipidfilme eignen sich zum Studium des Phasenverhaltens von Lipiden und Lipidmischungen (auch in Abhängigkeit freier oder aggregierter Proteine). Durch die planare Oberfläche lassen sich die Monoschichten auch an der Wasser-Luft-Grenzfläche mit einer Reihe analytischer Methoden untersuchen:

- Brewster-Winkel-Mikroskopie^[817]
- IRRAS^[818]
- CD^[819]
- Fluoreszenzmikroskopie (auch mit Verstärkung durch ein evaneszentes Feld)^[820]
- Röntgen-^[821, 822] und
- Neutronenreflektometrie^[823]
- QCM^[824]
- AFM^[825, 826]

Die genannten Methoden erlauben das Studium einer Vielzahl biophysikalischer und biologisch-chemischer Wechselwirkungen.^[827-830] Die Nachteile der Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche sind:

- a) Ihre Metastabilität, sie relaxieren zu stabileren strukturellen Anordnungen
- b) Sie sind normalerweise nicht chemisch an die Substratoberfläche gebunden und daher weniger stabil als kovalent angebundene Schichten.
- c) Die beschränkte Zahl der anwendbaren Substanzen. Es können nur Verbindungen verwendet werden, die sich auf Wasser spreiten lassen. (Ausnahme andere Lsgm.)
- d) Ihr Aufbau: Im Gegensatz zu einer biologischen Membran liegt hier nur eine Membranhälfte vor, deren Verhalten sich von dem der Lipiddoppelschicht unterscheidet.

3. Schwarze Membranen (engl. black lipid membrane BLM)



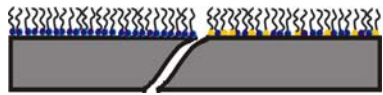
An schwarzen Membranen lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Membranproteinen und Membranen verschiedener Zusammensetzung untersuchen (Abbildung 35, 3). Ihre Kapazitätswerte und elektrischen Widerstände sind von exzellenter Qualität und erlauben dadurch auch die Signalaufnahme einzelner Ionenkanäle.^[831-834] Die Kapazitäten liegen um $0,5 \mu\text{F cm}^{-1}$ während die Angaben für die Widerstände von wenigen $\text{M}\Omega$ bis zu $100 \text{G}\Omega$ ^[835] schwanken. Da viele BLM-Widerstandsmessungen nicht auf eine Einheitsfläche normiert wurden (der Widerstand wird in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ausgedrückt) ist ein direkter Vergleich erst nach Umrechnung möglich – ist die Meßfläche nicht definiert, ist ein Vergleich nur bei Messungen mit demselben Meßaufbau möglich. BLMs ermöglichen Einblicke in Funktionsmechanismen von integralen Membranproteinen^[836] und die Rolle unterschiedlicher Lipide^[837, 838]. Ein Problem stellt ihre geringe mechanische und zeitliche Stabilität dar. Auch die durch den Herstellungsprozess bedingten Lösungsmittelrückstände stellen einen störenden Einfluß dar.^[839] Ihre Lebensdauer liegt gewöhnlich im Bereich von Stunden, kann aber beispielsweise durch die Stabilisierung mit Oligo- oder Polysacchariden in der wäßrigen Phase erhöht werden. Beispiele für diese Art der Membranstabilisierung sind aus der Biologie bekannt.^[840] Die Modifizierung bereits gebildeter Membranen mit hydrophilen Polymeren ist beschrieben.^[841]

Montal-Müller-Filme sind an dieser Stelle ebenfalls zu nennen. Auch hier handelt es sich um eine BLM, die frei über eine Teflonfolie mit Apertur gespannt ist. Diese wird aber im Gegensatz zu den klassischen BLMs nicht durch das Überstreichen der Apertur mit einer Lipidlösung und anschließender Ausdünnung der Schicht zur Doppelschicht präpariert, sondern durch einen beidseitigen LB-Transfer der Folie durch einen Lipidmonofilm.^[693]

Festkörpergestützte Membranen (4-6)

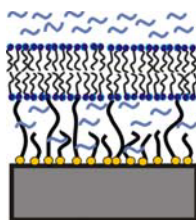
In den letzten zwei Jahrzehnten wurden festkörpergestützte Membranen entwickelt, die hinsichtlich ihrer Stabilität und ihre Zugänglichkeit mittels oberflächensensitiver Untersuchungsmethoden den Membranmodellen 1-3 überlegen sind. Trägergestützte Lipiddoppelschichten aus Phospholipiden wurden erstmals von McConnel et al. beschrieben.^[842] Sie gelten als geeignetes System zur Untersuchung von Membranproteinen und für den Aufbau von Biosensoren:

4. Monoschichten



Monoschichten auf Festkörperoberflächen werden gewöhnlich nicht als Membranmimikrie betrachtet, da die für Wechselwirkungen zugängliche Oberfläche für Alkylthiol-SAMs ohne polare Kopfgruppe hydrophob ist. Gerade diese Eigenschaft macht sie aber für das Studium von hydrophoben Wechselwirkungen, wie sie zum Beispiel im transmembranen Proteinteil und der nicht-spezifischen Proteinadsorption vorkommen interessant.^[843, 844] Neben der technischen Hydrophobisierung von Oberflächen werden sie für die Bereitstellung eines halben Membranäquivalents eingesetzt. Durch spontane Fusion von Vesikeln auf hydrophoben SAMs können Lipidmembranen präpariert werden.^[845] Ein Nachteil dieser Membranen ist die starre Fixierung der unteren Membranhälfte auf dem Substrat (Abbildung 35, 4 b) und die dadurch reduzierte laterale Beweglichkeit der proximalen Membranschicht. Ein weiterer Nachteil ist das Fehlen einer wässrigen Submembranphase wodurch der Einbau von Proteinen mit intrazellulären Proteinkomponenten nicht ungestört möglich ist. Außer der kovalenten Anbindung des SAMs ist auch die Physisorption von Molekülen, beispielsweise durch LB-Übertrag möglich (Abbildung 35, 4 a). Ein weiteres Beispiel für die nicht-kovalente Anbindung von Mono- oder Multischichten ist der Aufbau von elektrostatisch stabilisierten Multischichten, die sich auch für den Aufbau von Modellmembranen eignen.^[846-848] Ein Nachteil dieser Membrantypen ist die Gefahr der Denaturierung der Membranproteine durch die Kummulation elektrischer Ladungen und mangelnde Stabilität.

5. Kovalent über einen polaren Spacer an Festkörperoberflächen gebundene Lipiddoppelschichtmembranen tBLMs (tethered Bilayer Lipid Membranes)



tBLMs weisen gegenüber den zuvor genannten Membranmodellen und den unter Punkt 6 (siehe Abbildung 35, 6) genannten klassischen festkörpergestützten Membranen nach McCONNEL et al.^[842] entscheidende Vorteile auf. Sie bieten eine höhere Stabilität und eine variable Gestaltung des submembranen Volumens durch Adaption der Spacerchemie bzw. Geometrie. Dadurch erlauben sie die Lokalisation von Membranbestandteilen in einem definierten Abstand zur Festkörperoberfläche.

Die tBLMs unterscheiden sich im Hinblick auf die verwendeten Lipide, Spacer, Anker und Substratoberflächen. Neben verschiedenen Lipidmotiven (fast immer Diacylphospholipide) variieren die tBLMs vor allem im Spacerteil. In Anlehnung an das Cytoskelett der Zelle wurde

die „Biopolymeridee“ für tBLMs entwickelt (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.3), das heißt es wurden hydrophile polymere Verbindungen als Kissen (*engl. cushion*) bzw. Spacer für die Modellmembran von Ringsdorf und Sackmann eingeführt.^[44, 45, 849] Die funktionelle Anbindung der Lipidmembran an ein festes Substrat über einen flexiblen, polaren/hydrophilen Spacer ist seitdem ein populärer Ansatz mit folgenden Vorteilen: Zum einen wird eine robuste Anbindungen der empfindlichen Lipiddoppelschicht an das feste Substrat erreicht, die durch ihre Planarität Zugang zu einer Reihe sensitiver elektrischer und oberflächenanalytischer Methoden erschließt, zum anderen entkoppelt sie die Membran von der Oberfläche. Die Entkopplung von der Oberfläche führt zu einer Unterdrückung der auf Metalloberflächen auftretenden und für die Membran negativen hydrophoben Wechselwirkung.^[850] Außerdem vergrößert sie das cytosolanaloge Volumen zwischen Membran und Substratoberfläche, was besonders bei volumenabhängigen Transportprozessen aber auch zur Ausbildung einer fluiden Membran von grundlegender Bedeutung ist.

tBLMs können auf verschiedene Weise eingeteilt werden. Diese erfolgt zumeist anhand der Aufbau- und Präparationsmethoden oder an Hand der chemischen Natur des Spacers. Da die Eigenschaften der tBLM durch die chemische Zusammensetzung und die Präparationsmöglichkeiten bestimmt sind, werden diese hier kurz aufgeführt:

- a) Spontane Selbstanordnung von Lipid-Spacer-Anker-Konjugaten auf Fettkörperoberflächen (kovalente Anbindung eines SAMs), gefolgt von einer der besprochenen Methoden zur Ausbildung der Lipiddoppelschicht.
- b) Die Fusion von Vesikeln auf Festkörperoberflächen, in deren äußeren Lipidschicht Lipide mit Spacer-Anker-Gruppenterminus inseriert sind. (Problem: Die komplette Fusion der Vesikel zur Ausbildung dichter Membranen zu erreichen und die Anbindung intakter Vesikel zu vermeiden)
- c) Die Präparation eines hydrophilen SAMs oder einer hydrophilen Polymerschicht, gefolgt vom LB-Übertrag eines reaktiven Lipids (Beispiel: LB-Transfer von NHS-Ester-Lipiden auf nukleophile Oberflächen^[851]). Diese Präparationsmethode reagiert empfindlich auf den Hydratationsgrad der submembranen Polymerschicht und liefert oft keine elektrisch dichten Membranen. Es können nur Verbindungen verwendet werden, die auf Wasser LB-Filme bilden und in intakter Form auf das Substrat übertragen werden können.^[852] Analog können auch proximale Membranhälften und komplette Lipid-Spacer-Anker-Konjugate mittels LB-Transfer auf das Festkörpersubstrat übertragen werden.
- d) Als weitere Möglichkeit der Membranpräparation kann die Dialyse verwendet werden.

Spacersysteme:

Entsprechend dem natürlichen Vorbild wurden in der Literatur eine große Zahl verschiedener polymerer- und oligomerer Verbindungen als Spacer eingeführt. Eine Einteilung der Spacersysteme in polymere und niedermolekulare Verbindungen (siehe Abbildung 35 a und b) berücksichtigt die zunehmende Vielfalt struktureller Anordnungen der Spacerketten (parallele Kettenanordnung, Verschlaufungen ...) mit wachsendem Molekulargewicht.

Polymere (Abbildung 35, 5a) sind ein Beispiel für Spacersysteme, bei welchem sich die hydrophilen Eigenschaften durch die Wahl der zur Polymerisation verwendeten Monomeren und die Art der Polymere (Homo- und Copolymere verschiedener Taktizität) über weite Bereiche einstellen lassen. Die trifft im gleichen Maße auch für deren Molekulargewicht und der damit verbundenen Kettenlänge zu. Die beschriebenen Polymer-Lipid-Ankerkonjugate umfassen beispielsweise Lipid-Polysiloxan basierende Biomembranen^[853], Polyoxazoline^[854, 855], DMPE-Polyacrylamid-Disulfide^[71, 856, 857] und DMPE-PEG-Trialkoxysilan^[69]. Beispiele solcher Systeme die auf Goldoberflächen untersucht wurden, sind bei SPINKE et al.^[858] und THEATO et al.^[857] zu finden. Die meisten bisher auf Gold bekannten Systeme für die elektrische Daten vorliegen, weisen allerdings im Vergleich mit biologischen Membranen ungenügende elektrische Eigenschaften auf. Die stark hydrationsabhängigen, dynamischen Eigenschaften der Polymere und die Vielfalt ihrer strukturellen Anordnungsmöglichkeiten erschweren die optimale hydrophobe Wechselwirkung der hydrophoben Ketten im supramolekularen Verband. Durch die Dynamik der Polmerketten liegen die Entkopplungsabstände zwischen Membran und Festkörperoberfläche meist nur im Bereich von 1-5 nm.^[859] Auch ist die Vesikelfusion auf gequollenen Polymeren deutlich erschwert.^[860] Nur auf halbleitenden Materialien sind Modellmembransysteme mit Widerständen von $1 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ und Kapazitäten von $0,7 \text{ }\mu\text{F cm}^{-2}$ bekannt.^[861, 862] Diese entsprechen in ihren Eigenschaften dem biologischen Vorbild ($C = 0,5 \text{ }\mu\text{F cm}^{-2}$ und $R \sim 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$). Ein Einfluß des Festkörpermaterials ist evident.

Niedermolekulare Spacersysteme (Abbildung 35, 5b) schöpfen aus einem großen Pool polarer Verbindungen. In die praktische Anwendung haben aber nur wenige Verbindungen Eingang gefunden.

Eine biologisch inspirierte Verbindungsklasse die in Form niedermolekularer Spacer Anwendung gefunden haben, sind **Oligopeptide**. Die Arbeiten von BUNJES et al.^[863], NAUMANN et al.^[48, 864], SCHMIDT et al.^[66], und die sie betreffenden Patenten WO 96/18645 und WO 99/20649 beschreiben thiolmodifizierte Oligopeptide die rein oder in Mischungen der betreffenden Thiolipeptide und Thiopeptide als Modellmembransystem fungieren. Hierbei können schon mit Lipiden (DMPE) kovalent verknüpfte Peptide verwendet werden, oder die Lipidgruppe *in situ* auf die fertig vorgeformte Peptidmonoschicht kovalent angebunden

werden. Die Präparation der Lipiddoppelschicht erfolgt anschließend durch Vesikelfusion und liefert Modellmembranen mit Kapazitäten von einigen $\mu\text{F cm}^{-2}$ und Widerständen von 0,1-0,9 $\text{M}\Omega \text{cm}^2$ die, wie schon bei den polymergestützten Systemen besprochen, im Vergleich zu dem natürlichen Vorbild keine befriedigenden Eigenschaften besitzen. Anhand dieser Modellsysteme konnte allerdings die Funktionalisierung einer biologischen Modellmembran durch den Einbau und Nachweis der elektrische Funktion von Membranproteinen (z. B. H^+ -ATPase) eindrucksvoll gezeigt werden.^[47]

Der Arbeitskreis um R. GUIDELLI beschreibt ebenfalls Oligopeptide als membranstützende Komponenten, die mit polaren Triethylenglykoseitenketten versehen sind und einen hydrophilen Monolayer ausbilden.^[67] In dem beschriebenen Beispiel wird eine Quecksilberelektrode verwendet, die von Natur aus sehr glatt ist, aber für eine Vielzahl oberflächenanalytischer Methoden nicht geeignet ist. Auf der polaren Oligopeptidschicht bildet sich im Kontakt mit einer auf der Elektrolytlösung befindlichen Lipidmultischicht spontan eine Lipiddoppelschicht aus, die aber keine an die Peptidschicht angebondenen Lipide besitzt. Bakteriorhodopsin wurde in funktioneller Form in diesem System untersucht. Die Kapazitäten dieser Systeme liegen zwar bei $\sim 1 \mu\text{F cm}^{-2}$, der Widerstand von $0,14 \text{M}\Omega \text{cm}^2$ ist aber nicht mit dem der biologischen Membran vergleichbar. Ein nur indirekt mit diesen in Zusammenhang stehender Ansatz verwendet Mercaptopropionamid als schwefelhaltige Membranstütze für eine Anbindung von Lipiden auf Goldoberflächen. In diesem Modell konnten Kapazitäten von $\sim 1 \mu\text{F cm}^{-2}$ und Widerstände von $0,5 \text{M}\Omega \text{cm}^2$ erreicht werden. Das Fehlen eines Spacers führt bei diesem System aber zu einem kaum messbaren Effekt in Gegenwart von Valinomycin.^[865] Neben den für hochohmige Membranen ineffektiven Diacylphospholipiden wurden auch Beispiele mit Phytanamidderivaten auf PEG-Peptidspacern beschrieben.^[866] Die elektrischen Eigenschaften dieser Membranen liegen aber für Makrogoldelektroden (Flächen von etwa 1cm^2) nur im zuvor genannten Bereich von einigen $\mu\text{F cm}^{-2}$ und Widerständen von weniger als $1 \text{M}\Omega \text{cm}^2$. Der Einfluß der Amidbindungen und die Spacerstruktur dieser Lipide ist im Vergleich mit den sehr guten Werten für natürliche Phytanyl lipide zu diskutieren.

Die ersten mit Polyethylenglycol (PEG) gestützten Modellmembransysteme wurden von YEDA (EP-441 120A) und H. VOGEL^[68] in Form von **Oligoethylenglykol-Thiolipiden** eingeführt. Kapazitäten in Bereich von $0,5 - 0,7 \mu\text{F cm}^{-2}$ und Widerstände von $0,01-0,1 \text{M}\Omega \text{cm}^2$ wurden für kurze Oligoethylenglykolstützen auf Gold gemessen.^[68] Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Modellsystem beschrieben, bei dem die Kapazitäten die Werte einer biologischen Membran erreichen. Längere Oligoethylenglykolstützen erreichten dagegen nur Kapazitäten von $1 \mu\text{F cm}^{-2}$.^[867] Die Arbeiten von YEDA und VOGEL unterscheiden sich dahingehend, daß

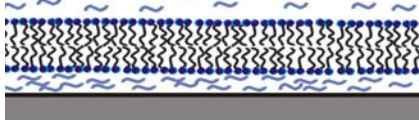
Yeda in seinen Arbeiten oligoethylenglykolhaltige Thiolipide mit terminaler Thiofunktion verwendet, wohingegen VOGEL zum Disulfid oxidierte oligoethylenglykolgestützten Thiolipide verwendet, welche bessere Kapazitäten aufweisen. Darüber hinaus wurden noch weitere Modifizierungen vor allem bei der Länge der Oligoethylenglykolkette vorgenommen und erstmalig Membranproteine in die Membran eingebaut. (EP 0 637 384 B1) Ein größerer Überblick über dieses Modellsystem wird im Artikel von HEYSE et al. beschrieben.^[868]

Ein weiteres, mit sehr kurzen Oligoethylenklykolketten gestütztes Modellsystem das Cholesterin als hydrophobe Domäne besitzt, ist von WILLIAMS et al. beschrieben.^[76] Die hier erreichten Kapazitäten sind gut, doch sind die Widerstände mit $0,1 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ im Vergleich mit dem biologischen Vorbild ungenügend. Ein zusätzliches Detail dieser Arbeiten ist das Aufbringen der Cholesterin-Oligoethylenglykol-Thiole durch Mikrokontaktdruck (engl. *Mikro-Contact-Printing* - μCP) und der damit verbundenen Herstellung einer lateral strukturierten Monoschicht.

Das bisher bezogen auf die elektrischen Eigenschaften beste biologische Modellmembransystem wurde von CORNELL et al. vorgestellt.^[80] Eine gute Übersicht über die Arbeiten dieser aus verschiedenen australischen Arbeitsgruppen zusammengesetzten Forschungsgemeinschaft bieten die Artikel von RAGUSE et al.^[869], KRISHNA et al.^[870] und die Patente: WO 8901159, WO 9002327, WO 9407593, WO 9701092, US 5,753,093 und US 5,783,054. Dieses Modellsystem zeichnet sich durch gute Kapazitäten ($0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$) und den bis dahin noch nicht erreichten Membranwiderständen von etwa $5 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ aus. Die zum Aufbau der Modellmembran verwendeten Komponenten bestehen aus verschiedenen Monophytanyl/oyl-oligoethylenglykol-thiolen/disulfiden, polaren lateralen Spacer-Molekülen und einem membrandurchspannenden Thiolipid. Außerdem sind speziell für die Funktionalisierung der Membran notwendige Moleküle wie z.B. Gramacidin in die Membran eingebaut. Die Modellmembran wird nach Behandeln einer Goldoberfläche mit einer ethanolischen Lösung aller Einzelkomponenten durch Spülen mit Puffer *in situ* erzeugt.

Nur kurze Zeit nach einer auf den Arbeiten dieser Dissertation basierenden Veröffentlichung^[49] (siehe Kapitel 5 – Modellsystem mit einer auf dem natürlichen Diphytanylglycerin basierenden, PEG-gestützten tBLM mit Widerständen von 4 - 12 $\text{M}\Omega$) publizierten Terratez et al. ein auf einem Monophytanamid-PEG-tBLM-System basierende tBLM die ebenfalls sehr gute Widerstände im Bereich von 5 $\text{M}\Omega$ und Kapazitäten von etwa $0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$ aufweist. Diese Monophytanamid-PEG-tBLM ist fast identisch mit einem von J. MACK (Arbeitskreis Prof. Dr. G. JUNG, Uni Tübingen) synthetisierten Monophytanamid-PEG-Molekül^[871], das aber auf Makroelektroden nur zu tBLMs mit unbefriedigenden elektrischen Eigenschaften führte.^[866]

6. Physisorbierte Membran (klassisch als festkörpergestützte bzw. engl. als Solid Supported Membrane bezeichnet)



Mitte der 80'er Jahre beschrieben McConnel et al.^[842] als erste festkörpergestützte Lipiddoppelschichtmembranen als Modelle der biologischen Membranen. Wie in Abbildung 35, Bild 6 schematisch dargestellt, handelt es sich bei diesem Membranmodell um eine Lipiddoppelschicht, die durch eine dünne Wasserschicht von der Oberfläche separiert ist. Sie „schwebt“ frei auf diesem Wasserfilm wodurch die Lipide eine große laterale Beweglichkeit besitzen. Typische Diffusionskonstanten liegen für EiPC-sBLM-Membranen bei etwa $4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$,^[872] einem Wert, der dem von EiPC-Vesikeln und BLMs entspricht^[838]. Als Trägermaterial werden vorzugsweise hydrophile Substrate, beispielsweise Glas- oder oxidierte Siliziumoberflächen verwendet. Anwendungen auf Transistoren sind beschrieben.^[873]

Die für klassische sBLMs typische Wasserschichtdicke von 1-2,5 nm zwischen Membran und Substrat^[874] erlaubt das Studium von Membranproteinen ohne plasmatische Untereinheiten. Für weiterführende Informationen sei auf die Übersichtsartikel^[50, 78, 79, 772, 875, 876] verwiesen. Durch die auf maximal 2,5 nm beschränkte submembrane Entkopplung der Membran von der Oberfläche und die im Vergleich zu den tBLMs geringere Langzeitstabilität, sind die sBLMs in ihrem Anwendungsspektrum eingeschränkt.

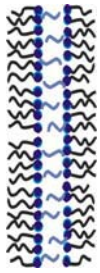
Eine Modifikation der klassischen sBLMs stellen polymergestützte Modellmembranen dar bei denen die Membran auf einem hydrophilen Polymer präpariert wird.^[143, 144, 877] sBLMs sind mit verschiedenen Lipiden und Polymeren beschrieben: Exemplarisch sollen hier Cellulose^[144], Agar^[878], Polyethylenimin (PEI)^[879, 880], Polyacrylamid^[881] und Polydimethyldiallylammoniumchlorid (PDMDAAC)-PEI^[882] genannt werden. Als Lipide wurden vorzugsweise EiPC, DMPC und DPPA (Dipalmitoylphosphatidsäure) verwendet.

Zusätzlich sind sBLM -Varianten durch „Painting“^[883] und „Tip-Dipping“ auf Agar^[878] präpariert worden. Große Stabilität erreichen solche sBLMs, die „Sandwich-artig“ auf beiden Seiten von Agar auf einem festen Substrat umgeben sind.^[884]

weitere Membranformen

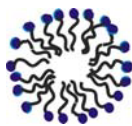
An dieser Stelle werden weitere Membranformen die im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet werden vorgestellt:

7. „Seifenfilme“



Bei Seifenfilmen liegt ein dünner Wasserfilm vor der beidseitig von einer Lipidschicht oder einer Schicht aus Amphiphilen (meist Tenside) umgeben ist. Die hydrophoben Kettenenden weisen dabei nach außen und sind der Luft zugewandt. Eine bekannte dreidimensional geschlossene geometrische Form ist in der Gestalt von Seifenblasen bekannt. Seifenfilm stellen strukturell aus der Sicht der Membranumwandlung bei der Vesikelfusion und der Vesikel-Mizell-Umwandlung eine wichtige „Membranform“ dar. Die seifenfilmanaloge Anordnung von Amphiphilen wird als Übergangszustand während der Vesikelfusion vermutet, da sich die beiden Membranen zur Fusion stark annähern. Der verbleibende Wasserfilm kann analog der Seifenfilmarchitektur betrachtet werden. Da bei den genannten Umwandlungen Lipid- bzw. Membranorientierungen auftreten, die eine seifenfilmanaloge Struktur aufweisen, sind Stabilisierungs- und Modifikationsvorgänge an Seifenfilmen ein möglicher Weg Einflüsse zu untersuchen, die auch bei realen Membranumwandlungen auftreten können.

8. Mizellen



Mizellen sind sphärische Anordnungen von Amphiphilen, die aus einer monolamellaren Schicht aufgebaut sind. Die polaren Kopfgruppen weisen nach außen. Bei inversen Mizellen ist die Lipid- bzw. Amphiphilarchitektur entgegengesetzt aufgebaut, das heißt, die polaren Kopfgruppen weisen nach innen zum eingeschlossenen wässrigen Kompartiment, die hydrophoben Schwanzketten nach außen. Sie sind natürlich auftretende Lipidaggregatformen die auch für biomimetische Studien eingesetzt werden. (siehe Abbildung 36)

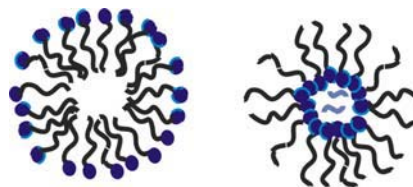


Abbildung 36 Mizellformen: Links mizellare, unilamellare Struktur, rechts inverse Mizelle

Die einfache Präparation und Modifizierbarkeit mit Proteinen und Peptiden machen Mizellen zu einem häufig angewandten Modellsystem für strukturelle Protein Charakterisierungen. So wurde die DMT1 Struktur, ein Protein das für die Eisenaufnahme wichtig ist, in mizellaren System untersucht.^[885] Allerdings weisen Mizellen selbst im Vergleich zu Vesikel (SUV) eine starke Membrankrümmung auf, wodurch sich das Verhalten der Lipide stark ändert und die Struktur von Proteinen beeinflusst wird.

Daneben eignen sich mizellare Systeme zum Studium von Membranwechselwirkungen. Wechselwirkungsprozesse von Mizellen mit Secretin, einem 27 Aminosäure Neuropeptid der vasoaktiven Intestinal-Polypeptid (VIP) Familie, wurden im Hinblick auf mögliche Strukturänderungen untersucht.^[886] Seine neuronale Funktion macht es für die Behandlung von Autismus interessant.

Neben feindispersen Mizellen lassen sich auch supramolekulare Strukturen durch die Verwendung geminaler Amphiphile mittel Vernetzung von Mizellen zu größeren Mizellaggregaten erzeugen.^[887]

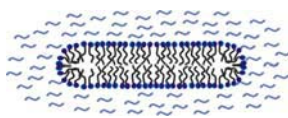
Inverse Mizellen besitzen ein mit Mizellen vergleichbares Einsatzfeld. Die inverse Struktur wird vom Lösungsmittel, der Geometrie und der Polarität des Amphiphils induziert.

Nach ihrem Einbau in inverse Mizellen zeigen die Gastmoleküle oft Änderungen in ihrer Konformation, bedingt durch die elektrostatische Wechselwirkung des Proteins mit den polaren Kopfgruppen des Amphiphils.^[888]

Die Enzyme folgen dabei meist der klassischen Michaelis-Menten Kinetik (die Reaktionsrate ist eine hyperbolische Funktion der Substratkonzentration)^[889], allerdings zeigen sie teilweise charakteristische Änderungen ihrer biologischen Funktion. Die Enzym-Struktur-Änderung wird vom Wassergehalt beeinflusst: Die katalytischen Parameter hängen von der Hydratation des Amphiphils ab (Verhältnis von Wasser zu Amphiphil) das die Größe der Mizellenkavität beeinflusst.

Inverse Mizellen auf Phospholipidbasis sind ein häufig verwendetes Modellsystem für enzymatische Studien.^[890] Zusätzlich gibt es Studien zum Einbau verschiedener Proteine (Cytochrom C, Methämoglobin und Cytochrom P450) in inverse, mizellare Strukturen.^[891]

NMR-Strukturuntersuchungen an Dermaseptin B2, einem antimikrobielles Peptid aus der Froschhaut,^[892] und Abbaustudien von MBP (myelin basic protein)^[893] wurden ebenfalls an inversen Mizellen durchgeführt.

9. Nanodiscs/Bizellen Doppelschichtmizellen

Nanodiscs, auch als Bizellen (engl. bicells) oder Doppelschichtmizellen (engl. bilayered micells) bezeichnet (siehe auch Kapitel 3.1), nehmen eine Mittelstellung zwischen Lipiddoppelschichtmembranen und klassischen Mizellen ein. Sie können als ebene Membranen bzw. zylindrisch-planare Mizellen betrachtet werden (Abbildung 37, A).

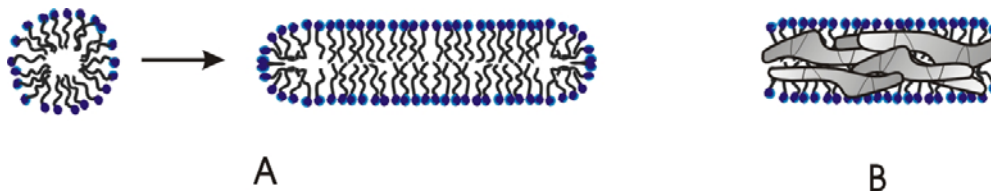


Abbildung 37 Bizellen/Nanodiscs – seitliche Ansicht: Expandiert man eine imaginäre Mizelle sphärisch in der XY-Ebene unter Beibehalt ihrer Dicke, erhält man die scheibenförmige Struktur in Abbildung 37 A. Eine andere Form der definierten Lipiddoppelschichtmembran wird am besten als Nanodiskmembran beschrieben. Hierbei wird die ebene Membran durch Proteine/Peptide an der äußeren Grenze der nanoskopischen Lipidscheibe stabilisiert (Abbildung 37 B).

Kleine isotrope Bizellen sind scheibenförmige Aggregate in welchen Lipide die zentrale Scheibe ausbilden die von Detergenzmolekülen umschlossen ist.^[894, 895] (Abbildung 37A) Durch Variation ihrer Zusammensetzung können sie für unterschiedliche Aufgaben modifiziert werden. So lassen sich die Eigenschaften der Bizellen bezüglich ihres Oberflächen - pH Wertes^[896] und ihrer thermischen Stabilität einstellen. Primär werden Bizellen für Festkörper-NMR Untersuchungen an Membranpeptiden/proteinen verwendet, die auf SANDERS und PRESTEGARD zurückgeht.^[897, 898]

Die Vielfältigkeit des Systems beruht auf der Variabilität der Lipidzusammensetzung und den damit veränderbaren physikalischen Eigenschaften der Bizellen für die Wechselwirkung mit Peptiden.^[896, 899-903] Das am besten studierte reine Lipidsystem ist aus den beiden Lipiden Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und Dihexanoylphosphatidylcholin (DHPC) zusammengesetzt (siehe Abbildung 38). Ein wichtiger Parameter, der die Bizellen definiert, ist das Verhältnis q ($c_{[DMPC]}/c_{[DHPC]}$). Für Bizellen mit einem $q > 3$ erhält man ein sehr komplexes Phasendiagramm.^[594] Unterhalb dieses Wertes erhält man typischerweise isotrope Mischungen. Die strikte Phasenseparation von Lipiden und Detergenzien wird noch debattiert, besonders für Bizellen mit q -Werten kleiner als 1 die üblicherweise für die hochauflösende NMR-Spektroskopie verwendet werden.^[595] Eine Reihe an Publikationen gibt Einblick in dieses Gebiet.^[904-909] Es wird vermutet, daß Bizellen mit einem q -Wert $< 0,5$ keine Diskform mehr besitzen und eine sphärische Gestalt aufweisen.^[910, 911]

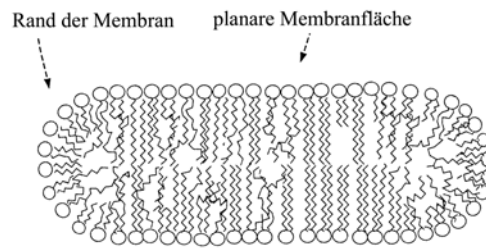


Abbildung 38 Schematische Darstellung einer planaren Bizellenmembran. Die planare Region wird von den langkettigen Phospholipiden ausgebildet, umgeben von einem Ring/Rand aus kurzkettigen Phospholipiden.^[912]

q-Werte > 3 (Verhältnis des langkettigen Lipids zu DHPC (oder eines passenden Detergenz) und einer Lipidkonzentration c_L von 15-25 %) erlauben die Ausbildung großer Bizellen von etwa 50 nm Durchmesser.^[913] In Magnetfeldern die größer sind als zwei Tesla richten sich Bizellen dieser Größe aus, wenn die Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur liegt. Dies erlaubt es Festkörper-NMR-Untersuchungen an Membranpeptiden/proteinen in Abhängigkeit der Peptid/Proteinorientierung von der Oberflächennormalen der Membran durchzuführen.^[912]

Manipulationen der Membran durch äußere Einflüsse und spezifische Zusammensetzungen erlauben die Ausbildung von Bizellen mit interessanten Eigenschaften: DMPG ist in der Lage 50 nm große Bicells zu bilden die auch bei Temperaturerhöhung stabil bleiben und nicht die für andere Aggregatformen beobachtbare Vesikelbildung durchlaufen.^[914] Bizellen können bei entsprechender Lipidwahl bei niedrigen pH Werten orientiert werden um definierte biomimetische Membranen zu formen, wie sie für orientierungssensitive NMR-Messungen notwendig sind.^[915] Zur Signalverstärkung der zu untersuchenden Proteine oder Peptide wird Festkörper-NMR Spektroskopie an Membran-Bizellen durchgeführt die durch Eu(III)-Zugabe orientiert werden.^[916] Kombiniert man MAS-NMR mit Bizellen als Membransystem anstelle von Liposomen kann die Linienbreite der Protonensignale drastisch reduzieren (auf 6 Hz bei 500 MHz).^[917] Eine für die Strukturaufklärung großer Proteine wichtige Signalverbesserung! Effekte der Membranzusammensetzung auf die Konformation von Peptiden z.B. von Methionin-Enkephalin können mit Hilfe von multidimensionaler NMR-Spektroskopie an Bizellen in einer biomimetischen Umgebung ebenso studiert werden,^[918] wie integrale Membranproteine,^[919] die Wechselwirkung von DNA mit Bizellen^[920] und die Wirkung von membranpenetrierenden Peptiden^[921].

Neben der Orientierung der planaren Membranaggregate im Magnetfeld, besitzen Bizellen gegenüber Mizellen noch einen weiteren Vorteil. Die Planarität! Mizellen besitzen nur kleine planare Membranareale und unterscheiden sich hierin von vielen biologischen

Membranen/Membranzuständen. Studien zeigen, daß die Diacylglycerinkinaseaktivität in Bizellen über einen langen Zeitraum erhalten bleibt, während sie in Mizellen instabil ist.^[922] Die funktionelle Einbettung von Membranproteinen in reine Lipidbizellen stellt daher eine attraktive Alternative zu Proteoliposomen und Mizellen dar.

SLIGAR und Mitarbeiter beschreiben Bizellen (in diesen Publikationen auch als *nanoparticulate phospholipid bilayer discs* oder *discoidal phospholipid bilayer nanoparticles* bezeichnet), die von amphiphilen helikalen Proteinen (auch als *engl. Membrane Scaffold Proteins (MSP)* bezeichnet) gürtelartig umschlossen und somit stabilisiert sind (siehe Abbildung 37, B und Abbildung 39).^[923]

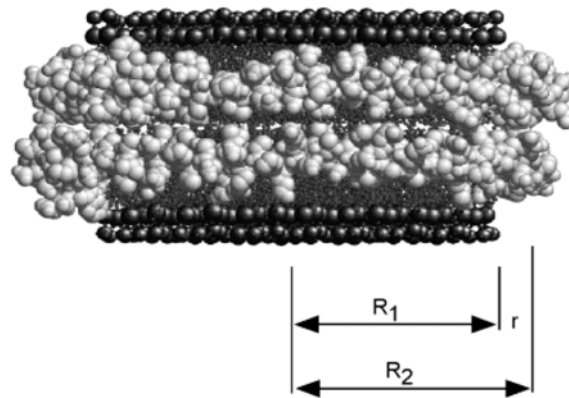


Abbildung 39 Modell einer Bizelle/Nanodisk (letztere Bezeichnung wird von Sligar überwiegend verwendet). Der diskoidale Lipid-Protein Partikel besitzt ein zylindrisches Lipiddoppelschichtfragment in der Mitte, umgeben von zwei helikalen Proteinen: R_1 ist der Radius des Lipidzylinders, r ist der durchschnittliche Radius der Protein- α -Helix und R_2 ist der Radius des Kreises, der durch die Achse der Proteinhelix gebildet wird.^[923]

Nanodisks lassen sich mit definierter Größe und Zusammensetzung herstellen. MSPs sind Partialsequenzhomologe des humanen Apolipoprotein A-1. Durch Variation des amphiphatischen, helikalen Teils dieses „Peptid-Gürtels“ können „Disks“ von 9,5 bis 12,8 nm Durchmesser und 5,5 nm^[923] bzw. 5,7 nm^[924] Dicke erhalten werden. Bizellen mit einem Durchmesser von 10 nm enthalten etwa 160 gesättigte oder 125 ungesättigte Lipide.^[924]

Mischungen des MSP mit freiem Lipid und Detergenz sind in der Lage nach Entfernen des Detergenz monodisperse Populationen von Bizellen/Nanodisks auszubilden. Für die Ausbildung homogener und monodisperser Strukturen ist das anfängliche Komponentenverhältnis entscheidend. Analysiert man das Phasendiagramm bezüglich des Phasenübergangs von der lamellaren zur Phospholipid-Detergenz-Mischmizelle, wird deutlich, daß die Assemblierung der Bizellen von der gemischten mizellaren Phase ausgeht. In diesem Fall wird eine homogene und monodisperse Population ausgebildet. Findet die

Bizellenausbildung ausgehend von der lamellaren Phase des Phospholipid-Detergenzübergangs statt, findet man variable Größen, Ausbeuten und Zusammensetzungen der Partikel.^[924] Angaben über das Phasenverhalten im Vergleich zu anderen Membranformen variieren. Während die letzte Publikation von einer konservierten Phasenumwandlungstemperatur für Lipidmischungen verschiedener gesättigter und ungesättigter Lipide im Vergleich zu anderen Membranaggregatformen berichtet,^[924] wird ein breiterer Übergang sowie eine um 3-4°C höhere Phasenumwandlungstemperatur für Bizellen einer DPPC und DMPC-Lipidmischung beschrieben^[925].

Auch diese Form der Bizellen findet in umfangreicher Weise Anwendung. Hervorzuheben ist die Anwendung der Bizellen für NMR-Untersuchungen an Membranproteinen da sie ebenfalls die Selbstanordnung von individuellen Membranproteinen^[926] und die Inkorporation von G-Proteinen^[927] erlauben. Weitere oberflächenanalytische Methoden wie z.B. AFM-Messungen an Cytochrom P450 2B4^[928] ergänzen das Anwendungsspektrum.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Bizellen einige der attraktiven Eigenschaften der Modellmembransysteme Mizelle und Vesikel vereinen. Analog den Mizellen sind sie nichtkompartimentalisiert, optisch transparent und effektiv monodispers. Konsequenterweise ist es einfacher eine homogene Bizellenpopulation zu erhalten als dies für Vesikel möglich ist. Zusätzlich ist der Detergenzgehalt in Bizellen sehr viel niedriger als in klassischen, gemischten Mizellen. Dadurch behalten Bizellen im Gegensatz zu Mizellen zahlreiche Membranschlüsseigenschaften die in Mizellen nicht vorhanden sind.^[929]

3.2.3 Wichtige Parameter biomimetischer Membranen

Die Analyse der verschiedenen Membrantypen in Abbildung 35 führt zu der Schlußfolgerung, daß tBLMs die im Kapitel 2 definierten Ziele am besten erfüllen. Nachdem in Kapitel 3.1 natürliche Strukturelemente identifiziert worden sind, die für die Präparation guter biomimetischer Membranen ausschlaggebend sind, müssen diese zusammen mit den Aufbauprinzipien der biologischen Membran funktionell auf das biomimetische Membransystem übertragen werden.

Im folgenden Abschnitt soll auf die dazu notwendigen Faktoren eingegangen werden. Hierzu werden insbesondere die Wechselwirkungen zwischen der chemischen Struktur, dem architektonischen Aufbau der Membran und den beteiligten Grenzflächen analysiert. Dem Einfluß der beim Aufbau biomimetischer Membrane verwendeten Methoden wird in diesem Rahmen ein besonderer Stellenwert eingeräumt.

Die direkte Übertragung von Strukturelementen und Zusammensetzungen vom biologischen Membransystem auf Membranmimikie reicht nicht aus, um Modellmembranen mit bioäquivalenten Eigenschaften zu präparieren. Besonders die artifizielle Umgebung muß bei der Auswahl der Membrankomponenten und der Präparationsmethoden berücksichtigt werden (siehe Abbildung 34). Um definierte Membranfunktionen nachahmen zu können, ist es oft erforderlich von der genauen Zusammensetzung des biologischen Vorbildes abzuweichen, um die Funktionen der biomimetischen Membran an die Funktionen der biologischen Membran anzupassen. Dem funktionellen Aspekt dieser Mimese wird in der vorliegenden Arbeit gegenüber dem strukturell/chemischen Aspekt ein höherer Stellenwert eingeräumt werden.

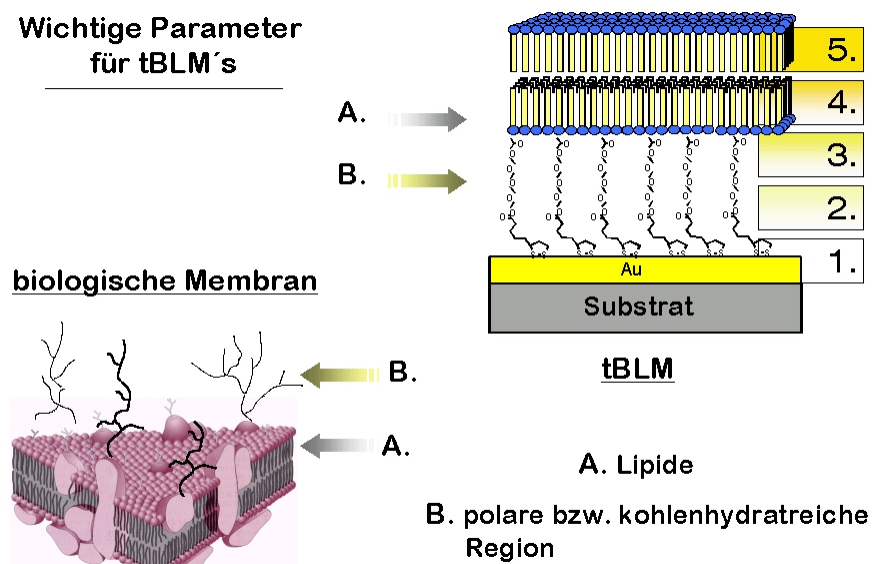


Abbildung 40 Wichtige Parameter für den Aufbau von tBLMs; Übersetzung der zellulären Membranstabilisation in ein Spacermodell, A&B Übertragung der natürlichen Membrankomponenten in das biomimetische System – inverse Reihenfolge: B) extrazelluläre Komponenten werden als submembrane Spacer (Cytoskelett/Cytosol-Analoge) verwendet

Der Aufbau der tBLM vollzieht sich in mehreren Schritten. Die Qualität der dabei stattfindenden Modifikationen der Grenzflächen hängt von den Eigenschaften der Grenzflächen, der Art der Modifikationen, den verwendeten Verbindungen und den präparativen Methoden der Grenzflächenchemie ab (Abbildung 40).

Folgende Elemente sind für die Funktion und die Eigenschaften der Membran von essentieller Bedeutung (Abbildung 40, Punkte 1-6):

1. Chemische Natur und Morphologie des Substrates (Kapitel 3.2.3.1/3.2.3.3)
2. a) Oberflächenaktive Gruppe bzw. Anker (Kapitel 3.2.3.2)
b) Länge, Konformation und Chemie des Spacers (Kapitel 3.2.2 – Punkt 5)
3. a) Kopfgruppe des Lipids (Kapitel 3.1 und 3.2.2)
b) Chemie und Länge der hydrophoben Gruppen der distalen bzw. cytosolanalogen Membranhälfte (Kapitel 3.1 und 3.2.2)
4. Chemie und Länge der hydrophoben Gruppen der proximalen bzw. extraplasmatischen Membranhälfte (Kapitel 3.1 und 3.2.2 – gilt auch für 5.)
5. Kopfgruppe der proximalen Membranlipide, eventuell weitere Modifikationen

Im folgendem soll im wesentlichen auf die Punkte 1 und 2 a) eingegangen werden. Der Einfluß und die Bedeutung der weiteren Punkte sind thematisch in Kapitel 3.1 und den vorangegangenen Abschnitten in Kapitel 3.2 dargestellt worden.

Die Wechselwirkung mit dem Festkörpersubstrat ist ein kritischer Punkt für die Qualität der tBLM. Wichtig ist hier die kovalente Anbindung der Membran an die Festkörperoberfläche. Neben der Vermittlung von Stabilität definiert sie, in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Spacers, den zur Verfügung stehenden maximalen Abstand für die Wechselwirkung zwischen beiden Grenzflächen (Festkörper und Membran). Die makroskopische Begrenzung des äußeren Membranrandes durch die Meßzelle muß zusätzlich berücksichtigt werden. Hydrophobe Begrenzungen sind hier von Vorteil da sie teilweise von überschüssigem Lipid benetzt werden können und ein dynamisches Lipidreservoir bilden.

Da mit zunehmender Membranfläche bei gleichbleibender Membranqualität auch die Anzahl der Defekte der Gesamtmembran zunimmt, ist ein Vergleich mit biologischen Membranen verschiedener Organismen für die erforderliche Qualität der tBLM aufschlußreich. Biologische Organismen besitzen sphärische Membranen deren Durchmesser für die größten Viren (z.B. Pockenvirus) bei 250-350 nm und für Säugerzellen bei etwa 10-20 µm liegt.^[115] Das Poliovirus (Picornavirus) ist zwar kleiner (etwa 24-30 nm) besitzt aber keine Membran. Unter der Annahme einer kugelförmigen Säugerzellmembran ($r = 5\mu\text{m}$) ergibt sich beim Vergleich mit den in dieser Arbeit überwiegend verwendeten tBLM-bedeckten Makroelektroden ($0,785\text{ cm}^2$) ein Flächenverhältnis von 1:250.000. Allgemeiner kann das Verhältnis der Membranoberfläche zwischen Pockenviren, Säugerzellen und der tBLM mit etwa $1 : 10^3 : 10^8$ angegeben werden. Die tBLM besitzt also eine im Vergleich zu klassischen Protocyten und Eucyten etwa 100.000 mal größere Membranoberfläche - eine Herausforderung an die Minimierung der Membrandefekte. Makroskopische Oberflächen müssen also, für eine Anwendung als tBLM-

Substrat, über Flächen von Quadratmillimetern eine einheitliche Oberflächenmorphologie aufweisen um homogene und defektfreie supramolekulare Membranstrukturen zu erlauben.

3.2.3.1 Festkörperoberflächen: Festkörpermorphologie und elektronische Eigenschaften

An die zum Aufbau der Membranmodelle verwendeten Substrate/Träger werden hohe Anforderungen gestellt. Eine wesentliche Rolle spielen die physikalischen Eigenschaften der Substrate. Neben den optischen Eigenschaften, die für die spätere Anwendung der Oberflächenplasmonenspektroskopie wichtig sind, ist vor allem die Oberflächenrauigkeit von Bedeutung. Zusätzlich muß die Modifizierbarkeit der Substratoberfläche mit Metallschichten für elektrochemische Messungen und die Anbindung organischer Moleküle gewährleistet sein. Es ist bekannt, daß die Topographie von Oberflächen die Eigenschaften vieler Materialien bestimmt. Obwohl die dafür verantwortlichen topographischen und chemischen Strukturen im Nanometer-Bereich liegen, beeinflussen sie die Wechselwirkung von Oberflächen über viele Größenordnungen hinweg bis in den makroskopischen Bereich.^[930] Mikroskopische Rauigkeiten führen beispielsweise zu einer Änderung der wirksamen Oberfläche, die bei flächenabhängigen Messungen in der Elektrochemie berücksichtigt werden muß. Als weiteres Beispiel sei der Einfluß von *van der Waals*-Kräften metallischer Oberflächen auf selbstorganisierte Monolagen (SAM) genannt. Dieser bewirkt eine Erniedrigung des Kontaktwinkels mit abnehmender SAM-Kettenlänge, der nicht auf eine Umorientierung kürzerer Ketten zurückzuführen ist.^[850]

Eine oft verwendete Substratoberfläche ist Gold. Es besitzt den Vorteil, daß es einfach, mit großer Güte und Kontrolle über die Schichtdicke auf verschiedene Festkörperoberflächen aufgedampft werden kann. Schon bei geringen Verunreinigungen auf der Substratoberfläche ist beim Aufdampfen von Gold mit der Ausbildung von dendritischen Goldstrukturen zu rechnen.^[931] Reine Substrate sind somit für die Präparation reproduzierbarer Goldoberflächen von großer Bedeutung. Durch ihre große Affinität zu organischen Schwefelmolekülen können die Goldfestkörperoberflächen effizient modifiziert werden. Der Goldoberfläche kommt dabei als proximaler Festkörperphasengrenze des Substrats eine besondere Bedeutung zu. Da sie direkt mit den organischen Oberflächenschichten in Kontakt steht, bestimmen ihre Eigenschaften das Verhalten und die Struktur des SAMs und weiterer Wechselwirkungspartner.

Gold besitzt auf Grund seiner elektronischen Konfiguration (5s² 5p⁶ 4f¹⁴ 5d¹⁰ 6s¹) ein Elektron, das 6s¹ Elektron, welches sich frei im Festkörpergitter bewegen kann. Gold

kristallisiert in einem kubisch flächenzentrierten Kristallgitter und seine kristallographische Orientierung wird durch die Millerschen Indizes definiert. Goldoberflächen weisen unterschiedliche Oberflächenstrukturen auf die sich in der kristallographischen Orientierung unterscheiden. Hierbei sind die (111) und die (100) Flächen am dichtesten gepackt, während die (110) Oberfläche eine wesentlich geringere Atomdichte aufweist. Besondere Bedeutung besitzen die (210) und die (311) Flächen da sie die am wenigsten dicht gepackten Oberflächenstrukturen aufweisen (größte Abstände zwischen den einzelnen Goldatomen in der ersten Atomlage). Die Packungsdichte definiert die Bindungsstellen für die entsprechenden SAM-Moleküle und die Oberflächenenergie der Goldoberfläche.

Unter dem Einfluß eines äußeren Potentials neigen die einzelnen Gitterstrukturen unterschiedlich stark zu einer Umorientierung durch Änderungen der atomaren Anordnung. Diese Umorientierung tritt besonders bei (100) – Flächen auf und kann zu einer Änderung der Oberflächenladung von bis zu $4 \mu\text{C cm}^{-2}$ führen.^[932] Die (210) und (311) Flächen zeigen diesen Effekt kaum.^[933] Generell tritt bei Anlegen eines Potentials eine Oberflächenumstrukturierung der Goldoberfläche an der Metall-Elektrolyt-Grenzfläche statt.^[934]

Die Tatsache, daß in polykristallinem Gold verschiedene Kristallgitter nebeneinander vorkommen, macht eine einheitliche Beschreibung dieser Oberflächen in morphologischer und elektrochemischer Sicht nicht möglich. Polykristallines Gold ist aus einer Mischung verschiedener Kristallgitter zusammengesetzt ((111), (100), (110), (210) u. a.), wobei sich die zugängliche Oberfläche in der angegebenen Reihenfolge der Kristallgitter vergrößert.^[935] Die auftretenden Kristallgitterstufen adsorbieren bevorzugt Anionen.^[936]

Biologische Verträglichkeit: Feste Substrate sind vergleichsweise inert. *In vivo* sind mehrere Wechselwirkungen von Gold bekannt, zum Beispiel die Hemmung lysosomaler Enzyme.^[937] Durch die weitgehende Stabilität und zusätzliche Passivierung der Goldoberfläche durch die Präparation von SAMs sind störende Effekte dieser Art bei der Verwendung von Goldoberflächen für biomimetische Membranen unwahrscheinlich.

3.2.3.2 Oberflächenarchitekturen: Selbstorganisierte Monoschichten (SAMs)

Um biomimetische Systeme auf Festkörperoberflächen zu präparieren bedarf es differenzierter Methoden. Sie müssen es erlauben Moleküle mit stark divergierenden Eigenschaften mit definierter Vorzugsorientierung und Verteilung auf dem jeweiligen Substrat anzuordnen. Eine Methode funktionalisierte Oberflächen zu erhalten, ist die spontane Selbstorganisation von mono- oder bifunktionellen Verbindungen durch deren geordnete Anordnung an einer Oberfläche durch Adsorption einer oberflächenaktiven Gruppe an das Substrat (*engl. self-*

assembled monolayer, SAM). Die oberflächenaktive Gruppe sollte im Gegensatz zu weiteren, in der zu assemblierenden Verbindung vorkommenden funktionellen Gruppen eine erhöhte Affinität zum Substrat besitzen. Die Präparation von SAMs stellt demnach einen Spezialfall der in der Natur häufig vorkommenden Selbstorganisation von Molekülen (z.B. Proteine mit nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten) beziehungsweise molekularen (z.B. DNA) oder supramolekularen Molekülaggregaten (z.B. Lipidmembranen) dar. Die Möglichkeit mit dieser Methode definierte Strukturen in molekularen Dimensionen zu präparieren, macht die Anwendung selbstorganisierter Monolagen vor allem wegen ihrer einfachen und effizienten Präparation zu einem wichtigen Werkzeug der Oberflächenchemie.

Die Triebkraft dieser Reaktion ist die stark exotherme Wechselwirkung zwischen der oberflächenaktiven Ankergruppe und dem Substrat (Chemisorption). Je nach chemischer Zusammensetzung des Substrats finden verschiedene funktionelle Gruppen für die Wechselwirkung mit dem Substrat Verwendung. Beispiele sind Thiole und Disulfide für Gold bzw. Edelmetalloberflächen (siehe auch Tabelle 4).^[938] Zusätzlich sorgen die hydrophoben Wechselwirkung der Alkylketten, die intermolekularen *van der Waals*-Kräfte^[939] und gegebenenfalls elektrostatische Wechselwirkungen,^[940] für eine Stabilisierung der Monolagen.

Selbstorganisierte Monolagen sind auf Grund folgender Eigenschaften von Interesse:

- Einfache Präparation
- Die Eigenschaften der Oberfläche lassen sich durch die Wahl der molekularen Struktur des Rückrades und der terminalen funktionellen Gruppen einstellen (Grenzflächenenergie, tribologische Eigenschaften, biologische Kompatibilität und submikroskopische Strukturierung auch in molekularen Dimensionen)
- Hoher Perfektionsgrad der Monolage möglich (dichte Packung, Ordnung)
- Chemische Stabilität ist je nach Anker-Oberflächenpaar einstellbar
- SAMs dienen als Ausgangspunkt für weitere Oberflächenreaktionen
- Aufbau von Multischichten ist möglich
- Zugänglichkeit der Verbindungen (oft kommerziell erhältlich)
- Möglichkeit laterale Strukturen im Nanometerbereich zu erzeugen ...

Die genannten Eigenschaften führten zu einem weiten Feld an Anwendungen, beispielsweise als Schutzschicht für die Passivierung von Metallen,^[941] Änderung der tribologischen Eigenschaften („Schmiereffekt“),^[942] Verhinderung der Proteinadsorption,^[943-946] Anbindung

weiterer Moleküllagen,^[947] den Aufbau biomimetischer Membranen^[49, 948] und die schaltbare Wechselwirkung mit Zellen^[949] um nur einige Beispiele zu nennen.

3.2.3.2.1 SAMs: Organische Schwefelverbindungen und Gold

1983 beschrieben NUZZO und ALLARA die Selbstorganisation/-assemblierung von Disulfiden zu geordneten Monoschichten auf Goldoberflächen.^[938] Selbstorganisierte Monolagen organischer Schwefelverbindungen auf Goldoberflächen sind die am besten untersuchten SAMs. Neben den chemisch beständigeren Disulfiden (bezogen auf die Lagerung vor der Assemblierung) werden am häufigsten Thiole zur SAM-Präparation eingesetzt.

Trotz der Beständigkeit der Edelmetalloberflächen sind chemische Veränderungen der Substratoberfläche bei Langzeitexperimenten durch Reorientierung der Substratoberfläche und chemische Modifikation zu beobachten. (siehe Kapitel 3.2.2.1)

Die Benennung der Thiole erfolgt nach IUPAC-Regel C-511 mit dem Suffix ...thiol oder beim Vorliegen höherer Benennungsprioritäten, mit dem Präfix Mercapto...; der Begriff Mercaptan leitet sich vom Quecksilbermercaptid ab: „Körper“, die man an Quecksilber (*lat. mercurius*) binden kann (*corpus mercurio aptum*). In der Technik halten sich verschiedentlich noch die veralteten Sulphydryl-Namen.

3.2.3.2.2 Bildung selbstorganisierter Monolagen und deren Wechselwirkungsenergien

Zur Präparation von SAMs werden die abzuscheidenden Moleküle aus der Lösung oder aus der Gasphase auf der Festkörperoberfläche abgeschieden. In kurzer Zeit bauen sich geordnete zweidimensionale Schichten aus.^[950]

Der hohe Organisationsgrad kann durch die Charakterisierung des entstandenen Kristallgitters untersucht werden. Die Anordnung der SAM-Moleküle wird dabei maßgeblich von der Kristallstruktur des Substrats beeinflusst.

Die in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Kristallgitter weisen erhebliche Unterschiede der für die Wechselwirkung mit SAM-Molekülen zur Verfügung stehenden Gitterplätze auf. Gold (111)-Oberflächen erlauben die Ausbildung von geordneten Alkylthiol-SAMs mit Packungsdichten von $21,6 \text{ \AA}^2$ bei vollständiger Oberflächenbelegung,^[951] siehe auch Abbildung 41. Die Packung $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ auf der Gold (111)-Oberfläche besitzt eine Einheitszelle mit den Vektoren $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$, die um 30° gedreht ist. Dabei sind die Moleküle um 32° gegen die Oberfläche geneigt.

Bei Silber bildet sich eine Einheitszelle mit $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R10,9^\circ$ aus, die einen Molekülabstand von 4,85 Å und 7,42 Å erlaubt, so daß eine Packungsdichte von $18,5 \text{ Å}^2$ pro Molekül erreicht wird.^[952] Der Neigungswinkel der Moleküle beträgt auf der Silberoberfläche etwa 12° .

Die Orientierung (Neigungswinkel) des SAM kann mit Hilfe von IR-spektroskopischen Methoden (IRRAS – Infrared reflection absorption spectroscopy) bestimmt werden.^[953]


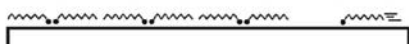

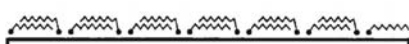

	Struktur	Fläche pro Molekül in Å ²	normalisierte Bedeckung θ
A	 "Gitter Gas"		
B	 $c(23 \times \sqrt{3})$ (auch gefunden: $p(11 \times \sqrt{3})$)	82,8 79,2	0,26 0,27
C	 $c(19 \times \sqrt{3})$	68,4	0,32
D	 $h(5\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$	54,0	0,40
E	 $(2\sqrt{3} \times 3)$ (auch als "c(4x2)" bezeichnet)	21,6	1,00

Abbildung 41 Verlauf der spontanen Selbstanordnung von molekularen Monolagen (A-E),^[954] A) „gasartiger“ Zustand, B) „streifenartiger“ Zustand, C) & D) intermediäre Zustände, E) hexagonales Supergitter mit einer $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30^\circ$ Einheitszelle (neben rechtwinkligen Einheitszellen) - dichteste Packung, durch verschiedene Orientierung der Neigungswinkel und Oberflächeninhomogenitäten entstehen vereinzelt Defekte

Die zur Anbindung von SAMs an Festkörpersubstrate (Gold) zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen enthalten vorzugsweise Schwefel. (Tabelle 4) Der genaue Mechanismus der Bindungsbildung bzw. Wechselwirkung zwischen Gold und Thiolen, Disulfiden und anderen in Tabelle 4 genannten Verbindungen ist noch nicht auf molekularer Ebene aufgeklärt. Thiolate, die durch Spaltung der S-H-Bindung entstehen, können neben den adsorbierten „intakten“ Thiolen koexistieren und werden zur bevorzugten Spezies, wenn die Bildung von molekularem Wasserstoff mit dieser einhergeht (Simulation).^[955]

Die zur SAM-Päparation verwendeten schwefelhaltigen Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Bildungsgeschwindigkeit des SAMs und dessen Stabilität. Thioacetate können in analoger Weise wie Thiole assembliert werden.^[956] Sie sind im Gegensatz zu Thiolen nicht oxidationsempfindlich, benötigen aber eine längere Assemblierungszeit oder höhere Konzentration, wenn sie nicht *in situ* zum Beispiel mit Ammoniak deblockiert werden.^[957] Durch die Deblockierung *in situ* wird das oxidationsempfindliche Thiol erst kurz vor der Wechselwirkung mit der Goldoberfläche generiert und die Oxidationswahrscheinlichkeit

minimiert. Eine weitere Methode zur Bildung von SAMs ist durch die elektrochemische Oxidation von Bunte Salz ($R-S-SO_3^-$) zu $R-S^+$ und $R-S-S-R$ möglich, das in analoger Weise zu den von NUZZO und ALLARA beschriebenen Disulfiden assembliert.^[958] Thioether besitzen zwar ebenfalls eine hohe Affinität zu Goldoberflächen, bilden aber weniger stabile SAMs als die vergleichbaren Thiole aus. Verwendet man aber Moleküle mit mehr als drei Thioetherfunktionen (Dialkylsulfide) so lassen sich relativ defektfreie SAMs assemblieren die mit Decanthiol vergleichbar sind.^[959, 960] Der Einsatz von Dithiolen führt im Vergleich zu einfachen Thiolen ebenfalls zu stabileren SAMs, was auf einen kumulativen Effekt zurückzuführen ist.^[961, 962] Verwendet man relativ steife Dithiole ist es möglich SAMs mit terminaler Thiolgruppe zu bilden.^[957] Enthält ein SAM einen Disulfidterminus, so ist eine Substitution des SAM-Terminus mit freien Thiolen unter einem Disulfidaustausch möglich.^[963]

Substrat	Ligand	„Bindung“
Au	RSH, ArSH (Thiole)	$RS \cdots Au$
Au	RSSR' (Disulfide)	$RS \cdots Au$
Au	RSR' (Thioether)	$RS \cdots Au$
Au	RSO_2H	$RSO_2 \cdots Au$
Au	RSCOR'	$RS \cdots Au$ ^[957]
Au	$R-CS_2$	$R-CS_2 \cdots Au$ ^[964]
Au	R_3P	$R_3P \cdots Au$
Au	RSeSeR-	$RSe \cdots Au$ ^[965]
Au	RTeTeR	$RTe \cdots Au$ ^[965]
Au	RNC	$RNC \cdots Au$ ^[966]
Au,Ag	$(NH_2)_2C=S$	$(NH_2)_2C=S \cdots Au$ ^[967]
Ag	RSH, ArSH	$RS \cdots Ag$
Cu	RSH, ArSH	$RS \cdots Cu$
Pd	RSH, ArSH	$RS \cdots Pd$
Pt	RNC	$RNC \cdots Pt$
GaAs	RSH	$RS \cdots GaAs$
InP	RSH	$RS \cdots InP$

Tabelle 4 Substrate und ihre Liganden zum Aufbau von SAMs. Alle nicht indizierten Beispiele sind in folgendem Artikel beschrieben ^[968] Schwerpunkt: Metalle und ihre Liganden, sowie Substrate die mit Thiolen und anderen Schwefelverbindungen (Ausnahme RNC, Se und Te) SAMs bilden).

Eine neue Methode zur Modifikation von Goldoberflächen stellt die Verwendung von Silanen dar. Silane sind in der Lage kovalent durch Si-H induzierte Aktivierung von Gold an dieses zu binden.^[969]

Andere Festkörpersubstrat/Adsorbat-Systeme sind reaktive Chlor- oder Alkoxysilane auf oxidischen Oberflächen wie hydroxyliertem Silizium oder SiO_x ^[970] und TiO_2 ^[971]; Phosphate oder Fettsäuren auf Al_2O_3 und AgO ,^[972-974] α -Olefine auf hydriertem Silizium,^[975] Carboxylate auf Aluminiumoxid,^[976] Silber^[977] und Kupfer^[978]; sowie Pyridiniumsalze auf Glimmer (Meica)^[979]. Bei der Bildung selbstorganisierter Monolagen spielen eine Reihe verschiedener physikalischer und chemischer Wechselwirkungsenergien eine Rolle. Schreiber^[954] teilt die bei der Bildung des SAMs ablaufenden Prozesse in 8 verschiedene Gruppen ein. Zur energetischen Betrachtung wurde das System Dodecanthiol- Au(111) gewählt:

Molekül-Substrat-Wechselwirkung – Adsorption: Die Adsorptionsenergie ist die stärkste aller Wechselwirkungsenergien und vermutlich die entscheidende Triebkraft bei der Bildung selbstorganisierter Monolagen auf Festkörperoberflächen. Entsprechend dem in Abbildung 42 dargestellten Potentialverlauf kommt es durch die Annäherung der Alkylthiole im ersten Schritt zu einer Physisorption, die zu einer nachfolgenden Chemisorption führt (Abbildung 42). Durch den additiven Beitrag der *van der Waals*-Kräfte der gesamten Alkylkette liegt die bei der Physisorption freiwerdende Energie bei -104 kJ mol^{-1} und ist bezogen auf den absoluten Beitrag mit der Chemisorption vergleichbar (-126 kJ mol^{-1}). Eine starke Physisorption verhindert den Übergang zur Chemisorption und verlangsamt somit die Wachstumskinetik.

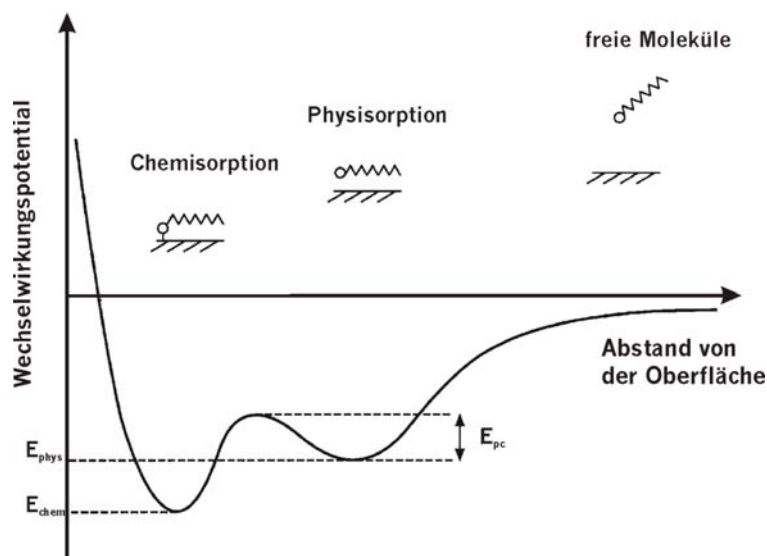


Abbildung 42 Wechselwirkungspotential^[954]

Molekül-Substrat-Wechselwirkung – Korrugationsenergie: Im Unterschied zur Adsorptionsenergie gibt die Korrugationsenergie ΔE_{corr} den Energieunterschied zwischen verschiedenen Bindungsstellen auf dem Substrat an. Sie ist an der Ausbildung der $c(4 \times 2)$ -Supergitterstruktur beteiligt und wichtig für die laterale Mobilität der Moleküle auf der Oberfläche. Damit ist sie ein wichtiger Parameter für die Strukturbildung des SAMs (Abbildung 43).

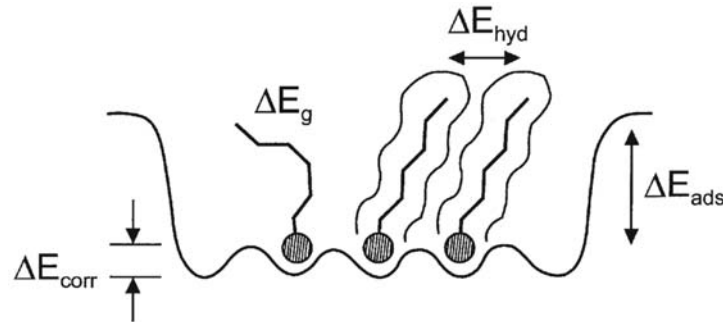


Abbildung 43 Wechselwirkungsenergien selbstorganisierter Monolagen: ΔE_{corr} Korrugationsenergie (Energie verschiedener Bindungsstellen auf dem Substrat), ΔE_g Energie auf Grund nicht perfekter Streckung der Ketten (gauche-Effekt), ΔE_{hyd} Wechselwirkungsenergie der Alkylketten, ΔE_{ads} Adsorptionsenergie

Wechselwirkungsenergie der hydrophoben Ketten: Die auf Grund sterischer Abstoßung der Ketten einerseits und der attraktiven *van der Waals*-Wechselwirkung andererseits resultierende Wechselwirkung gewinnt bei zunehmender Packungsdichte an Bedeutung. Sie liegt für Decanthiol im Festkörper bei $\Delta E_{hyd} = 66 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Wechselwirkungsenergie auf Grund des gauche-Effekts – Packung: Für die konformative Änderung einer *trans*-Konformation in eine *gauche*-Konformation ist innerhalb der Alkylkette eine Energie von $2,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ notwendig und kann somit bei Raumtemperatur angeregt werden. Die damit in Zusammenhang stehende Beweglichkeit der Ketten wirkt zwar einer für die dichteste Packung notwendigen Streckung der Moleküle entgegen, erleichtert aber den Strukturbildungsprozess durch dynamische Änderung der Molekülorientierung.

Endgruppenwechselwirkung: Endgruppenwechselwirkungen sind stark von der Größe, Form und chemischen Beschaffenheit des SAMs abhängig und können nicht in allgemeiner Form angegeben werden.

Chemisorptionsbarriere auf dem reinen Substrat: Diese Energie beschreibt die energetische Barriere zwischen dem physisorbierten und dem chemisorbierten Zustand der Moleküle und liegt für Alkylthiole auf Au (111) bei 29 kJ mol^{-1} .

Chemisorptionsbarriere auf einem teilweise bedeckten Substrat: Hier wird die mit der Wachstumskinetik in Zusammenhang stehende Energiebarriere berücksichtigt.

Wechselwirkungsenergie durch adsorbierte Moleküle: Ab einer bestimmten Belegungsdichte der Oberfläche werden die sich nähernden Moleküle zuerst an der bestehenden Schicht angelagert, bevor sie in die Schicht eindringen können. Die Stärke der Wechselwirkung liegt zwischen der Festkörperwechselwirkung und der Physisorption (für Decanthiol zwischen 66 kJ mol^{-1} und 104 kJ mol^{-1})

3.2.3.2.3 Kinetik, Strukturbildung und Stabilität

Bildung, Struktur und Stabilität selbstorganisierter Monolagen sind wichtig für die Präparation und Anwendung von SAMs. Durch die Steuerung der Adsorption (maßgeblich durch Konzentration, Temperatur, Wahl des Lösungsmittels und Assemblierungsdauer) können bei der Verwendung der gleichen Verbindung unterschiedliche Oerflächeneigenschaften erzielt werden.

Der erste Adsorptionsschritt läuft innerhalb der ersten Minuten ab und führt zu einer Oberflächenbedeckung von 80-90 %. Der nachfolgende zweite Schritt beinhaltet die Orientierung der Alkylketten um die perfekte Packung des SAMs mit einer all-trans-Konformation zu erlauben. Dieser Prozess verläuft innerhalb von Stunden bis Tagen. Verwendet man binäre Mischungen, so dauert die Einstellung eines Gleichgewichts durch den graduellen Austausch von kurzkettingen gegen langkettige Thiole gewöhnlich länger als 10 Tage.^[980]

Pro Methylengruppe steigt die Wechselwirkungsenthalpie um $1,3 \pm 0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$. – die wesentliche Triebkraft des Austauschs.^[981] Thermodynamisch ist die Stabilität der Alkylkettenpaare in SAMs, die sich aus Thiolen unterschiedlicher Kettenlänge zusammensetzen, für die Kombination lange Kette-lange Kette > kurze Kette-kurze Kette > lange Kette-kurze Kette.^[982] Bei großen Kettenlängenunterschieden besteht die Gefahr der Phasenseparation! Die Untersuchung asymmetrischer Dialkyldisulfide mit 5 Methyleneinheiten Unterschied, hat noch keinen erkennbaren Einfluß auf die Kristallinität des SAMs, wobei dies stark von der Gesamtkettenlänge abhängt.^[983] Auch für Diacyllipide ist beschrieben, daß sich ein Kettelängenunterschied von 4 Methyleneinheiten pro Kette nicht auf die Mischbarkeit

auswirkt.^[984] Mikrophasenseparation von funktionalisierten SAMs ist für Alkylkettenlängenunterschiede von fünf bis sechs Methylengruppen beschrieben.^[985] Es kommt dabei zu einer molekulardispersen Verteilung der längerkettigeren Verbindung,^[986] ohne die Ausbildung von Clustern^[987]. Die beschriebenen Prozesse sind stark temperatur- und lösungsmittelabhängig.

Terminal funktionalisierte Alkylthiole tragen durch ihre Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich zur Stabilisierung bei. 3-Mercaptopropionsäure ist in der Lage Dodecanthiol von der Oberfläche zu verdrängen.^[988] Gemischte SAMs können durch die Assemblierung binärer Mischungen^[989] oder den Einbau einer zweiten Komponente in einen nicht komplett aufgefüllten SAM präpariert werden.^[990]

Thiole besitzen auf Goldoberflächen eine erstaunliche laterale Beweglichkeit.^[974] Dies hat zur Folge, daß sich Alkylthiol-SAMs bei Temperaturen zwischen 60-110°C von der Goldoberfläche desorbieren lassen, wenn eine hinreichende Löslichkeit im Lösungsmittel oder genügend hoher Dampfdruck der Verbindungen vorhanden ist.^[981] Über lange Zeitintervalle kommt es zu einer Reorientierung und Verschiebung von Domänen auf dem Substrat.^[991]

Ein Vergleich der SAM-Bildungskinetik mit Disulfiden zeigt hier eine verzögerte SAM-Bildung. Sind sterisch anspruchsvolle Reste angebunden, oder ist die Disulfidbindung nicht direkt zugänglich (Beispiel einiger Peptide und Proteine), kann die Ausbildung des SAMs aus sterischen Gründen sogar ganz unterdrückt sein.^[67] Betrachtet man im Vergleich die Geschwindigkeit der Dialkylsulfidadsorption, kann festgestellt werden, daß diese drei Größenordnungen langsamer verläuft, als die der Thiole.^[992]

Das Wachstum einer selbstorganisierten Monolage hängt stark von der Kristallstruktur des Substrats und der Reinheit der Oberfläche ab. Die gezielte Präparation definierter Gitterstrukturen ist daher der erste Schritt zur Steuerung der Oberflächen-, bzw. SAM-Eigenschaften. Zusätzlich weisen unterschiedliche Adsorptionspositionen verschiedene Adsorptionsenergien auf (Abbildung 44). Die Stabilität und die Dynamik der einzelnen Moleküle des SAMs werden dadurch maßgeblich beeinflusst.

Das Plateau der Abbildung 44 zeigt, daß durch den geringen Energieunterschied der einzelnen Bindungsstellen eine dynamische Änderung der Anordnung des SAMs bei Raumtemperatur möglich ist (ca. 0,2 eV \leftrightarrow 19 kJ mol⁻¹ maximaler Energieunterschied in E_{akt} für den Übergang zwischen fcc - brd- und top - Anordnung), zur Einordnung der Stabilität dieser Wechselwirkungen sei an dieser Stelle auf die Energie der Wasserstoffbrückenbindung in Wasser (15 kJ mol⁻¹) und die Bindungsenergie der Si-O-Bindung mit 452 kJ mol⁻¹^[993] verwiesen.

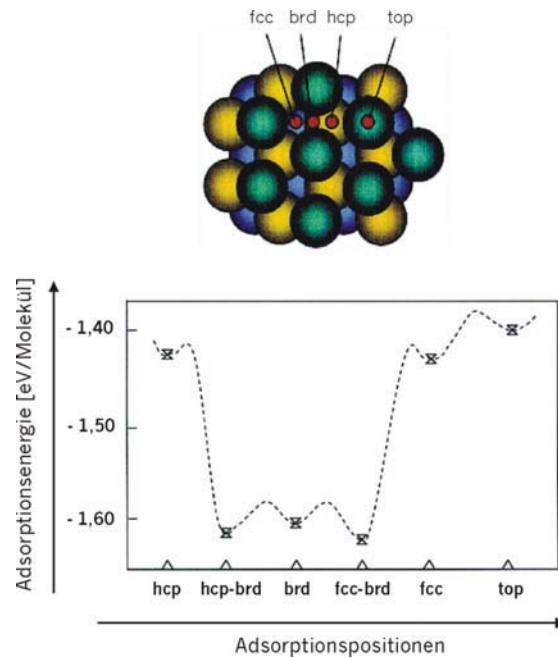


Abbildung 44 Abhängigkeit der Adsorptionsenergie von der Adsorptionsposition^[994]

Betrachtet man die Bindungsstärken der Monoschichten auf der Substratoberfläche, so müssen verschiedene Beiträge berücksichtigt werden. Die Stabilität hängt im wesentlichen von der Bindungsstärke der an die oberflächenaktive Gruppe gebundenen Reste, und der Bindungsstärke der Schwefel-Gold-Bindung oder der Silizium-Kohlenstoff-Bindung ab (die Si-O-Si Bindung besitzt eine größere Stabilität.).

AFM-Messungen zeigen, daß im Falle von selbstassemblierten Thiolen die zur Lösung der Schwefel-Gold-Bindung nötige Kraft bei $1,4 \pm 0,3$ nN und für die Si-C-Bindung von Si-O-Si-oberflächengebundenen Silanen bei $2,0 \pm 0,3$ nN liegt.^[995] Hierbei ist zu beachten, daß die direkten Bindungsseiten an die Oberfläche (Si-O-Si-Bindung/en) nicht die Schwachpunkte darstellen, da die Kohlenstoff-Silizium-Bindung für mechanisch wirksame Kräfte das schwächste Glied darstellt, vor allem wenn das Silizium dreifach über Si-O-Bindungen an die Oberfläche gebunden ist.

Thiolat-Gold Wechselwirkungsenergien sind in der Literatur mit Werten zwischen 126-180 kJ/Mol angegeben.^[996] Gold-Schwefel-Bindungen besitzen also eine geringere mechanische Stabilität als silangebundene SAMs und sind empfindlich gegenüber chemischen Einflüssen z.B. der Oxidation.^[997]

3.2.3.3 Wechselwirkung von Wasser mit verschiedenen Grenzflächen - Einfluß auf Membranen/Vesikel; Vesikelfusion

Wasser ist nicht nur ein entscheidendes Medium in dem biologische Prozesse ablaufen, es besitzt eine Vielzahl einzigartiger Eigenschaften.^[998-1000] Als Medium zwischen Grenzflächen erlaubt es durch seine große Dielektrizitätskonstante die Dissoziation von Ionen, die Vermittlung elektrostatischer Wechselwirkungen und die Ausbildung dicker Wasserfilme auf hydrophilen Oberflächen.^[1001] Seine Eigenschaften unterscheiden sich in der Solvationszone stark von denen in Substanz. Als Beispiele können der Brechungsindex, die Dielektrizitätskonstante und die Dichte angeführt werden.^[61] Die Rolle einzelner Wassermoleküle für die Stabilisierung der Struktur von Proteinen ist ein Indiz für dessen definierte Wechselwirkung mit komplexen Molekülen.^[1002] Daß Wasser in biologischen Prozessen auch in hochgeordneter Form vorliegen kann, wird am Beispiel von geordnetem Wasser in Nervenzellen deutlich.^[1003] Da alle natürlichen Membranprozesse an das wäßrige Medium gebunden sind, ist sein maßgeblicher Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen biologischen Grenzflächen evident.

Das **Verhalten von Vesikeln auf Oberflächen** aber auch zwischen zwei Vesikeln hängt von einer Reihe von Parametern ab, beispielsweise von der Oberflächenenergie und –morphologie. Die Parameter für das einzelne System sind meist analytisch unterdeterminiert wodurch eine exakte Beschreibung der einzelnen Prozesse nicht möglich ist. Eine Vielzahl an Publikationen zeigt, daß sowohl sehr hydrophile (z.B. hydrophiles Glas mit einem Kontaktwinkel zwischen 0° bis 15°)^[1004] aber auch sehr hydrophobe Oberflächen (z.B. Diphytanylglycerin-SAMs mit einem Kontaktwinkel von mehr als 110°)^[57] die Vesikelfusion begünstigen. Neben der Oberflächenenergie selbst, hängt die Fusion von der Ionenstärke, der Art der Ionen und dem pH Wert ab (Details siehe Kapitel 3.1.2.4.7).^[1004]

Die für die Chemie in definierten Volumina („Nanocontainer“)^[770] wichtige stabile Adsorption intakter Vesikel auf Oberflächen wird durch Oberflächenmodifikationen die zu einem Kontaktwinkel zwischen etwa $30-70^\circ$ führen (z.B. durch Acetylgruppen-terminierte SAMs)^[1005] vermittelt. Sie ist bei der Präparation von tBLMs meist unerwünscht. Hinweise für die chemische Induktion der Vesikelfusion auf polaren Oberflächen oder zwischen Vesikeln sind bei Menger et al. und Ekeröth et al. beschrieben.^[659, 1006]

Für die Wechselwirkung der Vesikel mit hydrophoben und hydrophilen Oberflächen werden verschiedene Effekte diskutiert. Neben dem schon besprochenen Einfluß von Ionen und der Oberflächenmorphologie,^[1007] ist das Wasser durch sein komplexes Verhalten^[1008] eine entscheidende Komponente der Wechselwirkung zwischen Vesikeln und Oberflächen. Die besonderen Eigenschaften von Wasser werden maßgeblich durch seine Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Im flüssigen Zustand geht ein Wassermolekül im

Durchschnitt 3,0-3,5 Wasserstoffbrückenbindungen zu seinen Nachbarn ein.^[61] Steht Wasser im Kontakt mit hydrophoben Teilchen/Oberflächen, so ist die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen eingeschränkt. Um eine maximale Erniedrigung der Energie zu erzielen, wird eine pentagonale Wasserstruktur postuliert.^[1009] Wasser ist dadurch in der Lage stabile käfigartige Strukturen auszubilden und vier Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen.^[61] Dadurch ändern sich die Eigenschaften der hydrophoben Oberfläche und der mit ihr in Kontakt stehenden Wasserschicht. Experimentelle Beweise für das Vorliegen solcher „eisartiger“ Strukturen wurden gefunden.^[1010] Bei der Wechselwirkung zwischen Vesikel und hydrophober Oberfläche kommt es zuerst zur Annäherung der polaren Vesikeloberfläche, dem Festkörper, und unter Phasenumwandlung (siehe oben: Punkt Membran-/Vesikelfusion) zur Wechselwirkung zwischen zwei hydrophoben Oberflächen. Für die Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Oberflächen wird neben dem Modell der geordneten Wasserstrukturen noch ein weiteres Modell diskutiert - die kapillare Verdampfung zwischen zwei sich nähernden hydrophoben Oberflächen.^[1011] Auch für diesen Prozess gibt es experimentelle Befunde, welche die Ausbildung einer Schicht geringer Dichte an der Oberfläche und das Auftreten von nanoskopischen Gasblasen belegen.^[1012-1014] Da stabile Wasserfilme erst ab drei Doppelschichten möglich sind,^[1015] ist eine Erniedrigung der Wasserdichte zwischen zwei sich nähernden Oberflächen bei geringen Abständen verständlich. Für die Vesikelfusion bedeutet dies, daß bei der im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Präparation von tBLMs auf hydrophoben Monoschichten, auf sehr reine, glatte und dichte hydrophobe Oberflächen geachtet werden sollte. Dadurch soll die Oberflächenenergie minimiert und der Einschluß von nanoskopischen Gasblasen in die Membran vermieden werden, falls die Membranfusion maßgeblich durch kapillare Verdampfung vermittelt wird.

Oberflächen mit Kontaktwinkeln zwischen 15 und 40° können mit der Eigenassoziation von Wassermolekülen mithalten. Die hier gebildeten Wasserstrukturen sind daher auch mit denen von Wasser in Substanz zu vergleichen.^[1016] Oberflächen mit Kontaktwinkeln von weniger als 15° bilden Wasserstrukturen aus, die mit hydrophilen Wechselwirkungen vergleichbar sind und eventuell mit abstoßenden Hydratisierungskräften in Verbindung stehen.^[1017] Wasser, das sich an Oberflächen mit einem Kontaktwinkel von mehr als 40° befindet, bildet keine Wasserstoffbrückenbindungen zur Oberfläche aus. Gemäß dieser Klassifizierung sollte die attraktive hydrophobe Wechselwirkung bei Kontaktwinkeln von mehr als 40° auftreten. Analysiert man allerdings die charakteristische Abklinglänge im Detail, wird deutlich, daß die hydrophoben Kräfte ab Kontaktwinkeln von 62,4-65° unterstützt werden.^[1017] Daher kann verallgemeinert werden, daß Oberflächen mit einem Kontaktwinkel > 65° als hydrophob bezeichnet werden können wohingegen hydrophile Oberflächen jene mit Kontaktwinkeln von weniger als 65° sind. Letztere unterstützen die hydrophobe Wechselwirkung nicht.^[1017]

Allerdings sind verhältnismäßig kleine Kontaktwinkel von etwa 20° oder weniger für eine polar vermittelte Vesikelfusion notwendig, wie sie durch die Verwendung hydrophiler Glasflächen möglich ist.

Aussagen über die molekularen Ursachen für die beschriebenen Oberflächeneffekte lassen sich durch den Mehrkomponentencharakter der Fusionsvorgänge, und die fehlenden Möglichkeiten die Einzelprozesse molekular aufzulösen, nur schwierig ableiten.

Für die direkte Fusion von Vesikel-Membranen ist die hydrophobe Wechselwirkung (mit dem SFA (surface force apparatus) gemessen) am bedeutsamsten. Zusätzlich sind Kräfte innerhalb der Lipiddoppelschicht und die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Membranen beteiligt. Die Membranen überwinden dabei die repulsive sterische Abstoßung durch die Hydratationssphäre nicht direkt, sondern umgehen diese durch lokale Membrandeformationen unter Ausbildung eines Phasenübergangs erster Ordnung mit einer plötzlich auftretenden Instabilität bei definierten Membranabständen.^[1018]

Es kann daher angenommen werden, daß die dynamische Beweglichkeit der Membran senkrecht zur Festkörperoberfläche einen wesentlichen Einfluß auf das Fusionsvermögen von Membranen besitzt. tBLMs mit flexiblen Spacermolekülen zwischen Membran und Substrat sind daher interessante Systeme die eine verbesserte Vesikelfusion erlauben könnten.

3.2.3.4 Stabilität von Membranen - Beeinflussung der Membran durch äußere Einflüsse wie sie unter biomimetischen Versuchsbedingungen auftreten können

Reine Lipidmembranen sind empfindliche Strukturen und reagieren nicht nur auf mechanische Einflüsse. Membranen beziehen ihre Stabilität in erster Line durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Ketten und die polaren und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen und dem Lösungsmittel. Die Wechselwirkung der Kopfgruppen hängt durch deren Exposition zum Lösungsmittel stark von dessen Natur und den darin enthaltenen Verbindungen ab.

Der Einfluß von Metallionen auf die Membran beruht auf deren Wechselwirkungen mit der Solvatationssphäre der Lipidkopfgruppen. Alle bivalenten Kationen und Lithium führen zu einer Stabilisierung des Gel-Zustands.^[1019] Mg^{2+} und Ca^{2+} stabilisieren die Membran und erhöhen die Zugänglichkeit der Carbonylgruppen, wahrscheinlich durch die Einbeziehung der Carbonylgruppen in die Hydratationssphäre der Ionen.^[1020] Als Folge tritt eine komplexe Reorganisation der Carbonylregion auf und die Hydratationssphäre der polaren Membranoberfläche wird insgesamt weniger strukturiert. Durch die stabilere Hydrathülle des Mg^{2+} (stabilerer Aquo-Komplex mit geringer Wasseraustauschreaktion) gegenüber Ca^{2+} (Mg^{2+}

$\sim 10^5 \text{ sec}^{-1}$; $\text{Ca}^{2+} > 10^5 \text{ sec}^{-1}$)^[1021] besitzt Mg einen geringeren Einfluß auf die Membraneigenschaften als Ca. So bewirkt Ca^{2+} bei DMPC-Vesikeln eine Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur um 8,5 °C während Mg^{2+} nur eine Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur um 2,8 °C vermittelt.^[1022] Zink hingegen dehydratisiert die Kopfguppen bei kleiner und mittlerer Hydratisierung.^[1019] Diese Beobachtungen korrelieren mit der freien elektrostatischen Solvatationsenergie der Ionen in Wasser bzw. invers mit deren Ionenradius (siehe auch Hofmeister Reihe). Unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Ionen mit den Lipidkopfguppen und ihr Einfluß auf deren Hydratationssphäre beeinflusst die Fusogenität der Membranoberflächen.^[1019]

Die Induktion von Domänen innerhalb der Membranstruktur durch Calcium ist beschrieben.^[1023] Eine Variation der Elektrolytzusammensetzung kann daher als variabler Parameter bei der Präparation von biomimetischen Membranen in Betracht gezogen werden.

Auch die Wechselwirkung mit den extrazellulären Komponenten und dem Cytoskelett trägt im biologischen System wesentlich zur Stabilisierung und der elektrischen Dichtigkeit der Membran bei.^[1024] Analog ihrer biologischen Umgebungsbedingungen sind reine Lipiddoppelschichten nur stabil, wenn sie von beiden Seiten von Wasser umgeben sind. Auch biomimetische Membranen z.B. physisorbierte Membranen sind instabile Systeme. Sie delaminieren, wenn die proximale Wasserschicht entfernt wird.^[1025] Auch bei sonst stabilen tBLMs delaminiert bei der Entfernung der proximalen Wasserschicht die darunterliegende Lipidschicht. Ausnahmen sind für Lipiddoppelschichten beschrieben, die:

- auf Aminosilanen präpariert sind^[1026]
- durch S-Layer stabilisiert sind (S-Layer adsorbieren stark mit den proximalen Lipidkopfguppen und erlauben es sogar, die Membran durch die Wasser-Luft-Grenzfläche zu führen ohne die Membran zu zerstören, wenngleich auch die Fluidität der Membran abnimmt)^[1027]
- durch die Anbindung von Avidin an biotinfunktionalisierte Lipidmembranen vor Delaminierung geschützt sind^[1028]
- anderweitig stabilisiert sind (beispielsweise durch polymerisierbare Lipide^[1029-1032]).

Im Rahmen der Oberflächeneffekte sind auch transmembrane Umverteilungen bzw. Reorientierungseffekte von Membranlipiden in Abhängigkeit vom Substrat (z.B. Meica) von Bedeutung.^[1033] In der Gruppe der membranstabilisierenden Verbindungen unterscheidet man

zwischen geladenen und nicht geladenen Verbindungen. Polymere spielen bei den nicht geladenen Verbindungen die Hauptrolle wohingegen bei den geladenen Verbindungen den Metallionen die größte Bedeutung beizumessen ist.

Innerhalb der Polymere sind insbesondere die stabilisierenden Effekte von Oligo-^[1034, 1035] und Polysacchariden beschrieben (Lebensdauer von BLMs steigt von Stunden auf 1-2 Tage).^[1036] Andere Polymere wie beispielsweise PEG ^[674, 1037, 1038] und PNIPAM^[1039] werden dagegen meist zur Initiierung der Vesikel- bzw. Membranfusion verwendet. Der Effekt der polaren Polymere wird auf eine kompetitive Verdrängung des Wassers aus dem Kopfgruppenbereich zurückgeführt.^[1040] Die Anwendung dieser Polymere zur Stabilisierung von Membranen ist ebenfalls möglich. Unter den geladenen Polymeren zeigt z.B. Polylysin vor allem bei negativ geladenen Membranen membranlysierende Eigenschaften.^[1041]

Magnetfelder – Daß Magnetfelder einen Einfluß auf Lipidmembranen ausüben ist bekannt.^[1042] Unter dem Einfluß statischer Magnetfelder < 0,5 Tesla (rechtwinklig bezogen auf die Phospholipid-BLM-Oberfläche) ändert sich der Membranwiderstand (bei $H=0$, 526 M Ω) um bis zu 24 M Ω .^[1043] Messungen unter dem Einfluß starker Magnetfelder können somit die Membraneigenschaften in signifikanter Weise ändern. Gerade das wachsende Interesse an Membranproteinstrukturaufklärung mit Hilfe der Festkörper-NMR an biomimetischen Membranen^[1044] erfordert die Berücksichtigung des Einflusses starker Magnetfelder auf geordnete Membranen.

Mechanisch-elektrische Wechselwirkungen^[1045, 1046] – Eine wesentliche Funktion der biologischen Membran ist die Separation von Ladungen und der Aufbau eines elektrischen Potentialgefälles über die Membran. Viele Membranproteine werden von der durch Ionenkanäle und Transporter kontrollierte Potentialdifferenz in ihrer Funktion gesteuert oder nutzen die Energie des Potential- und Stoffgradienten zur Synthese (z.B. H^+ -ATPase). Die Untersuchung dieser Prozesse geschieht mit Hilfe der elektrochemischen Analytik unter Anwendung äußerer elektrischer Felder. Überschreiten sie eine kritische Größe, ist ein Einfluß auf die Membranstabilität bzw. Integrität zu erwarten. Der Einfluß elektrischer Felder auf die Membran setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Die mechanische Spannung der Membran hat dabei einen bedeutenden Einfluß auf die Wirkung äußerer elektrischer Felder.^[1047] Elektrische Felder beeinflussen die Membran nicht nur über die Dipole und Ladungen der Lipide sondern auch durch die Wechselwirkung mit den in Lösung befindlichen Ionen.^[1048, 1049] Durch das Anlegen eines Potentials kann es zu einem reversiblen Zusammenbruch der Membranintegrität kommen^[1050] wodurch eine temporäre Ausbildung von Poren^[1051] induziert wird. Letztere können durch einen elektrischen Strom stabilisiert

werden.^[1052] Werden Membranen simultan elektrischen Feldern und Dextran oder PEG ausgesetzt kommt es schon unter milden Bedingungen zur Ausbildung stabilisierter Poren.^[1053]

Neben einem Einfluß auf die Membran selbst, haben elektrischen Felder auch einen Einfluß auf das Cytoskelett^[1054]. Bei sehr kurzen Potentialpulsen im Nanosekundenbereich treten die Einflüsse auf die Membranporenbildung in den Hintergrund und intrazelluläre Einflüsse nehmen stark zu.^[1055] Jedoch kommt es auch bei Potentialpulsen im Nanosekundenbereich zur transmembranen Reorientierung von Phosphatditylserinen und zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumionenkonzentration.^[1056]

Sowohl statische elektrische Felder als auch Wechselfelder im radiofrequenten Bereich können die Permeabilität der Membran stark erhöhen.^[1057]

Der Zusammenhang zwischen mechanischer Membranspannung und elektrischer Durchbruchsspannung hängt stark von der Pulsdauer des elektrischen Potentials ab. Messungen an Membranfragmenten von HEK293-Zellen zeigen, daß kurze Spannungspulse von 50 µs Dauer eine Spannung von mehr als 500 mV benötigen um zu einem Zusammenbruch der Membranintegrität zu führen. Unter diesen Bedingungen liegt eine Abhängigkeit des Membranzusammenbruchs von der mechanischen Spannung der Membran vor. Dagegen sind für Spannungspulse von 50-100 µs Spannungen von 200 – 400 mV notwendig um einen Membranzusammenbruch hervorzurufen, unabhängig von der mechanischen Membranspannung.^[1046] Oberhalb von 540 mV treten neben transienten Poren auch langzeitstabile Poren auf.^[1058] Untersuchungen an verschiedenen Tumorzelllinien zeigen, daß bei allen untersuchten Zelllinien die Porenbildung spätestens bei Spannungen von maximal 600 mV eintritt.^[1059] Die Wärmeentwicklung während der potentialinduzierten Porenbildung ist bei elektrochemischen Messungen oder Manipulationen ebenfalls zu berücksichtigen.^[1060] Die potentialabhängige Membranpermeabilisierung kann für eine Reihe wichtiger Membranmanipulationen verwendet werden. Exemplarisch sind hier die Anregung der Exocytose,^[1061] der Endocytose,^[1062] der Apoptose^[1063], der Einbau von Proteinen in die Membran^[1064, 1065], der Transport von Peptiden^[1066], Kohlenhydraten,^[1067] sowie von PNA^[1068], DNA^[1069-1072] und Wirkstoffen^[1073-1078] zu nennen.

Auch die durch den osmotischen Druck hervorgerufene Membranspannung führt zu einer Änderung der elektrischen Membrandichtigkeit.^[1079]

Untersuchungen zeigen, daß archaeale tBLM-Monoschichten auch bei Potentialen von über einem Volt keine merkliche Erniedrigung des elektrischen Widerstandes zeigen.^[1080]

Ein weiterer Effekt der durch elektrische Felder vermittelt wird, ist die durch ein elektrisches Feld induzierte Vesikelfusion.^[1081-1083] Mit Hilfe dieses Effekts lassen sich aus großen Liposomen natürlicher oder polymerisierbarer Lipide biomimetische Membranen präparieren.

Durch die Kombination der Elektrischen Impedanz-Tomographie (EIT) mit der Elektroporationsmethode ist es möglich gezielte Membranmanipulationen vorzunehmen und diese auch abzubilden.^[1084]

Stabilität von Membranen gegenüber Chemikalien: Die Stabilität der Membran gegenüber Chemikalien hängt stark von der Ladung und Amphiphilie ihrer Komponenten ab. Ein Testsystem das für Stabilitätstests verwendet wurde, setzt sich aus einem Alkylthiol-SAM mit einer proximalen 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin- (POPC) Membranhälfte zusammen. Gegenüber neutralen oder kationischen Detergenzien zeigt sich diese Membran am empfindlichsten. Als Vergleichsgröße wurde die Entfernung von 50% der Membran gewählt. Während die Konzentration für NaOH und anionische Detergenzien um den Faktor zwei empfindlicher ist, steigt die Empfindlichkeit der Membran gegenüber chemischen Einflüssen für Alkohole (Propanol) und Säuren (HCl) um den Faktor 10^3 bis 10^4 .^[1085]

Wesentlich größere Stabilität zeigen die in Kapitel 3.1 beschriebenen archaealen Membranen aus isoprenoiden Lipiden, die je nach Organismus auch Membranen aus transmembranen Tetraetherlipiden aufweisen, die auch bei hohen Temperaturen und kleinsten pH Werten stabil sind (s.o.).

Weiter treten Änderung der Membraneigenschaften auf, wenn sich die Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen in Abhängigkeit vom pH Wert des umgebenden Mediums ändert, die Membranlipide der Wechselwirkung mit amphipilen Lösungsmitteln ausgesetzt sind und wenn es bei hohen pH Werten zur Hydrolyse der Acylphospholipide kommt.

Ungesättigte Membranlipide wie sie beispielsweise in Ei-PC vorliegen sind zusätzlich empfindlich gegenüber atmosphärischen Sauerstoff und neigen zur Oxidation.^[294] Desweiteren erniedrigen sie durch eine Vergrößerung des Elastizitätsmoduls die Diffusionsbarriere von ungeladenen Verbindungen wie zum Beispiel Harnstoff.^[255]

Gezielte Permeabilisierung, zum Beispiel durch die Verwendung kationischer Lipide, sind biotechnologisch wichtige Prozesse für die Überwindung der Membranbarriere und den gezielten Transport von Verbindungen.^[1086] Dabei ist es wichtig die allgemeine Membranintegrität aufrechtzuerhalten.

3.3 Schlußfolgerungen & Definition neuer Membrankomponenten

Ansätze für verbesserte biomimetische Membranen und deren Komponenten – Schwerpunkt dieses Kapitels ist Diskussion der aus Kapitel 3.1 und 3.2 gezogenen Schlußfolgerungen für die Auswahl und Definition der geplanten Lipidmotive, Spacer, Immobilisationsmethoden und anzustrebenden Membranarchitekturen. Experimente die zur Definition der Strukturmotive für die Synthese neuer Lipidmotive durchgeführt wurden, aber noch nicht veröffentlicht wurden, sind ebenfalls in diesem Kapitel beschrieben.

3.3.1 Membrankonzept

Ein optimales Modell einer biomimetischen Membran zum Studium von Membranproteinen weist ein großes Maß an Stabilität, Variabilität, eine definierte Orientierung der Membrankomponenten bezüglich der Festkörperoberfläche und eine herausragende Anwendbarkeit oberflächenanalytischer Methoden auf. Funktionelle Studien statischer und dynamischer Membranwechselwirkungen/Prozesse mit definierter Zusammensetzung der Membrankomponenten unter kontrollierten Versuchsbedingungen sind mit tBLMs unter den oben genannten Kriterien möglich. Daher eröffnen tBLMs ein weites Feld an Einsatzmöglichkeiten und werden unter Berücksichtigung der definierten Ziele als geeignetes Membrankonzept für komplexe Funktionsstudien an Membranproteinen präferiert.

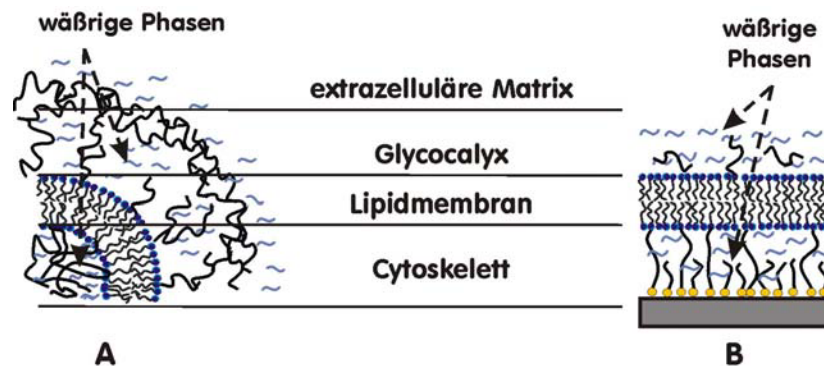


Abbildung 45 Die für die Entwicklung von neuen tBLMs wichtigen strukturellen Kompartimente - extrazelluläre Matrix (ECM)/Glycocalyx, Cytoplasmamembran und Cytosol/cytoskelett (A). Im Vergleich die ihnen entsprechenden Kompartimente der tBLM (B)

Das komplexe System der biologischen Membran und seiner angrenzenden Phasenräume kann zwar nicht an Hand der hier vorliegenden Literaturanalyse komplett beschrieben werden, es ergeben sich aber wichtige Hinweise auf Lipidmotive, Spacer- und Ankerkonzepte, die einen Zugang zu verbesserten biomimetischen Membranen im tBLM-Format erlauben.

Die Beschränkung auf die Eigenschaften, strukturellen Faktoren und Funktionen der Membrankomponenten selbst, und deren angrenzenden Kompartimente (Abbildung 45), stellt bereits eine Vereinfachung der komplexen zellulären Umgebung biologischer Membranen dar. Sie unterteilt die Zelle in die für die Cytoplasmamembran wichtigsten Wechselwirkungspartner und erlaubt die Analyse der wichtigsten Faktoren zum Aufbau biomimetischer Membranen. Die Variabilität der chemischen Zusammensetzung und der Membranarchitektur besitzt für die Mimese der biologischen Membran in einer artifiziellen Umgebung nur einen geringen Spielraum wenn die Membraneigenschaften auf höchstem - bioäquivalenten - Niveau gehalten werden sollen. Insbesondere wenn Modifikationen in der Schichtdicke und Fluidität auf Grund einer Anwendung für die Untersuchung von integralen Membranproteinen an deren geometrischen und funktionellen Vorgaben gebunden sind. Dazu müssen die biologischen Rahmenbedingungen architektonisch und funktionell adaptiert werden. Schlüsselpunkte sind hierbei:

- Die effektive und dynamische Wechselwirkung der einzelnen hydrophoben Molekülsegmente der Amphiphile untereinander – nur sie ermöglicht elektrisch dichte und fluide Membranen
- Die Präparation selbstheilender Membranen,^[1087, 1088] – dieser Gesichtspunkt ist sehr wichtig, um temporär auftretenden Membrandefekte ausheilen
- Die absolute Dicke des hydrophoben Membranbereichs – sie muß mit dem hydrophoben Membranabschnitt transmembraner Proteine kompatibel sein
- Die Bereitstellung eines polaren Submembranraumes der den funktionellen Einbau von transmembranen Proteinen mit submembranen Segmenten erlaubt ohne deren Funktion zu stören bzw. deren Struktur zu denaturieren und das funktionelle Studium von Transportproteinen erlaubt
- Chemische und physikalische Stabilität, sowie Langzeitstabilität der Membran

Im Hinblick auf diese Anforderungen können nun die natürlichen Membrankompartimente und ihre Komponenten analysiert werden:

3.3.2 Extrazelluläre Matrix/Glycocalix als stabilisierende Schichten oder Spacer für tBLMs

Zellwand, extrazelluläre Matrix und Glycocalyx wirken neben der Membran als zusätzliche Barriere und stabilisieren Cytoplasmamembranen von Ein- und Mehrzellern durch Peptidoglycane, Polysaccharid- und Proteinschichten, Lipopolysaccharide oder S-Layer. Daneben besitzen sie zusätzlich Signalcharakter beispielsweise für Zell-Zell-Wechselwirkungen.

Für Anwendungen ECM/Glycocalix analoger Elemente innerhalb des tBLM-Membrankonzepts ergeben sich zwei Ansätze. Erstens kann die chemische Zusammensetzung der ECM/Glycocalix als Grundlage neuer Spacermoleküle für die Entkopplung der Membran von der Festkörperoberfläche dienen. Zweitens könnten Oligo- oder Polysaccharide als proximale Schicht via Physisorption oder Insertion in die Membran via Lipo-Glycoconjugate die Membran stabilisieren.

Ein Verzicht auf die Verwendung von ECM/Glycocalix-analogen Verbindungen für die proximale Membranstabilisierung liegt in der beabsichtigten Funktionalisierung der Membran durch postkonstitutionellen Einbau von Membranproteinen. Dieser würde durch solche Modifizierungsstrategien erschwert oder unmöglich. Eine nachträgliche Funktionalisierung ist zwar möglich, die Notwendigkeit dafür aber auf Grund der bei *Thermoplasma acidophilum* beobachteten funktionellen Substitution der extrazellulären Matrix durch geeignete isoprenoide Membranlipidmotive nicht notwendigerweise gegeben.

Von hohem Interesse ist aber die Anwendung von ECM/Glycocalix-analogen Mimetika als polare Spacer. Zwei unterschiedliche Ansätze erscheinen hier für den Entwurf einer Folge hierarchischer tBLMs mit unterschiedlichem Entkopplungsabstand der Membran von der Festkörperoberfläche sinnvoll. Zum einen bieten Oligoethylenglykole (OEGs) die Möglichkeit einen Spacer mit geringem lateralen Platzbedarf und bekannter Biokompatibilität zu verwenden. Zum anderen sind Spacer auf Kohlenhydratbasis auf Grund ihrer biophysikalischen Eigenschaften von Interesse. Die Entscheidung welche Spacerchemie für welchen Bereich der Entkopplungsabstände sinnvoll ist, kann auf der Grundlage der Analyse der Spacereigenschaften getroffen werden.

Die Ermöglichung von thermodynamischer und mechanischer Stabilität ist eine der wichtigsten Eigenschaften makromolekularer Spacer. Die Voraussetzungen um diese Ziel zu erreichen,

können wie folgt definiert werden: 1. Zwischen Festkörperoberfläche und hydratisiertem Makromolekül muß es zu einer kompletten Benetzung kommen, sowie zwischen Membran und hydratisiertem Makromolekül.^[1087, 1089] 2. Die Wechselwirkung zwischen Membran und Festkörperoberfläche muß abstoßend sein, um ein Entnetzen zu vermeiden.^[53] 3. Nichtspezifische Kontakte durch van der Waals Wechselwirkung (wirksam bis zu 3 nm) zwischen Lipiden und der Festkörperoberfläche.^[53]

In erster Näherung erscheint die Variation des Abstandes zwischen Membran und Sensoroberfläche ein triviales Unterfangen. Ein Blick in die Literatur zeigt aber, daß dies nicht der Fall ist. Makromolekulare Spacermoleküle besitzen eine Reihe von herausfordernden Eigenschaften. Sie nehmen ab einer gewissen Kettenlänge geknäulte Konformationen ein die stark vom Lösungsmittel und der Temperatur abhängen, sie besitzen eine Molekulargewichts-/Kettenlängenverteilung, während die Wechselwirkungen zwischen den Ketten die Struktur und Stabilität des Polymerfilms bestimmen. Die Präparation von intakten Lipidmembranen auf der Grundlage lipidfunktionalisierter makromolekular Spacersysteme zeigt daher schon für Systeme mit weniger als 100 Repetiereinheiten, daß diese nur 40 % ihrer maximalen theoretischen Dicke erreichen. Als Beispiele seien Poly(ethylloxazoline) (n=50, 3-3.5 nm)^[854] und PEG2000 (n=45, 4,9 nm)^[1090] genannt.

Oligoethylenglykolen sind bekannt für ihre ausgezeichnete Hydrophilie. Aus diesem Grund wurden die Eigenschaften von Oligoethylenglykolen für die Ausbildung von Submembranräumen zwischen 0-3 nm untersucht. Es zeigt sich, daß schon innerhalb der Reihe der Oligoethylenglykole (2-10 Repetiereinheiten) Konformationseffekte zu stark unterschiedlichen Schichtdicken führen. Für die in der Literatur beschriebenen Tetraethylenglykol-Spacers kann auf Grund von FTIR-Messungen eine gestreckte hydrophile Kette angenommen werden, welche eine maximale Entkopplung der Membran von der Oberfläche ermöglicht. Andere Oligoethylenglycole, wie zum Beispiel Penta- bis Octaethylenglycol, nehmen eine 7/2 helikale Struktur ein, wobei die Octaethylenglycolstruktur leicht gestört ist, aber noch etwas helikale Konformation aufweist.^[1091] Diese Strukturen ergeben kleinere Entkopplungsabstände. Aus diesem Grund wird Tetraethylenglykol als niedermolekulare Spacervariante gewählt.

Von allen bekannten Systemen ist die Glycocalix der Zelle das effizienteste System um die oben erwähnten Funktionen zur Stabilisierung der Membran auszuführen. Die Kohlenhydrate der Glycocalix halten durch ihren relative hohen osmotischen Druck einen stabile Zell-Zellabstand zwischen 10-100 nm aufrecht.^[53] Zur gleichen Zeit erreichen sie eine hohe Stabilisierung innerhalb der Glycocalix durch kooperative Wasserstoffbrückenbindungen. Daher sind kohlenhydratmodifizierte Makromoleküle als geeignete Verbindungen zur Ausbildung von

tBLMs mit Entkopplungsabständen von mehr als 5 nm interessant. Theoretische Berechnungen unter Verwendung von CS Chem 3D Ultra (CambridgeSoft, Version 6.0) zeigt, daß zum Erzielen einer vertikalen Entkopplung von der Oberfläche von 6 nm ein Minimum von 12 β -1,4 verknüpften Monosacchariden notwendig ist. Da synthetischer Zugang zu Dodecasacchariden experimentell sehr aufwendig ist, wird die Alternative von kohlenhydratmodifizierten Makromolekülen in Betracht gezogen. Die gegenüber der natürlichen Kohlenhydratlokalisierung inverse Anordnung im Membranmodell (Definition des Spacer/Anker-Systems als plasmatisch – Vergleich siehe Abbildung 40) hat den Vorteil, daß die Kohlenhydratmotive nicht als Signalstrukturen auf der Modellmembranoberfläche zur Verfügung stehen.

3.3.3 Cytoplasmamembran – Lipidmotive für tBLMs

Biologische Membranen weisen eine nahezu unüberschaubare Zahl mehrerer tausend verschiedener Lipidspezies auf.^[173] Zum Aufbau funktioneller tBLMs müssen die Lipidmotive für eine Anbindung an Festkörperoberflächen eine Reihe verschiedener Eigenschaften aufweisen die am Ende von Kapitel 3.3.1 aufgeführt sind.

Nachfolgend werden die biologischen, chemischen und biophysikalischen Eigenschaften der einzelnen Lipidspezies zusammengefaßt um interessante Lipidmotive für den Aufbau von tBLMs zu definieren und ungeeignete Motive zu vermeiden

Phospholipide besitzen neben ihrer membranphysikalischen/strukturellen Funktion weitere biologische Funktionen. Es ist bekannt, daß Phospholipide (z.B. PE, PC, CI, PS und PG) Signalcharakter besitzen oder spezifisch mit Proteinen wechselwirken.^[1092, 1093] Sie selbst oder ihre Abbauprodukte sind häufig vorkommende Signal- oder Botenstoffe. Ihre Wirkung ist zwar membranproteinspezifisch und betrifft jeweils nur eine begrenzte Population von Proteinen, um eine breite Anwendbarkeit neuer tBLM zu gewährleisten sollen permanent auf der Trägeroberfläche immobilisierten Lipide keinen Signal- oder Botenstoffcharakter aufweisen. Auch die Hauptmembrankomponenten der Säugerzellen (PC - und PE – Lipide) sind in dieser Hinsicht nicht unbedenklich (Kapitel 3.1.2.3.3), vor allem, wenn das kleine submembrane Volumen betrachtet wird.

Daneben sind Verbindungen wie **Sphingolipide** und **Cholesterin**, die zur Ausbildung von Rafts neigen, keine optimalen Lipidmotive für die Modifikation mit einem oberflächenaktiven Anker (nur wenn diese Motive durch Mikrokontaktdruck (siehe Kapitel 5) in Form hydrophober Gitter^[876] gedruckt werden, können sie als Gitterränder stabilisierend auf die Membran wirken ohne die freien Lipide in der Mitte der freien Gitterfläche zu immobilisieren).

Wenn möglich sollten Lipidmotive immobilisiert werden die eine fluide Membran vermitteln. Die Ausbildung von Rafts kann durch laterale Verdünnung mit den entsprechenden freien Lipiden eingestellt werden.

Zur dichteren Packung der Membran kann Cholesterin eingesetzt werden. Allerdings besteht die Gefahr unerwünschter Nebeneffekte durch die in Kapitel 3.1.2.4.4 beschriebene Ausbildung von Lipidsupergitterstrukturen.

Lipidmischungen z.B. **EiPC** und **SojaPC** sind aus dreifacher Hinsicht problematisch: 1) Die enthaltenen ungesättigten Lipide sind oxidationsempfindlich (Alterung!). 2) Die Arbeit mit komplexen Lipidgemischen erschwert die Verifikation von chemischen Veränderungen einzelner Lipidkomponenten. 3) Durch Hydrolyse entstandenes LysoPC kann die Membran destabilisieren.

Alkyletherlipide weisen im Vergleich zu anderen Lipiden eine sehr geringe Diffusionskonstante auf. Dadurch wird die Zahl und Lebensdauer temporärer Poren erhöht und der Membranwiderstand erniedrigt.^[1094]

Oligoacyllipide: LPS/Lipid A erhöhen die Stabilität und Lebensdauer der bakteriellen Membran bei gleichzeitiger Erniedrigung der Permeabilität (im Unterschied zu den Alkyletherlipiden). Über die membranbildenden Eigenschaften von Oligoacyllipiden und deren biophysikalischen Eigenschaften ist vergleichsweise wenig bekannt. Für Cardiolipin ist beschreiben, daß es keine Lipiddoppelschichten^[294] formt.

Der große Einfluß des Lipids A auf diese beeindruckenden Eigenschaften machen Oligoacyllipide, insbesondere solche mit „Kohlenhydrat“ als Glycerinersatz, auch für tBLMs interessant. Auch wenn das komplexe LPS mit $3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ im Gegensatz zu gewöhnlichen Phospholipiden mit $1-10 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ eine sehr kleine Diffusionskonstante besitzt, so bietet sich die Reduktion der LPS-Struktur auf ein nichtphosphathaltiges Lipid A-Analogon an. Reduziert man das Lipid A - Motiv zusätzlich, indem die Anzahl der Oligoacylketten tragenden Kohlenhydrate auf ein Monosaccharid reduziert wird, sollten Lipide mit interessanten Eigenschaften zugänglich sein.

Im Gegensatz zu den gesättigten oder ungesättigten Diacylphospholipiden, den Hauptkomponenten der Protocyten und Eucyten,^[9] weisen archaeale Lipide sehr deutliche strukturelle, und physikalisch-chemische Unterschiede auf. **Terpenoide Lipide**, die sich von 2,3-Di-*O*-phytyl-*sn*-glycerin ableiten besitzen auf Grund ihrer Fähigkeit unter extremen Bedingungen intakte Membranen zu bilden gute Voraussetzungen für den Aufbau von tBLMs. Da die geplante Anwendung von planaren Goldoberflächen als Trägermaterial und die auf wenige Nanometer eingeschränkte Flexibilität der Cytoskelettanaloge entlang der z-

Koordinaten (senkrecht zur Oberfläche) der Membran extreme Stabilität abverlangen, sind Membranen extremophiler Organismen wichtige Vorbilder für neue Strukturelemente.

Daß die Terminologie „extreme Bedingungen“ für Modellmembranen angebracht ist wird an Hand mehrerer Punkten deutlich. Vergleicht man die Oberfläche des Substrats die von der Meßzelle begrenzt wird mit der Membranoberfläche von Organismen, so wird deutlich, daß die tBLM eine sehr große Oberfläche defektfrei bedecken muß (siehe Kapitel 3.2.3). Weiter sind die in biologischen Zellmembranen möglichen Undulationen von mehreren Mikrometern bei tBLMs besonders bei hoher Ankerdichte nicht möglich. Zusätzlich besitzt das Material der Träger unter Umständen eine Morphologie und chemisch/physikalische Oberflächeneigenschaften die auf die Membran störende Einflüsse ausüben können (siehe Kapitel 3.2.3.1). Membranen die große Stabilität mit großer Fluidität und elektrischer Dichtigkeit verbinden sollten unter diesen Rahmenbedingungen die besten Voraussetzungen für qualitativ hochwertige biomimetische Membranen besitzen.

Isoprenoide Etherlipide aus der Klasse der Phytanderivate weisen diese Eigenschaften auf. Ihre Etherverknüpfungen zwischen den Phytanylresten und Glycerin sorgen für eine große chemische Stabilität gegen Hydrolyse bei hohen Temperaturen und über einen großen pH Bereich. Das ungewöhnliche 2,3-Di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerin-Motiv verhindert den Abbau der Lipide durch Phospholipasen. Durch die Sättigung der terpenoiden Ketten sind diese vor Oxidation geschützt. Ein Vorteil für praktische Anwendungen bei denen tBLMs Luftsauerstoff und UV-Strahlung ausgesetzt sind. Kettenverzweigungen verhindern die kristalline Packung der Lipide und stellen sicher, daß sich die Lipide über den ganzen physiologischen Temperaturbereich im flüssigkristallinen Zustand befinden. Messungen an Liposomen zeigen, daß sie eine außergewöhnliche elektrische Dichtigkeit besitzen (Kapitel 3.1.2.3.2). Zusammen mit einer extremen Stabilität bei hohen Temperaturen erfüllen sie die oben definierten Anforderungen an tBLM-Lipide.

Aus Gesichtspunkten der Vesikelfusion scheint es vorteilhaft, daß Diphytanoylphospholipide einen für die Vesikelfusion auf hydrophoben Oberflächen wichtigen Phasenübergang (rhomboedrische Phase) der Übergangsstruktur zwischen der lamellaren (L_{α}) und der invertierten hexagonalen (H_{II}) Phasen aufweisen (Kapitel 3.1.2.4.4 und 3.1.2.4.7).

Signalfunktionen erster Ordnung sind für Phytan oder der vom Phytanylrest ableitbaren Stoffwechselprodukte nicht bekannt. Bekannt ist, daß auf Grund von Stoffwechselstörungen, z.B. dem sogenannten *Refsum Syndrom*, eine Akkumulation und Ablagerung von Phytansäure in Blut und den Geweben auftreten kann, die zu schweren neurologischen Schäden führt.^[1095]

Die Verwendung von isoprenoiden Etherlipiden sollte die Möglichkeit der Freisetzung von Lipidgruppen praktisch ausschließen. Zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Wechselwirkung zwischen Protein und Lipid minimiert, wenn mit

nichtarchaealen Proteinen gearbeitet wird. Es ist bekannt, daß durch die Substitution von Phytanylketten gegen Alkylketten eine strukturelle Störung von archaealen Bakteriorhodopsin hervorgerufen wird.^[1096] Die Notwendigkeit bestimmter Lipide für die Proteinstruktur wird somit auch für Extremophile bestätigt.

Zum Aufbau von tBLM-Membranen ist es sinnvoll zuerst reine Spacer/Anker-modifizierte Lipide zu assemblieren um Oberflächen zu erhalten, die stark hydrophob sind und eine effiziente Vesikelfusion erlauben. Da Oberflächen mit mittleren Oberflächenenergien oft nur zur Adsorption von Vesikel führen ist die Präparation gemischter Schichten aus polarem Spacer mit Ankergruppe und Lipid-Spacer-Anker-Konjugaten erst für weiterführende Versuche nach erfolgreicher Etablierung eines reinen Lipid-Spacer-Anker-Modellsystems sinnvoll.

Aus der Vielzahl der in der Natur vorkommenden Lipide bzw. artifiziellen amphiphilen Verbindungen besitzen drei Verbindungsklassen Eigenschaften, die sie für einen Einsatz als festkörperverankerte Lipide interessant machen. Ein weiterer Gesichtspunkt für die Wahl der verwendeten Lipidmotive stellt der Neuheitsgrad der verwendeten Lipide dar. Lipidmotive die noch nicht im Hinblick auf ihr Potential zum Aufbau von tBLMs untersucht wurden, aber interessante Strukturelemente aufweisen, sind potentiell interessante Kandidaten. Die folgenden natürlichen Membranlipide dienen als Vorbild für die Auswahl der neuen Lipidmotive für Membranmodelle:

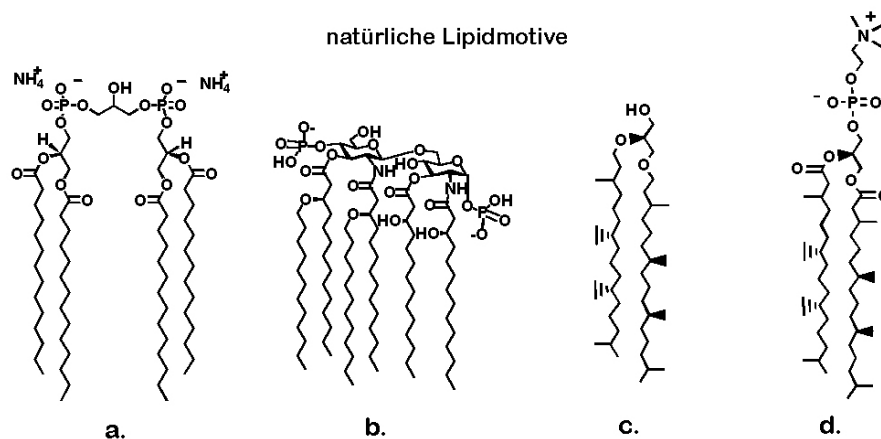


Abbildung 46 Interessante natürliche Lipidmotive zum Aufbau von tBLMs. A) Cardiolipin, B) Lipid A, C) 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin und D) 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerophosphatidylcholin

Die Auswahl fällt auf zwei natürliche Lipidanaloga und komplett artifizielles Lipid:

1) *Archaeale Lipide* (Etherlipide) – Hinsichtlich der Fluidität, die mit der Phasenumwandlungstemperatur korreliert ist, ergibt sich folgende Reihe zunehmender Fluidität in Abhängigkeit von der hydrophoben Kette (siehe Kapitel 3.1.2): Alkylether-Lipide < Acyl-Lipide < trans-Doppelbindungen-Acyllipide < cis-Doppelbindungen-Acyllipide < Phytanoyllipide < Phytanyllipide. Phytanylderivate sind aus Gründen der Fluidität vorteilhaft. Von den isoprenoïden Lipiden c) und d) in Abbildung 46 besitzt c) das größte Potential für eine Anwendung als oberflächenimmobilisierte Komponente perfekter tBLMs.

c) besitzt gegenüber d) den Vorteil, daß es bei einer Etherverknüpfung mit dem ankermodifizierten Spacer keine stark polare oder geladene Kopfgruppe aufweist, die eine höhere Ionenleitfähigkeit besitzt (siehe Kapitel 3.1.2.3.2). Aus Gründen der Geometrie und der Kompaktierung der Membran sind DiPhytPC und DiPhytPC/Cholesterin für den mobilen Teil der Lipide geeignete Lipidkomponenten. Die für isoprenoïde Lipide beschriebenen Diffusionskonstanten sind mit den für Säugerzellmembranen Werten vergleichbar. Die äußerst niedrigen Phasenumwandlungstemperaturen (kleiner – 50 °C für DPhyPC) lassen auf ein vergleichsweise homogenes Fluiditätsverhalten innerhalb aller physiologischen Temperaturen schließen. Der Schwerpunkt der neuen Lipidsynthesen liegt daher auf Diphytanyllipiden mit Etherverknüpfung zu polaren Spacern.

2) *Oligoacyllipide* – Obwohl Acyllipide chemisch und enzymatische labiler sind als Etherlipide, sind Cardiolipin- (Abbildung 46, a) und LPS-Derivate (Abbildung 46, b) aus folgenden Gründen interessant:

- Beide stabilisieren die biologische Membran in hohem Maße
- Der Einfluß der Lipidgrundmotive auf die Membranfluidität ist nicht oder nur wenig bekannt (es liegen keine Daten für nichtphosphorylierte Oligoacyllipide vor!)
- Die Oligoacylstruktur macht zwar Clustereffekte möglich, deren Variation durch die Minimierung der Kopfgruppenladung könnte aber zu interessanten Lipideigenschaften führen

Daher ist ein Oligoacylsystem bestehend aus mittellangen Acylketten und einer polaren, polyfunktionellen Kopfgruppe ohne Phosphatgruppen als Modellverbindung für diese Substanzklasse von Interesse. Da die im Rahmen dieser Arbeit in Betracht gezogene und synthetisierte Modellverbindung 1,2,3,4-Tetra-O-myristoyl- β -D-glucose (TMG) auf Grund

unzureichender biophysikalischer Daten nicht zum Aufbau von tBLMs angewandt und publiziert wurde, sollen hier deren wesentlichen Eigenschaften kurz beschrieben werden:

Die modifizierte Lipidstruktur, die man sich vom nichtreduzierenden Ende des Lipid A abgeleitet vorstellen kann, besitzt analog dieses Restes vier hydrophobe Ketten, siehe Abbildung 47. Die gezeigte 1,2,3,4-Tetra-O-myristoyl- β -D-glucose (TMG) weist im Gegensatz zu Lipid A einige wichtige Unterschiede auf, welche die Wahrscheinlichkeit einer cytotoxischen Wirkung minimieren sollten:

TMG besitzt keine Phosphatgruppen (keine negative Ladung – diese spielt bei der selektiven Erkennung der Membranen gramnegativer Bakterien durch endogene antibakterielle peptide wie CAP 18 eine Rolle)^[1097]

Es trägt nur ein Monosaccharid (nichtreduzierendes End, GlucN-II-Analogon des Lipid-A-Motivs)

das Lipidsubstitutionsmuster ist modifiziert, TMG trägt zwar ebenfalls vier hydrophobe Gruppen (im Fall von TMG Myristoylgruppen), Lipid A trägt am nichtreduzierenden Zucker 2 acylierte 3-Hydroxyfettsäureketten (3-Hydroxy-myristoylketten mit Lauroylketten acyliert)

die Orientierung und Präsentation der hydrophoben Gruppen ist durch das veränderte Substitutionsmuster nichtmehr vergleichbar. Neue biophysikalische Eigenschaften des TMG sind zu erwarten.

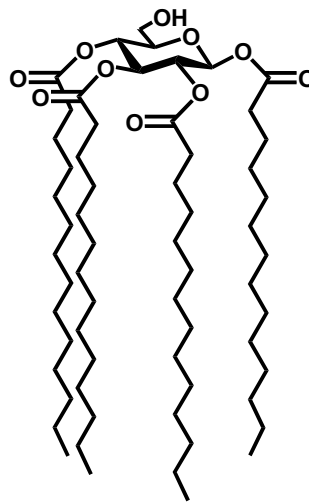


Abbildung 47 1,2,3,4-Tetra-O.myristoyl- β -D-glucose (TMG)

Um das Potential von TMG bezüglich einer Anwendung als spacermodifiziertes immobilisiertes tBLM-Lipid zur Anbindung an Sensoroberflächen zu untersuchen, werden folgende Eigenschaften untersucht:

- Das Verhalten von TMG an der Wasser-Luft-Grenzfläche (Orientierung an der Grenzfläche, Phasenverhalten und Stabilität)
- Die Fluidität (Diffusionskonstante D) von TMG haltigen Membranen mit Hilfe lateral strukturierter Membranen
- Die Phasenübergangstemperatur von TMG

Verhalten von TMG an der Wasser-Luft-Grenzfläche

Die biologische Relevanz von Monoschichtexperimenten an der Wasser-Luft-Grenzfläche für das Verhalten der Lipide in einer Lipidmembran ist durch das allgemein anerkannte Prinzip der Äquivalenz der Phasen gegeben.^[1098, 1099]

Aus den LB-Daten lassen sich Schlußfolgerungen über das Verhalten in lateral verdünnten und kompakten Molekülschichten ableiten. Wichtige Einflußgrößen für das Verhalten an der Wasser-Luft-Grenzfläche sind die auf Grund des Kopf- zu Schwanzgruppen Verhältnisses zu erwartende spontane Krümmungstendenz der Membran und der nicht durch Spacermoleküle besetzte Anteil des Submembranraums. Außerdem sind die Verteilung polarer Reste und eventuell vorhandene Ladungen für die Orientierung und die Wechselwirkung mit der Grenzfläche entscheidend. Die Zusammensetzung der wäßrigen Phase hat ebenfalls einen bedeutenden Einfluß. Neben reinem Wasser können Salze zugesetzt und Mischungen mit anderen Lösungsmitteln verwendet werden. Auch der Einsatz reiner organischer Lösungsmittel ist möglich.

Die in der Literatur beschriebenen Beispiele zeigen, daß die Ausbildung stabiler LB-Filme schwierig bis unmöglich ist, wenn nur Hydroxylgruppen als Bestandteil des polaren Lipidkopfes vorhanden sind.^[816, 1100] Das extrem asymmetrische Verhältnis zwischen der Fläche der polaren Kopfgruppe (eine Hydroxylgruppe) und dem hydrophoben Molekülteil (vier Myristoylgruppen) von TMG läßt interessante Eigenschaften der Monoschicht erwarten.

Um detailliertere Informationen über die Monoschichtausbildung, deren Stabilität und Morphologie zu erhalten, werden verschiedene Messungen durchgeführt. Temperaturabhängige Messungen der Druck-Flächen-Isothermen erlauben es Phasenübergänge zuzuordnen, da bei niedrigen Temperaturen oft der Phasenübergang von der gasanalogen Phase zur festanalogen Phase isoliert, das heißt unter Wegfall der anderen Phasenübergänge, beobachtet werden kann.^[1100] Die folgende Abbildung 48 zeigt die bei verschiedenen Temperaturen aufgenommenen Druck-Flächen-Isothermen:

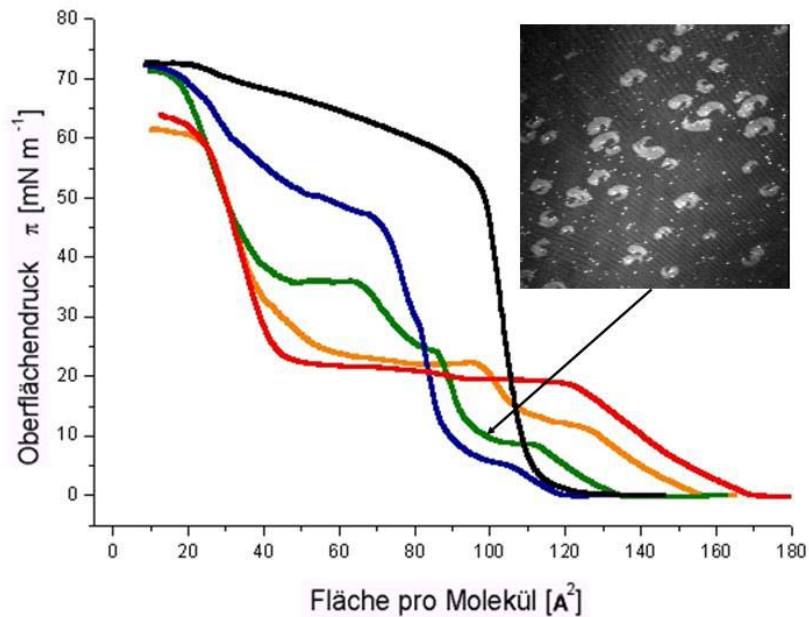


Abbildung 48 Druck-Flächen-Isothermen der TetraMyrGluc aufgenommen bei verschiedenen Temperaturen: rot = 35 °C, orange = 30 °C, grün = 27,5 °C, blau = 25 °C und schwarz = 15,5 °C. Der Bildausschnitt zeigt eine Brewstermikroskopaufnahme der 27,5°C Isotherme bei 10 mNm⁻¹.

TMG zeigt ein stark temperaturabhängiges Verhalten und die Ausbildung chirales Aggregate an der Wasser-Luft-Grenzfläche (Abbildung 48). Das Verhalten eines Amphiphils an der Wasser-Luft-Grenzfläche kann als zweidimensionales Analogon zum Phasendiagramm eines dreidimensionalen Gases betrachtet werden. Ein submonomolekularer Film eines Amphiphils wird dabei durch Barrieren auf einem LB-Trog komprimiert, wodurch sich die für das einzelne Molekül zur Verfügung stehende Fläche reduziert. Dies hat zur Folge, daß die Wechselwirkung zwischen den Amphiphilen erhöht und Phasenzustände durchlaufen werden, die den flüssig- und festanaloge Zuständen eines idealen Gases ähneln. Solche Druck-Flächen-Isothermen sind in Abbildung 48 dargestellt. Wie beschrieben kann unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur (siehe unten) das Verschwinden der Phasenübergänge zwischen der gasanalogen Phase und der festanalogen Phase beobachtet werden (schwarze Kurve bei 15,5 °C). Bei 15,5 °C ist somit nur noch der Übergang von der gas- zur festanalogen Phase auf Grund der fehlenden Kettenmobilität zu beobachten. Verlängert man die Isotherme um den Wendepunkt, so daß die Abszisse geschnitten wird, erhält man als Näherung die limitierende Fläche des freien Moleküls im Gaszustand^[1101] von 110 Å² pro Molekül bei 15,5 °C. Der Kurvenverlauf bei 20 °C (nicht gezeigt) entspricht dem Verlauf der bei 15,5°C gemessenen Isothermen. Die bei steigender Temperatur zunehmenden molekularen Flächen zu Beginn der Druck-Flächen-Isothermen lassen sich durch die größere laterale Beweglichkeit

und eine aufgefächerte Anordnung der Acylketten bei höherer Temperatur erklären. Im Vergleich der molekularen Flächen der auf 0 mN m^{-1} extrapolierten Isothermen des Übergangs der flüssig- zur festanaloger Phase bei $T = 27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ und $T = 15,5 \text{ }^\circ\text{C}$. stellt man nur einen geringen Unterschied von 100 \AA^2 gegenüber 110 \AA^2 fest. Bei $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ scheint eine dichter Packung der Acylketten stattzufinden wenn man eine Fläche von etwa 20 pro Acylkette zugrunde legt. Da die geometrische Mindestfläche bei allen Druck-Flächen-Isothermen, die bei Temperaturen mit erkennbarer Kettenmobilität gemessenen werden (oberhalb von $20 \text{ }^\circ\text{C}$), bei Oberflächendrucken um etwa 25 mN m^{-1} oder darunter liegen, ist die Analyse bis zu einem Maximaldruck von 25 mN m^{-1} ausreichend. Dieser Druck entspricht dem charakteristischen Oberflächendruck des Monoschichtanteils einer Lipiddoppelschicht (Membran).^[1102] Interessanterweise kann mit zunehmender Kettenmobilität (Temperaturen von 30°C und $35 \text{ }^\circ\text{C}$) das Verschwinden des Phasenübergangs beobachtet werden der mit der Bildung der Monoschicht in Verbindung gebracht werden sollte. Der vormalige Monoschichtphasenübergang löst sich förmlich auf und es kommt zu einer Ausbildung eines breiten Plateaus, das bei einer molekularen TMG-Fläche die einer Doppelschicht entsprechen könnte einen Phasenübergang zeigt.

Eine Methode die Stabilität einer Monoschicht zu überprüfen, ist die isoperimetrische Bestimmung der zeitlichen Änderung des Oberflächendrucks bei konstanter Barrierenposition. Hält man also die Fläche der Monoschicht konstant, sollte sich der Oberflächendruck nicht mit der Zeit ändern ($t \sim 15 - 60 \text{ min}$). Solche Messungen wurden auch vereinzelt bei den oben beschriebenen Druck-Flächen-Isothermen durchgeführt und zeigten keine Druckschwankungen. Auch isobare Messungen um den Kollapsunkt bei 25°C zeigen nach 20 Minuten keine außerhalb der Meßgenauigkeit von $\pm 0,1 - 0,2 \text{ mN m}^{-1}$ liegende Flächenabnahme, so daß die molekulare Lipidschicht als stabil betrachtet werden kann.

Die bei verschiedenen Temperaturen aufgezeichneten Druck-Flächen-Isothermen zeichnen sich nicht in allen Abschnitten durch ein monotones Steigungsverhalten der Isothermenabschnitte aus. Somit können nichtlinear ablaufende Kondensationseffekte nicht ausgeschlossen werden.^[1103] Daraus folgt, daß TMG dichtere Struktur- oder Packungsänderung beim Übergang von losen zu dicht gepackten Aggregaten eingeht.^[1103]

Druck-Flächen-Isothermen können zwar Indizien für das Vorliegen spezieller Oberflächenstrukturen zeigen, die zugrundeliegenden Einflüsse dieser Effekte sind aber nicht immer eindeutig. Daher werden die erhaltenen Daten mit den Daten komplementärer Methoden wie der Brewsterwinkelmikroskopie (BAM – Brewster angle microscopy) ergänzt. Ein Effekt, der mit Hilfe der Isothermen allein nicht hinreichend beschrieben werden kann, ist das

Auftreten eines nicht horizontalen Plateaus für den Phasenübergang, das bevorzugt bei großer Aggregationszahl auftritt.^[1103] Dieses Phänomen kann auch hier teilweise beobachtet werden. Eine Änderung der Isothermensteigung ist auf Kondensationseffekte in den Aggregaten zurückzuführen, wenn die Fläche pro Molekül innerhalb der Aggregate größer oder kleiner ist als die der Moleküle außerhalb.^[1103] Der zuletzt genannte Effekt läßt sich in Abbildung 48 erkennen, wodurch auf ein „nicht ideales“ Verhalten innerhalb des Aggregats - mit Komprimierungseffekten - geschlossen werden kann. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß diese Interpretation nicht nur auf einem Effekt allein beruhen muß. Aus diesem Grund werden die LB-Filme bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Oberflächendrucks Π gemessen und zusammen mit den parallel aufgezeichneten Brewsterwinkelmikroskopaufnahmen analysiert.^[1104] (Die Messungen konnten dankenswerter Weise während eines kurzen Gastaufenthalts am Weizmann Institut, Rehovot, Israel und an der Ben Gurion University of the Negev, Israel bei Prof. A. Berman durchgeführt werden.)

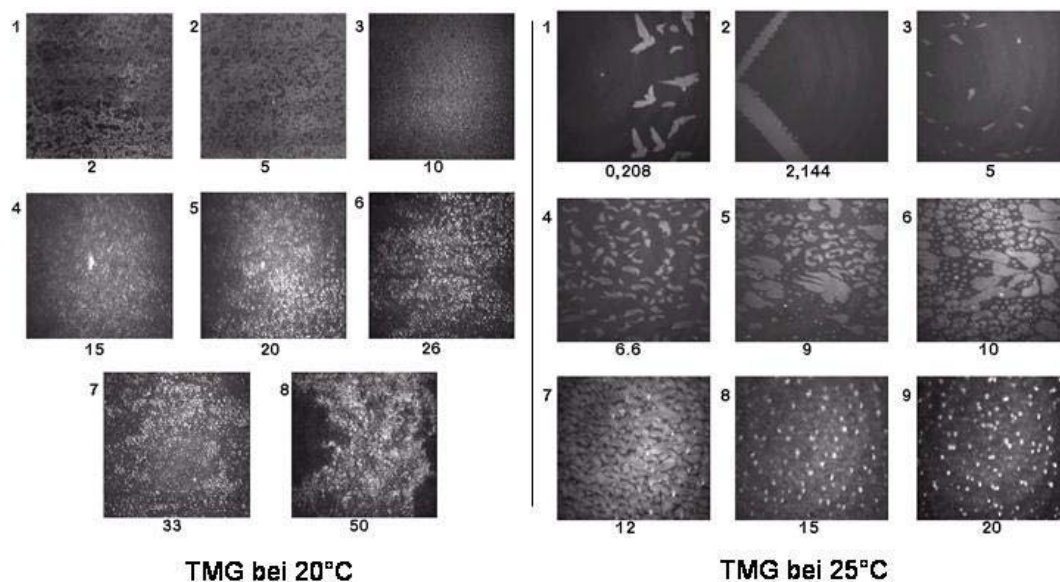


Abbildung 49 BAM-Messungen von TMG-Monoschichten bei 20 °C und 25 °C. Links oben ist die Bildnummer angegeben, unter dem Bild der jeweilige Druck in mN m^{-1} .

BAM-Messungen zeigen das auf Grund des Isothermenverlaufs vermutete Aggregationsverhalten deutlich. Bei 20 °C ist auf Grund mangelnder Fluidität der Ketten keine definierte Strukturbildung oder die Ausbildung einer homogenen Monoschicht zu erkennen. Demgegenüber zeigen BAM-Messungen erstmalig das Auftreten großflächiger, homogener Aggregate und den Beginn chiraler Muster.

Das Auftreten chiraler Muster durch Synkinese (Synthese von nichtkovalenten „Verbindungen“)^[1009] ab einem Oberflächendruck von etwa 6 mN m^{-1} (eingblendetes Bild in Abbildung 48, Abbildung 49 und besonders Abbildung 50) kann als Übergang zwischen gasanaloger und flüssig-expandierten Phase betrachtet werden. Hierbei handelt es sich aber weniger um isolierte Amphiphile als gasanaloge Teilchen, sondern um makroskopische Dünnschichtaggregate. Die bei steigendem Lateraldruck deutlicher hervortretenden chiralen Aggregate (eingblendetes Bild in Abbildung 48, Abbildung 50) zeigen einen gegen den Uhrzeigersinn gerichteten, spiralförmigen Drehsinn. Der Übergang von der flüssig-expandierten Phase zur flüssig-kondensierten Phase ist in den Bildern 7-9 zu beobachten.

Chirale, synkinetische TMG-Strukturen treten bei Temperaturen oberhalb von 20°C und unterhalb von 30°C bei Oberflächendrücken zwischen etwa 9 und 13 mNm^{-1} auf. Bei Raumtemperatur scheint also eine teilweise Kettenbeweglichkeit, bzw. Kopfgruppenerkennung aufzutreten. Der Phasenübergang zum flüssig-kondensierten Zustand kann ab 13 mN m^{-1} unter dem Verschwinden der chiralen Muster beobachtet werden.

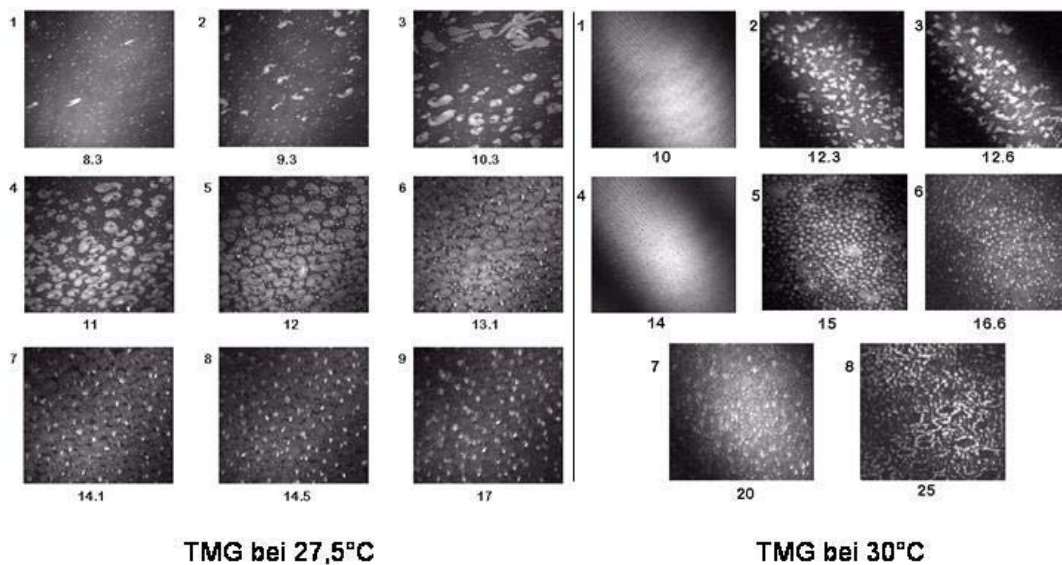


Abbildung 50 BAM-Messungen von TMG-Monoschichten bei $27,5^\circ\text{C}$ und 30°C . Links oben ist die Bildnummer angegeben, unter dem Bild der jeweilige Druck in mN m^{-1} .

Spiralförmige Strukturen sind in der Literatur beispielsweise für das Glykolipid *N*-Dodecyl-L-mannonamid und *N*-Dodecyl-D-mannonamid beschrieben. *N*-Dodecyl-L-mannonamid zeigt bei $0,5 \text{ mN M}^{-1}$ spiralförmige bis dendritische Strukturen, mit gegen den Uhrzeigersinn gerichteten Drehsinn, während der Drehsinn der beobachtbaren Strukturen bei *N*-Dodecyl-D-mannonamid dem Uhrzeigersinn folgt. Mischungen beider Enantiomere zeigten dendritische und

spiralförmigen Strukturen beider Drehrichtungen.^[1105] Die in den Versuche mit TMG beobachteten Strukturen weisen alle Spiralen mit einem entgegen dem Uhrzeigersinn gerichteten Drehsinn auf. Durch das Auftreten chiraler Strukturen mit nur einer Drehrichtung, kann auf die Reinheit des D-Glucosederivats TetraMyrGluc geschlossen werden.

Bestimmung der Diffusionskonstanter gemischter TMG-Membranen mit Hilfe elektrophoretischer Methoden lateral strukturierter Membranen

Zur Bestimmung des Einflusses von TMG auf die Membranfluidität wurde eine neue Methode angewandt, die von Jennifer Hovis im Arbeitskreis von Prof. S. Boxer, Stanford, USA entwickelt wurde.^[1106-1111] Sie beruht auf der strukturierten Entfernung eines Teils der Lipiddoppelschicht mit einem PDMS-Stempel, anschließender elektrophoretischer Trennung der unterschiedlich geladenen Lipidspezies und deren anschließenden passiven Vermischung bei abgeschaltetem Feld. Die Diffusionskonstante wird durch die zeitliche Änderung des durch die Elektrophorese erzeugten Fluoreszenzgradienten ermittelt. Durch das Prägen der Membran mit dem Stempel wird ein Teil der Membran entfernt, und es verbleibt ein lipidfreies Areal zurück. Kann sich die zurückbleibende Membran auf beiden Seiten der Membran auf 106 % ausdehnen^[1111] ohne daß die Lipidareale die durch das Prägen (Entfernen der Lipiddoppelschicht) geformt wurden wieder verschmelzen, ist die Bildung stabiler strukturierter Membranen möglich.

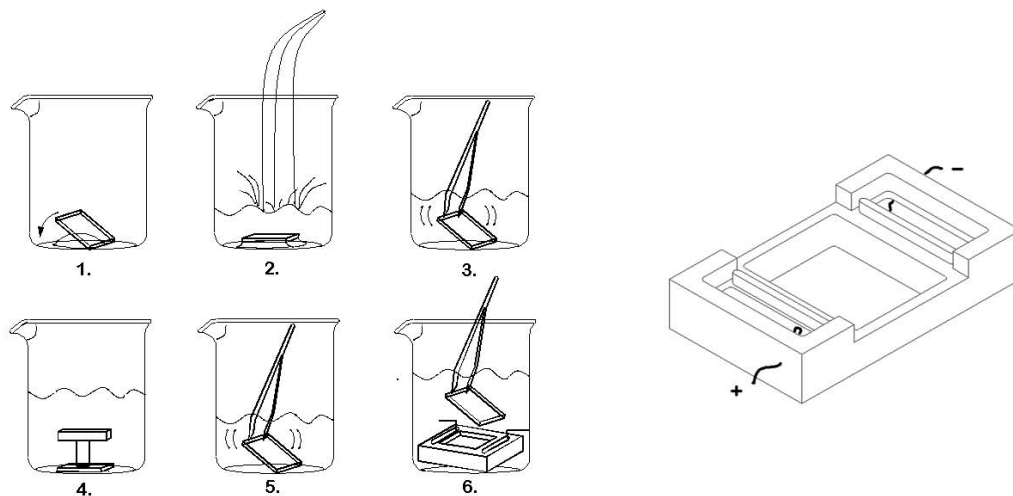


Abbildung 51 Präparation der lateral strukturierten Membran durch Prägen mit Hilfe eines PDMS-Stempels. Die linke Bilderserie zeigt den Herstellungsprozess, die rechts Abbildung zeigt die Meßzelle.

Zur Präparation der strukturierten Membranen werden Mischungen von 94 % bzw. 49 % Eigelb-Lecithin-Lipidmischung (Eigelb PC) mit 5% bzw. 50 % TMG und 1 % TexasRed-funktionalisierten Lipid (DMPE) untersucht. Mischungen mit 50 % TMG ließen sich allerdings nicht vollständig solubilisieren, so daß dieser Wert auf Grund unzureichender Genauigkeit nicht aufgeführt wird. Die Lipide werden in Chloroform gelöst und anschließend getrocknet, in PBS-Puffer hydratisiert und durch Extrusion Vesikel präpariert. Die frisch präparierten Vesikel werden zur Präparation einer Lipiddoppelschicht auf einem hydrophilen Objektglas fusioniert.^[1106-1111] Anschließend wird der Träger unter Wasser mit einem PDMS-Stempel (mit einer Gitterstruktur versehen: 20 µm Stege, 200 µm Abstand im quadratischen Design) strukturiert (Abbildung 51). Dies geschieht durch die Adsorption/Übertragung von Lipidmaterial auf den PDMS-Stempel. Durch das Anlegen einer Spannung von 11 V cm⁻¹ werden die Lipide elektrophoretisch getrennt und anschließend ihr dynamisches Verhalten, d.h. die erneute homogene Verteilung durch Diffusion quantitativ untersucht.

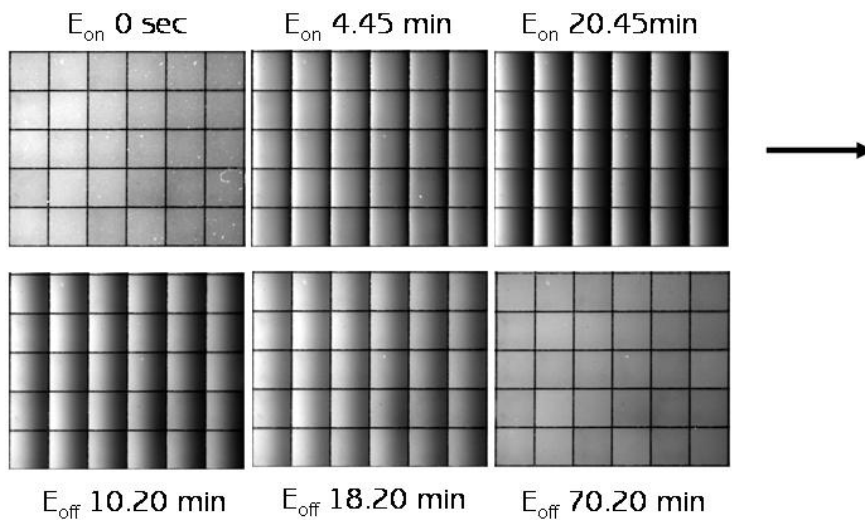


Abbildung 52 Elektrophoretische Trennung der Membranlipide – das fluoreszente, mehrfach negativ geladene TexasRed wandert nach links, zur Anode: Obere Abbildungen zeigen die Wanderung von TexasRed zur Anode bei eingeschaltetem elektrischen Feld. Untere Abbildung – Vermischung der Lipide bei abgeschaltetem elektrischen Feld

Die strukturierte Membran wird nach dem Einbau in die Elektroforeszelle unter ein Epifluoreszenzmikroskop gebracht und das Potential angelegt. Zu Beginn der Messung bei $t = 0$ sec ist für das System 95 % Eigelb PC, 5% TetraMyrGluc und 1 % TexasRed-DMPE eine quadratisch strukturierte Membran zu erkennen, deren schwarze Gitterlinien die lipidfreien

Bereiche markieren. Die Membran ist zu diesem Zeitpunkt uneinheitlich und durch anhaftende Lipidreste und Vesikel lokal mit einer erhöhten Fluoreszenzsondenkonzentration versehen. Schon kurz nach dem Anlegen des Potentials sind innerhalb weniger Minuten kaum noch einzelne fluoreszierende Partikel zu erkennen (Abbildung 52, Bild links oben).

Diffusionskoeffizienten die mit dieser Methode bestimmt wurden sind für EggPC mit $4,6 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ (15-25 V cm^{-1} 1% Texas Red DHPE in Egg PC)^[1112] angegeben, in guter Übereinstimmung mit Werten von FRAP-Messungen liegen ($4,4 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$)^[1113]. Membranen mit der Zusammensetzung 95 % Eigelb PC, 5% TetraMyrGluc und 1 % TexasRed-DMPE zeigen eine deutlich verminderte Fluidität von $0,66 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$.

Für den Gebrauch von Lipiden mit Fluoreszenzsonden sollte berücksichtigt werden, daß Fluoreszenzsonden schon im Konzentrationsbereich von 1% die Membraneigenschaften in unbekannter Weise ändern.^[1114]

Phasenumwandlungstemperatur von TMG

Die graduelle Zunahme der Kettenbeweglichkeit und das Erstarren des Moleküls korrelieren gut mit der mittels Differentialkalorimetrie - DSC (*engl. differential scanning calorimetric*) bestimmten Phasenübergangstemperatur der TetrytMyrGluc von $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (in Substanz gemessen). Diese Temperaturzusammenhang steht in gutem Einklang mit den temperaturabhängigen Druck-Flächenisothermen/Brewsterwinkelmikroskop Experimenten. Die Phasenübergangstemperatur von $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ist mit der von Cardiolipin (C14) mit Ammoniumionen als Gegenionen vergleichbar ist ($39,8 \text{ }^\circ\text{C}$). Die Phasenübergangstemperatur scheint hier von dem Vorhandensein ionischer Gruppen wenig beeinflusst zu sein und wird in erster Linie durch die Anzahl und Kettenlänge der Acylketten bestimmt

Schlussfolgerung: TMG zeigt auch eine Tendenz zur Aggregation, induziert eine signifikante Reduktion der Fluidität und eine hohe Phasenumwandlungstemperatur. Zusammengenommen machen diese Eigenschaften TMG zu einem ungeeigneten Lipidmotiv zur Oberflächenimmobilisierung.

3) *Alkylipide* – Ihr Vermögen Membrandefekte auszuheilen,^[1115] ihr relativ inerte Charakter und ihre große chemische Stabilität machen sie zu einer interessanten Verbindungsklasse die sich auch aus synthetischen Gründen (Stabilität, einfache Modifizierbarkeit) zum Aufbau verschiedener Spacersysteme anbietet. Alkylipide oder die aus Gründen der Membranstabilität bevorzugten Dialkylipide^[1116] können verschiedenartig aufgebaut sein. Dabei kommt der Verknüpfung der beiden Alkylreste eine große Bedeutung für die Vermittlung von fluidem Membranverhalten zu. Die oben erwähnte Reduktion der Membranfluidität wird bei Glycerinethern beobachtet. Sind die beiden Alkylketten aber beispielsweise in Form eines tertiären Amins an Stickstoff gebunden, erhält man durch die veränderten Bindungswinkel eine andere geometrische Orientierung der Alkylketten, die nichtmehr auf einfache Weise parallelisiert werden kann. Es kommt zur Ausbildung geometrisch gestörter/nichtparalleler Dialkylresten die mit der durch cis-Doppelbindungen innerhalb der Kette hervorgerufenen Störung ungesättigter Lipide vergleichbar ist.

Ein mögliches Motiv sind Dialkylamine, beispielsweise Dioctadecylamin (DODA). DODA ist bekannt dafür stabile LB-Filme^[1117] und fluide Membranen^[1118] ohne Anzeichen von physikalischer Netzbildung zu formen^[1117]. Es ist unter potentiellen Polymerisationsbedingungen chemisch stabil, hat keinen bekannten biologischen Botenstoff- oder Signalcharakter (im Gegensatz zu Lipiden wie PE, PC, CL, PS, PG)^[1092, 1093] und ist kommerziell erhältlich.

Die mögliche kovalente Anbindung an den Spacer über eine stabile Kohlenstoff-Stickstoffbindung und die Vermittlung von Membranfluidität sind erfolgversprechende Eigenschaften für die Ausbildung stabiler und fluider biomimetischer Membranen.

3.3.4 Cytoskelett/Cytosol – Spacerarchitekturen für tBLMs

Das Cytoskelett bzw. cytoskelettanaloge Spacersystem ist ein wichtiger Bestandteil des natürlichen, aber auch des biomimetischen Membransystems. Sein Einfluß, besonders durch die Entkopplung der Membran von der artifiziellen Substratoberfläche, sollte nicht unterschätzt werden. Als Material zur Beschichtung der Festkörperoberflächen soll Gold angewendet werden, da es sich zur effizienten Modifizierung mit Hilfe von Thiolen und Disulfiden eignet. Diese zeigen an der Goldoberfläche ein dynamisches Verhalten, wodurch eine Umorganisation bzw. ein Austausch von Molekülen an der Oberfläche prinzipiell möglich ist. Dadurch ist eine Variation der Monoschichtzusammensetzung und eine Anpaßung der Orientierung der Molekülachsen des SAMs möglich.

Die Möglichkeit des Spacers in Abhängigkeit von den Substrateigenschaften durch unterschiedliche Spacerlängen die Entkopplungsentfernungen von der Oberfläche und damit deren Einfluß auf die Membran (Kapitel 3.2.3.1) einstellen zu können, wird erst durch eine variable Spacerchemie möglich. Durch die eingeschränkte Geometrie der Festkörperoberfläche und der molekularen Dimension der Lipidmembran ist die Oberflächengeometrie/morphologie der Festkörperoberfläche wichtig. Es ist daher notwendig verschiedene synthetische Ansätze zu entwickeln, um definierte Spacer mit unterschiedlichen Entkopplungsentfernungen, wie sie in Kapitel 3.3.2 definiert wurden, zu synthetisieren.

Die experimentelle Analyse der Abhängigkeit der Membraneigenschaften vom Verhältnis der Oberflächenrauigkeit zur Moleküldimension der Lipid-Spacer-Anker-Konjugate ist ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Betrachtet man die Wechselwirkung zwischen der biologischen Zellmembran und dem Cytoskelett, kann festgestellt werden, daß nur **wenige Lipide** kovalent an Cytoskelettkomponenten gebunden sind. Für die Synthese der tBLM-Lipide bedeutet dies, daß die Fluidität des Lipids so groß sein muß, daß auch bei der Assemblierung **reiner Ankerlipide** keine gelanalogen Phasenzustände eingenommen werden. Die Anwendung von Schichten reiner thiofunktionalisierter Lipide erlaubt den einfachsten Zugang zu hydrophoben Monoschichtmembranen, auf denen die **Vesikelfusion begünstigt** sein sollte(siehe Kapitel 3.2.3.3).

Die Voraussetzung für derartige tBLMs sollte bei der Anwendung von 2,3-Di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerin-Lipiden gegeben sein.

Neben den Proteinstrukturen die in der Zelle die Komponenten des Cytoskeletts bilden, führt die Suche nach Verbindungen für die Synthese effektiver Spacermoleküle im Rahmen dieser Arbeit auf die Substanzklassen der Kohlenhydrate und Polyethylenglykole.

PEGs da ihre Kompatibilität mit biomimetischen Membranen bekannt ist (Kapitel 3.2.2) und es auf Grund seiner Hydrophilie, seiner chemischen Stabilität (relativ inert) und die Fähigkeit besitzt dynamische Wasserstoffbrücken-Netzwerke auszubilden. Letztere erlauben es die Strukturierung des Submembranraums^[1117] und die notwendigen polaren Eigenschaften mit der dynamischen Flexibilität des Spacers zu verbinden.

Kohlenhydrate, besitzen im extrazellulären und plasmatischen Bereich der Zelle einen einzigartigen Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften der Zelle der von ihrem Hydratationszustand abhängt. Weiterhin sind sie ebenfalls in der Lage Wasserstoffbrücken einzugehen, die allerdings im strukturellen Vergleich mit PEG weniger flexibel sind. In Analogie zu proximalen hydrophilen Deckschichten z.B. PEG, Glycerin... führt auch die intrazelluläre Anreicherung des Cytosols mit Trehalose zur Stabilisierung von Säugezellemembranen die auch nach Trocknung und erneuter Hydrolyse intakt bleibt.^[1119] Zucker weisen somit ein weites Spektrum an adaptierbaren Eigenschaften auf.

Die Anwendung von Polyelektrolyten ist problematisch, da sie zur Denaturierung von Proteinen führen können.

Die Synthese von definierten Verbindungen der oben genannten Substanzklassen mit den Methoden der klassischen organischen Chemie soll den synthetischen Zugang zu Spacermolekülen definierter Länge erlauben. Da natürliche Oligosaccharide häufig komplizierte 3-dimensionale Strukturen ausbilden, die einer effektiven vertikalen Entkopplung der Membran von der Oberfläche entgegenstehen, wird im Rahmen dieser Arbeit auch ein Ansatz angestrebt, der Monosaccharide als Seitengruppen kurzer polymerer Verbindungen verwendet.

Um eng definierte Spacerlängen bzw. Entkopplungsabstände von mehr als 5 nm theoretisch möglich zu machen, werden polymerchemische Methoden an die speziellen Anforderungen der biomimetischen Membranen adaptiert.

Größere Abstände von der Festkörperoberfläche lassen sich durch die Immobilisierung von polymeren Verbindungen nur bedingt erreichen, da eine hinreichende supramolekulare Anordnung besonder zu elektrisch dichten Membranen of nur unzureichend möglich ist (Knäulstruktur). Eine effiziente Methode die im Rahmen dieser Arbeit für die Synthese von kovalent an die Festkörperoberfläche gebundener polarer Spacersysteme zwischen 16 und 50 nm (Abbildung 53 (III)) erstmalig angewandt werden soll, ist die Plasmapolymerisation

elektrophiler Monomere zu glatten, lochfreien und vernetzten Polymerfilmen die eine kovalente Anbindung von Amphipilen erlauben und ein in Abhängigkeit von den Polymerisationsparametern einstellbares Quellverhalten zeigen.

Die dazu angewandten Strategien und die Synthese der Verbindungen ist in Kapitel 4 beschrieben. Eventuell lassen sich für diesen methodischen Zugang auch Monomere anwenden, die dem teilweise deutlich anionischen Charakter mancher cytoskellatler Verbindungen entsprechen.

Schlußfolgerung - Faßt man die aus den Kapiteln 3.1 und 3.2 gezogenen Schlußfolgerungen zusammen, so ergibt sich für die Synthese und den Aufbau biomimetischer Membranen der nachfolgende Ansatz. Dieser ist mit dem Ziel eine Hierarchie an Membranmodellen mit variierbaren Abständen zwischen Membran und Festkörperoberfläche aufzubauen kompatibel:

Überträgt man die Eigenschaften und Funktionen der biologischen Membrankompartimente – extrazelluläre Matrix/Glycocalix, – Lipidmembran/Membranlipide und – Cytoskelett/Cytosol auf das tBLM-Modell, so ergeben sich für jedes Kompartiment eine Reihe von Aufbauvarianten bezüglich der Zusammensetzung und Architektur, sowie vielfältige Kombinationsmöglichkeiten der Kompartimente untereinander (Abbildung 53). Mit dem Ziel verschiedene Entkopplungsmodelle bezüglich der Spacerchemie, Architektur und Distanz zwischen Membran und Festkörperoberfläche, neben der Untersuchung neuer Lipidmotive zu realisieren, ist es sinnvoll ein System von Modellmembranen mit komplementären Eigenschaften zu konstruieren, um die Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten in Abbildung 53 einzugrenzen.

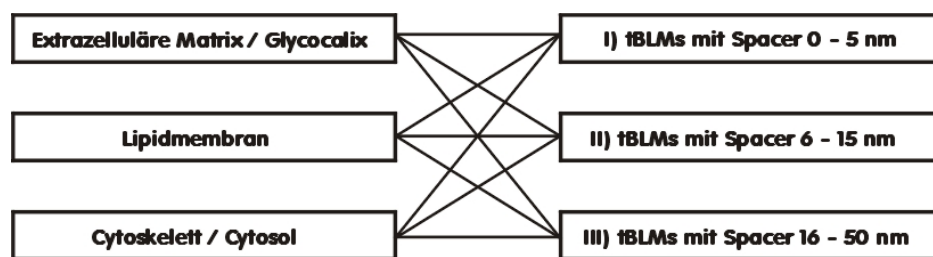


Abbildung 53 Das Aufbauprinzip soll sich für alle tBLM-Membranmodelle unabhängig von ihrem Spaceraufbau am biologischen Membranaufbau bzw. den dort vorhandenen Nachbarkompartimenten orientieren.

Hierzu wird ein paralleler Ansatz verfolgt: Zum einen soll die komplexe Architektur des Cytosols/Cytosketts in einer Weise auf das tBLM-Modell übertragen werden, die es erlaubt

Membranfunktionen mit verschiedenen Anforderungen an das submembrane Kompartiment anhand unterschiedlicher Modelle zu studieren.

Zum anderen sollen die neuen Lipidmotive auf ihre Eignung als oberflächengebundene tBLM-Lipidkomponenten untersucht werden, und die daraus resultierenden, besten Lipid-Spacerkombinationen durch effizienten synthesechemische Routen dargestellt werden.

Die Aufteilung der tBLM-Modelle in drei Gruppen mit unterschiedlichen „Spacerlängen“ trägt sowohl den synthesechemischen, als auch den präparationsmethodischen Möglichkeiten Rechnung. Die biologischen Membrankompartimente bzw. Membranräume werden strukturell und funktionell den tBLM-Kompartimenten in Annäherung an Abbildung 53 zugeordnet:

System I: Für den Aufbau niedermolekularer tBLMs mit einer Spacerlänge von 0 - 5 nm Abbildung 53 (I) bieten sich Diphytanylerlipide an, da für kurze Spacerlängen vergleichsweise einfach gestreckte Spacerkonformationen eingenommen werden können und somit die hydrophoben Wechselwirkungen der hydrophoben Schwanzteile dieser Lipide zur Ausbildung von tBLMs mit großer elektrischer Dichtigkeit maximal zur Ausprägung kommen können. Als Spacerkomponente bietet sich ein Oligoethylenglykol an, das für kurze Kettenlängen relativ gestreckte Konformationen einnehmen sollte. Die Verknüpfung der beiden Komponenten soll wenn möglich durch eine Etherbindung hergestellt werden. Als Ankergruppe bieten sich Thiole oder Disulfide an.

System II: tBLMs mit einem Entkopplungsabstand von mehr als 5 nm (Abbildung 53 (II)) sind schwierig zu präparieren. Niedermolekulare Verbindungen besitzen meist nicht die nötige Geometrie (Länge), oligomere oder polymere Verbindungen lassen sich oft schon bei geringen Membran-Substrat Abständen nur schlecht durch eine spontane Selbstanordnung linearer, lipidgruppentragender Polymere zu tBLMs anordnen. Große Entkopplungsabstände erlauben kaum die *in situ* Formierung der Membran unter gleichzeitiger Anordnung und Anbindung des Spacers und der Ausbildung qualitativ hochwertiger Membranen mittels linearer Polymere. Dies liegt insbesondere in der internen Polymerstruktur und Dynamik begründet, die in guten Lösungsmitteln zu einer expandierten Knäuelstruktur führt. Die bisher in der Literatur beschriebenen polymeren Systeme, die auf Grund ihrer Kettenlänge Entkopplungsabstände in diesen Größenordnungen erlauben könnten, liegen aus den genannten Gründen meist weit unter dem für das Molekül maximal theoretisch möglichen Entkopplungsabständen (siehe hierzu die Literaturstellen in Kapitel 3.2.2). Da der Synthesaufwand im Rahmen der Dissertation nicht zusätzlich Raum für die Synthese komplexer, strukturstabiler dreidimensionaler Spacer bietet, muß versucht werden, durch die Wahl der Polymerfunktionalitäten und die membranchemischen Präparationsmethoden eine teilweise Streckung der Polymerketten zu

erreichen. Als Strukturelement bieten sich Monomere, zum Beispiel Acrylate mit kohlenhydrathaltigen Seitengruppen an. Diese sind in wenigen Stufen synthetisch zugänglich, und lassen sich beispielsweise mit Hilfe der kontrollierten radikalischen Polymerisation zu kohlenhydrathaltigen Polymeren mit enger Molekulargewichtsverteilung umsetzen. Hierzu ist es sinnvoll den Radikalstart durch einen lipidmodifizierten Initiator vorzunehmen, und auf diese Weise eine terminale Lipidfunktion einzuführen. Dieses Lipid muß den Polymerisationsbedingungen standhalten (die Temperaturen liegen of deutlich über 100 °C), einfach kommerziell oder synthetisch zugänglich sein, und günstige Membraneigenschaften aufweisen. DODA (Dioctadecylamin) stellt in diesem Zusammenhang eine interessante Verbindung dar. Es ist in der Lage unter Ausbildung eines tertiären Amins an ein Initiatorgerüst zu binden und besitzt zwei Alkylreste. Da diese durch die Bindungswinkel am Stickstoff nicht parallel stehen, stören sie eine dichte Membranpackung und könnten trotz ihrer Kettenlänge auch Membranfluidität vermitteln.

System III: Die Verwirklichung von Entkopplungsabständen von mehr als 16 nm (Abbildung 53 (III)) stellt besondere Anforderungen an die Präparations- beziehungsweise Aufbaumethode. Das Ziel das hierbei verfolgt werden soll, ist eine kovalente Anbindung der Spacerschicht, die durch die ganze Schicht hindurchreicht. Eine Methode dicke Molekülschichten auf Oberflächen zu präparieren ist mit LB-Methoden möglich. Diese Schichten wechselwirken aber gewöhnlich durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen. Die Methode soll idealerweise die Synthese einstellbarer Schichtdicken verschiedener Polarität liefern und eine gleichbleibend glatte Spaceroberfläche erzeugen, die in möglichst wenigen Syntheseschritten kovalent mit Lipomotiven funktionalisiert werden kann. Diese Anforderungen lassen sich durch die Anwendung plasmapolymersierter Filme verwirklichen. Hierbei werden in einem radiofrequenten Plasma „Monomere“ in hochangeregte Zustände versetzt und miteinander Verknüpft. Je nach Oberflächenfunktionalisierung ist auch eine kovalente Anknüpfung möglich. Die Methode eignet sich zur Präparation von Polymerschichten die dicker als 15 nm sind (darunter besteht die Gefahr inkompletter Filme) und bis zu mehreren hundert Nanometern dick sein können. Da hierbei eine von der eingestrahlten Leistung abhängige Vernetzung auftritt, lassen sich die freien lateralen Abstände nur bedingt einstellen. Der polare, submembrane Phasenraum muß aber nicht zwangsweise für alle Cytosol-/Cytoskelettmodelle über größere solvensgefüllte Areale, die Platz für submembrane Proteinsegmente bieten können verfügen. Auch Cytoskelettanaloge, die eine relativ dichte Packung aufweisen, aber ein großes, effektives Totalvolumen besitzen das für Ionen penetrierbar ist, entsprechen cytoskelettalen Varianten (siehe Kapitel 3.1.3).

4 Methoden der Grenzflächenanalytik

In den letzten Jahren gewannen biomimetische Membransysteme für die Charakterisierung von biologisch relevanten molekularen Erkennungsprozessen stark an Bedeutung. Um die Dynamik und die Struktur der beteiligten Prozesse und Verbindungen beschreiben und verstehen zu können, ist es notwendig, komplementäre grenzflächenanalytische Methoden miteinander zu kombinieren.

Zusätzlich müssen verschiedene Elemente und Methoden zur Präparation definierter Verbindungen auf Festkörperoberflächen und deren Anordnung zu supramolekularen Architekturen angewandt, beziehungsweise neu entwickelt werden. Nur so ist es möglich, einzelne Amphiphile zu definierten supramolekularen Lipidaggregaten zu organisieren und qualitativ hochwertige biomimetische Membranen zu präparieren!

Die Anforderungen an die Analyse molekularer Architekturen auf Oberflächen steigen, wenn die zu untersuchenden Objekte in Form von molekularen Strukturen von einer oder wenigen Molekülschichten vorliegen, lateral strukturiert sind oder sich dynamisch verhalten. Biologische Modellmembranen können alle genannten Merkmale aufweisen. Ihre hinreichende Charakterisierung ist eine wichtige Voraussetzung zur Optimierung von Membranmimikrie. Die Möglichkeiten und Grenzen der angewandten analytischen Methoden und ihre Bedeutung für die Analyse der biomimetischen Membranen und der mit ihr koppelbaren biologischen Prozesse werden in diesem Kapitel beschrieben.

Grenzflächenanalytik

Die Analytik von Grenzflächen soll es ermöglichen molekulare und makroskopische Informationen von supramolekularen Architekturen an Oberflächen als Moleküldoppel-, Mono- und Submonolagen bezüglich deren Dicke, Anordnung, Orientierung, Morphologie, Oberflächenenergie, Struktur, Dynamik, elektrischen und chemischen Eigenschaften zugänglich zu machen. Folgende Methoden werden in dieser Arbeit für die Charakterisierung biomimetischer Membranarchitekturen und deren grenzflächenchemischen Modifikationsprozessen angewendet:

4.1 Kontaktwinkelgoniometrie

Die makroskopische Wechselwirkung von Wasser mit Oberflächen besitzt große Bedeutung für biologische Vorgänge und technische Anwendungen.^[1120] Qualitative, aber auch quantitative Aussagen über die Eigenschaften von Festkörpergrenzflächen sind durch die **Bestimmung der Oberflächenspannung**, beziehungsweise der **Oberflächenenergie** über den experimentell leicht zugänglichen Kontaktwinkel θ möglich.^[1121]

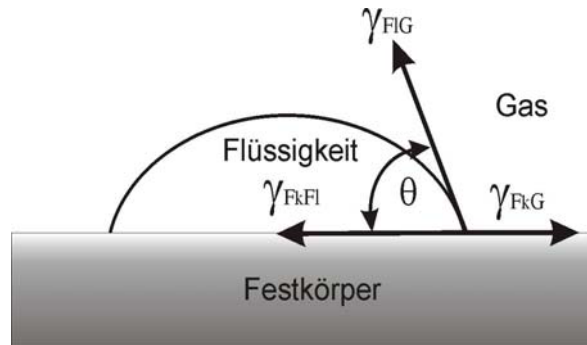


Abbildung 54 Grenzflächenspannungen eines Tropfens auf einer Festkörperoberfläche

Eine für Grenzflächen wichtige Größe, die Oberflächenenergie, bestimmt dabei die Wechselwirkung des Wassers (beziehungsweise anderer Flüssigkeiten) mit der Oberfläche des Festkörpers.^[1122] Der Kontaktwinkel des Tropfens auf der Festkörperoberfläche ergibt sich aus der Minimierung der freien Enthalpie, die durch die Oberflächenenergie der Flüssigkeit und die Oberflächenenergie des Festkörpers bestimmt wird. Bei einer Vergrößerung der Kontaktfläche des Tropfens auf der Festkörperoberfläche ergibt sich ein Anwachsen der freien Enthalpie an der Festkörper-Flüssigkeitgrenzfläche um γ_{FKFI} , eine Abnahme der freien Enthalpie an der Gas-Festkörpergrenzfläche um γ_{FKG} und eine Zunahme der freien Enthalpie an der Flüssigkeits-Gasgrenzfläche $\gamma_{GFI} \cos \theta$. Je attraktiver die Wechselwirkung ist, das heißt, je größer der Energiegewinn bei der Benetzung der Oberfläche des Festkörpers ist, desto größer ist die Spreitung der Flüssigkeit und um so kleiner ist der Kontaktwinkel θ . Eine funktionelle Beziehung zwischen dem Kontaktwinkel und den Oberflächenenergien, liefert die Young'sche Gleichung. (Gleichung 1)

$$\gamma_{GFI} \cdot \cos \theta = \gamma_{FKG} - \gamma_{FKFI}$$

Gleichung 4

Sie verknüpft die Oberflächenenergien zweier reiner Phasen (hier fest/flüssig) mit der Grenzflächenspannung zwischen den Phasen und dem ausgebildeten Randwinkel (Kontaktwinkel θ), der als tangentialer Kontaktwinkel des Tropfens zur Oberfläche gemessen wird. Es stellt sich ein stabiles thermodynamisches Gleichgewicht ein das zu einem festen Winkel zwischen der Oberfläche und der Flüssigkeit an der Festkörper-Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche führt. Dies ist der Fall, wenn sich die Oberfläche ideal verhält, das heißt, wenn die Festkörperoberfläche ideal glatt und homogen ist. Inhomogenitäten, vor allem in Form von rauhen oder unregelmäßig strukturierten Oberflächen, erzeugen nur ein metastabiles Gleichgewicht und stärker abweichende Messwerte (**Hysterese**).

In der Praxis wird die Messung des Kontaktwinkels θ durch Vergrößerung und Verkleinerung des Tropfenvolumens durchgeführt, wodurch zwei Kontaktwinkel, der fortschreitende Kontaktwinkel θ_f bei der Volumenvergrößerung, und der zurückziehende Kontaktwinkel θ_z bei Verkleinerung des Tropfenvolumens gemessen werden.^[1123, 1124]

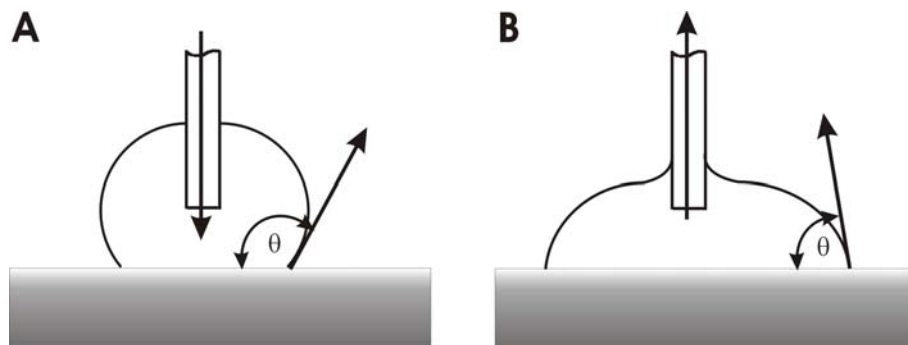


Abbildung 55 Definition des fortschreitenden (A) und zurückziehenden (B) Kontaktwinkels

In der englischen Sprache wird der fortschreitende Kontaktwinkel auch als θ_a für *engl. advancing*, und der zurückziehende Kontaktwinkel auch als θ_r für *engl. receding* indiziert. Aus der Differenz der beiden Winkel erhält man die Kontaktwinkelhysterese $\Delta\theta$, die zusätzliche Informationen über die **Oberflächenmorphologie** und **chemische Inhomogenitäten** liefert.^[1125] Je größer die Hysterese, desto größer ist die Inhomogenität. Die Chemie der Festkörpergrenzfläche bestimmt das Verhalten der Grenzfläche innerhalb der obersten 5 Å.^[1126] Da der Kontaktwinkel eine thermodynamische, und damit rein makroskopische Größe ist, gibt er keinen Aufschluß über die zwischenmolekularen Kräfte in der Grenzfläche da diese üblicherweise eine geringere Dimension als der Tropfen besitzen.^[61]

Der Kontaktwinkel kann für Wasser Werte zwischen annähernd 0° (hydrophile Oberfläche z.B. hydrophiles Glas) und ca. 110° (hydrophobe Oberfläche z.B. Alkyl-SAMs) annehmen. Maximale Werte von etwa 160° sind auf hydrophoben mikrostrukturierten Oberflächen

beobachtbar (Lotuseffekt).^[1127-1131] Die Bestimmung des Kontaktwinkels stellt nicht nur wegen ihrer einfachen experimentellen Durchführbarkeit eine sehr wichtige Methode dar. Sie liefert wichtige Informationen über die chemische und morphologische Beschaffenheit von makroskopischen Festkörperoberflächen und darauf befindlicher Molekülschichten. Sie eignet sich für die Verfolgung der Abscheidung/Assemblierung von Molekülen auf Festkörperoberflächen und der qualitativen/quantitativen Bestimmung der resultierenden Oberflächeneigenschaften, da der Kontaktwinkel von Oberflächenrauigkeiten, chemischen Heterogenitäten, dem Ordnungsgrad der terminalen, das heißt zur Oberfläche zeigenden Gruppen aber auch von der Präsenz von Verunreinigungen abhängt.

Da die Oberflächenenergie und die Morphologie von SAMs für die Präparation von fluiden Lipiddoppelschichten von entscheidender Bedeutung sind (Kapitel 3.2) erlaubt die Bestimmung des Kontaktwinkels eine Abschätzung über den zu erwartenden Verlauf der Funktionalisierung (z.B. mittels Vesikelfusion) und die späteren Oberflächeneigenschaften der Membran. Empirisch findet man, daß der Aufbau von Lipiddoppelschichten auf SAMs durch Vesikelfusion vom Kontaktwinkel abhängt. Auf hydrophoben Oberflächen (Kontaktwinkel $> 80^\circ$) und auf hydrophilen Oberflächen (Kontaktwinkel $\sim 0^\circ$ - 15°) kann meist eine spontane Vesikelfusion beobachtet werden, während auf Oberflächen mit einem mittleren Kontaktwinkel von beispielsweise 50° oft eine verstärkte Vesikeladsorption auftritt.

Die Bestimmung der Kontaktwinkel (Wasser auf Festkörpersubstraten) wird an einem Krüss G1-Gerät (Goniometertyp) bei Raumtemperatur durchgeführt. Um experimentelle Fehler zu minimieren wird an fünf verschiedenen Stellen des Substrates gemessen.

4.2 Rasterkraftmikroskopie

allgemeine Grundlagen

Die Rasterkraftmikroskopie (*engl. Atomic Force Microscopy, AFM*) gehört zu den **Rastersondenverfahren** welche die weitgehend zerstörungsfreie dreidimensionale Abbildung von Oberflächen in molekularen Dimensionen und im Subangströmbereich erlauben^[1132-1134]

Im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie (*engl. Scanning Tunneling Microscopy, STM*), benötigt sie keine leitfähigen Oberflächen wodurch sie sich als Nahfeldmethode für nichtleitende Oberflächen eignet. Ein Vorteil der Rasterkraftmikroskopie ist die Untersuchung von Oberflächen *in situ*. Dadurch eignet sie sich besonders für die Anwendung in den Material- und Biowissenschaften. Biologische oder synthetische Moleküle, anorganische Materialien, beispielsweise Keramiken, und monomolekulare Oberflächenschichten können in verschiedenen Umgebungen, z.B. Flüssigkeiten, Vakuum oder hohen/tiefen Temperaturen

untersucht werden.^[1135] Auch die Wechselwirkung zwischen einzelnen Molekülen^[1136, 1137] und konformatorische Strukturänderungen von Polysachhariden^[1138-1140] sind mit ihrer Hilfe meßbar. Die atomare Auflösung macht die Methode zur Analyse von SAMs interessant, besonders wenn Oberflächenmorphologien, Defekte in der organischen Molekülarchitektur auf der Substratoberfläche oder die Phasenseparation binärer SAMs untersucht werden sollen.

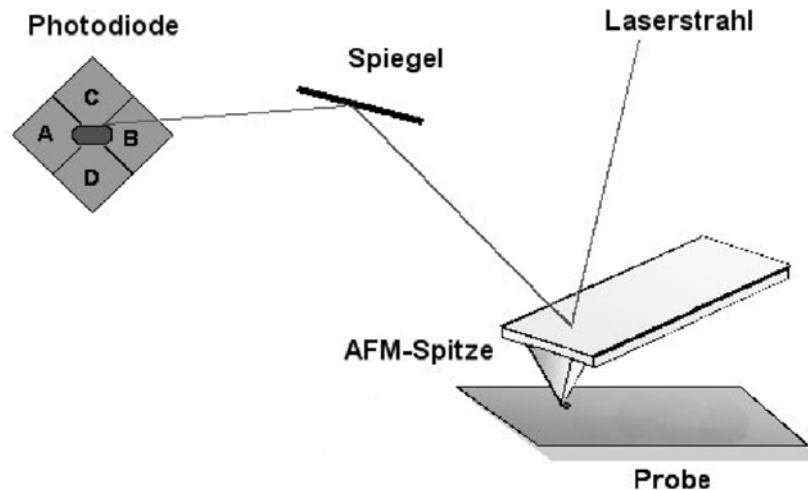


Abbildung 56 Schema eines Rasterkraftmikroskopaufbaus

Das Rasterkraftmikroskop besteht im wesentlichen aus drei Teilen. 1. Einer feinen Spitze aus Si-, SiO₂- oder Si₃N₄-Einkristallen, die mit anderen Materialien (zum Beispiel Gold, organische Moleküle ...) modifiziert werden können und sich am Ende einer linearen oder dreieckigen Feder (Blattfeder, *engl. cantilever*) befinden. 2. Einem Piezoelement das Bewegungen in XYZ-Richtung ermöglicht und auf das die Probe oder die Feder montiert sind und 3. einem Laserstrahl zur Detektion der Federbewegung. Der Laserstrahl wird auf der Rückseite der Feder reflektiert und über einen Spiegel auf einen positionsempfindlichen Detektor gelenkt. Auf diese Weise ist es möglich kleine durch die Oberfläche hervorgerufene Auslenkungen oder Verdrehungen der Feder zu messen und die mechanischen Bewegungen durch die Photodiode in elektrische Signale umzuwandeln.

Auf die mit einer Rasterbewegung über die Oberfläche bewegte Feder wirken dabei Kräfte von etwa 10⁻¹² N.^[1141]

Zur Messung kann das AFM im **Kontakt-** oder **Tapping-Modus** betrieben werden. Im Kontaktmodus berührt die Spitze die Oberfläche. Während der Rastermessung wird die Auslenkung der Feder durch die Reflexion des Laserstrahls an deren Rückseite verstärkt und die Auslenkung der Feder durch einen elektronischen Rückkopplungsmechanismus durch das

Heben oder Senken der Probe oder der Feder mit Hilfe des Piezoelements konstant gehalten. Bei der Messung im Tapping-Modus handelt es sich im Gegensatz zur Messung im Kontaktmodus um eine dynamische Meßmethode. Dabei wird die AFM-Spitze mit einer Oszillationsfrequenz zu Schwingungen angeregt die knapp unter der Eigenfrequenz der Spitze liegen. Der Abstand zur Oberfläche der Probe wird dabei so gewählt, daß bei maximaler Schwingungsamplitude die Probenoberfläche nur leicht berührt wird. Durch attraktive Wechselwirkung verschiebt sich die Resonanzfrequenz bei einer Änderung der Oberflächentopographie zu höheren Frequenzen. Dies führt zu einer Verringerung der Amplitude und zu einer veränderten Reflektion des Laserstrahls. Das Piezoelement verändert den Abstand der Spitze zur Probenoberfläche und gleicht damit die Schwingungsfrequenz der Feder wieder an. Die im Kontaktmodus wirksame Kraft liegt in der Größenordnung von 100 nN, ausreichend um empfindliche Oberflächenstrukturen zu zerstören und Messung von weichen und fluiden Oberflächenarchitekturen unmöglich zu machen.

Aus diesem Grund werden die in dieser Arbeit präsentierten Messungen im Tapping-Modus durchgeführt. Dies hat den Vorteil, daß Scherkräfte weitgehend vermieden und die auf die Oberfläche wirkende Kraft reduziert wird, wodurch sich diese Methode für Messungen an biologischen Membranen eignet.^[1142-1145] Auch die Fusion von Vesikeln kann mit Hilfe von AFM-Messungen untersucht werden.^[686]

Chemische Kraftmikroskopie^[1146-1148]

AFM-Kraftmessungen an biologischen oder biomimetischen Membranen^[1149-1151] erfordern neben instrumentellen Adaptionen des AFM auch experimentelle Modifikationen.^[1152]

Die Verwendung chemisch modifizierter Spitzen und die Auswahl der Meßmethode sind für diese spezielle Aufgabenstellung von besonderer Bedeutung.

Neben der Modifikation mit Nanotubes (Durchmesser im nm-Bereich)^[1153] sind Polystyrol-^[1154] oder Silikakugeln^[1155] (mit einem Durchmesser von einigen μm), SAMs und Biomoleküle^[1156] z.B. Antikörper^[1157] und Enzyme^[1158] beschrieben. Zum Studium von Membraneigenschaften werden SAMs mit hydrophoben, hydrophilen und unterschiedlichen Ladungszuständen verwendet.

Neben Kraft-Abstands-Kurven sind auch dynamische Vorgänge und Bindungsenergien einzelner Bindungen meßbar.

Die chemische Rasterkraftmikroskopie eignet sich zur Analyse von SAM-Architekturen bezüglich Schichthomogenität und Struktur, aber auch für die Analyse von Lipidmembranen und membranassoziierten Vorgängen wie der Vesikelfusion.

Die AFM-Aufnahmen werden unter verschiedenen Bedingungen mit einem Nanoskop III (multimode, Digital Instruments) mit einem $12\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$ Scan-Kopf und Siliziumfedern (MikroMash) aufgezeichnet. Die AFM-Federspitzen besitzen eine Federkonstante von etwa $4,5\ \text{Nm}^{-1}$ und eine Resonanzfrequenz im Bereich von 135-165 kHz, abhängig von der verwendeten Federspitze. Die Spitzen zur Untersuchung der Festkörperoberflächen besitzen eine konische Form mit einem Winkel von ca. 20° . Der Kurvenradius dieser Spitzen beträgt 10 nm. Die in der Arbeit gezeigten Abbildungen von AFM-Aufnahmen zeigen die rohen, ungefilterten Daten im sogenannten „Tapping“-Modus (dynamisch) bei einer Scanrate von zwei Linien pro Sekunde. Für die AFM-Experimente zur Vesikelfusion werden andere AFM-Spitzen verwendet. Da es sich bei diesen Experimenten um Kraftmessungen handelt, müssen die beiden miteinander Wechselwirkenden Flächen eine möglichst definierte Geometrie besitzen. Da normale AFM-Spitzen von AFM-Nadel zu AFM-Nadel Abweichungen der Spitzengeometrie aufweisen (da sich am Spitzenende häufig nur noch kleine Atom- oder Molekülcluster befinden) und die Kurvenradii meist nicht genau bekannt sind, können bei Wechselwirkungen der AFM-Spitze mit einer Probenoberfläche auch nur geringe Abweichungen das Meßergebnis verändern wodurch eine definierte Verifikation der zu untersuchenden Prozesse nicht mehr möglich ist. Anstelle einer konischen Spitze werden die für Kraftmessungen verwendeten Federn mit sphärischen Kugeln modifiziert (z.B. Polystyrol für hydrophobe Kugeloberflächen und Quarzkugeln für hydrophile Kugeloberflächen).

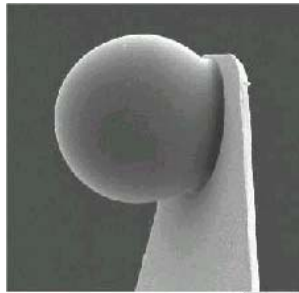


Abbildung 57 AFM-Feder mit angeklebter Polystyrolkugel (Bild mit freundlicher Erlaubnis von O. Vinogradova)

Der experimentelle AFM-Aufbau und die verwendeten Geräte sind im Detail in der Literatur beschrieben.^[1159-1161]

4.3 Profilometer (“Alpha-Stepper”)

Der Alpha-Stepper ist ein mit dem AFM vergleichbares Gerät zur Charakterisierung von Oberflächen. Auch bei dieser Methode wird mit Hilfe einer feinen Nadel die Oberfläche abgetastet. Ein großer Vorteil dieses Meßverfahrens liegt in der vergleichsweise robusten mechanischen Bauweise und der **großen lateralen Meßbereiche**. Diese liegen im Bereich von mehreren Zentimetern und somit im Bereich makroskopischer Körper. Durch die große laterale Skala ist es möglich, den Profilverlauf ganzer Trägersubstrate zu bestimmen, wodurch insbesondere Randeffekte, wie sie bei der Plasmapolymerisation zu beobachten sind (Dickenabhängigkeit der Polymerschicht von der Probenposition im Reaktor und in Abhängigkeit von der Entfernung des Meßpunktes vom Rand des Trägers), charakterisierbar sind.

Der vertikale Meßbereich reicht für das verwendete Gerät (P-15 Profiler der Firma KLA-Tencor) von < 10 nm bis zu 1 mm mit einer Auflösung von etwa $7,5 \text{ \AA}$. Insbesondere die Analyse sehr steiler Stufenübergänge großer vertikaler Erstreckung ist mit diesem Gerät möglich. Dadurch sind auch dicke Polymerschichten von mehreren Mikrometern Schichtdicke unterschiedlicher Morphologien auf einfache Weise analysierbar.

Alle Dickenmessungen an Trägern mit plasmapolymerisierten Polymeren werden mit dem P-15 Profiler der Firma KLA-Tencor durchgeführt. Hierzu werden die fertigen Polymerschichten mit einer Nadel bis auf das Substrat durchtrennt und das Stufenprofil gemessen. Zusätzlich wird die Oberflächenrauigkeit lokal und über laterale Entfernungen bis zu mehreren Zentimetern bestimmt. Dickenmessungen werden ausschließlich auf Glas oder Siliziumwafern als Kontrollmessungen durchgeführt, da bei der Verwendung von Glas-Chrom-Gold-Trägern durch die Duktilität der Metalle, insbesondere des Goldes, eine Verfälschung der meßbaren Schichtdicke durch die Deformation der Metallschichten nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Dickenanalyse von Materialien mit großer Thraustizität, sowohl von Trägern als auch der auf diese aufgebrachtten Schichten, muß mit großer Vorsicht erfolgen wenn die Gefahr besteht, daß sich Material von der Oberfläche abhebt und damit die Distanz zur Trägeroberfläche zusätzlich verändert wird.

4.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (*engl. Scanning Electron Microscopy* – SEM genannt), gehört neben der Kraftmikroskopie zu den **oberflächenabbildenden Analyseverfahren**.^[1162]

Das Rasterelektronenmikroskop (SEM oder REM) erlaubt die Oberflächenanalyse bezüglich der Zusammensetzung und der Topologie bis zu einer Auflösung von ca. 5 nm.^[1163] Das wesentliche Bauelement des Rasterelektronenmikroskops ist die sogenannte Elektronensäule, eine Elektronenkanone mit mehreren magnetischen Linsen die sich im Vakuum befinden. Sie erzeugt einen Elektronenstrahl dessen Elektronen auf Energien von etwa 0,2-30 keV beschleunigt und durch die magnetischen Linsen auf einen dünnen Strahl fokussiert werden, der auf die im Vakuum befindliche Probe fokussiert wird. Durch ein Ablensystem wird der Strahl punktförmig über die Oberfläche geführt. Das entstehende Rastermuster wird dann zu einem Bild zusammengesetzt. Ein Punkt des Bildes wird dabei durch Analyse der Emission von Elektronen und Photonen von der Oberfläche generiert, die aus der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe resultieren. Die Analyse erfolgt durch die Detektion der Sekundärelektronen (SE) und der von der Probe zurückgestreuten Elektronen (*BSE = engl. Back Scattered Electrons*). Letztere sind hochenergetisch und stammen nicht von der Probenoberfläche sondern von den tieferen Regionen der Probe. Ihr Kontrast hängt von der Topographie der Probe und von der durchschnittlichen Ordnungszahl der Probensubstanz ab.

Per Definition werden alle Elektronen mit Energien kleiner als 50 eV als Sekundärelektronen bezeichnet. Rückgestreute Elektronen weisen daher höhere Energien auf.^[1164]

Die Sekundärelektronen stammen dagegen aufgrund ihrer geringen Energie ausschließlich von den ersten Nanometern der Probenoberfläche ab und beinhalten daher überwiegend Informationen über die Topographie der Probe. Nichtleitende Proben wie Polymere sind anfällig für Strahlenschäden und werden üblicherweise mit einem dünnen Goldschutzfilm überzogen. Verwendet man dünne Polymerfilme (z.B. Plasmapolymere) auf leitfähigen Oberflächen, kann auf diese Behandlung teilweise verzichtet werden. Auch der Einsatz moderner SEMs welche mit geringer Beschleunigungsspannung arbeiten (< 5 keV) macht die Verwendung leitfähiger Schutzfilme unnötig.^[1165-1168]

Zusätzlich weisen die Oberflächen der Polymerproben bei Beschleunigungsspannungen zwischen 0,8 und 1,6 keV einen Ladungsneutralpunkt auf, bei dem die Anzahl der „emittierenden“ Elektronen gleich der Anzahl an eingehenden (= Primärstrahlelektronen) ist. Als Folge lädt sich die zu untersuchende Polymerprobe an diesem Punkt im Elektronenstrahl nicht auf. Bei sehr niedrigen Beschleunigungsspannungen (< 1 keV) kommt es jedoch zu einer

geringen Verbreiterung des Primärstrahls, so daß hochauflösende Bilder (Auflösung < 10 nm) in der Regel nicht mehr realisierbar sind.

Die Messungen wurden an einem Niedrigspannungs-SEM (LV-SEM) der Fa. LEO (Typ Gemini 1530) mit SE-Detektor durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung wurde von 0,2 bis 4 keV variiert. Das Instrument wurde zur Untersuchung der plasmapolymersierten Teflonschichten verwendet

4.5 Massenbestimmungen mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM)

Die Analyse von Oberflächenarchitekturen mit der Quarzkristallmikrowaage liefert verschiedene Informationen. Neben Informationen über die **Massenänderung** an der Quarz- bzw. der darauf aufgedampften Goldoberfläche, sind wertvolle Daten über die **viskoelastischen Eigenschaften** der mit dieser Grenzfläche in Wechselwirkung stehenden Moleküle und supramolekularen Architekturen zugänglich.

Grundlage der QCM ist der **piezoelektrische Effekt**. Die theoretischen Grundlagen des piezoelektrischen Effekts wurden 1885 von Raleigh beschrieben^[1169] und erstmalig von Jacques und Pierre Curie im Jahre 1880 im Detail untersucht. Jacques und Pierre Curie legten in ihrer Arbeit erstmalig die Anwendung des piezoelektrischen Effekts zum Aufbau einer Meßvorrichtung zur Massendetektion dar.^[1170]

Beim piezoelektrischen Effekt kommt es durch äußere mechanische Krafteinwirkung auf einen Kristall (z.B. einem Quarzkristall bestimmter Schnittebene) zum Aufbau einer elektrischen Spannung. Die umgekehrte Erscheinung, eine Geometrieänderung bei Anlegen einer elektrischen Spannung wird als inverser piezoelektrischer Effekt bezeichnet. Der piezoelektrische Effekt ist physikalisch eng verwandt mit dem piezoresistiven Effekt. Die Piezoelektrizität wird durch die piezoelektrischen Koeffizienten beschrieben. Man unterscheidet zwischen piezoelektrischen Verzerrungskoeffizienten ($d_{ij,k}$, Gleichung 5), die die Reaktion der Verzerrung auf das elektrische Feld beschreiben,

$$d_{ij,k} = \frac{\partial \varepsilon_{ij}}{\partial E_k}$$

Gleichung 5

und piezoelektrischen Spannungskoeffizienten ($e_{ij,k}$, Gleichung 6), die die Reaktion der mechanischen Spannung auf das elektrische Feld beschreiben.

$$e_{ij,k} = \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial E_k}$$

Gleichung 6

Die beiden Koeffizienten hängen über die elastischen Konstanten (Gleichung 4) zusammen:

$$e_{ij,k} = \sum_{lm} c_{ijlm} d_{lm,k}$$

Gleichung 7

Effekte zweiter Ordnung werden durch die elektrostriktiven Koeffizienten beschrieben.

Der Piezoelektrische Effekt läßt sich wie folgt erklären: Wird makroskopisch auf einen Kristall Druck ausgeübt, führt dies innerhalb der Elementarzelle zu einer Dipolbildung durch die relative Verschiebung der positiv geladenen Si-Gitterbausteine und der negativ geladenen O-Gitterbausteine zueinander (Abbildung 58). Die Aufsummierung über alle Elementarzellen des Kristalls führt zu einer makroskopisch meßbaren elektrischen Spannung.

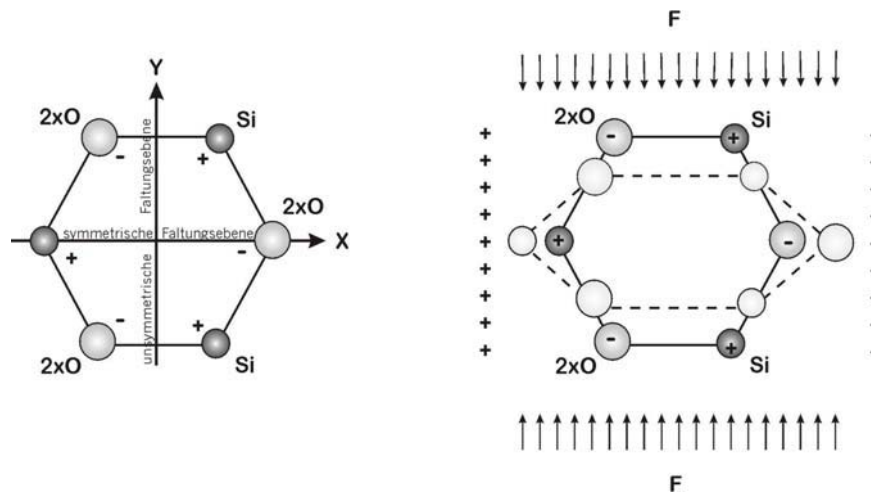


Abbildung 58 Verschiebung der Gitterbausteine eines Quarzkristall - piezoelektrischer Effekt

Entsprechend führt beim inversen piezoelektrischen Effekt eine äußere Spannung auf mikroskopischer Ebene zu einer Änderung der Gitterkonstanten der Elementarzellen, die sich wiederum zu einer meßbaren Längenänderung addieren. Da beide Effekte gemeinsam in einem Kristall auftreten, entstehen Schwingungen bei einmaliger äußerer Anregung. Deren Frequenz ist nur von der Schallgeschwindigkeit (eine Materialkonstante) und der Dicke des Kristalls

abhängig. Piezoelektrische Materialien sind beispielsweise Quarz, Polyvinylfluorid, Zirkonate Titanate, aber auch die menschliche Haut und Knochen.

Die Funktion der Quarzmikrowaage beruht auf dem **inversen piezoelektrischen Effekt**. Legt man ein oszillierendes elektrisches Feld durch auf den Kristall aufgedampfte Goldelektroden an (Abbildung 59), so induziert das E-Feld eine innere mechanische Spannung im Kristall die eine akustische Welle erzeugt.

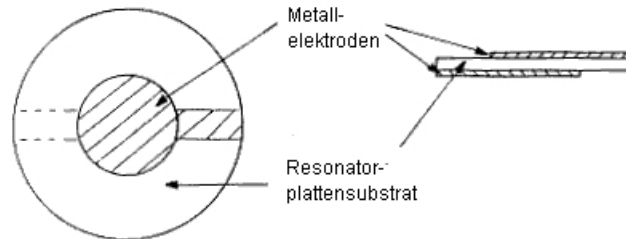


Abbildung 59 QCM-Kristall mit aufgedampften Goldelektroden

Diese Welle erreicht eine minimale Impedanz, wenn die Dicke des Kristalls ein Vielfaches der halben Wellenlänge der akustischen Welle beträgt. Die Art der Schwingung hängt von der kristallographischen Schnittebene des Kristalls ab. Der Kristall der QCM ist ein Dickenschwinger in dem die akustische Welle senkrecht zur Kristalloberfläche durch den Kristall fortschreitet.^[1171] (Abbildung 60)

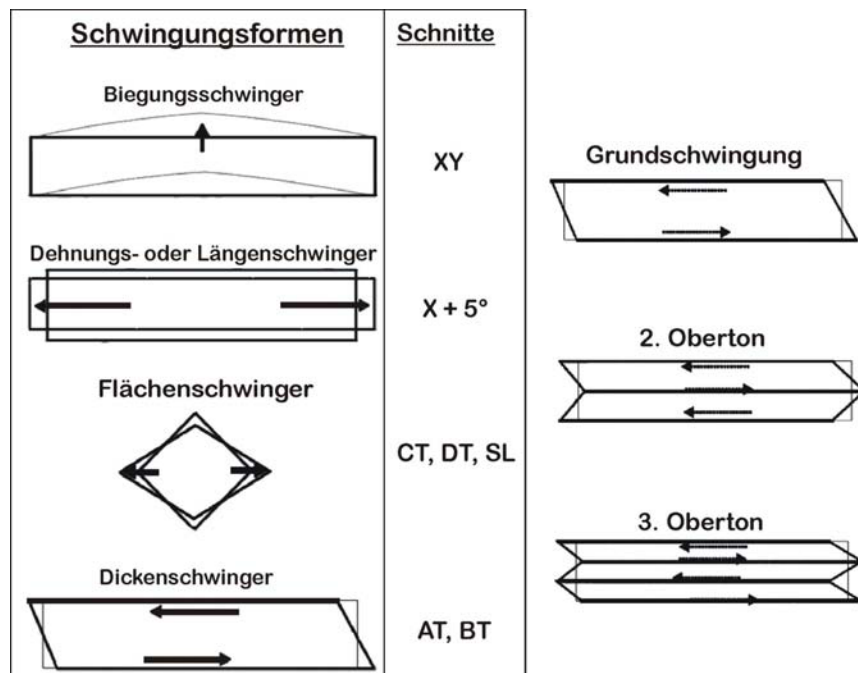


Abbildung 60 Schwingungsformen von Quarzkristallen (in Anlehnung an Produktinformationen der Firma Auris))

Um dies zu ermöglichen und einen geringen Temperaturkoeffizienten des Quarzes bei Raumtemperatur zu ermöglichen, kommen nur bestimmte Schnittrichtungen des Quarzes bezüglich seiner kristallographischen Achsen in Frage. QCM-Kristalle gehören zur der rotierten Y-Achsen-Schnittfamilie zu der auch die AT- und BT-Schnitte gehören (Abbildung 60). Der **AT-Schnitt** (Abbildung 61) wird bevorzugt für QCM-Kristalle verwendet, da er mit

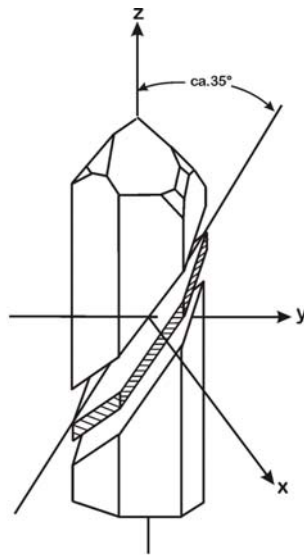


Abbildung 61 Quarz AT-Schnitt

einem Temperaturkoeffizienten von $\beta = - 1,10^{-6} \text{ K}^{-1}$ die geringste temperaturabhängige Frequenzverschiebung aufweist (bei $f = 5 \text{ MHz}$ beträgt die Temperaturabhängigkeit $\Delta f / \Delta T$ nur $- 5 \text{ Hz K}^{-1}$). Ändert man die Dicke des Kristalls durch die Aufbringung einer zusätzlichen Schicht verringert sich die Schwingungsfrequenz proportional zur Masse der aufgebrachtten Schicht. Eine resonante Oszillation erreicht man, indem man den Quarz in einen Oszillationsschaltkreis einbaut, in dem die elektrische und die mechanische Oszillation nahe bei der Fundamentalfrequenz des Kristalls liegen. Die Fundamentalfrequenz des Kristalls hängt von der Dicke des Kristallschnittes, seiner chemischen Struktur, Form und Masse ab. Wie Sauerbrey 1959 zeigte, hängt die Änderung der Resonanzfrequenz (f) in einfacher Weise mit der auf dem Quarz akkumulierten Masse (m) zusammen (Gleichung 8). Man findet:

$$\frac{\delta f}{f_0} \propto - \frac{\delta m}{m_q}$$

Gleichung 8

Für dünne Filme können vereinfacht

$$m_q = \rho_q \cdot d_q \quad \text{und} \quad d_q = \frac{v}{2 f_0}$$

Gleichung 9

Gleichung 10

gesetzt werden. Führt man für eine einfache akustische Welle im Festkörper den folgenden Term (Gleichung 11)

$$Z_q = \rho v = \sqrt{G\rho}$$

Gleichung 11

ein, wobei $Z_q = 8,8 \cdot 10^6 \text{ kg/m}^2\text{s}$, die akustische Impedanz (Materialkonstante) ist; läßt sich mit δm = Massenbelegung per Einheitsfläche, f = gemessene Frequenz und f_n = Frequenz der n'ten Harmonischen des reinen Quarzkristalls (f_0 ist die fundamentale Meßfrequenz, in dieser Arbeit 5 MHz) die **Sauerbrey Gleichung**^[1172, 1173] formulieren:

$$\frac{\delta f}{f_0} = -\frac{2 f_0}{Z_q} \delta m$$

Gleichung 12

Aus ihr folgt die akustische Dicke $d_{ac, f}$ der dielektrischen Zusatzschicht mit

$$d_{ac, f} = -\frac{\delta f}{f} \frac{Z_q}{2 f_0 \rho}$$

Gleichung 13

(Gleichung 13) wobei ρ die Dichte der dielektrischen Schicht auf dem Quarz ist.

Analysiert man zusätzlich die halbe Halbbandbreite der Resonanzkurve mit Hilfe der Impedanzanalyse^[1174], sind zusätzliche Aussagen über die viskoelastische Eigenschaften der dielektrischen Schicht möglich. Zur Messung der viskoelastischen Eigenschaften (vgl. **QCM-D Technology** (Q-Sense)) wird der Oszillatorstromkreis in regelmäßigen Intervallen unterbrochen und der Abfall der sinusoidalen frequenzmodulierten Quarzamplitude gemessen. Die Dissipationsenergie ist ein Maß für die Viskoelastizität und gibt Auskunft über die

mechanische Kopplung der auf der Quarzoberfläche befindlichen Moleküle. Ist die Lipidschicht kovalent an den Quarz gebunden, besteht eine starke mechanische Kopplung zur Oberfläche. Die Energiedissipation ist sehr gering. Sind dagegen Vesikel durch Vermittlung eines Wasserfilms durch Physisorption an die Oberfläche gebunden, ist die Kopplung/Anbindung an die Oszillatoroberfläche schwach und die Energiedissipation durch das zusätzliche Schwingungselement größer. Folglich ist die Bestimmung der Energiedissipation eine gute Möglichkeit die Membranbildung und die Vesikelfusion zu verfolgen und Hinweise auf adsorbierte Vesikel zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wird mit Hilfe eines Netzwerkanalysators (Hewlett-Packard, Modell 4396A) innerhalb eines Frequenzfensters um die Resonanzfrequenz des Quarzes gemessen. Trägt man die Leitfähigkeit gegen die Frequenz auf, erhält man die Resonanzfrequenz und die Halbbandbreite auf halber Höhe Γ durch Anpassen der Resonanzkurve mit der Lorentzfunktion. Die Bandbreite steht in direktem Zusammenhang mit der Dissipation der Schicht D:

$$D = \frac{2 \Gamma}{f_0}$$

Gleichung 14

Die Geräte werden dabei mit einer in der Literatur beschriebenen Software gesteuert^[1175], die die Aufzeichnung von 0.1 – 1 Datensätzen pro Sekunde mit einer Auflösung im Angströmbereich erlaubt. Die Quarzmeßzelle besitzt einen Quarz (Fundamentalfrequenz $f_0 = 5$ MHz, polierte Goldelektroden, Maxtek) der horizontal in einem Halter (Maxtek, Modell CHF200) eingebaut ist und die Aufzeichnung von QCM-D - Messungen auf der Goldoberfläche (Rauigkeit < 5 nm) in Flüssigkeitsvolumina von 1 mL erlaubt. Die Dichte der verwendeten Lipide auf der Oberfläche wird dabei mit 1.2 g cm^{-3} angenommen.

Anwendung findet die QCM in einem weiten Spektrum wissenschaftlicher Fragestellungen: (1) Proteinadsorption/-desorption^[1176], (2) Zelladhäsion^[1177], (3) Protein-Protein-Wechselwirkung^[1178, 1179], (4) Relaxation von Polymeren^[1180], (5) Vesikelfusion^[689], (6) pharmazeutische Wirkstoffanalyse^[1181], (7) DNA-Biosensoren^[1182] und weitere biologische Anwendungen.^[1183, 1184]

4.6 Spontane-Desorption-Flugzeit-Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen gehören zu den Standardmethoden der modernen Analytik organischer und anorganischer Verbindungen. Untersuchungen von fester Materie

oder von Adsorbaten die nicht in eine Matrix eingebracht werden können (Voraussetzung zur Massenbestimmung mit der MALDI-TOF MS-Methode) stellen besondere Anforderungen an die Meßmethode. Untersuchungen dieser Art sind in der Industrie und Forschung etablierte Verfahren.^[1185, 1186]

Die **massenspektroskopische Untersuchung von an Oberflächen** gebundenen molekularen Architekturen oder komplex aufgebauten supramolekularen Systemen lassen sich nicht mit den üblichen massenspektroskopischen Methoden wie zum Beispiel FD-MS oder MALDI-TOF MS untersuchen. Das Problem besteht darin, die zur untersuchenden Moleküle in die Gasphase zu überführen, zu ionisieren und anschließend alle auftretenden Ionen möglichst parallel zu detektieren. Zusätzlich ist es für Oberflächenarchitekturen oft wünschenswert den molekularen Aufbau beizubehalten und das System nicht in homogene Lösungen zu überführen. Eine Desorption von Molekülen aus der Oberflächenschicht erlaubt zusätzlich Aussagen über die chemische Zusammensetzung entlang des Tiefenprofils der Probe. Die in der MS oft angewandten Desorptionsmethoden sind für Oberflächen oft ungeeignet. Die thermische Verdampfung durch Aufheizen der Probe führt rasch zur chemischen Veränderung der Probe und die Desorption im elektrischen Feld läßt sich nur durch hohe Feldstärken bewerkstelligen die extrem kleine Krümmungsradien der Probe bzw. des Probenträgers verlangen – unvereinbar mit der Verwendung planarer Probensubstrate. Dagegen führt der Beschuß mit Ionen oder Neutralteilchen ebenso wie mit Photonen immer zu einem Materialabtrag von der Oberfläche unter der Entstehung von Neutralteilchen und Ionen. Der anschließende Schritt der Separation und Analyse der desorbierten Teilchen soll unter paralleler Erfassung aller Massenfragmente erfolgen. Als Methode der Wahl bietet sich die Flugzeitmassenspektrometrie (*engl. Time Of Flight Mass Spectrometry*, TOF-MS) an. Die zu analysierenden Ionen erhalten alle die gleiche kinetische Energie durch die Beschleunigung im elektrischen Feld wodurch auf Grund der unterschiedlichen Massen unterschiedliche Partikelgeschwindigkeiten erzielt werden. Dadurch resultieren verschiedene Flugzeiten für unterschiedliche Massen die zur Bestimmung der Masse des Teilchens herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Spontane-Desorptions-Massenspektrometrie in Kombination mit der Flugzeittechnik (TOF) zur massenspektrometrischen Analyse von Oberflächenarchitekturen auf planaren Festkörperoberflächen verwendet.^[1187, 1188]

Spontane Desorptions-Flugzeit-Massenspektrometrie (SDMS)

Die „spontane Desorption“ (SD) ist ein zweistufiger Prozess. Abbildung 62 zeigt die einzelnen Prozesse und den schematischen Aufbau des SDMS-Spektrometers:

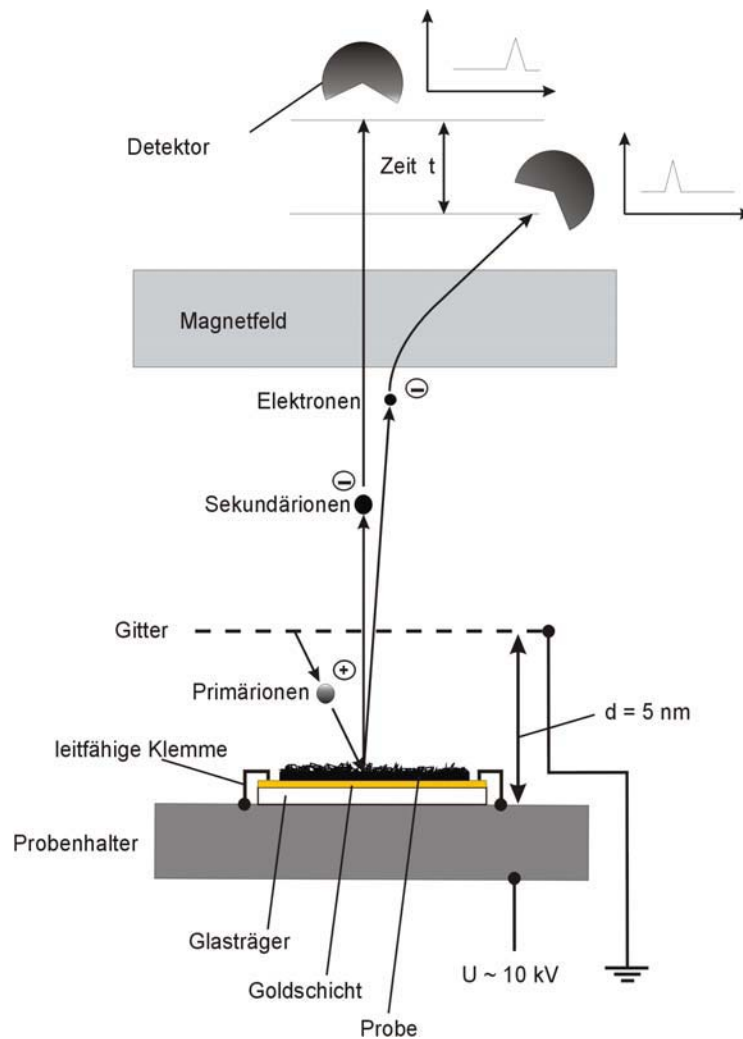


Abbildung 62 SDMS: Funktionsprinzip und Aufbau

Der erste Schritt besteht in der Erzeugung von Primärionen (PI^+). Diese werden durch die Felddesorption von Adsorbaten an den Kanten des Beschleunigungsgitters erzeugt (die Verzerrung des elektrischen Feldes sorgt für lokale Feldstärken oberhalb der Felddesorptionsschwelle), die aus Restgasen der in der Vakuumkammer befindlichen Kohlenwasserstoffe stammen. Der zweite Schritt stellt den ablativen Desorptionsprozess dar. Die bei negativer Probespannung positiv geladenen Primärionen werden in einem Beschleunigungsfeld (Probespannung $U \approx -10 \text{ kV}$ bei einem Proben-Gitter-Abstand von $d = 5 \text{ mm}$) auf die Probe hin beschleunigt und erzeugen dort simultan Sekundärionen und Elektronen. Die Sekundärionen und Elektronen werden zum Gitter hin beschleunigt, driften in den feldfreien Raum und können mit dem Detektor nachgewiesen werden.

Zur Aufnahme des Flugzeit-Massenspektrums müssen simultan zu den Sekundärelektronen Triggerteilchen emittiert werden. In diesem Messaufbau sind dies bei der Verwendung einer negativen Probenspannung die erzeugten Elektronen. Unter dem Einfluß eines Magnetfeldes werden die leichten Elektronen (e^-) aus der Bahn der schweren Sekundärionen (SI) gelenkt und treffen auf den Startdetektor. Unter diesen Bedingungen werden die Sekundärionen (SI) nur unwesentlich aus der Bahn gelenkt. Die Zeitspanne zwischen Ereignis der Elektronendetektion am Startdetektor und dem Auftreffen der Sekundärionen (SI) auf den Proben- bzw. Stopdetektor wird gemessen und mit Hilfe der Beziehungen in Gleichung 12 und 13 mit der Ionenmasse korreliert.

$$t \propto \sqrt{\frac{m}{U}}$$

Gleichung 15

mit $m \propto t^2$

Gleichung 16

Unter der Annahme, daß alle Teilchen die gleiche kinetische Energie ($E = \frac{1}{2} mv^2$) besitzen, kann die Flugzeit der einfach negativ geladenen Ionen mit der Masse der Teilchen mit Hilfe der Gleichungen 12 und 13 korreliert werden. t ist dabei die Flugzeit der erzeugten Sekundärionen (SI), m deren Masse, U die Probenspannung (≈ -10 keV) und L deren Driftstrecke im Probenrohr. Der dadurch bestimmbare Quotient m/Z wird auch als Sekundärionenmasse bezeichnet. Details sind in den Arbeiten von Peter Wohlfahrt^[1187, 1188] und Stefan Krämer^[1189] beschrieben.

Der Kernprozess der spontanen Desorption (SD) ist das Zerstäuben der Probe durch Ionen im keV-Bereich auf dem auch die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) beruht. Die SD unterscheidet sich von der SIMS in der Erzeugung und Art der Erzeugung von Primärionen. Im Fall der SD sind die Primärionen im wesentlichen die oben beschriebenen Molekülionen unbekannter Zusammensetzung, Anzahl und Energie, Parameter die sich nicht vorherbestimmen lassen. Bei der SIMS werden dagegen meist atomare Primärionen verwendet, die mit definierter Chemie und Energie auf die Probe gelenkt werden. Dies hat den Vorteil quantitative Aussagen über die Probenbeschaffenheit zu erleichtern. Die Nachweisgrenze der SIMS liegt bei etwa 10^6 Molekülen pro cm^2 .^[1190] Mit den verwendeten keV-Primärionen werden quasimolekulare Sekundärionen organischer Proben aus einer Tiefe von bis zu 200 Å emittiert.^[1191] Die höchsten Ausbeuten an Sekundärionen erhält man für organische Substanzen

unter keV-Ionenbeschuss auf (Ag, Au, Pt).^[1192] Die Molekülionenausbeute an deprotonierten Molekülionen (M-H)⁺ ist bei SIMS von der Schichtdicke abhängig und für Monolagen am größten. Sie nimmt mit steigender Schichtdicke ab und bleibt ab ca. 200 Å konstant.^[1193, 1194] Durch die dickenabhängige Signalintensität innerhalb der ersten 20 nm der zu untersuchenden Oberflächenarchitekturen und relativ großer Sensitivität (schon 10.000 Moleküle pro Quadratmillimeter d.h. ein Molekül auf einer Fläche von 10^{10} Å² mit einem Abstand von ca. 100 nm von Molekül zu Molekül lassen sich nachweisen!) eignet sich die SDMS- und die SIMS-Methode auch zur Bestimmung von Orientierungstendenzen funktioneller Gruppen innerhalb einer selbstorganisierten Monoschicht. Diese Möglichkeit ist besonders für die Analyse makromolekularer Monolagen (z.B. von Glycolipopolymeren) auf Goldoberflächen von Interesse und wird im Zusammenhang mit dieser Fragestellung im Rahmen der Arbeit angewendet.

4.7 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie auch bekannt als ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Application (ursprünglich: Analysis)), wird auch als Röntgen (X-ray)-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS), Röntgen-Photoemissionsspektroskopie XPES und weniger häufig als Photoelektronen Spectroscopy of the Inner Shell (PESIS) bzw. (PES) bezeichnet.

Die Elektronenspektroskopie, mit deren Hilfe Bindungszustände analysiert werden können, beruht auf dem **photoelektrischen Effekt**. Wird eine Substanz Röntgenstrahlung der Energie $h\nu$ ausgesetzt, so sind zwei verschiedene Wechselwirkungen möglich.

Einerseits gibt es die Absorption der Röntgenstrahlung und anschließende Emission mittels Röntgenfluoreszenz. Andererseits kann, wenn die Röntgenstrahlung energiereich genug ist, ein kernnahes Elektron aus dem Atomverband herausgeschlagen werden. In diesem Fall kommt es zum direkten Austritt eines Photoelektrons (XPS-Prozeß) und es fällt ein Elektron aus einer energetisch höheren Lage in das entstandene Loch zurück. Durch Abgabe dieser Energie wird ein drittes Elektron, das sogenannte Auger-Elektron, aus dem Atomverband herausgelöst.

Beide Elektronen, sowohl das "XPS-Elektron" aber auch das "Auger-Elektron", können bezüglich ihrer kinetischen Energie analysiert werden. Aus diesen Daten ermittelt man, nach Vergleich mit tabellierten Werten, welches **Element** durch die Röntgenstrahlung „tiefen“-ionisiert wurde.

Nach Gleichung 14 hängt die kinetische Energie E_{kin} des austretenden Photons von der Energie des eingestrahnten Photons $h\nu$ und der Bindungsenergie E_B des XPS - Photons im Atom ab. (siehe auch Abbildung 63)

$$h\nu = E_{kin} + E_b$$

Gleichung 17

Nachdem das Photoelektron die Bindungsenergie der Probe (E_B^P) bis zum Fermi-Niveau und die Austrittsarbeit $e\Phi^P$ (nach EINSTEINS Frequenzgesetz) ins Vakuum überwunden hat, besitzt es die kinetische Energie E_{kin} gegenüber der Probe. (Abbildung 63) Die Austrittsarbeiten $e\phi$ von Analysator und Probe sind selten genau bekannt, es genügt jedoch die Austrittsarbeit $e\phi^A$ des Analysators zu bestimmen, da die Fermi-Niveaus durch elektrische Kontaktierung gleich sind.

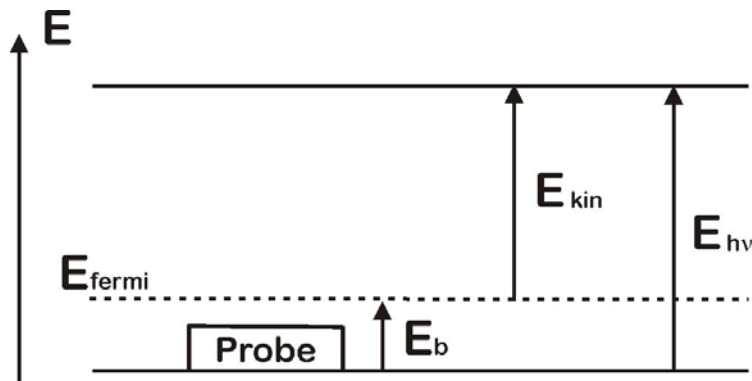


Abbildung 63 Verallgemeinertes Energiediagramm der XPS-Energieübergänge

Durch Vermessen einer leitenden Probe mit bekannter Bindungsenergie wird $e\phi^A$ bestimmt. Somit erhält man Gleichung 15 zur experimentellen Ermittlung der Bindungsenergie der Probenatome E_B^P . Die auftretenden Abweichungen der Bindungsenergie zwischen Experiment und Referenz werden elektronisch korrigiert.

$$h\nu = E_B^P + e\phi^A + E_{kin}^A$$

Gleichung 18

Die zugängliche Informationstiefe zur Bestimmung der **Probenzusammensetzung** hängt mit der Ausdringtiefe der Photoelektronen zusammen. Röntgenstrahlen können ohne weiteres

einige μm und tiefer in Metalle eindringen. Der Grund für die Verwendung von XPS als Untersuchungsmethode für Oberflächen hängt wesentlich mit der Ausdringtiefe der Photoelektronen zusammen. Diese ist für unterschiedliche Materialien bestimmt worden. Hierbei zeigt sich, daß die mittlere freie Weglänge der Elektronen von deren kinetischen Energien abhängt. Seah und Dench fanden empirisch für die Beschreibung der mittleren freien Weglänge folgende Gleichungen.^[1195]

$$\lambda_m = \frac{538}{E_{kin}^2} + 0,41\sqrt{aE_{kin}}$$

Gleichung 19

$$\lambda_m = \frac{2170}{E_{kin}^2} + 0,72\sqrt{aE_{kin}}$$

Gleichung 20

Gleichung 16 gilt hierbei für Elemente, während Gleichung 17 für anorganische Substanzen gilt. Dabei ist der Faktor „a“ die Schichtdicke in nm. Elektronen im Bereich von 10 bis etwas 1400 eV haben eine relative Reichweite von 1-5 nm.^[1196] Photoelektronen mit diesen kinetischen Energien stammen hauptsächlich aus den obersten Schichten der Probe.

Eine weitere Möglichkeit die Oberflächenempfindlichkeit der Untersuchungsmethode zu steigern, ist die winkelabhängige Photoelektronenspektroskopie AR-XPS (*engl. Angle-Resolved-XPS*). Bei dieser Methode wird der Eintrittswinkel der Röntgenstrahlung und damit der Austrittswinkel der Photoelektronen variiert.

Die Ausdringtiefe der Photoelektronen ist proportional zu $E_{kin}^{1/2}$. Somit ist für Photoelektronen eines diskreten Niveaus der Weg durch die Schicht abhängig vom Winkel θ zwischen der Flächennormalen der Probe und dem Analysatoreintrittspalt. Durch Variation des Winkels θ ist es möglich ein zerstörungsfreies Tiefenprofil zu erstellen. Hiermit kann man den **lagenweisen Aufbau einer Probe** untersuchen. Jedes Signal erfährt eine Selbstschwächung und wird darüber hinaus durch die darüberliegende Schicht abgeschwächt.

Chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung der einzelnen Peaks der Photoelektronenenergie (aufgetragen als deren Bindungsenergie in eV) hängt von zwei Faktoren ab. Erstens der Kernladung und damit von der **Atomspezies** und zweitens vom **Bindungszustand** des entsprechenden Atoms, bzw. Ions. In erster Linie wird die chemische Verschiebung durch die Bindungsenergie der Elektronen bestimmt, die hauptsächlich von der Kernladung abhängt. Dies erlaubt die

qualitative Analyse der Probenoberfläche bezüglich der vorkommenden chemischen Elemente.

Die chemische Verschiebung des Signals wird aber auch durch das auf das Elektron wirkende Potential des Kerns und dessen Abschirmung durch andere Elektronen beeinflusst. Die Verschiebung der Elektronenverteilung erlaubt Rückschlüsse auf den Bindungszustand des Atoms oder Ions und hängt von der chemischen Umgebung des Atoms oder Ions ab (Bindungszustand und Art der chemischen Nachbaratome).

Bei Verbindungen von Elementen unterschiedlicher Elektronegativität (z.B. Metallen mit Sauerstoff), sind die Bindungselektronen stärker zum elektronegativeren Bindungspartner verschoben. Dies führt zu einer Erhöhung der effektiven Kernladung, so dass sich die Rumpfelektronen der Metallatome in einem stärkeren Coulombfeld aufhalten und entsprechend fester gebunden sind. Diese Elektronen verlassen die Probenoberfläche mit niedrigeren kinetischen Energien, so dass das Signal im Spektrum zu einer höheren Bindungsenergie verschoben erscheint.

Das Integral der Signalintensität, erlaubt Aussagen über die **quantitative Zusammensetzung** der Probe durch Vergleich der Integralflächen. Meist wird das Verhältnis zweier Peakflächen verglichen und deren stöchiometrisches Verhältnis bestimmt. Über das Lambert-Beersche Gesetz ist die Signalintensität mit der Schichtdicke der Probe korreliert die durch den Vergleich der unbeschichteten mit einer beschichteten Probeoberfläche bestimmt werden kann.

4.8 Elektrochemische Impedanzspektroskopie & Cyclovoltametrie

Die Untersuchung von Grenzflächen kann heute mit einer Reihe sensitiver Methoden durchgeführt werden. Dabei nehmen elektrochemische Methoden eine bedeutende Rolle ein.^[1197] Analysierbare Grenzflächen können hierbei aus Monolagen und Mehrschichtsystemen einfacher oder komplexer Zusammensetzung aufgebaut sein. Durch die Möglichkeit gekoppelte Prozesse, die mit einer unterschiedlichen Zeitkonstante ablaufen analysieren zu können, eignet sich die Impedanzspektroskopie (IS) zur Analyse einer Vielzahl gekoppelter elektrochemischer Prozesse die gerade bei biologischen Prozessen von Bedeutung sind. Auf Grund der **großen Empfindlichkeit** der Methode **für kleine Änderungen der Kapazität**, eignet sie sich in herausragender Weise für die Analyse der Ionenpermeabilität von biologischen Membranen durch passiven Transport oder Membranproteine. Darüber hinaus stellt sie eine empfindliche Methode für die Detektion von Membrandefekten dar. Schon eine

geringe Anzahl an Membrandefekten, die nicht ohne weiteres mit optischen Methoden detektierbar sind, führen zu einer kapazitiven Änderung der Membran.

Theoretische Grundlagen: Die elektrische Doppelschicht

Steht eine Elektrodenoberfläche im Kontakt mit einem Elektrolyten, so kommt es an der Grenzfläche der Elektrode zu einer Kompensation der Oberflächenladung durch entgegengesetzt geladene Ionen. Diese bilden eine elektrochemische Doppelschicht aus. Zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen den geladenen Schichten werden im Wesentlichen drei Modelle verwendet. Das einfachste **Modell von Helmholtz** formuliert eine starre elektrolytische Doppelschicht, die aus einer der Elektrodenoberfläche zugewandten starren Schicht aus Kationen (auch als „*inner Helmholtz plane*“ IHP bezeichnet) und einer weiteren, weniger dicht gepackten Schicht hydratisierter Anionen (auch als „*outer Helmholtz plane*“ OHP bezeichnet) aufgebaut ist. (siehe auch Abbildung 64) Aus diesem Grund bezeichnet man dieses Modell auch als Modell der „starrten Doppelschicht“.^[1198] Zwischen IHP und OHP fällt das Potential linear ab und bleibt erst außerhalb der OHP im freien Elektrolyten konstant. Da die Ladungsschwerpunkte der positiven und negativen Ladungen innerhalb einer Fläche liegen, kann die elektrische Doppelschicht als ebener Plattenkondensator beschrieben werden:

$$C = \frac{Q}{U} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d}$$

Gleichung 21

Man unterscheidet zwischen spezifisch adsorbierten Ionen, die durch das Fehlen ihrer Hydrathülle dichter an der Oberfläche angelagert sind, und unspezifisch adsorbierten Ionen, die durch ihre Hydrathülle eine geringere Oberflächenladungsdichte aufweisen und sterisch anspruchsvoller sind. Das Helmholtz-Modell eignet sich, um die vor einer Elektrode auftretende Raumladungsverteilung zu beschreiben und die Kapazität zu berechnen. Da das Modell von starren Schichten ausgeht, berücksichtigt es keine Wärmebewegung.

Im **Gouy-Chapman-Modell** werden die thermischen Bewegungen der Ionen und Lösungsmittelmoleküle berücksichtigt. Durch die thermische Bewegung der Ionen und Moleküle kommt es mit zunehmendem Abstand von der Elektrodenoberfläche zu einer diffusen Verteilung der Ionen. Die ganze elektrische Doppelschicht kann daher auch als diffuse Raumladung behandelt werden. Man bezeichnet das Modell daher auch als Modell der „**diffusen Doppelschicht**“. Ein Nachteil des Gouy-Chapman-Modells liegt in der

ausschließlichen Berücksichtigung der Coulomb-Wechselwirkungen und der Annahme kontinuierlicher Oberflächenladungen. Gerade in verdünnten Elektrolyten liegen aber weder ausschließlich eine starre, noch eine diffuse Doppelschicht vor.^[1199]

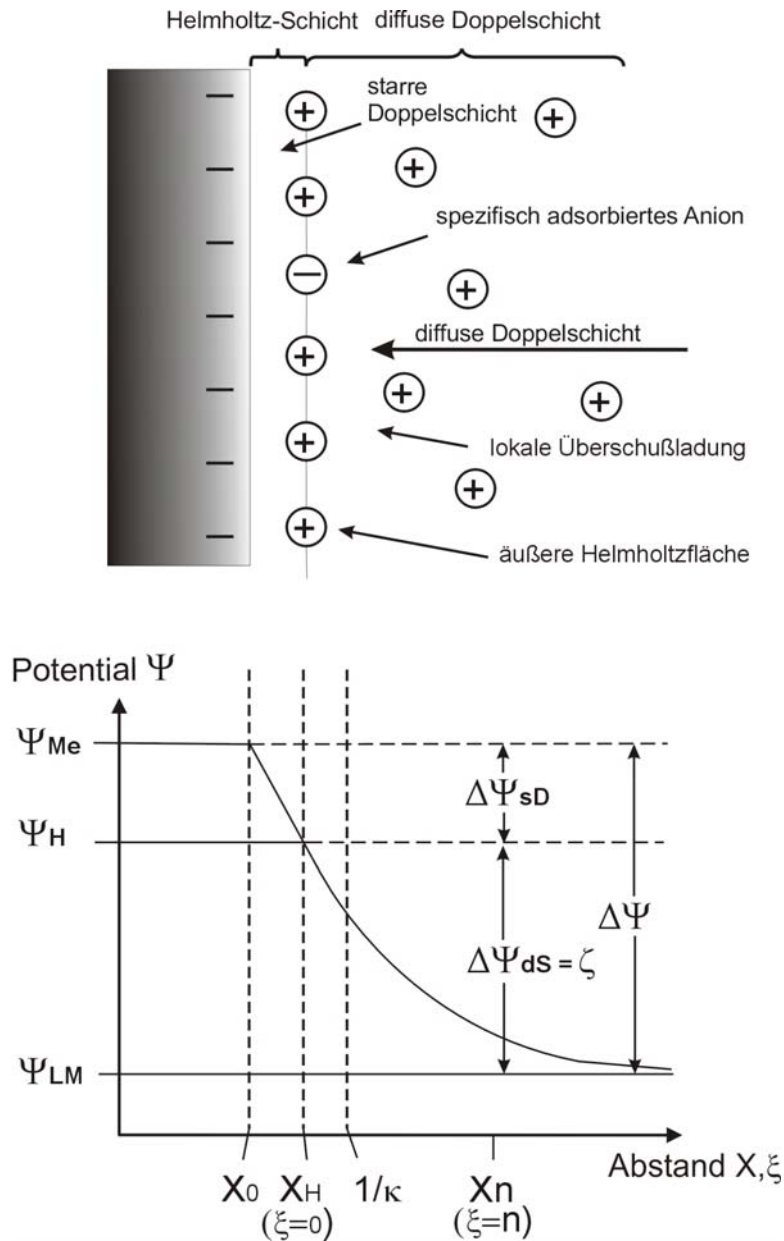


Abbildung 64 Graphische Darstellung des Potentialverlaufs zwischen Elektrode und Elektrolyt. Im Helmholtz-Modell verläuft die zwischen Ψ_{Me} und Ψ_H linear abfallende Kurve horizontal weiter, die Annahme einer diffusen Doppelschicht entfällt. Die komplette Darstellung entspricht dem Stern'schen Modell und dessen Potentialverlauf. (sD=starre Doppelschicht, dS=diffuse Doppelschicht, Me=Metall, H=Helmholtz-Schicht, LM=Lösungsmittel)

Geht man davon aus, daß sich nur die erste Doppelschicht nahezu starr verhält, und die Beweglichkeit der Ionen mit zunehmendem Abstand von der Elektrodenoberfläche zunimmt, kommt man der realen Situation sehr nahe. Die Kombination der beiden Modelle führt zum sogenannten **Stern'schen Modell**. Innerhalb der Stern'schen Doppelschicht fällt das Potential zwischen der IHP und der OHP durch die relativ starr adsorbierten Ionen linear auf einen bestimmten Wert ab. Das an dieser Grenzfläche auftretende Oberflächenpotential wird in Abbildung 64 als Ψ_H bezeichnet. In der darauf folgenden diffusen Doppelschicht fällt das Potential Ψ exponentiell auf den Wert des Elektrolyten Ψ_{LM} ab.^[1200]

Das Galvanipotential $\Delta\Psi$ zwischen der Elektrode Ψ_{Me} und dem Inneren der Elektrolytlösung Ψ_{LM} setzt sich wie folgt aus den Einzelpotentialen zusammen:

$$\Delta\Psi = (\Psi_{ME} - \Psi_H) + (\Psi_H - \Psi_{LM}) = \Delta\Psi_{sD} + \Delta\Psi_{dS}$$

Gleichung 22

Eine wichtige biophysikalische Größe ist die Potentialdifferenz zwischen der äußeren Helmholtz-Schicht und dem Inneren des Elektrolyten, die auch als **Zeta-Potential** ζ bezeichnet wird. Betrachtet man die Grenzfläche in molekularen Dimensionen, so stellt man fest, daß sich in der Nähe der Grenzfläche stets eine dünne Schicht von Lösungsmittelmolekülen und in Lösung befindliche Ionen in Ruhe befindet. Das Zeta-Potential wird als das Potential bezeichnet, das an der Scherfläche (der Grenzfläche zwischen der unbewegten Lösungsmittelgrenzschicht und dem Elektrolyten) herrscht.^[1121] Zu den elektrokinetischen Effekten tragen daher nur die Potentiale an den Scherflächen bei.

Einfluß von Defekten der Lipidmembran auf die Kapazität von Goldelektroden

Beschreibt man eine planare Goldelektrode die sich in einer Elektrolytlösung befindet nach Helmholtz als ebenen Plattenkondensator, besitzt die Gold/Elektrolyt-Grenzfläche eine spezifische Kapazität von etwa **30 $\mu\text{F cm}^{-2}$** . Ist die Goldelektrode vollständig mit einer dünnen, isolierenden und dielektrischen Schicht modifiziert, so erhöht sich die Gesamtkapazität der modifizierten Goldoberfläche durch dieses zusätzliche, „in Serie geschaltete“ Element. Die Schichtkapazität ist nach Gleichung 24 durch die Dicke d und die Dielektrizitätskonstante des Films (für Lipidmembranen etwa **0,4 bis 1 $\mu\text{F cm}^{-2}$**) gegeben. Zusätzlich muß zu Berechnung der Gesamtkapazität noch die Kapazität der Elektrolytdoppelschicht, die für hohe

Elektrolytkonzentrationen ($c > 0,1 \text{ M}$) größer als $100 \mu\text{F cm}^{-2}$ ist, addiert werden. Letztere fällt damit in einer Serienschaltung nicht ins Gewicht.^[1201]

$$C = \Theta \cdot C_{\text{Dielekt}} + (1 - \Theta) \cdot C_{\text{Au}}$$

Gleichung 23

$$C_{\text{Dielekt}} = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0}{d}$$

Gleichung 24

Liegen teilbedeckte Elektroden vor, kann man über die Messung der Kapazität grob den Bedeckungsgrad Θ bestimmen.^[68, 1202] Da die Kapazität der elektrischen Doppelschicht auf einer Goldoberfläche mit etwa $30 \mu\text{F cm}^{-2}$ um ein vielfaches größer ist, als die Kapazität des Dielektrikums, dominiert diese bei Defekten schnell die Gesamtkapazität. Liegen die Defekte parallel zum intakten Dielektrikum als sogenannte „pinholes“ vor, so ergibt sich die gemessene spezifische Kapazität aus dem Bedeckungsgrad nach Gleichung 23. Wählt man zur Verdeutlichung des Effekts ε mit 2,5, so erhält man für eine Schichtdicke von 5 nm bei:

- 100 % Bedeckung eine Kapazität von $0,44 \mu\text{F cm}^{-2}$,
- 99,6 % Bedeckung eine Kapazität von $0,56 \mu\text{F cm}^{-2}$,
- 99,0 % Bedeckung eine Kapazität von $0,74 \mu\text{F cm}^{-2}$,
- 97,0 % Bedeckung eine Kapazität von $1,33 \mu\text{F cm}^{-2}$,
- 95,0 % Bedeckung eine Kapazität von $1,92 \mu\text{F cm}^{-2}$.

4.8.1 Zyklische Voltammetrie (CV) – Reduktive Desorption

Mit Hilfe der zyklischen Voltammetrie (*engl. Cyclic voltammetry*) ist es möglich **Redoxprozesse** chemischer Substanzen in einem **definierten Potentialbereich** in Lösung zu untersuchen. Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von thermodynamischen Größen (Redoxpotentiale), zur Verifikation elektrochemischer Reaktionsmechanismen und der Analyse von Kinetiken von homogenen und heterogenen Elektronentransferschritten.

In dieser Arbeit findet die zyklische Voltammetrie in erster Linie zur Bestimmung der Belegungsdichte mittels reduktiver Desorption von Thiolipid-SAMs Verwendung, Abschätzungen der Defektdichte sind ebenfalls möglich.

Ein typisches CV-Experiment läuft folgendermaßen ab: An einer stationären Arbeitselektrode wird ein sich zeitlich linear änderndes Potential angelegt, das von seinem Startwert über ein Umkehrpotential zu einem Endpotential läuft (Abbildung 65).

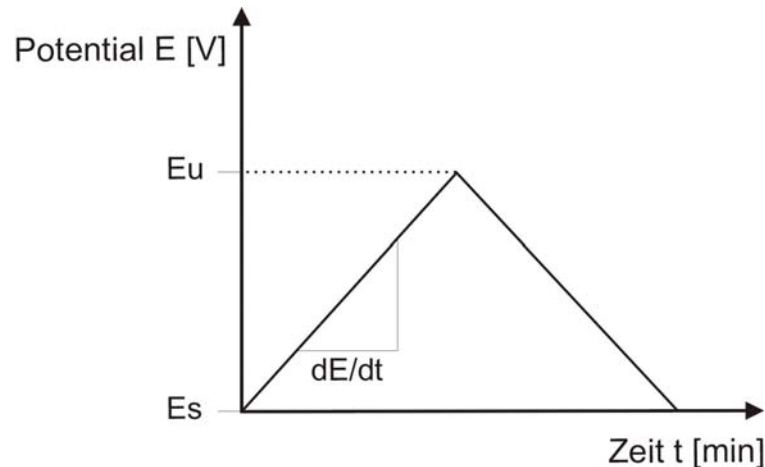


Abbildung 65 Spannungsrampe des Zyklovoltammogramms

Als Observable dient die resultierende Stromantwort. Ein komplettes Zyklovoltammogramm setzt sich aus zwei direkt aufeinander folgenden potentiodynamischen Messungen (LSV, *engl. Linear Sweep Voltammetry*) zusammen, die bei Bedarf mehrere Male hintereinander ausgeführt werden können.

Der Messaufbau kann in der **Zwei- oder Dreielektrodenanordnung** erfolgen. In der Dreielektrodenanordnung fließt der Strom über die Arbeits- und Gegenelektrode, während die Referenzelektrode stromlos bleibt, bzw. zum Abgreifen der Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode dient. Im Zweielektrodenaufbau bleibt die Referenzelektrode dagegen nicht stromlos und das gemessene Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode unterliegt dem Spannungsabfall ($IR_{\text{Lösung}}$) über die Lösung und wird vom Strom beeinflusst. Dieser Aufbau ist daher nur sinnvoll, wenn in Experimenten $IR_{\text{Lösung}}$ kleiner als 1 mV ist. Die Arbeitselektrode ist in dieser Arbeit stets die Goldoberfläche, die Gegenelektrode eine Platinelektrode und die Referenzelektrode eine $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{NaCl sat.}$ -Elektrode. Die Elektrodenmaterialien definieren hierbei den Typ der Elektrode. Man unterscheidet **ideal polarisierbare Elektroden (IPE)** und **ideal unpolarisierbare Elektroden**. Erstere lassen unabhängig vom angelegten Potential keinen Ladungstransfer über die Metall-Elektrolyt-Grenzfläche zu, was umgekehrt bedeutet, daß infinitesimale Ströme eine große Potentialänderung hervorrufen. Ideal unpolarisierbare

Elektroden, zu denen die zuletzt genannten Referenzelektroden zählen, ändern dagegen ihr Potential nicht wenn Strom über die Elektrode fließt. Sie besitzt daher ein konstantes Potential. Der Grad der Polarisierung ist durch die **Überspannung** $\eta = E - E^0$ gegeben.

Der Verlauf eines Zyklovoltammogrammes lässt sich am besten anhand eines Redoxpaares beschreiben. Dessen Verwendung ist aber nicht zwingend notwendig, wie weiter unten am Beispiel der reduktiven Desorption gezeigt wird.

Der Kurvenverlauf des Zyklovoltammogramms ist ein Resultat zweier kombinierter Elektrodenprozesse von **heterogenem Ladungstransfer** und **Stofftransport** zur Elektrode. Für ein reversibles Redoxpaar mit einem n-Elektronenübergang nimmt das zyklische Voltammogramm folgende Form an (Abbildung 66):

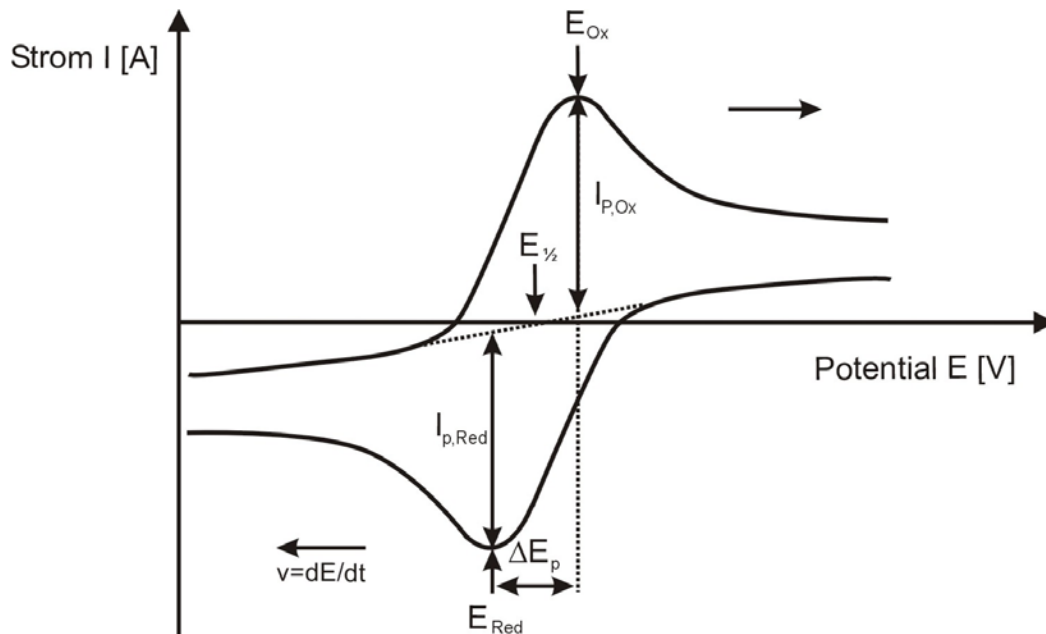


Abbildung 66 Zyklovoltammogramm eines Redoxpaares

Der Start des Zyklovoltammogramms beginnt mit dem Anlegen des Startpotentials, das deutlich positiver ist als das Reduktionspotential des Redoxpaares. Zuerst fließt ein nichtfaraday'scher Ladestrom I_c der zur Aufladung der elektrischen Doppelschicht auf der Elektrodenoberfläche führt (Gleichung 25).

$$I_c = \frac{E}{R} \cdot e^{-\frac{t}{RC}}$$

Gleichung 25

Parallel zum Aufbau der Doppelschicht schreitet das Potential mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit v , die auch als Scanrate bezeichnet wird, zu negativeren Werten fort. Es fließt ein geringer Ladestrom und die Reduktion des Stoffes an der Oberfläche setzt ein – ein kathodischer, faraday'scher Strom fließt. nichtfaraday'sche Ströme sind rein elektrostatischer Natur. Chemische Umwandlungen durch Elektronenübertrag treten nicht auf. Ein typisches Beispiel ist das Aufladen einer Helmholtz'schen Doppelschicht. Faraday'sche Ströme beruhen dagegen auf einer chemischen Umsetzung, der elektrische Strom der beim Anlegen einer geeigneten Spannung durch eine Elektrode fließt, ist mit der Stoffmenge der chemisch umgesetzten Substanz in Elektrodennähe proportional. Diese Aussage formuliert das **Faraday'sche Gesetz**:

$$I = \frac{q}{t} = \frac{z \cdot n \cdot F}{t}$$

Gleichung 26

I ist der geflossene Strom, q die Ladung, t die Zeit, z der Ladungswechsel der umgesetzten Substanz, n die umgesetzte Stoffmenge und F die Faradaykonstante ($9.6486 \cdot 10^4$ Coulomb). Der faraday'sche Prozeß beinhaltet zum einen den heterogenen Elektronentransfer durch die Elektrodengrenzfläche und den Stofftransport der redoxaktiven Substanz zur Grenzfläche. Die Form des Zykelvoltammogramms (siehe Abbildung 66) resultiert aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der beiden Prozesse zueinander. Zum **Stofftransport** tragen im Allgemeinen **Diffusion**, **Migration** und **Konvektion** bei. Die Migration, also die Bewegung geladener Teilchen entlang eines Potentialgefälles, läßt sich durch die Zugabe einer ausreichenden Menge Leitsalz minimieren. Bewegungen auf Grund thermischer oder mechanischer Einflüsse (Konvektion) können meist vernachlässigt werden, wenn es sich um ein kurzes Experiment ohne Rühren bei Raumtemperatur handelt. Einen signifikanten Beitrag zum Stofftransport liefert die Diffusion, die durch das **Fick'sche Gesetz** beschrieben wird. Der Konkurrenzprozeß, der heterogene Ladungstransfer, wird dagegen von der Butler-Volmer-Gleichung beschrieben. Je nachdem, wie das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Stofftransport k_{ST} und heterogenem Ladungstransfer k_{HT} zueinander liegt, unterscheidet man zwischen der reversiblen, diffusionskontrollierten Elektrodenreaktion ($k_{HT} \gg k_{ST}$) bei welcher der heterogene Ladungstransfer gegenüber dem Stofftransport schnell erfolgt, und einem irreversiblen Fall, wenn der Elektronentransfer den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Sowohl für diesen, aber auch für intermediäre Fälle (quasi-reversible Systeme) sind sowohl I_p als auch E_p eine Funktion der Vorschubgeschwindigkeit v und dem Durchtrittsfaktor

α . Die Peakseparation ΔE ist in diesen Fällen größer als $0,059/n$ V.^[1203, 1204] Im Fall der reversiblen Elektrodenreaktion befindet sich das System in Gleichgewichtszustand und es fließt somit kein Nettostrom. Damit vereinfacht sich die **Butler-Volmer-Gleichung** zur **Nernst-Gleichung**:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{\text{Ox}}}{c_{\text{Red}}}$$

Gleichung 27

Das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ und somit auch die Spitzenpotentiale, sind für den reversiblen Fall unabhängig von der Vorschubgeschwindigkeit v . Die Peakseparation beträgt bei 25°C $\Delta E = 0,059/n$ V. Die Spitzenströme I_p sind durch die **Randles-Sevich-Gleichung**

$$I_p = (2,69 \cdot 10^{-5}) \cdot n^{2/3} A D^{1/2} v^{1/2} c_0$$

Gleichung 28

gegeben und das Verhältnis $i_{\text{Ox}}/i_{\text{Red}}$ beträgt 1.

Mit fortschreitender Annäherung an das Reduktionspotential steigt der kathodische faraday'sche Strom an. Ist das Reduktionspotential erreicht und überschritten, ist die Elektrodenoberfläche derart an Spezies der oxidierten Form der Redoxpaars verarmt, daß der Strom nur noch durch den diffusionskontrollierten Stofftransport von weiteren oxidierten Molekülen zur Oberfläche hin und von reduzierten Molekülen von der Oberfläche weg kontrolliert wird. Aus dem diffusionskontrollierten Massentransport resultiert ein konstanter Grenzstrom. Im Zyklovoltammogramm macht sich diese Änderung in einer Reduktion des Stromes bemerkbar. Nach dem Durchlaufen der Potentialrampe in einer Richtung, wird die Potentialrampe in entgegengesetzter Richtung durchlaufen. Das an der Elektrode zuvor reduzierte Redoxpaar wird dadurch wieder zurückoxidiert. Für die hier auftretenden Prozesse gelten die analogen Phänomene.

Zur Beschreibung eines Zyklovoltammogrammes sind die Spitzenströme für den oxidativen und den reduktiven Prozess $I_{p,\text{Ox}}$ und $I_{p,\text{Red}}$, sowie die zu ihnen gehörenden Potentiale $E_{p,\text{Ox}}$ und $E_{p,\text{Red}}$, die wichtigsten Kenngrößen. Zusätzlich wird die Peakseparation ΔE zu:

$$\Delta E = E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}}$$

Gleichung 29

zwischen dem kathodischen und dem anodischen Prozess, sowie das Halbstufenpotential $E_{1/2}$.

$$E_{1/2} = \frac{E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}}}{2}$$

Gleichung 30

Es entspricht dem Redoxpotential E_0 wenn der elektrochemische Prozess nicht kinetisch gehemmt ist. Der Vorgang wird dann als elektroreversibel bezeichnet.

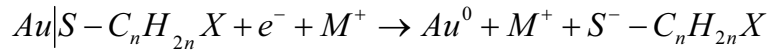
Zyklische Voltammetrie an modifizierten Elektroden

Ist die Goldelektrode mit einer dielektrischen Schicht modifiziert, wird der Zutritt der redoxaktiven Substanz zur Elektrodenoberfläche gehemmt. Das Zyklovoltammogramm ändert sich in folgender Weise: ΔE_p wird größer und $I_{p,\text{Ox}}$ und $I_{p,\text{Red}}$ werden kleiner. Im Falle vollständiger Bedeckung der Elektrodenoberfläche ist der Elektronentransfer blockiert und es wird kein faraday'scher Strom mehr gemessen. Das Ausmaß und die Überspannung faradayscher Ströme eines löslichen Redoxpaares kann zur Charakterisierung von modifizierten Elektroden bezüglich von „pinholes“ und Defekten verwendet werden. Als Pinhole bezeichnet man Stellen, an denen die reine Elektrode dem Elektrolyt ausgesetzt ist. Im Zyklovoltammogramm treten deutliche Strompeaks oder ausgeprägte Plateaus bei geringen Überspannungen auf. Diese Ströme sind faraday'scher Natur und werden meist durch Stofftransport kontrolliert. Als Defekte bezeichnet man hingegen Stellen, an welche der Elektrolyt näher an die Elektrodenoberfläche gelangen kann, als dies an den intakten Stellen der Fall ist. Dementsprechend liegen die Überspannungen zwischen denen von Pinholes und dem intakten Film.

Reduktive Desorption schwefelhaltiger SAMs

Die „Reduktive Desorption“ von Thiolen stellt eine elegante Methode zur Charakterisierung von leitfähigen Oberflächen bezüglich deren Belegungsdichte und der Zusammensetzung des SAMs dar. Führt man das Potential über einem Alkthiol-SAM auf einer leitfähigen Oberfläche in 0,5 M KOH (um die Wasserstoffabscheidung zu stärker negativen Potentialen als sie für die Thiolreduktion notwendig sind zu verschieben) zu negativen Spannungen, so taucht zwischen – 0,7 und – 1,4 V (gemessen gegen eine Ag|AgCl-Elektrode) der Reduktionspeak der Au-S-Wechselwirkung auf. Das Desorptionpotential hängt in erster Linie von der chemischen Nachbarschaft des Schwefelatoms ab, wobei besonders die Alkylkettenlänge durch die Ausbildung zweidimensional dicht gepackter Monolagen durch die hydrophobe Wechselwirkung zu einer signifikanten Stabilisierung des SAMs beiträgt.^[1205] Dadurch wird

das Desorptionspotential zu negativen Potentialen verschoben. Die Peakfläche des Reduktionspeaks hängt von der Belegung beziehungsweise der Zahl der mit der Goldoberfläche wechselwirkenden Thiolgruppen zusammen. Üblicherweise wird die an der Elektrodenoberfläche Reaktion folgendermaßen formuliert:^[1206-1209]



Für die Berechnung der Belegungsdichten aus den Desorptionspeakflächen sollten einige Einschränkungen beachtet werden.^[1210] Das Freisetzen blanker Goldoberflächen durch die Desorption des SAMs führt zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht mit einer großen Kapazitätserhöhung von ca. 0,5 auf 20-30 $\mu\text{F cm}^{-2}$.^[1211] Der dazu aufgewendete Ladestrom geht additiv in die Peakfläche ein und kann nur teilweise durch das Setzen einer Basislinie korrigiert werden.^[1212] Er wird auf maximal 20 % geschätzt.^[1213] Das während der Reaktion entstehende Thiolat bildet je nach Löslichkeit, Diffusionsgeschwindigkeit und der Scanrate nahe der Elektrodenoberfläche eine Akkumulationsschicht, aus der die Thiolate nach einer Erniedrigung des Potentials unter Ausbildung eines Oxidationspeaks reabsorbiert werden können.^[1214] Die Reproduzierbarkeit der Peaklage, -zahl und -fläche hängt von der Kristallinität und der flächenmäßigen Verteilung der einzelnen Kristallgittertypen zusammen.^[1201]

In Abhängigkeit von der kristallinen Beschaffenheit sind also Aussagen über die Zusammensetzung von SAMs möglich. Da durch das Vorhandensein verschiedener Kristallgittertypen polykristalliner Elektroden auch bei reinen SAMs eine einzige Verbindung zu mehreren sich überlagernden Reduktionspeaks führen kann, bietet sich die Arbeit mit Gold (111)-Elektroden an, um diesen Effekt zu vermindern. Unter der Verwendung von Goldelektroden die aus homogenen Kristallgittern und möglichst großer homogener Kristallterrassen aufgebaut sind, können auf Grund der Peakseparation Aussagen über die Domänenbildung bzw. die Phasenseparation der Moleküle innerhalb des SAMs gemacht werden (interessant bei der Verwendung binärer oder komplexer Mischungen). Sind die Desorptionspeaks lateral hinreichend separiert, so läßt sich aus dem Verhältnis der Peakflächen das Molenverhältnis der einzelnen Spezies eines Monolage experimentell bestimmen.^[1215] Mischungen die oberflächenaktive intramolekulare Disulfide enthalten komplizieren die Betrachtung.

4.8.2 Impedanzspektroskopie (IS)

Die Impedanzspektroskopie (IS) ist eine relativ neue und sehr vielseitig einsetzbare Methode zur Bestimmung der elektrischen und dielektrischen Eigenschaften dünner Schichten und komplexer Materialien. Dabei können die dünnen Schichten auch Grenzflächen zwischen fester und flüssiger Phase **leitender**, **halbleitender** und **nichtleitender** Natur sein.^[1197] Ein besonderer Vorteil der Methode liegt darin, daß sie auch zur Untersuchung von dynamischen Vorgängen gebundener und mobiler Ladungen in Feststoff- oder Grenzflächenregionen herangezogen werden kann. Damit eignet sich die Methode zur Untersuchung von festkörperunterstützten Lipidmembranen, wobei hier die flüssige Phase, das Umgebungsmedium, eine wäßrige Elektrolytlösung ist, die das physiologische Analogon des extrazellulären Mediums für die Lipidmembran darstellt. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit für Membrandefekte, bzw. Veränderungen in der Ionendurchlässigkeit der Membran durch funktionelle Membranproteine ist diese Meßmethode besonders gut geeignet um Aussagen über die Membranqualität zu machen, wo optische Methoden auf Grund der Auflösungslimitierung an Grenzen stoßen.

Die Impedanzspektroskopie bedient sich mehrerer experimenteller Methoden zu denen die Beobachtung der zeitlichen Stromantwort auf eine Spannungsänderung, das Registrieren eines Signals aus weißem Rauschen und die Registrierung der Impedanz beim Anlegen einer sinusidalen Spannung. Das letztere Meßprinzip wird im Rahmen dieser Arbeit angewendet. An das zu untersuchende System wird über die Arbeitselektrode ein Frequenzspektrum einer sinusidalen Wechselspannung mit der Frequenz ω und geringer Amplitude angelegt. Wird die Amplitude der Störung hinreichend klein gehalten, besitzt die Antwort die gleiche Frequenz, so daß die Strom-Spannungs Beziehung linearisiert werden kann.

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t)$$

Gleichung 31

Dadurch wird das System aus seiner Gleichgewichtslage gebracht und der resultierende Antwortstrom $I(t)$ auf die Störung mit seiner Amplitude I_0 und der Phase Φ aufgezeichnet:

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi)$$

Gleichung 32

Aus der anregenden Wechselspannung und der resultierenden Stromantwort resultiert ein **komplexer, frequenzabhängiger Wechselstromwiderstand**, der als **Impedanz** bezeichnet wird. Er lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$Z_\omega = \frac{E_\omega(t)}{I_\omega(t)} = \frac{E_0 \cdot \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \Phi)}$$

$$= |Z_\omega|(\cos \Phi + i \sin \Phi) = |Z_\omega| \cdot e^{i\Phi} = Z_\omega' + iZ_\omega''$$

Gleichung 33

Für den **Betrag der Impedanz** erhält man die beiden Gleichungen:

$$|Z_\omega| = \frac{E_0}{I_{0,\omega}}$$

Gleichung 34

$$|Z_\omega| = \sqrt{(Z_\omega')^2 + (iZ_\omega'')^2}$$

Gleichung 35

mit der folgenden Beziehung zwischen dem aus der Stromantwort resultierenden **Phasenwinkel Φ** und der Impedanz Z :

$$\tan \Phi = \frac{Z_\omega''}{Z_\omega'}$$

Gleichung 36

Zur Berechnung des **Realanteils** Z_{ω}' und des **Imaginärteils** Z_{ω}'' der Impedanz Z bei einer bestimmten Frequenz ν können die obigen Gleichungen (Gleichung 34, Gleichung 35 und Gleichung 36) verknüpft werden:

$$Z_{\omega}' = \frac{E_0}{I_{0,\omega}} \frac{1}{\sqrt{1 + \tan^2 \Phi_{\omega}}}$$

Gleichung 37

$$Z_{\omega}'' = \frac{E_0}{I_{0,\omega}} \frac{\tan \Phi_{\omega}}{\sqrt{1 + \tan^2 \Phi_{\omega}}}$$

Gleichung 38

Die Messungen erfolgen über einen bestimmten Frequenzbereich bei gleichbleibender Anregungsamplitude E_0 . Innerhalb bestimmter Frequenzintervalle werden bei jeder Wechselfrequenz der resultierende Strom $I_{0,\omega}$ und der dazu gehörende Phasenwinkel Φ gemessen. Das erhaltene Wertepaar Z_{ω}' und Z_{ω}'' dient zusammen mit dem Phasenwinkel Φ und der Frequenz ν zur Darstellung der Impedanzspektren. Die so erhaltenen Ergebnisse für den Widerstand und die Kapazität des Systems werden mit Hilfe von Ersatzschaltkreisen simuliert, in denen die Schaltelemente (Widerstand und Kondensator) analog eines elektrischen Schaltkreises in Reihe oder parallel, einzeln oder in Gruppen geschaltet sind. Jedes Elektroden-Meßzelle-System besitzt eine systemspezifische Kapazität und einen dazugehörigen Widerstand. Da diese Größen von der Messgeometrie/Anordnung/Material abhängen, bezeichnet man sie auch als geometrische Kapazität und Materialwiderstand. Die Zeit die das System benötigt, um wieder in den Gleichgewichtszustand zu kommen, bezeichnet man als **dielektrische Relaxationszeit** der Zelle τ mit $\tau=R \cdot C$. Die phasenverschobene Stromantwort setzt sich aus verschiedenen Zeitkonstanten zusammen, mit denen die gestörten Gleichgewichtszustände eines komplexen Systems in ein neues Gleichgewicht relaxieren. Im Fall eines homogenen Systems würde man nur eine Zeitkonstante erwarten. Liegen mehrere Zeitkonstanten vor, wie es bei heterogenen Systemen häufig der Fall ist, wird die Simulation erschwert, da die Meßwerte nur mit einer endlichen Zahl and Schaltelementen beschrieben werden können. Wenn das theoretische Modell zu viel unbekannte Variablen besitzt ist die Eindeutigkeit der Zuordnung vom Impedanzspektrum zum Modell nicht mehr gegeben!^[1216]

Eine Möglichkeit Inhomogenitäten und die hieraus resultierenden Verteilungen von Kapazitäten in einem System zu beschreiben, liegt in der Verwendung eines sogenannten „constant phase element“ auch CPE genannt:

$$Z = \frac{1}{C(i\omega)^\alpha}$$

Gleichung 39

Das CPE wird durch die beiden Parameter α und C bestimmt. Für einen idealen Kondensator besitzt $\alpha=1$ und man findet für die elektrische Doppelschicht auf rauen Elektroden häufig Werte zwischen 0.9 und 1. Die diffusionsbedingte Warburg-Impedanz lässt sich mit einem Wert für α von 0,5 simulieren. α wird auch als phänomenologischer Parameter bezeichnet, der in der Lage ist die Verteilung der Relaxationszeiten zu beschreiben. Für einen Wert von 0 entspricht das CPE-Element einem Widerstand. Vor allem durch Membranproteine, die durch ihre spezifische Zeitkonstante die Ionenpermeabilität der Membran verändern, kann ihr Einsatz vorteilhaft sein.

Impedanzspektren und deren Darstellungen

Die folgenden Darstellungen zur Erläuterung der Impedanzspektren und deren Interpretation basieren auf folgendem Schaltbild:

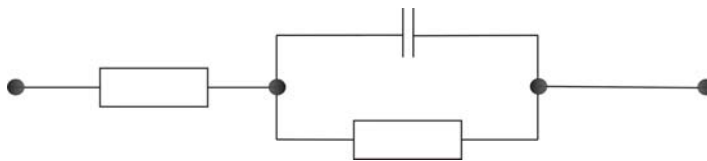


Abbildung 67 Ersatzschaltkreis – R_a –RC–

Im Ersatzschaltkreis sind ein Vorwiderstand R_a (Zuleitungen und Elektrolyt) sowie ein paralleles RC-Glied für die Lipidmembran gezeigt, wobei das CPE den Exponenten $\alpha=1$ besitzt. Es handelt sich also um eine idealisierte Darstellung. Eine mögliche Ergänzung des Schaltbildes besteht in der Einführung eines weiteren kapazitiven Elementes für die Helmholtz-Schicht am rechten Ende des Schaltkreises. Der prinzipielle Kurvenverlauf wird davon aber nicht beeinträchtigt und bei der Simulation eines realen Spektrums erlaubt die Verfeinerung

aber oft eine bessere Anpassung der simulierten Kurve an die Meßdaten. Es wird für die nachfolgenden Betrachtungen zu den grundlegenden Darstellungen der Impedanzspektren ausgelassen.

Gängige Auftragungen von Impedanzspektren sind die sogenannte Ortskurve (auch als Nyquist-Plot oder Argand-Diagramm bezeichnet), der Bode-Plot und die frequenzreduzierte Admittanz.

Ortskurve (Nyquist-Plot/Argand-Diagramm)

Die Auftragung der frequenzabhängigen Impedanzen in der komplexen Ebene, der sogenannten Ortskurve (Nyquist-Plot/Argand-Diagramm) ist die einfachste Darstellungsform der Impedanzen. Hierzu trägt man den Realteil und den Imaginärteil der Impedanz Z' und Z'' gegeneinander auf.

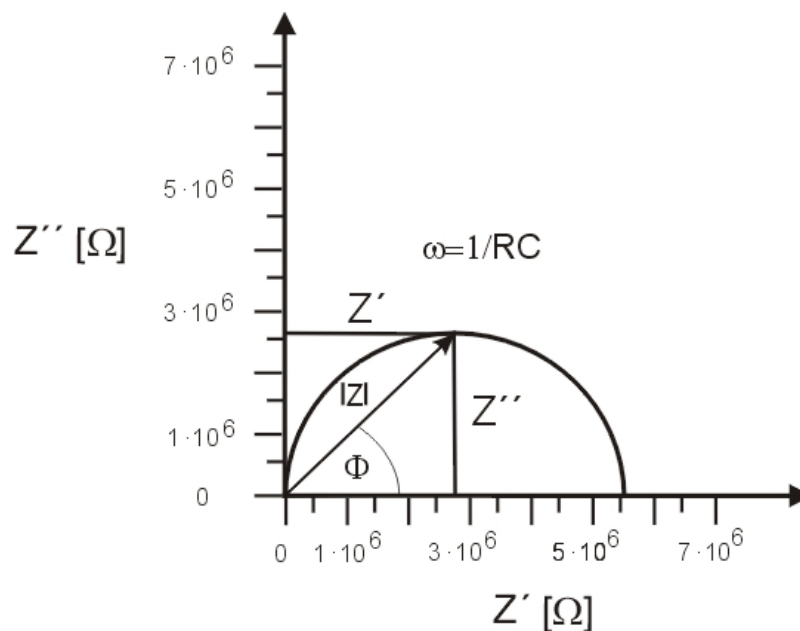


Abbildung 68 Impedanzkurve, auch Argand-Diagramm/Nyquist-Plot genannt

Die Kurve schneidet den realen Anteil der Impedanz Z' -Achse bei R_a und R_a+R . Der Scheitelpunkt der halbkreisförmigen Kurve ist durch $\omega=1/RC$ gegeben.

In Abbildung 68 ist $R_a=0$ gesetzt. Größere Werte für R_a verschieben die Kurve vom Ursprung nach rechts. Folgt man der Kurve von rechts nach links entspricht dies einer Verschiebung der Frequenz von niedrigeren zu höheren Frequenzen.

Im realen Experiment weicht die Kurvenform oft vom Idealzustand ab. Beginnen die Kurven nicht im Ursprung kann dies von der Ausbildung weiterer Kurven bei höheren Frequenzen herrühren. Diesen Effekt beobachtet man besonders, wenn die Elektrode mit Substanzen bedeckt ist, deren durchschnittliche Zeitkonstanten im Gemisch weniger als zwei Größenordnungen auseinanderliegen.

Ist der Halbkreis dagegen abgeflacht, das heißt das Kreiszentrum liegt unterhalb der X-Achse, kann dies auf eine sehr inhomogene Schicht deuten (Elektrodenbedeckung mit Substanzen unterschiedlicher Zeitkonstanten oder einer rauhen Elektrode).

Frequenzreduzierte Admittanz

Die Auftragung der frequenzreduzierten Admittanz in der komplexen Ebene ist eine nützliche Darstellung zur einfachen Bestimmung der Kapazität des Systems. Die Admittanz wird als inverse Impedanz definiert und stellt somit eine komplexe Leitfähigkeit dar.

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

Gleichung 40

Dabei sind G = Leitwert und G_a = Leitwert des Elektrolyten. Dividiert man die Admittanz um ω so erhält man eine frequenzunabhängige Darstellung in welcher der Schnittpunkt mit der imaginären Achse direkt die Systemkapazität liefert.

$$\frac{Z}{\omega} = \frac{G + G_a}{\omega} + iC$$

Gleichung 41

Liegen mehrere RC-Glieder mit einer genügenden Trennung in τ vor, bildet jede Kapazität einen eigenen Halbkreis aus der einen Schnittpunkt mit der imaginären Achse liefert. Im realen Experiment sind oft die einzelnen Zeitkonstanten nicht hinreichend getrennt und es kommt zu überlagerten Kurven.

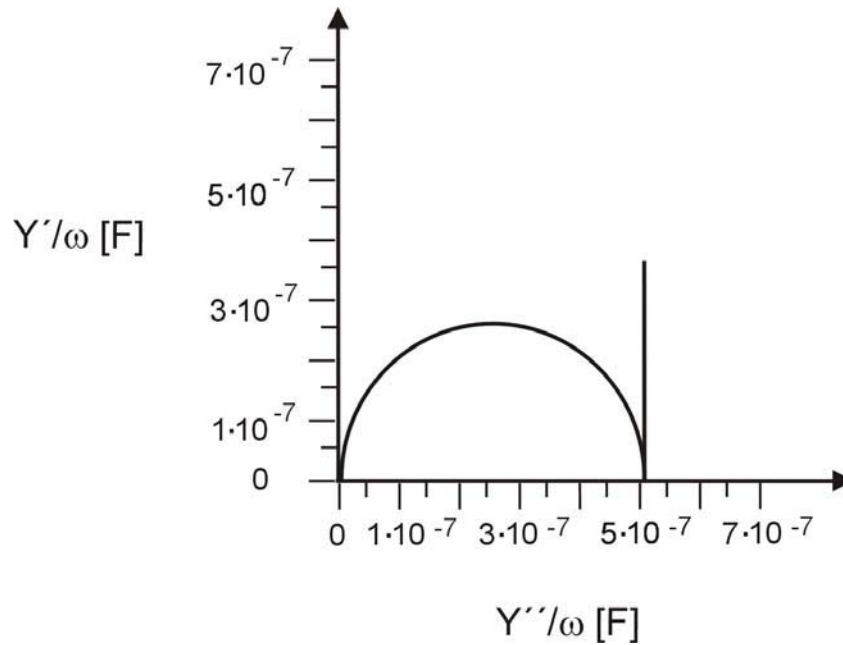


Abbildung 69 Darstellung der frequenzreduzierten Admittanz Y/ω , die Kapazität kann direkt auf der X-Achse an der Stelle des Kurvenschnittpunktes abgelesen werden

Bode-Plot

Der Bode-Plot ist eine geeignete Darstellung wenn die RC-Glieder in ihrer Zeitkonstanten deutlich voneinander getrennt sind und die anderen Darstellungsformen in der komplexen Ebene unbefriedigend sind. In diesem Fall sollten die Darstellungen entweder in doppell-logarithmischer Form aufgetragen werden. Alternativ können die Daten direkt in Form des sogenannten Bode-Diagramms aufgetragen werden.

Im Bode-Diagramm werden die Phase und der Betrag der Impedanz gegen die Anregungsfrequenz ν oder ω aufgetragen. Für hohe Frequenzen nimmt der Betrag der Impedanz $|Z|$ den Wert des Elektrolytwiderstandes und für sehr niedrige Frequenzen den Wert des Systemwiderstands an. In diesen Bereichen verläuft die Kurve horizontal. Betrachtet man ein rein kapazitives Element beträgt die Steigung -1 . Im Falle der Warburg-Impedanz nimmt sie den Wert $-1/2$ an.

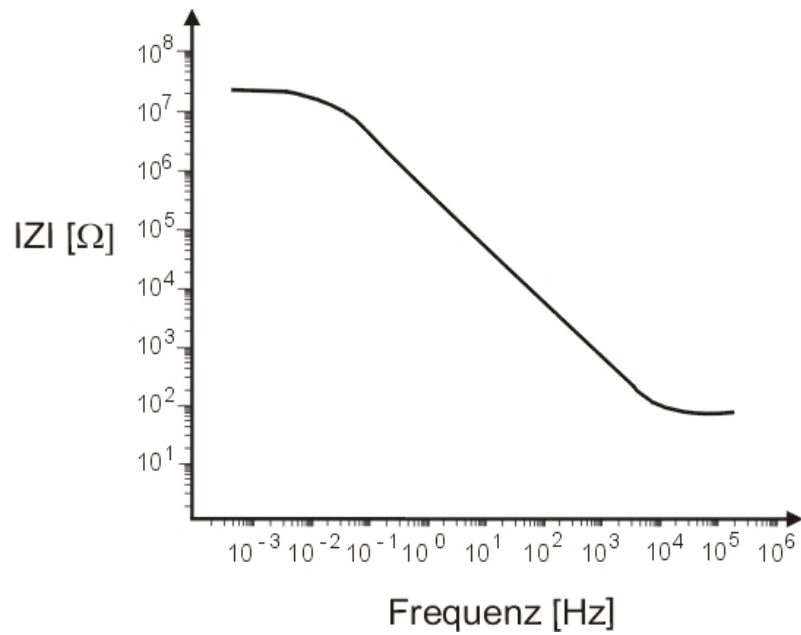


Abbildung 70 Bode-Plot, Auftragung der Frequenz gegen den Betrag der Impedanz

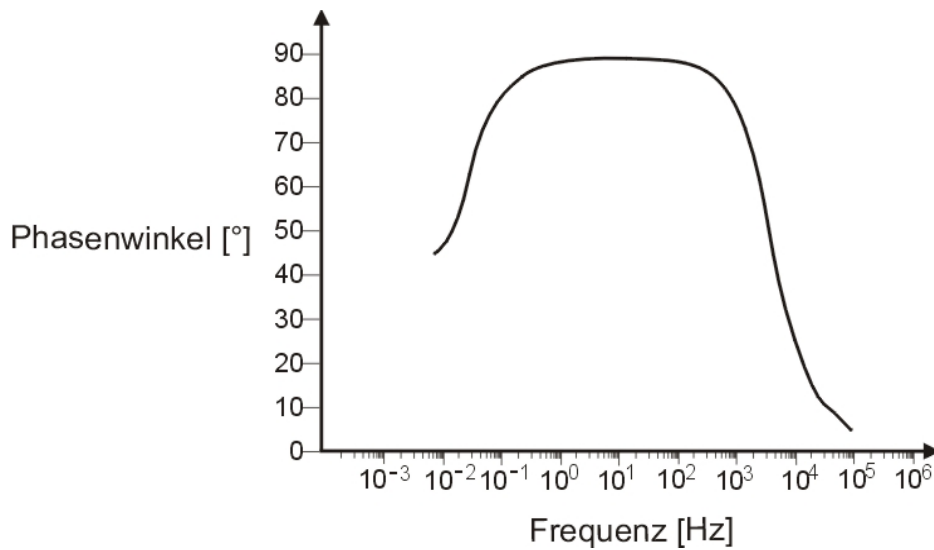


Abbildung 71 Bode-Plot, Auftragung der Frequenz gegen den Phasenwinkel Φ

Der Phasenwinkel Φ läuft bei 0° in ohm'schen Bereich und steigt dann im kapazitiven Bereich auf einen Wert von 90° an. Warburg-Impedanzen besitzen einen Phasenwinkel von $\Phi = 45^\circ$.^[1197, 1217]

4.9 Oberflächen-Plasmonen-(Resonanz)-Spektroskopie

Oberflächen-Plasmonen-Spektroskopie *engl. „Surface Plasmon (Resonance) Spectroscopy* (entsprechend als OPS, SPS oder SPR(S) bezeichnet), ist eine empfindliche Methode zur **Untersuchung molekularer Architekturen an Oberflächen.** ^[1218-1220]

Das Phänomen der SPR wurde ursprünglich von Turbadar beobachtet^[1221], obwohl es die Arbeiten von Otto,^[1222, 1223] Kretschmann und Raether,^[1224] Agerwal^[1225] und Swalen^[1226] waren, die zu einem tieferen Verständnis führten und die vielseitige praktische Anwendung der Technik erlaubten. Übersichtsartikel bezüglich der SPR-Technologie sind bei Knoll,^[1220, 1227] Welford^[1228] und Raether^[1229] zu finden.

In den letzten Jahren rückte die Oberflächen-Plasmonen-Spektroskopie durch die aufkommenden biosensorischen und nanotechnologischen Fragestellungen neben den Rastersondenverfahren, der QCM und den Fluoreszenzmethoden in den Fokus der Betrachtungen. Sie eignet sich zum Studium des schichtweisen Aufbaus von Oberflächenarchitekturen, Bindungsvorgängen an der Oberfläche und deren dynamischen Veränderungen in Echtzeit. ^{[1227, 1230] [49]} Zusätzlich läßt sie sich zum Auslesen von Proben im Arrayformat verwenden. Da die Oberflächen-Plasmonen-Spektroskopie berührungs- und meist auch markierungsfrei durchgeführt wird, ist der Einfluß auf das zu untersuchende System minimal und Störungen desselben können weitgehend ausgeschlossen werden. Je nach Fokussierung des verwendeten Lasers kann die Analyse von Oberflächen auch mit guter lateraler Auflösung erfolgen, wobei die Größe des Lichtkegels den Meßbereich definiert.

Optische Grundlagen

Licht läßt sich als **transversale elektromagnetische Welle** beschreiben, bei der sich ein elektrisches und ein magnetisches Feld, die senkrecht zueinander stehen, mit Lichtgeschwindigkeit ausbreiten und dabei in Phase schwingen. (Gleichung 42)

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

Gleichung 42

$|E|$ ist dabei die Amplitude, $\omega=2\pi\nu$ die Kreisfrequenz, $|k|=2\pi/\lambda$ der Wellenvektor, δ der Phasenwinkel und die Indizes **Fehler! Es ist nicht möglich, durch die Bearbeitung von Feldfunktionen Objekte zu erstellen.** und t geben die Orts- und Zeitabhängigkeit an.

Polarisation

Eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung des Lichts mit Grenzflächen spielt die Polarisation. Man bezeichnet eine Welle als linear polarisiert, wenn sie nur in einer Richtung quer zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Das Licht kann dabei parallel (p) oder senkrecht (s) bezüglich der Einfallsebene des eingestrahlt Lichts polarisiert sein. Der einfallende und der reflektierte Strahl definieren die **Einfallsebene**. Diese ist senkrecht zur Grenzfläche der beiden Medien.

Liegt die Feldkomponente \vec{E} in der Ebene der Grenzfläche (Licht, dessen Polarisationsebene senkrecht zur Einfallsebene liegt) so spricht man von **s-polarisiertem Licht**, während die Feldkomponente beim **parallel polarisiertem Licht** (Licht, dessen Polarisationsebene parallel zur Einfallsebene liegt) senkrecht zur Grenzfläche steht. Abbildung 72 zeigt den Zusammenhang graphisch.

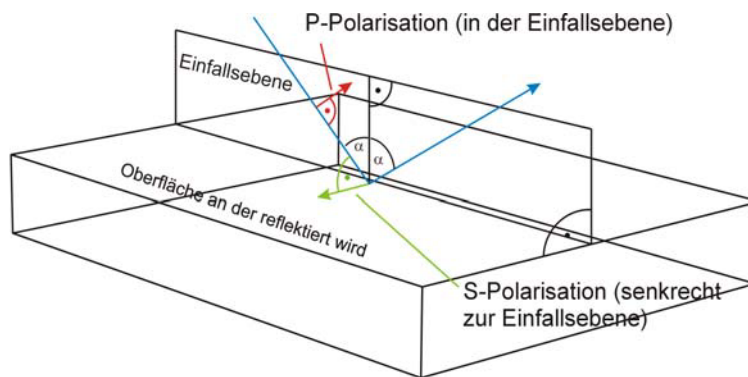


Abbildung 72 Definition der Polarisationsebenen

Als Ausbreitungsrichtung wird allgemein die des E-Feldes gewählt, die des B-Feldes steht darauf senkrecht.

Beim **zirkular** polarisiertem Licht rotieren an einem gegebenen Ort \vec{r} beide Felder mit der Kreisfrequenz ω um die Ausbreitungsrichtung. Zirkular polarisiertes Licht entsteht durch die Überlagerung von zwei zueinander senkrechten und um $\pi/2$ phasenverschobenen, linear polarisierten Wellen, die die gleiche Ausbreitungsrichtung und Frequenz haben. Die beiden E-Felder haben also den gleichen Betrag eilen aber einander voraus.

Falls entlang zweier orthogonaler Richtungen linear polarisiertes Licht mit einer Phasenverschiebung von $\pi/2$ aber mit unterschiedlicher Amplitude überlagert wird, so erhält man **elliptisch** polarisiertes Licht. **Linear** und **zirkular** polarisiertes Licht können als Spezialfälle der **elliptischen Polarisation** angesehen werden.

Abhängigkeit des Wellenvektors von der Wellenlänge und der Dielektrizitätskonstanten

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Wellen hängt nicht nur von äußeren Umständen wie der Temperatur und dem Medium ab. Sie kann auch mit der Wellenlänge einer Welle variieren. Diesen Effekt nennt man **Dispersion**. Funktionen die einen Zusammenhang zwischen Energie und einem Wellenvektor herstellen bezeichnet man als **Dispersionsfunktion** oder **Dispersionsrelation**. Eine Darstellungsform ist die Abhängigkeit von Wellengeschwindigkeit und Wellenlänge. Die Dispersion von Lichtwellen in Gläsern wird in der optischen Spektroskopie ausgenutzt um Lichtstrahlen in Farben zu zerlegen. Gleichung 43 beschreibt den Zusammenhang zwischen Wellenvektor der Frequenz des Lichtes im dielektrischen Medium (ω) und dessen Dielektrizitätskonstanten. (ϵ_i)

$$k_{\text{Photon}} = \frac{\omega \sqrt{\epsilon_i}}{c}$$

Gleichung 43

Totalreflektion und Anregung von Oberflächenplasmonen

Gelangt ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte (verschiedener Brechungsindex), kommt es je nach Einstrahlungswinkel und Brechungsindizes zu verschieden starker Brechung und Reflektion des Lichtstrahls.

Das **Reflexionsgesetz** besagt dabei, daß der Einfallswinkel θ_{Ein} dem Ausfallswinkel θ_{Aus} , auch Reflektionswinkel genannt, entspricht.

$$\theta_{\text{Ein}} = \theta_{\text{Aus}}$$

Gleichung 44

Findet der Übergang des Lichtstrahls von einem optisch dichterem (n_1) in ein optisch dünneres Medium (n_2) statt (Abbildung 73), wird der Lichtstrahl vom Lot hin weg gebrochen, das heißt, der Winkel des gebrochenen Strahls, der Brechungswinkel θ_{Trans} , ist größer als der Einfallswinkel θ_{Ein} .

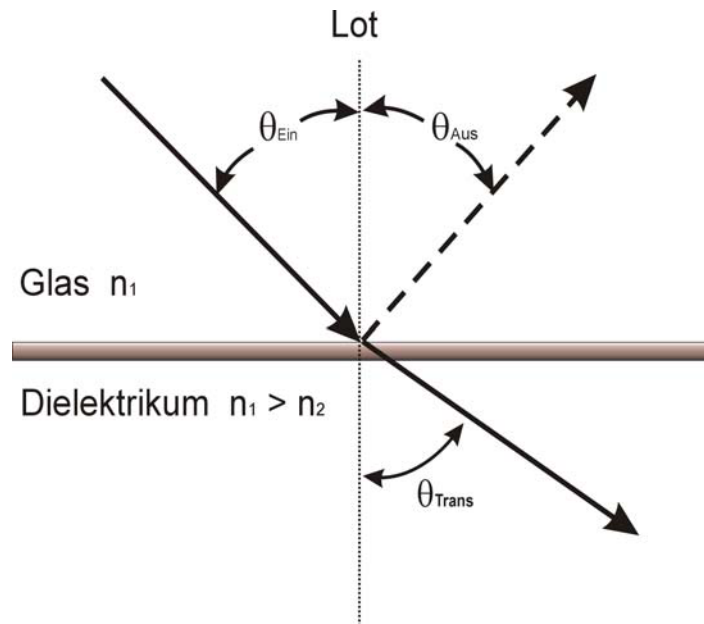


Abbildung 73 Reflektionsverhalten eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex

Eine Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Einfallswinkel θ_{Ein} und Brechungswinkel θ_{Trans} liefert das **Snellius'sche Brechungsgesetz** (Gleichung 45):

$$\frac{\sin \theta_{\text{Ein}}}{\sin \theta_{\text{Trans}}} = \frac{n_2}{n_1}$$

Gleichung 45

Vergrößert man den Einfallswinkel θ_{Ein} so nimmt auch der Brechungswinkel zu, bis ab einem bestimmten Einfallswinkel θ_{Ein} der Brechungswinkel von $\theta_{\text{Trans}^*} = 90^\circ$ erreicht wird. Der Lichtstrahl läuft dann parallel entlang der Grenzfläche. θ_c wird als **Grenzwinkel der Totalreflektion** bezeichnet. Für Einfallswinkel die größer als θ_c sind, wird kein gebrochener Strahl mehr beobachtet. Es tritt nun noch Reflexion auf (Abbildung 74).

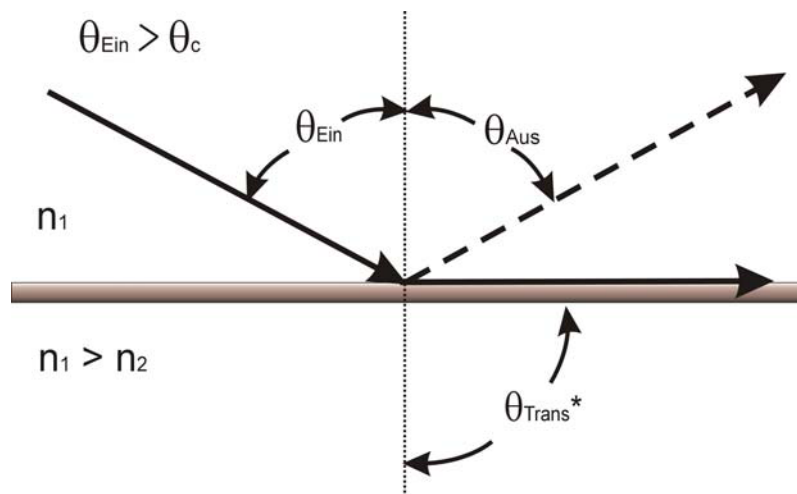


Abbildung 74 Totalreflexion an der Grenzfläche zweier Medien. Erreicht der Einfallswinkel θ_{Ein} den Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c , wird der Brechungswinkel $\theta_{\text{Trans}^*} = 90^\circ$

Sind die Brechungsindizes der Medien bekannt, läßt sich der **Winkel der Totalreflexion** θ_c mit dem Snellius'schen Brechungsgesetz berechnen. Setzt man in Gleichung 45 den Winkel θ_{Trans} mit 90° ein, resultiert Gleichung 46:

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

Gleichung 46

Der transmittierte Strahl nimmt die Form einer Oberflächenwelle an, die sich entlang der Grenzfläche fortsetzt und deren Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abfällt. Die Maxwell'schen Gleichungen beschreiben die Ursache, die Wirkung, die Wechselwirkungen und die zeitliche Abhängigkeit der beteiligten Felder. Mit ihrer Hilfe läßt sich die raum-zeitliche Dynamik des elektrischen, bzw. magnetischen Feldes beschreiben. Unter Berücksichtigung der Randbedingungen (Normalkomponente des E-Feldes und die Tangentialkomponente der dielektrischen Verschiebung D an der Grenzfläche, sind stetig) folgt, daß bei der Totalreflexion eine Störung im optisch dünneren Medium n_2 auftritt. Die Z-Komponente dieses elektrischen Feldes dringt in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex ein und klingt dabei senkrecht zur Grenzfläche exponentiell ab. Die Eindringtiefe d_p (Gleichung 47) nach der die Amplitude des evaneszenten Feldes im optisch dünneren Medium auf $1/e$ abgefallen ist, wird durch folgende Gleichung gegeben:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{\frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2 \theta_i - 1}}$$

Gleichung 47

Man erkennt, daß die Eindringtiefe d_p von der Wellenlänge, den Brechungsindizes n_1 und n_2 und vom Einfallswinkel θ_{Ein} abhängt.^[1220] Sie liegt in der Größenordnung der Wellenlänge λ des eingestrahnten Lichtes. Die Intensität des reflektierten Lichtes reagiert auf die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit der dielektrischen Schicht innerhalb der Dicke einer Wellenlänge.

Um eine Verstärkung der Sensitivität zu erreichen, ist es sinnvoll das evaneszente Feld zu verstärken. Hierzu bietet sich die Anregung von Oberflächenplasmonen (auch Oberflächenplasmon Polaritonen genannt) an.^[1220, 1229, 1231]

Eine **Oberflächen-Plasmaschwingung** ist eine elektrodynamische, kollektive Anregung, die sich entlang der Grenzfläche zwischen dem Metall und Vakuum (bzw. einem Dielektrikum) longitudinal ausbreitet. Sie entsteht aus **Dichteschwingungen des Elektronengases** im Leitungsband des Metalls (Volumenanregungen) und den daran gekoppelten Schwingungen im Dielektrikum.

Da die Elektronen auf Grund ihrer Ladung im freien Elektronengas einen bestimmten Abstand zueinander einhalten bilden sie eine Art kristallgitteranaloge Struktur aus und bewegen sich daher nur kollektiv durch das Gitter. Die Anregungen von freien Elektronen in Metallen zu Plasmaschwingungen gegen die Ionenrümpfe werden in der Festkörperphysik allgemein als Plasmonen bezeichnet. Das Quant dieser Grenzflächenmode (Schwingung) wird daher als **Oberflächenplasmon-Polariton** oder kurz als Oberflächenplasmon (OP) bezeichnet. Abgeleitet vom *englischen Plasmon Surface Polaritons* werden Oberflächenplasmonen auch als PSP abgekürzt. Oberflächenplasmonen sind Oberflächenwellen, bei denen sich die oben beschriebenen longitudinalen elektronischen Schwingungen parallel zur Oberfläche eines Metalls angeregt werden.

Da die Plasmafrequenz von Metallen typischerweise im Ultravioletten liegen, können Oberflächenplasmonen mit optischen Frequenzen propagieren.

Die aus dem Oberflächenplasmon resultierende elektrische Feldstärke ist im Raum über der metallischen Oberfläche verstärkt. Die Feldintensität der evaneszenten Welle nimmt in

Ausbreitungsrichtung (x) und senkrecht zur Grenzfläche (z) in beiden Medien (Metall und Dielektrikum) exponentiell ab.

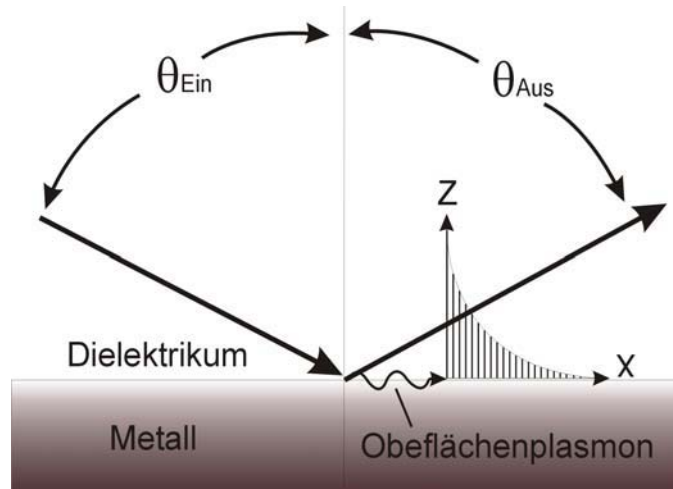


Abbildung 75 Ein reflektierter Lichtstrahl wird an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum unter gleichzeitiger Anregung eines Oberflächenplasmons reflektiert. Das Oberflächenplasmon besitzt ein elektrisches Feld im Dielektrikum, das in X- und in Z-Richtung exponentiell abfällt.

Entlang der Ausbreitungsrichtung verhält sich das Oberflächenplasmon wie eine Lichtwelle, mit einem sinusförmigen Verlauf des elektromagnetischen Feldes:

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

Gleichung 48

$\left(\frac{2\pi}{\lambda_p} \right)$ wird als Wellenvektor \bar{k} bezeichnet. Für gewöhnliche, ebene Lichtwellen im Vakuum

gilt die bekannte Beziehung:

$$c = \lambda \nu = \left(\frac{2\pi}{k} \right) \left(\frac{E}{h} \right) \rightarrow \text{also } E \propto k$$

Gleichung 49

Oberflächenplasmonen haben eine andere Dispersionsrelation als Lichtquanten und können daher nur über einen Trick mit ebenen Wellen wechselwirken: Man strahlt das Licht in einer sogenannten Totalreflexionsgeometrie ein. Um zu verstehen, warum ein eingestrahktes Lichtquant nicht direkt Oberflächenplasmonen anregen kann, müssen die Wellenvektoren, die Dispersionsrelation des Photons und des Oberflächenplasmons, bzw. deren Wellenvektoren betrachtet werden.

Entlang der Grenzfläche Metall/Dielektrikum gilt für die Ausbreitung von Oberflächenplasmonen folgende **Dispersionsrelation**:

$$k_{x,Plasmon} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega) \cdot \epsilon_d(\omega)}{\epsilon_m(\omega) + \epsilon_d(\omega)}}$$

Gleichung 50

Um eine **Resonanz** zwischen den anregenden Photonen (Licht) und der resultierenden Oberflächenplasmonenmode herzustellen, müssen beide Wellen in Energie ($E=h\nu$) und Impuls ($p=h/\lambda$) übereinstimmen. Der Wellenvektor des Plasmons $k_{x,Plasmon}$ ist dabei durch die Frequenz des verwendeten Lasers ω_L festgelegt. Das bedeutet, daß der Wellenvektor des Photons k_{Photon} in Ausbreitungsrichtung (X-Richtung) an den Wellenvektor des Plasmons angepasst werden muß.

Abbildung 76 zeigt den Zusammenhang zwischen der Wellenfrequenz und dem Wellenvektor für das anregende Photon und das Oberflächenplasmon. Stimmen sie überein, kommt es zur Anregung des Oberflächenplasmons durch das eingestrahkte Licht. Gerade **a** zeigt die Dispersionsrelation des Photons im Vakuum, **b** in Luft. Beide Geraden schneiden die Dispersionslinie des Plasmons nicht. Der Wellenvektor der Photonen ist für alle Frequenzen zu gering, das heißt, der Impuls des Photons ist auch in Luft zu klein, um ein Oberflächenplasmon anzuregen. Die Photonen müssen „abgebremst“ werden, das heißt, daß bei konstanter Laserfrequenz ω_L muß c_{Photon} im Medium kleiner werden bzw. der Impuls des Photons p muß erhöht werden. Der Impuls des Photons läßt sich durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten ϵ_i (Dielektrikum mit höherem Brechungsindex n_j wobei $n_j > n_i$ sein muß) vergrößern. Hierzu strahlt man das Laserlicht zur Impulserhöhung vom Medium mit höherem Brechungsindex auf die Grenzfläche zum Medium mit dem geringeren Brechungsindex. In Abbildung 76 ist dies durch die Gerade **d** dargestellt. Man erkennt, daß sich **d** mit der Geraden des Laserphotons und der Dispersionslinie des Plasmons schneiden, jedoch nicht in einem Punkt. Da der

Wellenvektor des Lichts nach Gleichungen **a-c&d** in Abbildung 76 auch vom Einstrahlwinkel abhängt, muß dieser variiert werden, um einen gemeinsamen Schnittpunkt der drei Kurven zu erzielen. Dieser Fall ist für die Gerade **c** der Fall. Die Wellenvektoren des Photons und des Plasmons stimmen überein und es kommt zur Energieübertragung vom Photon auf das Plasmon, woraus ein Intensitätsminimum des reflektierten Lichts resultiert. Da der Anregungswinkel des Oberflächenplasmons oberhalb des kritischen Einstrahlwinkels der Totalreflexion θ_c liegt, bezeichnet man diese Anregung auch als ATR-Methode (*engl. Attenuated Total Reflection*).

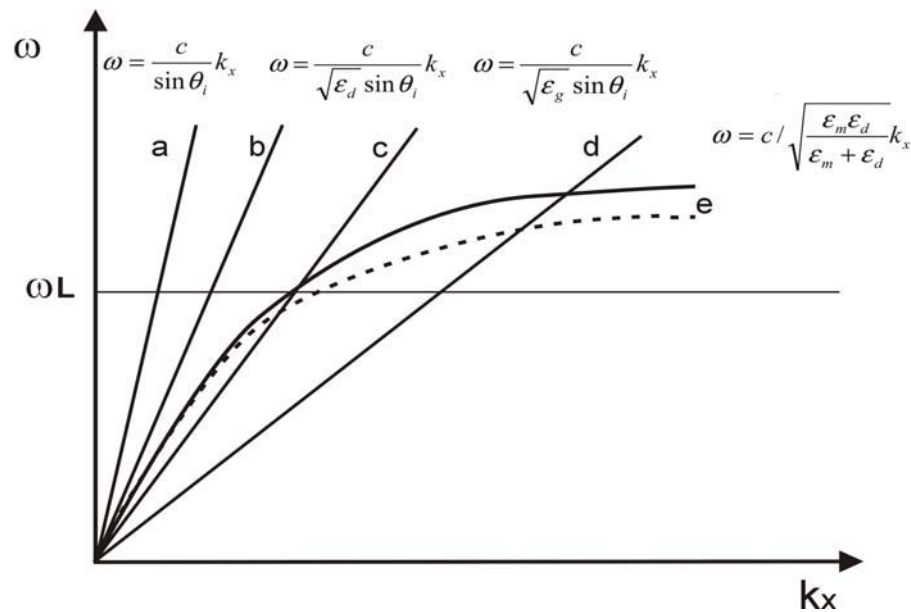


Abbildung 76 Dispersionsrelationen des Photons und des Oberflächenplasmons. Die waagerechte Gerade ist die Frequenz des Lasers ω_L . Zur Anregung des Oberflächenplasmons (Kurvenverlauf e) muß sich die Gerade des Photons (Beispiele a-d) mit der Geraden des Lasers ω_L und der Kurve des Plasmons e in einem Punkt schneiden. (e(---) = Dispersionsrelation des Plasmons mit zusätzlicher dielektrischer Schicht)

Experimentell erreicht man die Kopplung von Photonen- und Oberflächenplasmonenwellenvektor mit Hilfe von **Gittern** oder einem Medium mit höheren Brechungsindex, der **Prismenkopplung**.

Im Folgenden soll auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Prismenkopplung eingegangen werden. Die Gitterkopplung erlaubt andere experimentelle Probenpositionen im Bezug auf die Einstrahlung des Laserlichts, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird. Für weitergehende Beschreibungen sei auf die Literatur verwiesen.^[1232]

Im Fall der Prismenkopplung wird die Angleichung der Photonen- und Plasmonenwellenvektoren über die Einstrahlung durch ein optisch dichteres Medium – dem Glasprisma aus hochbrechendem Glas – und Variation des Einfallswinkels erzielt (Abbildung 77).

Strahlt man mit monochromatischem, parallel polarisiertem Licht auf die Hypothenuse eines Glasprismas mit einem Einfallswinkel (Winkel zwischen Strahl und Lot auf die Hypothenuse) der größer ist als der Winkel der Totalreflexion, erwartet man zunächst, daß die gesamte Lichtenergie reflektiert wird. Jedoch breitet sich die exponentiell abklingende evaneszente Welle in den Raum unterhalb des Glases aus. Dort befindet sich eine ca. 50 nm dicke Metallschicht (Ag, Au). An der Grenzfläche Metall-Dielektrikum (z.B. Luft oder Siliziumdioxid) wird nun - abhängig vom Einfallswinkel - ein Oberflächenplasmon erzeugt. Ist die Metallschicht ausreichend dünn (ca. 50 nm), so setzt sich das elektromagnetische Feld des Plasmons durch das Metall hindurch fort und wechselwirkt auf der rückseitigen Grenzfläche mit dem dortigen Dielektrikum. Da der Brechungsindex auf der Rückseite von den dort aufgetragenen molekularen Schichten und deren Dicke abhängt, ist es möglich diese zu detektieren.

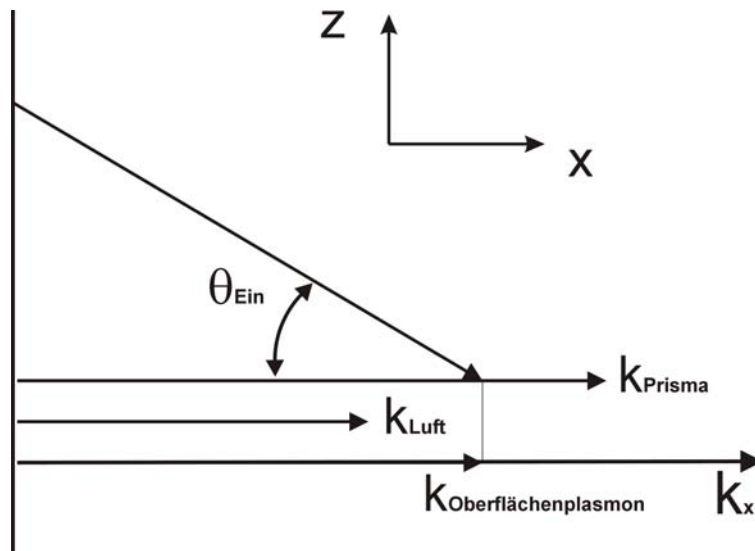


Abbildung 77 Orientierung und Betrag der Wellenvektoren bei der Prismenkopplung. Der Wellenvektor des Photons in der Luft ist nicht groß genug um das Oberflächenplasmon anzuregen. Durch die Kopplung des photonischen Wellenvektors über ein Prisma kann dieser vergrößert werden. Der Wellenvektor k_{Prisma} ist jetzt aber zu groß. Durch Variation des Einfallswinkels θ_{Ein} kann der Wellenvektor des Photons im Prisma an den Wellenvektor des Plasmons $k_{\text{Oberflächenplasmon}}$ angepasst werden und es kommt zur resonanten Anregung.

Konfigurationen der Prismenkopplung

Zur Einkopplung der Laser-Photonen durch ein Prisma unterscheidet man zwischen der Otto- und der Kretschmann-Konfiguration (Abbildung 78).

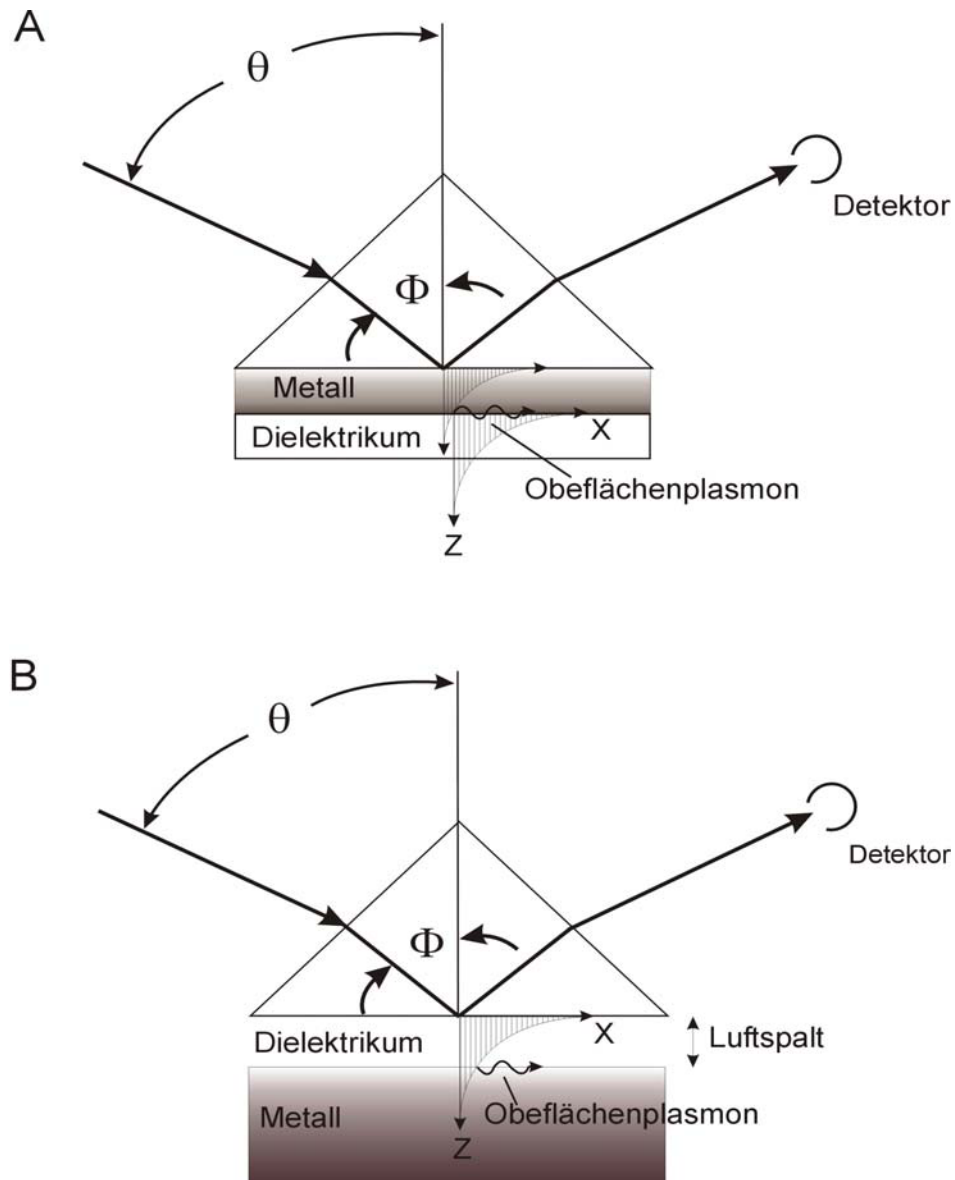


Abbildung 78 Prismenkopplung mit Hilfe der Kretschmann-Konfiguration (A) und der Otto-Konfiguration (B)

In der **Otto-Konfiguration** (Abbildung 78 B) wird der Lichtstrahl auf die Prismabasis gelenkt und dort unter Totalreflektion gebrochen. Das an der Basis entstehende evaneszente Feld tritt durch das Dielektrikum hindurch (zum Beispiel ein Luftspalt, bzw. ein Luftspalt und das auf

der angrenzenden Metalloberfläche aufgebrauchte dielektrischen Material). Anschließend trifft es auf eine Metalloberfläche die bezogen auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes unendlich dick ist. Dort regt das evaneszente Feld ein Oberflächenplasmon an, wenn die oben beschriebenen Impuls- und Energiebedingungen erfüllt sind ($k_{\text{Photon}} = k_{\text{Oberflächenplasmon}}$).

In der **Kretschmann-Konfiguration** (Abbildung 78 A) wird der Lichtstrahl ebenfalls auf die Prismabasis gelenkt und dort unter Totalreflektion gebrochen. Das an der Basis entstehende evaneszente Feld trifft dort jedoch direkt auf einen auf die Prismenbasis (Hypothense) aufgedampften Metallfilm, der eine Dicke von etwa 50 nm aufweist. Das Dielektrikum hindurch. Sind die Impuls- und Energiebedingungen erfüllt ($k_{\text{Photon}} = k_{\text{Oberflächenplasmon}}$) kommt es auch hier zur Anregung eines Oberflächenplasmons. Im Dielektrikum zeigt das angeregte Plasmon ein elektrisches Feld, das in X- und in Z-Richtung exponentiell abfällt.

Unterschiede: In der Otto-Konfiguration wird das Plasmon über einen dünnen Luftspalt angeregt, der praktisch schwierig einzustellen ist. Zudem befindet sich die zu untersuchende Schicht auf der dem Luftspalt zugewandten Goldseite. Dadurch limitiert dieser Aufbau die dynamischen Manipulationsmöglichkeiten, zum Beispiel dynamische Messungen in einem Lösungsmittel unter Stoffaustausch. In der Kretschmann-Konfiguration ist die Metalloberfläche hingegen frei zugänglich. Im Rahmen der Arbeit wurde die Kretschmann-Konfiguration^[1233] verwendet.

Änderung der Oberflächenplasmonen-Dispersion durch ultradünne Schichten

Die oben beschriebenen Meßkonfigurationen erlauben die Wechselwirkung von evaneszenten Licht mit dielektrischen Materialien. Befinden sich auf der Metalloberfläche zusätzliche Moleküllagen adsorbierter Moleküle (diese besitzen in der Regel einen höheren Brechungsindex $n_{\text{Schicht}} > n_{\text{Puffer}}$), so verursachen diese eine Verschiebung des resonanten Einfallswinkel, da die Plasmonendispersionskurve aus Abbildung 76 zu höheren Wellenvektoren verschoben wird (Abbildung 76 e(---)). Dadurch verschiebt sich die Resonanzkurve bei gleich bleibender Wellenlänge des anregenden Lichtes zu größeren Einfallswinkeln (Abbildung 79):

$$k_{\text{Oberflächenplasmon}} = k_{\text{Oberflächenplasmon}, 0} + \Delta k_{\text{Oberflächenplasmon}} \rightarrow \theta_{\text{Oberflächenplasmon}} \uparrow$$

Gleichung 51

Ursache hierfür ist der Einfluß der zusätzlich auf der Metalloberfläche befindlichen ultradünnen dielektrischen Schicht. Sie beeinflusst die Feldverteilung an der Metallgrenzfläche. Der mittlere Brechungsindex des Dielektrikums wird durch die Wechselwirkung mit zusätzlichen Molekülen auf der Goldoberfläche innerhalb der Wechselwirkungszone des Oberflächenplasmons erhöht.

Der Betrag der Winkelverschiebung $\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0$ ist proportional zu dem Produkt aus Filmdicke d und der Differenz der Brechungsindizes $n_{\text{Film}} - n_{\text{Dielektrikum}}$.^[1234]

$$\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0 \propto (N_{\text{Film}} - N_{\text{Dielektrikum}}) \cdot d$$

Gleichung 52

N ist dabei der komplexe Brechungsindex, zwischen ihm und der komplexen Dielektrizitätskonstanten ε besteht folgende Beziehung:

$$\varepsilon = N^2 = (n + ik)^2 = n^2 + 2ikn - k^2 = \varepsilon' + i\varepsilon''$$

Gleichung 53

Hierbei ist:

n = Realteil des Brechungsindex

k = Imaginärteil des Brechungsindex (entspricht der Absorption)

ε' = Realteil der Dielektrizitätskonstanten ($\varepsilon' = n^2 - k^2$)

ε'' = Imaginärteil der Dielektrizitätskonstanten

Die Dielektrizitätskonstante hängt dabei von der Natur der aufgetragenen dielektrischen Schicht ab. Ist die Schicht aus einem nichtabsorbierenden Material entfällt der Imaginärteil der Dielektrizitätskonstanten ε und diese reduziert sich auf $\varepsilon' = n^2$.

Die Reflektivität an einem Multischichtsystem kann unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen des elektrischen und magnetischen Feldes an der Grenzfläche mit Hilfe der **Fresnel'schen Gleichungen** beschrieben werden.^[1235, 1236]

Die Reflektionskurven können durch Variation der Parameter ε' , ε'' und d für jede Schicht angepasst werden. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, mit denen die Fresnelkoeffizienten für Schichtsysteme beschrieben werden können. Als Beispiel sei die Rekursionsmethode genannt.^[1237]

Ist der Brechungsindex n der Schicht bekannt, kann mit Hilfe der Fresnel'schen Gleichungen die Winkelverschiebung $\Delta\theta$ direkt einer Schichtdickenzunahme d zugeordnet werden. Dieser Zusammenhang stellt die Basis der Schichtdickenbestimmung mit Hilfe von Oberflächenplasmonen dar. Die Problematik besteht darin, daß eine Separation des Brechungsindex der dielektrischen Schicht und seiner Schichtdicke d nicht möglich ist. Daher muß eine der beiden Größen mit hinreichender Genauigkeit bekannt sein (zum Beispiel aus der Literatur oder unabhängigen Messungen).

Ist keiner von beiden Werten bekannt und deren Bestimmung mit anderen Methoden nicht möglich, kann an ein und demselben System durch Variation des Brechungsindex des Lösungsmittels bzw. Puffers (Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Puffer oder verschiedene Konzentrationen derselben) der Brechungsindex graphisch ermittelt werden. Für jedes Lösungsmittel wird eine Reflektionskurve aufgenommen und der Brechungsindex mit einer Startschichtdicke mit Hilfe einer Auswertungssoftware (Winspall^[1238]) angepasst. Durch Variation der Schichtdicke wird ein Datensatz Brechungsindizes erhalten. Führt man dies für drei oder mehr Lösungsmittel durch ergibt sich idealerweise ein gemeinsamer Schnittpunkt der n/d Kurven. Dieser liefert den Brechungsindex und die Schichtdicke der dielektrischen Schicht.

Die Linienbreite der Plasmonenresonanzen wird zum einen durch die Lebensdauer der kollektiven elektronischen Anregung bestimmt, zum anderen wird sie in Abhängigkeit von Form und Größe der Partikel inhomogen verbreitert,^[1239] da es sich bei aufgedampften oder templatabgeformten Goldfilmen nicht um homogene Einkristalle handelt.

Eine Zunahme der Halbwertsbreite der Resonanzkurve deutet auf eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit hin. Treten Streuverluste auf, hat dies meist eine Verschiebung des Reflektionsminimums zu höheren Reflektivitäten zur Folge.

Die Hauptsächliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der optischen Schichtdicke liegt in der Oberflächenreinheit der Referenzprobe, beziehungsweise der noch nicht modifizierten Probe, da diese nach frischer Präparation der Goldoberfläche zur unspezifischen Adsorption von Adsorbaten aus der Umgebung neigt. Diese können zwar meist während der Assemblierung von molekularen Oberflächenarchitekturen wieder entfernt werden, verfälschen aber den Brechungsindex und „Probendicke“ der „reinen“ Goldoberfläche.

Meßmodi

In der Oberflächenplasmonenspektroskopie sind im wesentlichen zwei Meßarten von Bedeutung. Man unterscheidet die Messung der Reflektivität in Anhängigkeit vom Einfallswinkel (**Reflektionsmodus**) und die Messung der Änderung der Reflektivität in Abhängigkeit von der Zeit (**Kinetikmodus**) bei der dynamischen Verfolgung von Adsorptionsprozessen oder Bindungs- und Bindungslösungsvorgängen (zum Beispiel Rezeptor-Ligandwechselwirkungen).

Im **Reflektionsmodus** wird die Reflektivität R als Funktion des Einfallswinkel θ_{Ein} gemessen. Dabei ist die reflektierte Intensität bis zu einem gewissen Einfallswinkel relativ konstant. Erreicht der Einstrahlwinkel den kritischen Winkel θ_c tritt Totalreflektion ein. Die Reflektivität steigt kurz vor dem Erreichen von θ_c steil an. Wird der Einfallswinkel weiter vergrößert, ändert sich die Reflektivität. Die Intensität des reflektierten Strahls fällt stark ab und durchläuft bei einem bestimmten Einfallswinkel θ_0 ein Minimum, da hier die gesamte Lichtleistung resonant in die Schwingung der Oberflächenplasmonen übergeht (Abbildung 79). Letztlich erzeugen diese dann Joule'sche Wärme.

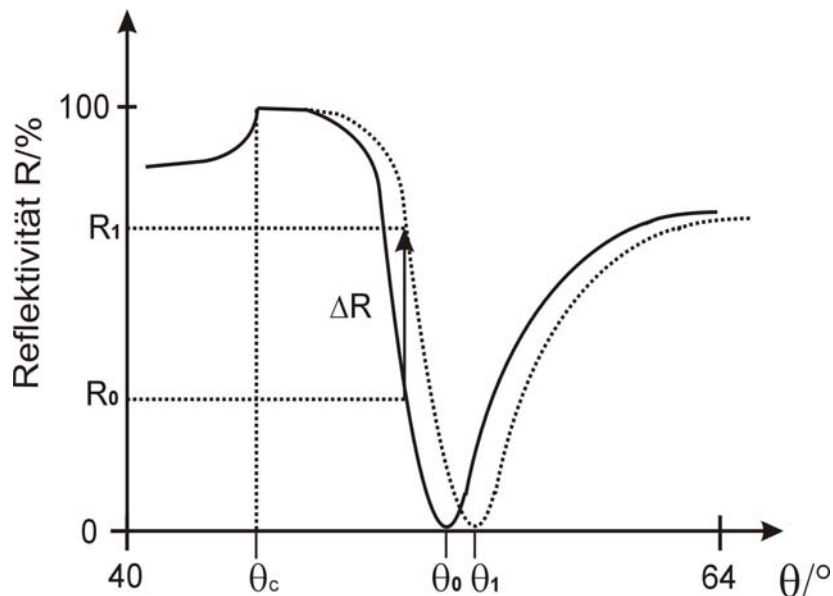


Abbildung 79 SPS-Kurve (Reflektionskurve) bei der Anregung von Oberflächenplasmonen

Im **Kinetikmodus** kann durch die zeitabhängige Beobachtung der Verschiebung des Resonanzwinkels („Minimumverfolgung“) oder der Intensitätsänderung des reflektierten Lichts bei konstantem Einfallswinkel in der nahezu linearen Flanke des Plasmons^[1240] die Kinetik der Zu- oder Abnahme einer dielektrischen Schicht gemessen werden.

Da im linearen Steigungsbereich der Zusammenhang zwischen Reflektivität und Dickenänderung proportional ist, kann aus der Änderung der Reflektivität direkt die Schichtdicke berechnet werden. Für die Minimumsverfolgung besteht nach Gleichung 52 auch für θ und d ein linearer Zusammenhang.

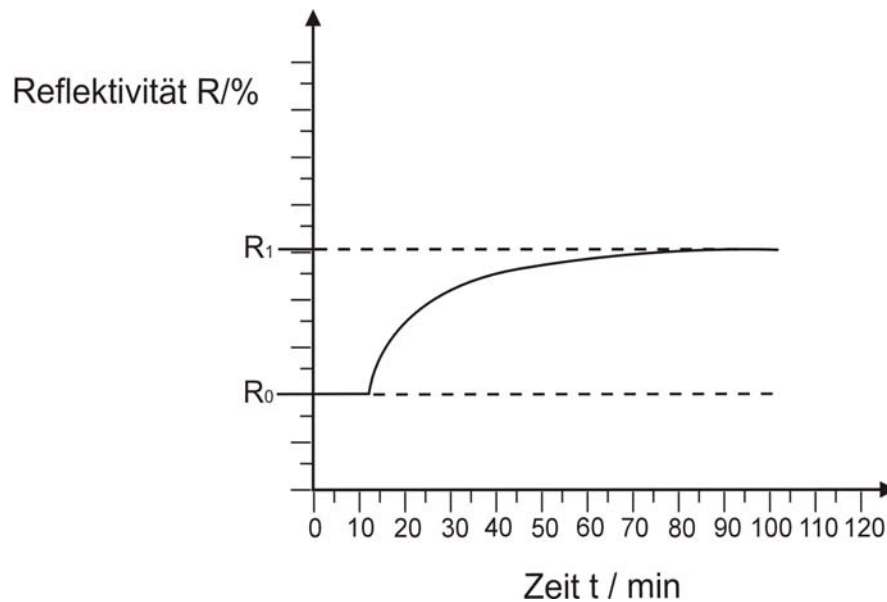


Abbildung 80 Kinetikmessung eines Adsorptionsvorgangs mit Hilfe von Oberflächenplasmonen

Kommt es zu einem Schichtdickenzuwachs auf der Metalloberfläche steigt die Reflektivität von R_0 auf R_1 . Die Intensitätszunahme ΔR entspricht dabei der Verschiebung des Resonanzwinkels von θ_0 auf θ_1 (siehe Abbildung 79). Nachdem die Reflektionskurven für die Winkel R_0 und R_1 simuliert und d bestimmt wurde, läßt sich die Y-Achse in Abbildung 80 mit Werten für die Schichtdicke skalieren. Hierzu ist es notwendig eine komplette Reflektivitätskurve vor und nach Beendigung des zu beobachtenden Prozesses zu messen.

Meßanordnung der Oberflächenplasmonenspektroskopie

Die SPS-Meßanordnung ist in Abbildung 81 dargestellt. Der Versuchsaufbau erlaubt die Messung der Reflektivität an einem Multischichtsystem an Luft oder in einem flüssigen Medium über einen großen Winkelbereich. Die Architektur der verwendeten Meßzelle erlaubt die gleichzeitige Messung elektrochemischer Größen wie der Kapazität und der Impedanz. Auch Messungen in organischen Lösungsmitteln sind möglich. Ihre flexible Bauweise erlaubt die Verwendung unterschiedlicher planarer, metallbedampfter Substrate. Durch die Adaption eines Pumpensystems ist das Spülen des Probenraumes mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (bevorzugt wässrige Lösungen wie Puffersysteme) möglich.

Folgend wird der detailliertere Meßaufbau beschrieben. Zur Anregung der Oberflächenplasmonen dient ein HeNe-Laser ($\lambda=633$ nm) als monochromatische Lichtquelle, die durch einen Frequenzmodulator periodisch mit einer Frequenz von 1192 Hz moduliert wird. Diese modulierte Frequenz wird als Referenzsignal an den Lock-In-Verstärker (EG&G, 5210) gegeben, um Störsignale zu vermeiden. Dadurch läßt sich die Meßanordnung ohne die Abschirmung von Kunstlicht (die Raumbelichtung erzeugt eine 50 Hz-Hintergrundfrequenz) betreiben. Anschließend durchläuft der Laserstrahl zwei Glan-Thompson Polarisatoren (Berliner Glas). Der erste dient dabei zur Regelung der Intensität, der zweite legt die Polarisationsrichtung fest. Um den experimentellen Aufbau zu verkleinern wird der Strahl mit einem Spiegel um 90° umgelenkt. Eventuell kann es vorteilhaft sein, den Strahl mit einer Linse zu fokussieren. Anschließend wird der Strahl in das Prisma eingekoppelt. Das Prisma besteht aus hochbrechendem LaSFN9-Glas, das unter Vermittlung von Immersionsöl optisch an den auf der Rückseite (zur Meßzelle hin) mit einer etwa 50 nm dicken Goldschicht bedampften LaSFN9-Glasträger gekoppelt ist. LaSFN-Glas (SiO_x -Grundsubstanz) besitzt neben 1-10% an Boroxid, 1-10% Natriumoxid, 1-10% Zinkoxid und 1-10% Niobpentoxid einen hohen Anteil an Bariumoxid (21-50%), Lanthanoxid (21-50%) und Titandioxid (11-21%); daneben können noch bis zu einem Prozent Arsenoxid enthalten sein (Schottdatenblatt). Die Meßzelle ist der Goldoberfläche zugewandt und an eine Temperaturkontrolleinheit angeschlossen, um Änderungen des Brechungsindex in Folge von Temperaturschwankungen zu vermeiden. Der Prisma-Glasträger-Meßzellenaufbau ist auf einem Zweikreisgoniometer (Fa. Huber) montiert und wird über eine Schrittsteuerung (zwei Schrittmotoren) mit einer Winkelauflösung von $1/1000^\circ$ im $\theta/2\theta$ -Modus betrieben, wobei der Probemotor um den Winkel θ bewegt wird und der Detektormotor um den Winkel 2θ , um die Bedingung Einfallswinkel = Ausfallswinkel zu erfüllen. Der reflektierte Strahl wird durch eine Bikonvexlinse mit der Brennweite $f = 100$ mm auf eine Si-Photodiode fokussiert, deren Ausgangsspannung proportional zur gemessenen

reflektierten Lichtintensität ist. Die Steuersoftware wurde von Andreas Scheller, EDV-Abteilung MPIP entwickelt. Der Computer ist mit einer IEEE Karte (Keithley) ausgerüstet. Die rechnergestützte Auswertung der gemessenen Reflektionskurven erfolgt im Rahmen der Dissertation mit dem von Jürgen Worm am MPIP entwickelten WinSpall-Programm. Das Programm verwendet einen Rekursionsformalismus in Form einer Anpassungsrechnung, die auf einem Transfer-Matrix-Algorithmus zur Berechnung der Fresnelkoeffizienten des Schichtsystems beruht.^[1238]

Die graphische Aufbereitung erfolgt mit Hilfe einer Datenanalyse-Software (Origin 5.0).

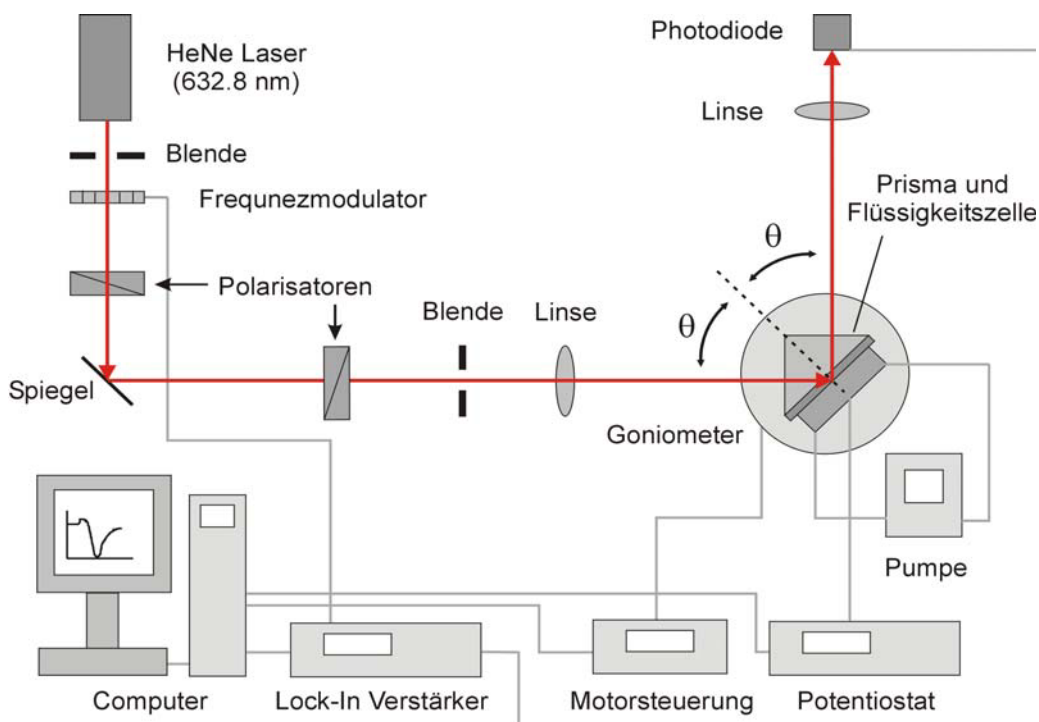


Abbildung 81 Versuchsanordnung der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS) mit Darstellung des optischen Versuchsaufbaus, der Meßzelle mit Pumpvorrichtung und elektronischer Satenaufnahme und Auswertung

Moderne Meßaufbauten kombinieren zunehmend oberflächenplasmonenspektroskopische Methoden und Effekte mit Anderen Meßmethoden. Als Beispiele seien an dieser Stelle SPS gekoppelte MALDI-TOF MS in einem wiederverwertbaren^[1241] und in einem Einwegchipformat^[1242-1245], der Einsatz von Oberflächenplasmonen zur Fluoreszenzverstärkung^[66, 1246-1249] und die Kombination von SPS mit elektrochemischen Methoden^[47, 864, 1250, 1251] erwähnt.

4.10 FT-Infrarotspektroskopie unter streifendem Einfall

Eine wichtige Methode zur Charakterisierung von organischen Verbindungen auf Oberflächen ist die Infrarotspektroskopie. Der Spektralbereich umfaßt bei der IR-Spektroskopie (mittleres Infrarot) die Spektralbereiche der elektromagnetischen Strahlung in Tabelle 5:

Wellenzahl	400-4000 cm ⁻¹
Wellenlänge	25-2,5 µm
Frequenz	12-120 THz

Tabelle 5 Spektralbereich der IR-Spektroskopie

Um mit infraroter Strahlung wechselwirken zu können, müssen die zu untersuchenden Moleküle in der Lage sein von der elektrischen Komponente des elektromagnetischen (optischen) Wechselfelds von einem Schwingungszustand zu einem anderen Schwingungszustand angeregt zu werden.

Die Voraussetzung für die IR-Anregung eines Schwingungsübergangs ist, daß sich das **(dynamische) Dipolmoment** durch die Anregung ändert. Die Anregung ist nicht unbedingt an das anfängliche Vorhandensein eines Dipolmoments im Molekül gebunden. Es reicht, wenn sich das Dipolmoment durch die Schwingungsanregung ändert.

Die Schwingungsamplitude individueller Moleküle ist indirekt proportional zu ihrer Masse. Schwere Atome schwingen weniger stark als leichte. Schwere Atome schwingen gleichzeitig langsamer als leichte, was in der Massenträgheit begründet liegt. Die erlaubten Schwingungsniveaus lassen sich in guter Näherung anhand des harmonischen Oszillators beschreiben (Gleichung 54).

Durch die Einwirkung eines elektrischen (oder optischen, das heißt elektromagnetischen) Feldes auf den Dipol beginnt dieser zu rotieren und entlang der Bindungslänge zu schwingen. Das Molekül nimmt Rotations- und Schwingungsenergie auf, die dem anregenden elektromagnetischen Feld entstammt.

$$\vec{E} = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) hc \tilde{\nu}; \text{ mit } \tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

Gleichung 54

Aus der Quantenmechanik folgt, daß nur diskrete Energien erlaubt sind und die Energiebeträge nur diskret aufgenommen werden können (Energie- und Schwingungszustände $\nu = 0, 1, \dots$, Vergleich Gleichung 54). Die Aufnahme von Energie ist deshalb nur dann möglich, wenn die Frequenz (Umpolen des elektrischen Felds) der anregenden Strahlung mit der Übergangsfrequenz der Rotation bzw. Schwingung korreliert was zu Rotationsschwingungsbanden führt. Die Intensität der Absorptionsbande ist durch die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Zuständen i und $i+1$ definiert (Gleichung 55).

$$\mu_{i,i+1} = \left| \langle i+1 | \vec{E} \mu | i \rangle \right|^2 \delta(\nu_0 - \nu)$$

Gleichung 55

Die verschiedenen Schwingungen können in Näherung einzeln betrachtet werden. Die Abstraktion auf einzelne Molekülgruppen führt zum Konzept der Gruppenfrequenzen.

Viele funktionelle Gruppen besitzen charakteristische Absorptionsfrequenzen bzw. -wellenzahlen. Diese sind annähernd konstant und nur wenig von ihrer chemischen Umgebung im Molekül abhängig. Gleichwohl - und das ist die Näherung - verschieben sie (Shift) in Abhängigkeit ihrer chemischen Nachbarschaft um einen geringen Wert. Die Verschiebung ist im Falle der Feldverstärkung an Oberflächen auch von der molekularen Orientierung der funktionellen Gruppen zur Oberfläche abhängig. Es können nur Schwingungen von funktionellen Gruppen beobachtet werden, deren Dipol parallel zum elektrischen Feld steht.^[1252]

Neben der qualitativen Analyse lassen sich durch die Aufnahme von Eichspektren und der Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes auch quantitative Aussagen machen.

Schwingungssymbole

In der IR-Literatur ist die Bezeichnung der einzelnen Schwingungen mit Symbolen üblich. Nachfolgend ist eine Tabelle mit den Bezeichnungen der wichtigsten Molekülschwingungen abgebildet:

Symbol	Bezeichnung der Schwingungsform
α, β	i. p. Deformationsschwingung, allgemein
Γ	o. o. p. Deformationsschwingung von Gerüstatomen
γ	o. o. p. Deformationsschwingung
Δ	i. p. Deformationsschwingung von Gerüstatomen
δ	i. p. Deformationsschwingung einer X-H-Bindung
δ_s	symmetrische Deformationsschwingung (bending)
δ_{as}	asymmetrische Deformationsschwingung (bending)
δ'	Deformationsschwingung (twisting, rocking)
κ	o. o. p. wagging Schwingung einer XH_2 -Gruppe ($X \neq C$)
r	rocking Schwingung
r_β	i. p. rocking Schwingung
r_γ	o. o. p. rocking Schwingung
ρ	i. p. rocking Schwingung einer XH_2 -Gruppe ($X \neq C$)
ν	Streckschwingung einer X-H-Bindung
ν_s	symmetrische Streckschwingung
ν_{as}	asymmetrische Streckschwingung
ν_β	i. p. Streckschwingung
ν_γ	o. o. p. Streckschwingung
t	twisting Schwingung
τ	Torsion, twisting Schwingung einer XH_2 -Gruppe ($X \neq C$)
Φ	o. o. p. Ring-Deformationsschwingung

Tabelle 6 Symbole für die Bezeichnung der Schwingungsform

Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) wird auch synonym als ERAS (*engl. External Reflection Absorption Spectroscopy*), GIR-FTIR (*engl. Grazing Incidence Reflection FTIR Spectroscopy*) oder ERS (*External Reflection Spectroscopy*) bezeichnet. Erste Anwendungen liegen gegen Ende der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts durch Francis und Ellison die LB-Filme auf Metallspiegeln analysierten.^[1253] Wenige Jahre später erlangte die Methode stärkere Bedeutung durch Greenler der auch die Intensitätsverstärkung durch polarisiertes Licht erklären konnte.^[1254] Bei dieser Meßmethode wird IR-Licht an der Außenseite einer Metall-Oberfläche (extern) reflektiert. Ziel ist die Spektroskopie von auf dieser Oberfläche befindlichen, dünnen Schichten. Die Empfindlichkeit dieser Meßmethode reicht aus, um IR-Spektren selbst monomolekular dünner Filme mit einer Schichtdicke von einigen Ångström messen zu können. Typische Bandenhöhen dieser Monoschichten liegen im Bereich unterhalb 0,005 AU (Absorbance Units).^[1255]

Auswahlregel an der Metalloberfläche^[1256]

Der elektrische Anteil (E-Feld) des auf die Oberfläche einfallenden IR-Lichts (elektromagnetische Welle) wechselwirkt mit in der Oberfläche vorhandenen Ladungen. Das besondere an Metallen ist dabei, daß diese aus frei beweglichen, negativ geladenen Elektronen und im Metallgitter fixierten, positiv geladenen Atomrümpfen bestehen. Die Wechselwirkung erfolgt mit den Atomrümpfen als auch mit den Elektronen. Natürlich führt die Wechselwirkung mit den positiven Atomrümpfen nicht zu einer merklichen Polarisierung, da diese nahezu ortsfest im Kristallgitter des Metalls fixiert sind. Die innerhalb des Metalls frei beweglichen Elektronen hingegen werden durch die elektrische Kraft des von außen einwirkenden E-Felds verschoben. Das Metall wird an der Oberfläche polarisiert.

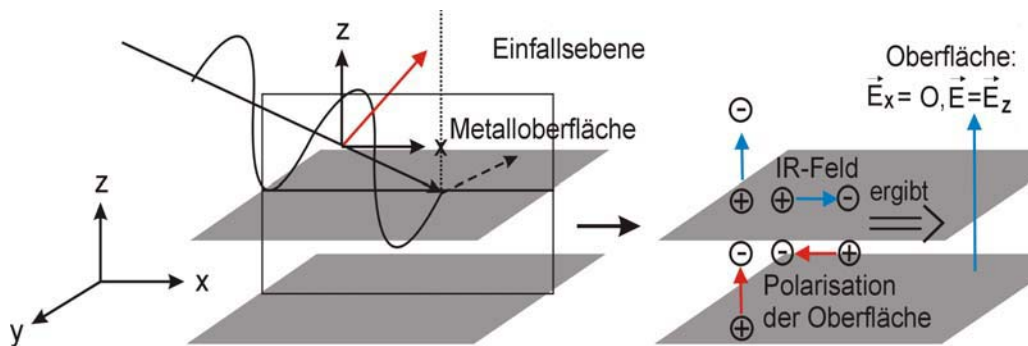


Abbildung 82 Die durch IR-Licht polarisierte Metalloberfläche und die daraus resultierende Verstärkung der Normalkomponente des einfallenden Felds

Das in Abbildung 82 oben links dargestellte, von außen einwirkende E-Feld der Welle wird an der Oberfläche in Komponenten senkrecht und parallel zur Oberfläche aufgespalten. Die parallel zur Oberfläche gerichtete Komponente verursacht eine Verschiebung von Elektronen parallel zur Oberfläche. Es entsteht eine Anhäufung negativer geladener Elektronen und positiv geladener Atomrümpfe (eine Polarisation) in Folge derer sich ein elektrisches Feld an der Metalloberfläche aufbaut. Es ist der Ursache - dem äußeren Feld - entgegengesetzt gerichtet. Die Ladungsverschiebung erfolgt genau so lange, bis das äußere und das durch Polarisation erzeugte Feld gleich stark sind. Dann addieren sich beide Felder zu Null, sie heben sich auf. Damit entfällt die ursächlich wirkende, elektrische Kraft, es werden keine weiteren Polarisationsladungen aufgebaut. Die senkrecht der Oberfläche gerichtete Feldkomponente erzeugt ein Polarisationsfeld, daß dem äußeren Feld gleichgerichtet ist und sich zu diesem addiert. Es kommt zu einer Verstärkung der Normalkomponente des einfallenden Felds.

Der ganze Vorgang findet ständig (dynamisch) statt, da das von außen einwirkende E-Feld von einer Welle herrührt, deren Polarität und Feldstärke sich mit ihrer Frequenz ständig ändert. Im infraroten Spektralbereich ist die Trägheit der Elektronen vernachlässigbar. Die Elektronen können auf Änderung des äußeren E-Felds unmittelbar reagieren. Die Feldkompensation erfolgt vollständig. Hingegen spielt die Trägheit der Elektronen im Ultravioletten eine zunehmende Rolle. In Bereichen weicher Röntgenstrahlen und kurzwelliger ändert sich das E-Feld so schnell, daß die Elektronen wegen ihrer Trägheit dem E-Feld nicht mehr folgen können. Dann entfällt die Oberflächenauswahlregel vollständig. Die "Grenze" (eigentlich ein kontinuierlicher Übergang) zwischen beiden Bereichen entspricht der Plasmafrequenz des "Elektronengases" im konkreten Metall und liegt meist in tiefen UV (100.-.200 nm).

Die Wechselwirkung des Dipolmoments nimmt mit zunehmender Feldstärke E zu und damit auch die Intensität der Absorptionsbande. Die Verstärkung auf des E-Feldes erfolgt durch die Überlagerung der eingestrahnten und der reflektierten Welle, die auf reflektierenden Metalloberflächen eine stehende Welle ausbilden die mit IR-aktiven Molekülen wechselwirken kann. Die Stärke der Welle ist vom Polarisationszustand des eingestrahnten Lichts und dessen Einfallswinkel abhängig. Um zu verstehen, warum nur das p-polarisierte Licht zu einer Felderhöhung senkrecht zur Oberfläche führt betrachten wir Abbildung 83:

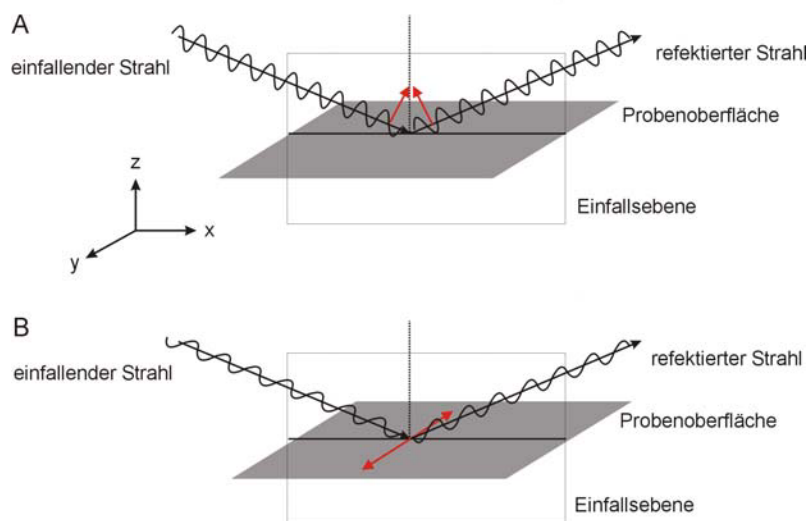


Abbildung 83 Unterschiede in der Felderhöhung für p- und s-polarisiertes IR-Licht

Der einfallende Strahl kann bezogen auf seine Einfallsebene in eine senkrechte und eine parallele Komponente unterteilt werden. Die schwarzen Pfeile in Abbildung 83 zeigen die Strahlkomponenten zur Einfallsebene. In der linken Abbildung ist es die senkrechte

Komponente zur Einfallsebene (s-Polarisation), in der rechten Abbildung die der parallelen Polarisation. Die E-Feldkomponente des s-polarisierten Strahls weist ausschließlich in Y-Richtung (E_s). Die p-polarisierte Welle besitzt dagegen zwei E-Feldkomponenten, E_x und E_z . Daraus resultieren die folgenden Felder E_s , E_p^\perp und E_p^\parallel an der ersten Grenzschicht:

$$E_y = E_s = E_s^i [\sin \phi + r_s \sin (\phi + \delta_s)]$$

Gleichung 56

$$E_z = E_p^\perp = E_p^i [\sin \phi + r_p \sin (\phi + \delta_p)]$$

Gleichung 57

$$E_x = E_p^\parallel = E_p^i [\sin \phi + r_p \sin (\phi + \delta_p)]$$

Gleichung 58

E_s , beschreibt das resultierende elektrische Feld der Strahlkomponente senkrecht zur Einfallsebene, E_p^\perp und E_p^\parallel die Strahlkomponenten parallel zur Einfallsebene. Die Komponenten der eingestrahnten Welle die senkrecht bzw. parallel zur Einfallsebene stehen sind als E_p^\perp und E_p^\parallel indiziert.

Für die Feldverstärkung an der Goldoberfläche ist die Phasenverschiebung δ zu beachten, da sich die elektrischen Felder bei einer Verschiebung von 180° kompensieren. Der Einfluß von Einfallswinkel ϕ und Einfallsebene auf die Phasenverschiebung δ ist in Abbildung 84 dargestellt. Durch eine Phasenverschiebung von fast 180° im Fall von s-polarisiertem Licht kommt es zu einer destruktiven Interferenz zwischen der eingestrahnten und der reflektierten Welle an der Grenzfläche und die elektrischen Feldvektoren heben sich weitgehend auf. Somit kommt es für s-polarisiertes Licht zu keiner Feldverstärkung an der Oberfläche. Abbildung 84 zeigt, daß für s-polarisiertes Licht keine starke Abhängigkeit zwischen Phasenverschiebung δ und Einfallswinkel ϕ besteht. Das elektrische Feld E_p^\parallel parallel zur Metalloberfläche ist für alle Einfallswinkel klein. E_p^\perp , das resultierende E-Feld in y-Richtung verhält sich dagegen anders. Für senkrechten Einfallswinkel ϕ ist die Phasenverschiebung δ sehr klein und nimmt mit zunehmenden Einfallswinkel ϕ besonders nahe dem streifenden Einfall stark zu. Geht der Einfallswinkel ϕ aber gegen 90° , so tritt auch hier eine Phasenverschiebung δ von 180° auf.

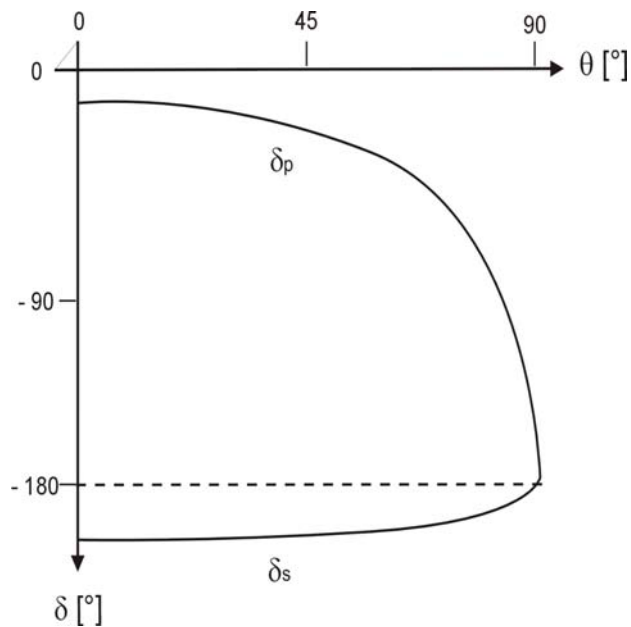


Abbildung 84 Phasenverschiebung δ für s- und p-polarisiertes Licht^[1254]

Die Messungen erfolgen mit p-polarisiertem Licht, da s-polarisierte Anteile des E-Felds nicht zur Messung beitragen können. Sie würden nur einen zusätzlichen "Energieballast" am Detektor erzeugen und das Rauschen erhöhen. Der Einfallswinkel wird so gewählt, daß möglichst viele Anteile des einfallenden p-polarisierten E-Felds senkrecht zur Oberfläche stehen. Deshalb empfiehlt sich ein möglichst streifender Einfall. Andererseits erhöht der flacher werdende Einfallswinkel die zur Reflexion erforderliche Probenoberfläche. Bei begrenzter Oberfläche führt das zu Energieverlusten und zur Erhöhung des Streulichts im Probenraum. Deshalb wird als Kompromiß ein Einfallswinkel von etwa 80° - 84° empfohlen. Optimale Werte werden im Versuch ermittelt.

Damit die Moleküldipole mit dem senkrecht auf der Metalloberfläche stehenden Feld eine endliche elektrische Feldstärke E notwendig. Es werden daher nur Schwingungen beobachtet, deren Dipolkomponente senkrecht zur Substratebene orientiert sind, da nur die Komponenten des Übergangsdipolmoments mit dem elektrischen Feld koppeln, die senkrecht zu diesem orientiert sind. Intensität des beobachtbaren IR-Signals hängt vom Winkel des entsprechenden Übergangsdipolmoments relativ zur Oberflächennormalen ab. Aussagen über die Orientierung der Moleküle in geordneten Schichten sind somit möglich.

4.11 Brewsterwinkelmikroskopie

Die Brewsterwinkelmikroskopie^[1257] (BAM, Brewster Angle Microscopy) stellt neben der Fluoreszenzmikroskopie das einzige bildgebende Verfahren zur Untersuchung des Phasenverhaltens von Molekülen an Grenzflächen, insbesondere von Monoschichten, an der Wasser/Luft-Grenzfläche dar.^[1258] Im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie ist man bei dieser Methode nicht auf die Zugabe von sondenmarkierten Molekülen angewiesen. Da sondenmarkierte Moleküle nicht mit den zu untersuchenden Molekülen identisch sind, fügt man dem System dadurch eine Störung zu, welche einen nicht immer verifizierbaren Einfluß auf das Phasenverhalten ausüben kann. Dieses Problem wird in der Brewsterwinkelmikroskopie vermieden.^[817, 1259-1261]

Strahlt man Licht, das parallel zur Einfallsebene polarisiert ist, unter einem bestimmten Winkel, dem Brewsterwinkel, auf eine Wasseroberfläche ein, wird es nicht reflektiert, sondern es tritt Totalreflektion auf, siehe Abbildung 85.

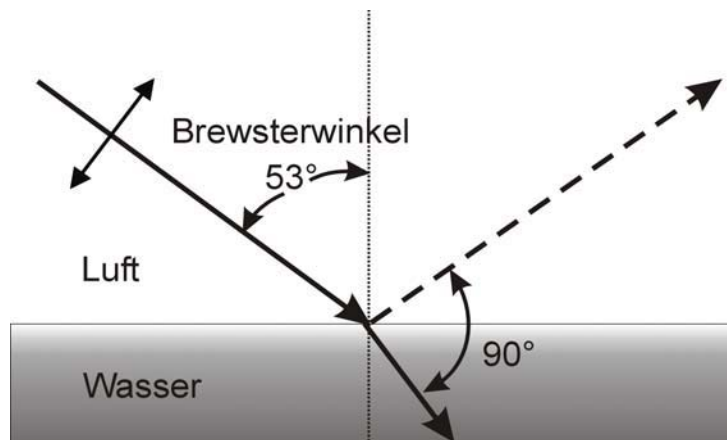


Abbildung 85 Strahlengang von p-polarisiertem Licht beim Auftreffen auf die Wasser-Luft-Grenzfläche unter dem Brewsterwinkel. Der reflektierte Strahl (---) wird nicht beobachtet.

Der Brewsterwinkel wird durch die Brechungsindizes der beiden Phasen n_1 und n_2 bestimmt^[1262]:

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

Gleichung 59

Handelt es sich bei der Grenzfläche um das System Luft-Wasser mit $n_1 = 1$ für Luft und $n_2 = 1,33$ für Wasser, ergibt sich ein Wert von $53,1^\circ$ für den Brewsterwinkel. Befindet sich eine mono- oder multimolekulare Schicht auf dem Wasser, ist das Gesetz von Brewster nicht mehr erfüllt. Es kommt zu einer partiellen Reflexion, siehe Abbildung 86.

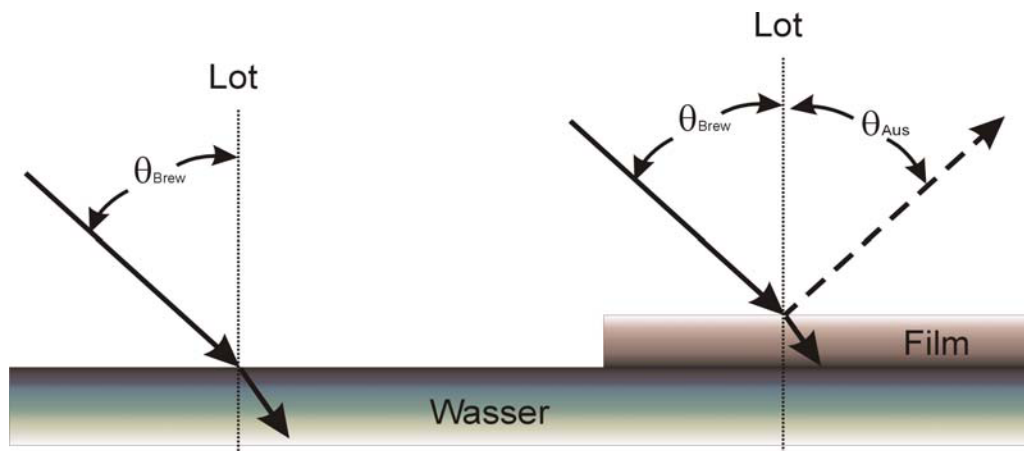


Abbildung 86 Reflektionsverhalten des p-polarisierten Lichts unter dem Brewsterwinkel mit und ohne molekulare Schicht. Mit Schicht kommt es zur partiellen Reflexion (---)

Die Reflexion ist von den optischen Eigenschaften der Moleküle und deren Orientierung in der Schicht abhängig.^[1263, 1264] Die Orientierung der Moleküle in der Mono- oder Multischicht kann durch den Azimut und den Polarwinkel beschrieben werden. Die Mono- oder Multischichten sind jedoch in der Regel nicht isotrop, sondern in flüssig-kristallinen oder festen Phasen optisch anisotrop.

Der einfachste Fall der Anisotropie ist dabei die durch Bereiche mit unterschiedlicher azimuthaler Orientierung der Moleküle der Mono- oder Multischicht gegebene Anisotropie. Durch unterschiedliche Brechungsindizes in paralleler und senkrechter Richtung der Molekülachse wird eine Änderung der Polarisation des reflektierten Lichtes hervorgerufen. Dies wird als eine Kontraständerung in der abgebildeten Reflexion gemessen, wodurch die Berechnung der Molekülorientierung möglich wird.^[1265, 1266] Ein in den reflektierten

Strahlengang eingebauter Analysator verbessert die Detektion der Polarisationsänderung und erlaubt die Bestimmung unterschiedlicher azimuthaler Molekülorientierungen.

Betrachtet man die Wasseroberfläche unter dem Brewsterwinkel für reines Wasser, so erscheint die reine Wasseroberfläche dunkel, während Teile die mit einer Mono- oder Multimolekülschicht bedeckt sind hell erscheinen. Dadurch lassen sich laterale Änderungen der chemischen Zusammensetzung der Grenzflächenschicht oder deren Änderung der molekularen Orientierung bzw. Packung mit einer Auflösung im μm -Bereich beobachten.^[1267] Die so gewonnenen Ergebnisse zeigen kaum Unterschiede zu den mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Informationen.^[1268]

4.12 Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzerholung nach Photobleichung

Fluoreszenzmikroskopische Methoden erlauben eine Vielzahl experimenteller Analysemöglichkeiten für die Untersuchung molekularer Architekturen. Sie dienen der Strukturaufklärung, der Bestimmung von molekularen Abständen und der Analyse dynamischer Prozesse. Dadurch sind fluoreszenzmikroskopische Methoden für die Untersuchung biologischer Systeme nahezu unentbehrlich geworden.^[1269] Besonders ihr bildgebender Charakter und die Möglichkeit die Lokalisation spezifischer Moleküle dynamisch und in Echtzeit zu verfolgen, ist für molekular- und zellbiologische Fragestellungen von besonderer Bedeutung. Hierzu werden die zu beobachtenden Moleküle, z.B. Lipide oder Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und biologische Vorgänge (z.B. Transport, Transcytose, Lipidsortierung) untersucht.^[1270]

Im Rahmen dieser Arbeit werden Fluoreszenzmethoden für die Analyse von monomolekularen Schichten an der Wasser-Luft Grenzfläche angewendet.

Grundlagen

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen lichtemittierenden Prozeß, der durch die Einstrahlung von Licht geeigneter Wellenlänge initiiert wird. Nach Beendigung der Bestrahlung beobachtet man ein sofortiges Ende der Fluoreszenz, da die Übergang innerhalb von Nanosekunden stattfindet.^[1271] Die Deaktivierung aus dem angeregten Zustand kann auf unterschiedlichen Wegen (auch ohne Fluoreszenz) erfolgen.

Die von der Absorption von Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht führenden Prozesse werden mit Hilfe von Energiediagrammen dargestellt, die nach dem polnischen

Physiker Alexander JABLONSKI benannt sind. JABLONSKI ist der Begründer der modernen Fluoreszenzspektroskopie. Viele Fluorochrome haben aromatische Ringstrukturen, das heißt sie besitzen delokalisierte Elektronen in den bindenden π -Orbitalen. Die Elektronen dieser Orbitale treten leicht in Wechselwirkung mit der Umgebung und erreichen bei Absorption eines Anregungsphotons ein energetisch höher gelegenes Orbital, das π^* -Orbital. In bindenden Orbitalen liegen Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor - eine Anordnung, welche die sogenannten Singulett-Zustände charakterisiert (S_0 , S_1 , S_2). Im Jablonski-Diagramm in Abbildung 87 sind die Energieniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 , des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes S_1 und des ersten elektronisch angeregten Triplett-Zustandes T_1 dargestellt.

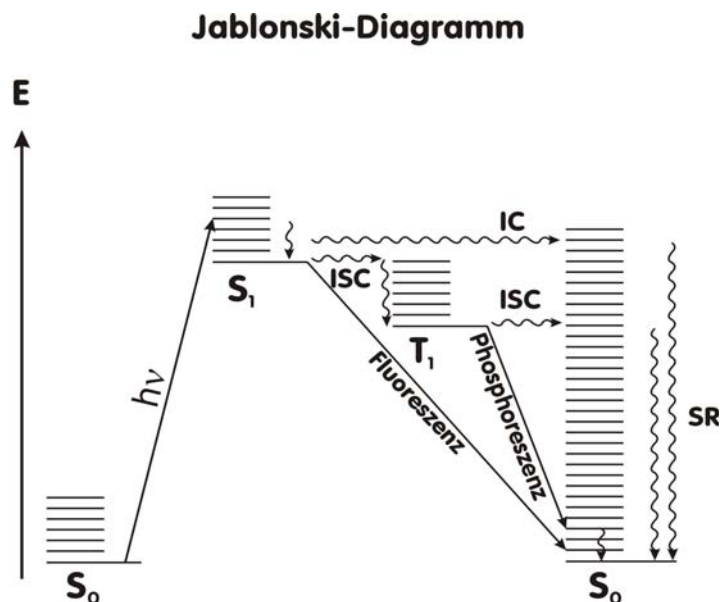


Abbildung 87 Jablonski-Diagramm: Die durchgezogenen Pfeile stellen radiative Elektronenübergänge dar, d.h. Elektronenübergänge, die unter Absorption oder Emission von elektromagnetischer Strahlung stattfinden: Aufsteigende Pfeile deuten Lichtabsorption an, absteigende Pfeile entsprechen der Emission von Licht. Es ist zu beachten, daß es sich dabei stets um Elektronenübergänge zwischen verschiedenen Elektronenzuständen handelt. Die geschlängelten Pfeile stellen nicht-radiative Prozesse dar und haben folgende Bedeutung: ISC (=intersystem crossing) ist der Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität und kann im ersten elektronisch angeregten Zustand ablaufen, z.B. S_1T_1 ; IC (=internal conversion) ist der Übergang zwischen dem niedrigsten Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustandes S_1 und einem sehr hoch angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes S_0 ; SR (=Schwingungsrelaxationen) sind Übergänge von höheren nach niedrigeren Schwingungszuständen innerhalb ein- und desselben elektronischen Zustandes.

Jeder elektronische Zustand untergliedert sich in mehrere Schwingungszustände, dargestellt durch die parallelen äquidistanten Linien. In Wirklichkeit sind die Energiedifferenzen zwischen den Schwingungszuständen nicht gleich, sie werden nach oben hin immer geringer. Auch die Energiedifferenzen zwischen S_0 , S_1 und T_1 sind in der Graphik nicht maßstabgerecht dargestellt, weil zunächst nur die relative Anordnung zueinander von Bedeutung ist. Es ist zu beachten, daß die Abszisse im Jablonski-Diagramm fehlt, sie hätte keine Bedeutung. Die laterale Verschiebung von S_0 , S_1 und T_1 zueinander soll nur der Übersicht dienen. Unter Einhaltung des Frank-Condon-Prinzips wird durch die Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu_A$) ein Elektron aus dem Grundzustand S_0 in einen der angeregten Zustände S_1 oder S_2 angehoben. Da dieser Vorgang extrem schnell ist, vollzieht er sich innerhalb etwa 10^{-15} s. Aus dem oberen angeregten Zustand ist ein Übergang nach S_1 möglich, ohne daß ein Photon emittiert wird ("innere Umwandlung"). Im Singulett-Zustand S_1 sind alle Elektronenspins des Systems gepaart, weil das angehobene Elektron während des Übergangs seinen Spin beibehalten hat. Der Licht emittierende Übergang findet unter Emission eines Fluoreszenzphotons ($h\nu_F$) aus dem vibronischen Grundzustand in statt (Regel von KASHA). Dabei ist die Energie des emittierten Photons immer geringer als die des absorbierten Photons - damit ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts größer als die des Anregungslichts (Stokes'sche Regel). Die Verschiebung der Wellenlänge kann dazu verwendet werden, bei der Wahl des richtigen Kantenfilters das anregende vom emittierten Licht zu trennen. Die mittlere Verweilzeit im angeregten Zustand (Fluoreszenz-Lebenszeit) ist bei vielen Fluorochromen im Bereich von 10 ns.

In Abhängigkeit von der chemischen Natur der Verbindungen kann es durch Spinumkehr im elektronisch angeregten Zustand ("Interkombination", *engl.* ISC=*Intersystem Crossing*) zu einem Übergang aus einem angeregten Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand (T_1) kommen. Das angeregte Elektron und das in S_0 verbliebene Elektron, mit dem es vor der Anregung ein Paar bildete, haben nun parallele Spins. Auch der Sprung in den Grundzustand erfordert eine Spinumkehr. Solche Vorgänge sind jedoch sehr unwahrscheinlich, da quantenmechanisch verboten, und die Emissionsraten sind sehr gering (1-1000 pro s). Diese geringe Übergangsrate ist der Grund für das langsame Abklingen der Phosphoreszenz. Die Phosphoreszenz-Strahlung ist gegenüber der Fluoreszenz-Strahlung wiederum bathochrom verschoben.

Sowohl bei der Fluoreszenz als auch bei der Phosphoreszenz ist das emittierte Licht polychromatisch, die Spektren weisen Bandenstruktur (nicht Linienstruktur wie bei der Atomemission) auf. Das ist in Übereinstimmung mit der Deaktivierung aus S_1 bzw. T_1 in unterschiedliche Schwingungszustände $S_{0,k}$ des Grundzustandes.

- Bei der Deaktivierung aus der "Triplet-Falle" T_1 konkurrieren die Übergänge $T_1-S_1-S_0$ (verlangsamte Fluoreszenz) und T_1-S_0 (Phosphoreszenz). Da bei der verlangsamten Fluoreszenz der erste, geschwindigkeitsbestimmende Schritt endotherm verläuft (positive Aktivierungsenergie), wird die T_1 -Desaktivierung via S_1 bei höheren Temperaturen beschleunigt und bei tieferen Temperaturen gebremst.

Beobachtung der Fluoreszenz

Eine Flüssigkeit, in der eine fluoreszierende Substanz (ein Fluorochrom) gelöst ist, zeigt Fluoreszenz, wenn sie mit Licht bestrahlt wird, das geeignet ist, die Fluorochrom-Moleküle anzuregen. Fluoreszenz kann am besten in einem steilen Winkel zur Achse des Anregungslichtes beobachtet werden, weil so eine Überlagerung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht vermieden wird. In Fluoreszenz-Photometern ist aus diesem Grund der Lichtdetektor (*engl.* PMT = *PhotoMultiplier Tube*) rechtwinklig zum Anregungslicht angeordnet. Anregungs- und Emissionslicht können auch mit optischen Filtern getrennt werden (s.o.).

Viele Fluoreszenzfarbstoffe, die in Lösung fluoreszieren, zeigen erst bei sehr tiefen Temperaturen auch Phosphoreszenz.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Lipidmonoschichten gibt man zusätzlich zu den untersuchten Molekülen einen fluoreszierenden amphiphilen Farbstoff z.B. auf die Wasser-Luft Grenzfläche eines LB-Troges der auch als Filmwaage bezeichnet wird. Der Film wird beleuchtet und mit einem Lichtmikroskop beobachtet. Man beobachtet dabei die laterale Verteilung des Farbstoffs im Film.^[1272] Je nach Phasenzustand der Monoschicht lagert sich der Farbstoff in verschiedene Lipidphasen ein oder hat eine unterschiedliche Quantenausbeute. Anhand der Fluoreszenzintensität lassen sich die Phasen unterscheiden. Dadurch war es möglich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erstmals die Koexistenz verschiedener Phasen in Monoschichten auf Wasser nachzuweisen.^[1273, 1274]

Die neben der Bresterwinkelmikroskopie verbreitetsten Methoden zur Charakterisierung von mono-, bi- und Multischichten sind zweifellos Fluoreszenztechniken.

Die Lokalisation der Fluoreszenzsonde am Lipid führt zu veränderten Lipideigenschaften. Deren Einfluß/Störung der Membran hängt unter anderen von deren Polarität ab.^[1275, 1276]

Oft hält sich die Sonde hauptsächlich im flüssig expandierten Bereich auf,^[639] und nur wenig im flüssigkristallinen Bereich, da hier Unterschiede im Packungsverhalten am deutlichsten sichtbar werden.

FRAP-Messungen

FRAP (*engl. Fluorescence Recovery After Photobleaching*) wurde ursprünglich für die Analyse der lateralen Diffusion von fluoreszenzmarkierten Lipiden in Membranen entwickelt. Zwischenzeitlich wird die Methode für die Bestimmung der Mobilität von einer ganzen Reihe verschiedener biologischer oder pharmazeutischer Moleküle verwendet.^[1277]

Häufig verwendete Fluorophore schließen Fluoreszeinderivate wie zum Beispiel Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Diphenylhexatrienderivate (DPHs), Nitrobenzoxadiazolderivate (NBDs) oder Dialkylcarbocyaninderivate (DiIs) ein.^[1277] Im Rahmen dieser Arbeit werden in erster Linie NBD-markierte Fluoreszenzsonden verwendet.

Die Messung wird wie folgt vorgenommen:

Nach Präparation der Monoschicht, funktionalisiert mit fluoreszenzsondenmarkierten Lipid, wird ein Ausschnitt des Films gebleicht, das heißt der Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe von starkem Laserlicht zerstört. Anschließend beobachtet man bei Vorliegen eines fluiden Lipidfilms eine „Erholung“, das heißt der zuerst dunkel erscheinende Fleck verschwindet durch das Eindiffundieren intakter fluoreszenzmarkierter Lipide von außerhalb des Bleichflecks langsam wieder.

Die einfachste Methode ist die Bleichung eines Fleckes mit einem einheitlichen Gaußprofil.^[1278] Die Analyse der zeitabhängigen Fluoreszenzerholung macht die Diffusionskonstante D der Lipide zugänglich. Zusätzlich wird die relative Erholung R (siehe unten) erhalten.

Wird das Bleichmuster geändert, kann ein gerichteter Fluß oder eine anisotrope Diffusion durch eine Orientierungsänderung des Bleichmusters der Analyse zugänglich gemacht werden. Zusätzlich ist es möglich die Diffusionskoeffizientenverteilung zu bestimmen.^[1279]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bleichung eines runden Flecks mit einheitlichem Bleichprofil angewandt (siehe Abbildung 88).

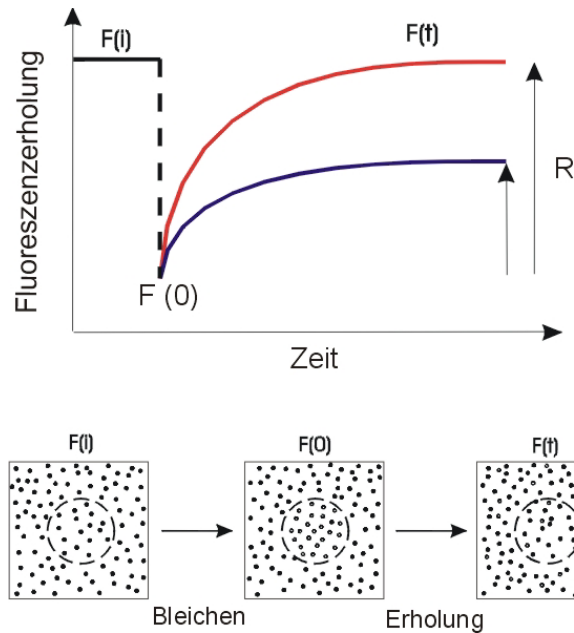


Abbildung 88 Grundlagen des FRAP: Oberer Teil der Abbildung: Darstellung der Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzerholung. Die Erholungskurve $F(t)$ ist eine Funktion des lateralen Diffusionskoeffizienten D und der relativen Erholung R . Die obere der beiden Kurven zeigt eine 100 %ige Erholung, die darunter liegende Kurve eine Erholung von etwa 50%. Unterer Teil der Abbildung: Durch zirkuläre Illumination wird Fluoreszenz mit der Intensität $F(i)$ angeregt. Kurze Belichtung mit hoher Strahlungsintensität führt zur kompletten oder partiellen Bleichung mit der resultierenden Fluoreszenzintensität $F(t = 0)$. Ist die Membran lateral fluide wird der gebleichte Membranbereich durch Eindiffundieren intakter fluoreszenzmarkierter Lipide mit der restlichen Membranfläche harmonisiert. Modifizierte Abbildung aus^[64]

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse ist eine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Probenkonzentration, die nur für einen eingeschränkten Konzentrationsbereich gilt.^[1269] Zusätzlich muß die Bleichung irreversible sein. Der letzte Gesichtspunkt spielt vor allem schnelle Diffusionsvorgänge mit Diffusionszeiten τ_D im Bereich von Millisekunden untersucht werden,^[1277] wo die Beziehung:

$$\tau_D = \frac{w^2}{D}$$

Gleichung 60

mit dem Radius des Bleichflecks w gilt. SOUMPASIS^[1280] zeigte, daß die Fluoreszenzintensität $F(t)$, (siehe Abbildung 88) durch die Analyse des zeitabhängigen Konzentrationsprofils der

gebleichten Moleküle berechnet werden kann. Details können Der Dissertation von T. Baumgart entnommen werden.^[64]

Versuchaufbau

Der für die Fluoreszenzmikroskopie und das FRAP verwendete Versuchsaufbau wurde schon im Detail beschrieben.^[64, 1281]

Im wesentlichen besteht er aus einem inversen Mikroskopaufbau (IX-70, Olympus) mit einer Quecksilberlampe (HBO 100, Olympus, 100 Watt) für die Ausleuchtung des gesamten Beobachtungsfeldes. Für die Fluoreszenzmikroskopie werden ein Anregungs-Filter (BP 470 – 490, Olympus, Hamburg) und ein Barrierenfilter (BA 515, Fluoreszenzwürfel U-MNIB, Olympus, Hamburg) verwendet. FRAP-Experiment wurden mit einem Argon-Ionen-Laser (Innova 90/4, Coherent, Dieburg) durchgeführt der mit einer Wellenlänge 488 nm bei einer Leistung von 1,2 Watt betrieben wurde. Eine Kombination von drei Pockelzellen und vier linearen Polarisatoren (Gsänger, München) erlauben in alternierender Anordnung eine Verstärkung um den Faktor 10^6 .

Durch die Änderung der Spannung an den Pockelzellen kann die Beobachtungsintensität eingestellt werden. Dies ist notwendig um die Photobleichung während der Intensitätsbestimmung zu unterdrücken.

Um zu starke Schwankungen in der Laserintensität zu vermeiden sollte der Laser mindestens 30 min vor der Messung eingeschaltet werden. Die Schwankung des Lasers müssen nur bei der Meßung extrem langsamer Diffusionskonstanten berücksichtigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Fluoreszenzerholung in Zeitintervallen gemessen die kleiner als 5 min sind. Hierbei sollte der Fehler unter 1 % liegen.^[64]

Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Photomultiplier (9893/100, Thorn EMI, England) gemessen.

Die Einstellung des Fokus (und Fluoreszenzmikroskopie) werden mit einer lichtverstärkenden Kamera (extended ISIS, Photonic Sciences) vorgenommen. Die erhaltenen Fluoreszenzbilder mit einer AG-5, Scion, USA Karte digitalisiert und mit dem Programm SCION image (SCION, USA) oder Image Pro Plus (Media Cybernetics, Leiden, Netherlands) bearbeitet.

Da im Rahmen dieser Arbeit auch langsame Diffusionskoeffizienten gemessen werden, wird dafür Sorge getragen, daß möglichst keine Bleichung durch den Beobachtungsstrahl vor der Aktivierung des Bleichlaserpulses auftritt. Aus diesem Grund wurde die mechanische Blende im Strahlengang nur für kurze Beobachtungsintervalle geöffnet. Diese wurden durch das von A. Sinner geschriebene FRAP-Kontrollprogramm gesteuert.^[1281]

4.13 Elektrophoretische Methoden

Die klassische Elektrophorese ist eine häufig angewandte Methode in der Molekularbiologie und Gentechnik. Sie dient zur Trennung und Analyse von Molekülgemischen, meist Protein- oder Nukleinsäuregemische. Diese werden einem elektrischen Spannungsfeld ausgesetzt. Die einzelnen Moleküle bewegen sich in diesem Feld aufgrund ihrer elektrischen Ladung und ihrer Größe unterschiedlich schnell und werden dadurch getrennt. Meistens wird als Trägersubstanz ein Gel (Gelelektrophorese) verwendet. Das Molekülgemisch wird in das Gel geladen und unter elektrischer Spannung wandern die Moleküle durch das Gel. Kleinere Moleküle passieren das Gel schneller als größere. Ebenso Moleküle mit größerer Ladung. Nach einiger Zeit sind die Moleküle an unterschiedlichen Stellen im Gel einzeln nachweisbar und können beispielsweise mit einem fotografischen Verfahren sichtbar gemacht werden. Bestimmte Gene hinterlassen typische Abfolgen von „Banden“.

In Analogie zur klassischen Elektrophorese zeigten POO und ROBINSON 1977 als erste, daß Membrankomponenten durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine umverteilt werden können.^[1282] Die Mikroelektrophorese von Proteine an festkörperunterstützten Membranen ist eine interessante Übertragung des klassischen Elektrophoreseprozesses auf eine ein biomimetisches System.^[1202] 1992 demonstrierten STELZLE et al. die Bestimmung der Mobilität von Fluoreszenzproben in unterstützten Lipidmembranen durch die Messung der Driftgeschwindigkeiten unter Zuhilfenahme der kontrollierten Mikroelektrophorese.^[1113]

Membranen können somit als molekular dünne Medien betrachtet werden, in denen sich elektrisch geladene Moleküle analog einem klassischen Gel unter Anlegung eines elektrischen Feldes bewegen können. Membranlipide unterscheiden sich in ihrer Kopfgruppenladung und der Stärke der hydrophoben Wechselwirkung unter den hydrophoben Molekülteilen. Dadurch besitzen sie eine unterschiedliche Mobilität. Sie verteilen sich ohne die Einwirkung einer äußeren Kraft in der Membran einzeln oder als verschieden große Aggregate ohne Vorzugsrichtung. Legt man ein elektrisches Feld an, kommt es durch dessen Einwirkung zur Ausbildung unterschiedlich starker elektromotorischer Kräfte auf individuelle Molekülspezies.^[1112] GROVES und BOXER zeigten, daß es dadurch zu einer lateralen Reorganisation^[1283] und Entmischung^[1284, 1285] der Lipide in der Membran kommt.^[1286]

Die gleichen Autoren untersuchten die Ausbildung von Konzentrationsgradienten fluoreszenzmarkierter Lipide durch das Anlegen eines elektrischen Feldes^[1112, 1287] und stellten

fest, daß die dynamische Reorientierung der Membrankomponenten von deren Mobilität abhängt^[1288].

Die Lipidbewegung läßt sich durch Manipulation der effektiven, und auf spezifische Moleküle unterschiedlich stark wirkende elektromotorische Kraft direktionalisieren. Barrieren zwischen integralen Membranarealen erlauben durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Lipiden die Visualisierung individuell funktionalisierter Oberflächen.

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Erzeugung solcher Phasengrenzen, beziehungsweise Barrieren beschrieben. Die Membran kann physisch mit einem scharfen Gegenstand, zum Beispiel mit einer Nadel oder Kanüle durchtrennt werden,^[1112, 1289] das Festkörpersubstrat, zum Beispiel PDMS, kann durch unterschiedliche Oberflächenbehandlung (zum Beispiel durch lokale Plasmaoxidation) die bevorzugte Ausbildung von Membranarealen auf definierten Flächen erlauben,^[1290] es können Barrieren aufgedampft oder geätzt werden,^[1291, 1292] photolithographisch oder Elektronenstrahl-lithographisch erzeugt werden,^[1293] oder die Membran kann durch „Prägen“ entfernt werden^[1294]. In Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung des Barrierenmaterials assemblieren die Lipide auf der strukturierten Region nicht oder sie assemblieren dort und sind immobil.^[1293] Der Barriereneffekt wird hiervon nicht beeinträchtigt.

Die Barrierenfunktion von Leerräumen zwischen mechanisch (durch Kratzen) geteilten Membranen hängt vom pH Wert ab. Im basischen Milieu sind die Phasengrenzen der Barriere stabil (elektrostatistischer Effekt). Liegt der pH Wert im sauren, kommt es zu einer langsamen Fusion der getrennten Membranhälften.^[1283, 1289] Die Funktion der Kratzer als Barrieren der freien lateralen Diffusion beruht auf einer Kombination topographischer und tribologischer Wechselwirkungen.^[1295] In beiden Fällen (Kratzer und Barrieren durch lithographische Methoden) wird das Glas physikalisch oder chemisch modifiziert. Im ersten Fall ist wird zwar eine sehr einfache Methode angewandt, diese läßt sich aber schlecht kontrollieren und ist nicht im Detail verstanden.

Im zweiten Fall müssen zusätzliche Materialien auf die Oberfläche des Trägers aufgebracht werden, ein weiterer Parameter der die Membran beeinflusst. Hovis und Boxer beschreiben einen anderen Ansatz. Bei diesem wird nicht die Funktionalisierung der Trägeroberfläche zur Strukturierung der Membran verwendet, sondern die inhärenten Eigenschaften der Lipide bzw. Membran selbst.

Lipide formen Lipiddoppelschichten als ein Resultat des Gleichgewichts zwischen hydrophober Wechselwirkung, Oberflächenspannung der Grenzschichten und abstoßenden intermolekularen Kräften; die Wechselwirkung zwischen der planaren Lipiddoppelschicht und dem oxidischen Substrat schließt ein Gleichgewicht zwischen *van der Waals*, elektrostatischen,

Hydratations- und sterischen Kräften ein. Als Konsequenz all dieser subtilen Kräfte können sich Lipiddoppelschichten lateral nur um ein limitiertes Maß an der Oberfläche ausdehnen.^[1004, 1296] Insbesondere CREMER und BOXER zeigten, daß sich durch Vesikelfusion von Ei-PC-Vesikeln gebildete festkörperunterstützte Membranen auf dem Festkörpersubstrat auf maximal 106% ihrer Originalfläche ausdehnen, wenn eine Teil der Lipidmembran vom Glassubstrats durch Aussetzen eines Teils des Trägers an Luft entfernt wurde. Die Ausbreitung der Membran erfolgt in Form von „fingerartigen“ Lipidstrukturen auf dem Träger.^[64, 1294]

Die Ausdehnung ist pH abhängig, bei hohen pH Werten ist die Expansion arretiert, während bei niedrigen pH Werten eine anfangs schnelle Expansion beobachtet werden kann, die gegen Erreichen des maximalen Expansionszustandes stark verlangsamt wird. Der pH Effekt kann vermutlich auf eine Protonierung der Glasoberfläche und die Beeinflussung der molekularen Wasserschicht auf dem Substrat zurückgeführt werden die eine attraktive Wechselwirkung der Lipide mit Festkörpersubstrat fördert.

Die Strukturierung der Membran^[1297] erlaubt es Kompartimente bzw. Areale der Membran unterschiedlich zu modifizieren und an diesen gezielte biophysikalische Messung vorzunehmen. Zusätzlich erlaubt etwa eine gitterartige Kompartimentierung der Membran die Durchführung von parallelen Experimenten und die gezielte Selektion von Arealen hoher Qualität.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene der oben genannten Aspekte miteinander verknüpft, um mit einem neuen, in der Arbeitsgruppe von Steve G. BOXER von J. HOVIS entwickelten Ansatz zerstörungsfrei via Fluoreszenzmikroskopie Diffusionskonstanten in festkörperunterstützten Membranen zu messen.^[1109, 1294, 1298] Der Ansatz soll selektiv Membranmaterial von der Oberfläche entfernen, um unter Ausnutzung der limitierten lateralen Expansion form-/strukturstabile Membranareale zu erzeugen. Die Messung von Diffusionskoeffizienten unter Zuhilfenahme elektrophoretischer Membranmanipulationen stellt dabei das Ziel dar.

Hierzu werden Membranen durch Entfernen eines Teils der Lipiddoppelschicht von der Festkörperoberfläche strukturiert (siehe Kapitel 5.2.4). Anschließend wird der Glasträger unter Wasser in die Teflonmeßzelle eingebaut. (siehe Abbildung 89)

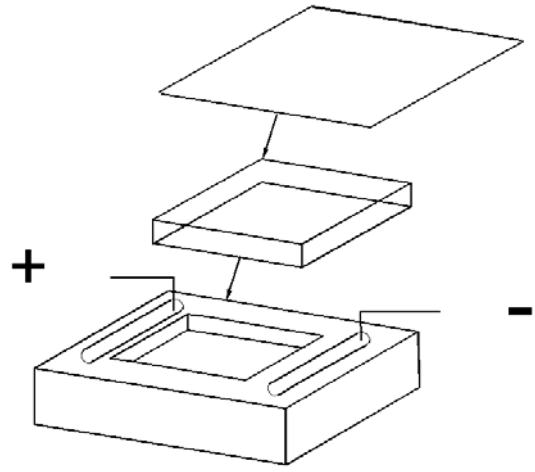


Abbildung 89 Schematischer Aufbau der Meßzelle zur Durchführung der Elektrophorese. Der Glasträger der Membran (Mitte) wird unter Wasser mit einem Deckglas bedeckt und in die Zelle eingelegt.

Da der mittlere Teil der Meßzelle optisch frei zugänglich ist, kann die Beobachtung der Membran auf einfache Weise von beiden Seiten erfolgen. (siehe Abbildung 90)

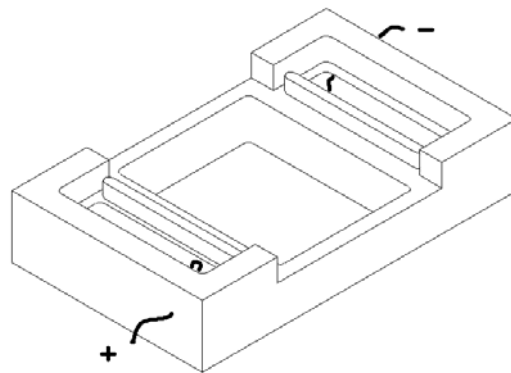


Abbildung 90 Detailansicht der Elektrophoresemeßzelle mit den elektrischen Anschlüssen

In Abbildung 90 ist der genaue Aufbau der Meßzelle zu erkennen. Wesentlich sind die Flüssigkeitsreservoirs an den beiden Kopfenden, die mit der Kathode und der Anode verbunden sind. Diese sind durch einen dünnen Steg vom Glasträger getrennt, und an den Seiten zum Reservoir hin offen, damit ein leitender Flüssigkeitsfilm die zwischen den beiden

Glasplatten befindliche Wasserschicht und die Membran mit den Reservoirs und Elektroden verbindet.

Die einzelnen Schritte der Präparation sind in Abbildung 91 schematisch dargestellt:

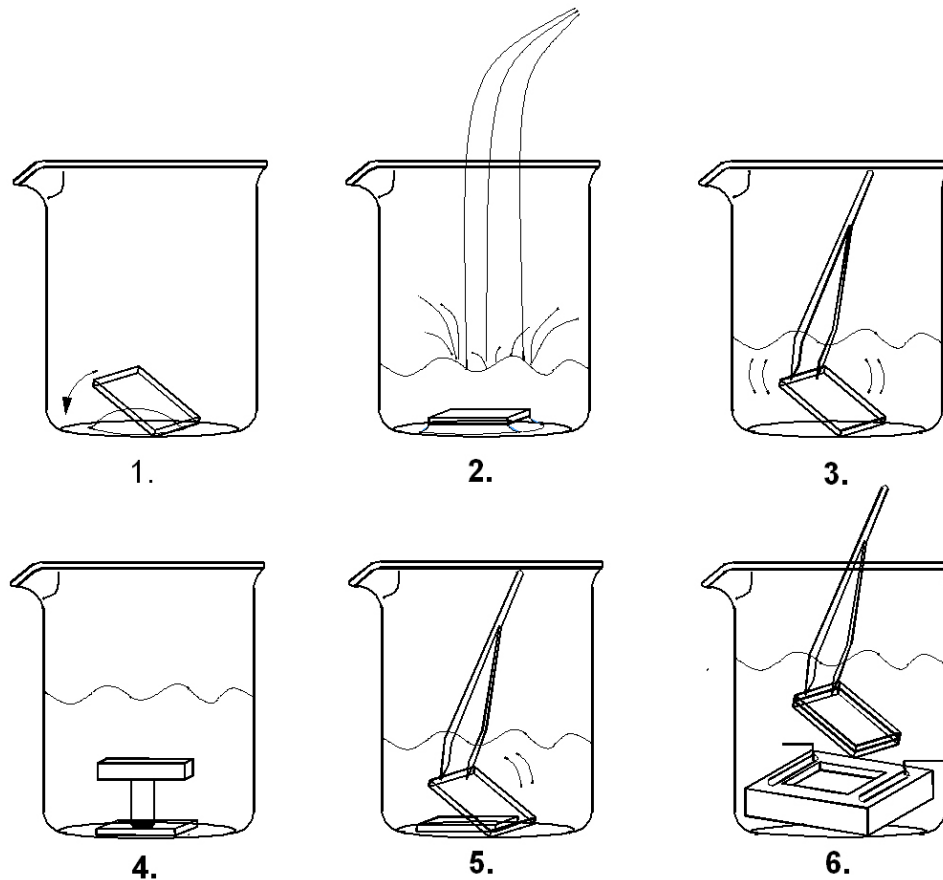


Abbildung 91 Die Strukturierung der physisorbierten Lipidmembran erfolgt in 6 Schritten, die in den oben dargestellten 6 Abbildungen verdeutlicht sind. 1. Die Vesikellösung wird auf den Boden eines Becherglases gegeben und der Träger auf diesen gelegt. 2. Das Becherglas wird mit Pufferlösung oder MilliQ-Wasser aufgefüllt. 3. Nach einigen Minuten wird der Träger leicht im Becherglas geschwenkt um loses Lipidmaterial von der Oberfläche zu entfernen. 4. Anschließend wird der mit einem Gewicht beschwerte Stempel vorsichtig und ohne laterale Bewegungen auszuführen auf die Membran gesetzt. 5. Nachdem der Stempel vorsichtig senkrecht zur Oberfläche entfernt wurde, wird der Träger mit einem Deckglas abgedeckt. 6. Die beiden geschichteten Glaträger werden ohne sie zu scheren in die Meßzelle eingebaut.

Ist die Membran mit negativ geladenen, fluoreszenzsondenmodifizierten Lipiden funktionalisiert (in der vorliegenden Arbeit werden für diese Versuche Lipidmischungen mit 1 mol % N-(Texas Red sulfonyl)-1,2-dihexanodeconoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (TexasRedDHPE) von Molecular Probes verwendet) können die Membranen im elektrischen Feld manipuliert werden. Texas Red besitzt den Vorteil, daß es mehrfach negativ geladen ist und demzufolge die elektromotorische Kraft, die es zur Anode zieht, verhältnismäßig stark ist. Der elektrochemische Versuchsaufbau entspricht dem in der Literatur beschriebenen.^[1112]

Legt man nun parallel zur Membranfläche über die Membranareale hinweg ein elektrisches Feld von 11 V cm^{-1} mit einem Strom von $1 \mu\text{A}$ an, so wird ein Konzentrationsgradient des stark anionischen „Texas Red“-funktionalisierten Lipids erreicht. Nach etwa 65 min ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, und die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle haben sich stark im anodischen Raum der Lipidareale angereichert. Schaltet man das Feld aus, diffundieren die Moleküle wieder in alle Richtungen des Raumes und verteilen sich gleichmäßig. Durch Umpolung des Feldes können die „Texas Red“-funktionalisierten Lipids in die entgegengesetzte Richtung bewegt werden.

Die gleichmäßige Verteilung der Lipide nach Abschalten des Feldes durch Diffusion kann zur Bestimmung der Diffusionskonstanten verwendet werden. Hierzu wird die Änderung des fluoreszierenden Gradienten über das Membranareal zeitlich verfolgt und die Diffusionskonstante berechnet.

Der Vorteil dieser Methode zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten liegt in seiner zerstörungsfreien Analyse der gemischten Lipidmembran. Bei Anwendung der FRAP-Technik werden durch die Zerstörung der fluoreszenzmarkierten Lipide bei der Bestimmung der Diffusionskonstanten neue Moleküle mit unbekanntem Einfluß auf die Membran gebildet. Eine Kombination aus einem elektrophoretischen Meßaufbau und Fluoreszenzmikroskop stellt bei entsprechender Membranpräparation eine Methode zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten dar, bei welcher die Störung der Membran minimiert wird.

Der Meßaufbau besteht aus einem 10,14ANikon E800 Fluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einer Photometrics Sensys CCD-Kamera. Die Elektrophorese wird wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.^[1112] Als Solvens wird Millipore Wasser mit einem Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega$ verwendet. Da der Strom dabei $2 \mu\text{A}$ nicht überschreitet, ist die durch den Widerstand entstehende Wärme vernachlässigbar.

4.14 Filmwaage, Druck-Flächen-Isothermen & monomolekulare Schichten

Der heute unter dem Namen Langmuir, Langmuir-Pockels- oder Langmuir-Blodgett (LB) Trog bekannte Versuchsaufbau wurde von Agnes POCKEL, einer österreichischen Amateurwissenschaftlerin, mit einfachsten Mitteln und in genialer Heimarbeit zur Untersuchung grenzflächenaktiver Verbindungen entwickelt (siehe auch Kapitel 3.2.1). Ihre Methode wurde von Irving LANGMUIR übernommen und nur geringfügig weiterentwickelt (Abbildung 92).

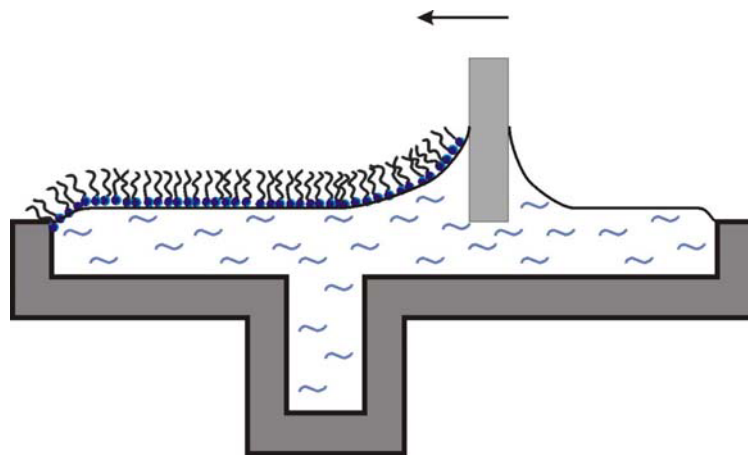


Abbildung 92 Langmuir-Pockels Trog bzw. Filmwaage

Monomolekulare Schichten besitzen für das Verständnis biologischer Prozesse in Form von biologischen Lipidmembranen eine essentielle Rolle. Soll gezielt eine monomolekulare Hälfte der Membran beobachtet und untersucht werden, spielt die Filmwaage, auch als Langmuir- oder Langmuir-Pockels-Trog bezeichnet, eine zentrale Rolle.

Amphiphile Moleküle bilden auf der Wasser/Luft-Grenzfläche eine monomolekulare Schicht, wenn sie auf die Wasser/Luft-Grenzfläche aufgetragen werden. Das Aufbringen der Moleküle auf die Wasseroberfläche, wird auch als „Spreiten“ bezeichnet.

Ist der hydrophobe Molekülteil (als kettenförmige Acyl- oder Alkylreste auch als Schwanzketten bezeichnet, relativ kurz, sind die Moleküle wasserlöslich und es findet ein Austausch zwischen Monolage und gelösten Molekülen in der Subphase (Wasser) statt. In diesem Fall spricht man von einer **Gibbs-Monolage**. Sind die Schwanzketten länger, sind die Moleküle wasserunlöslich und die Monolage kann als ein isoliertes, quasi-zweidimensionales System betrachtet werden. Man spricht dann von einem **Langmuirfilm**.

Zur Präparation eines Langmuirfilms gibt man ein definiertes Volumen einer Lösung der zu spreitenden Verbindung, gelöst in einem leicht flüchtigen, nicht wasserlöslichen Lösungsmittel (z.B. Chloroform), auf die Grenzfläche. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, werden die auf der Grenzfläche befindlichen amphiphilen Moleküle mit Hilfe beweglichen Barrieren aus Dynal oder Teflon auf der Wasser/Luft-Grenzfläche komprimiert. Die für die Barrieren verwendeten Polymere können hydrophilisiert sein. Der Filmdruck steigt in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Fläche pro Molekül beim Zusammenfahren der Barrieren an. Das heißt, der Filmdruck der Monoschicht agiert hierbei gegen die Kompression der Barriere, so daß der Druck in der Monoschicht durch die Änderung der zur Verfügung stehenden Trogfläche variiert werden kann.^[1100]

Ein wichtiger Meßparameter ist der Lateraldruck der Monoschicht bzw. Langmuirfilms. Dessen Meßung kann auf verschiedene Weise experimentell durchgeführt werden. Am verbreitetsten ist die Kombination aus Langmuir-Pockels-Trog und Wilhelmy Plattenmethode.

Taucht eine Platte teilweise in eine Flüssigkeit welche die Platte benetzt, dann wirkt eine zusätzliche Kraft an der Platte, die durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit hervorgerufen wird. Ist die Platte vollständig benetzt, ($\Theta=0$) und wird die Position der Plattenunterkante auf das Niveau der Flüssigkeit eingestellt, dann ist die gemessene Kraft, abzüglich der Gewichtskraft der Platte, mit dem Term $\gamma_{l,g} \cdot p$ identisch. Hierbei ist p der Plattenumfang (Perimeter). Dadurch erlaubt eine einfache Gewichtsmessung einer Platte an Luft und im Kontakt mit der Flüssigkeitsoberfläche die Berechnung der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit. Wichtig ist die komplette Benetzung der Platte. Die Technik, wie sie angewendet wird, besteht aus einer Messprozedur. Hierin wird die Platte verschieden tief in die Flüssigkeit eingetaucht und bis zum Null-Niveau wieder herausgezogen. Zur Messung wird die Platte so tief eingetaucht, daß sie etwa zu $\frac{3}{4}$ eintaucht.

$$\Delta W = \gamma_{l,g} \cdot p + h \cdot A$$

Gleichung 61

Der mathematische Zusammenhang der Größen ist in Gleichung 61 formuliert. Dabei ist h die Eintauchtiefe der Platte und A eine Konstante, die für die an der Platte oberhalb des Meniskus anhaftende Schicht der Flüssigkeit steht. Zeichnet man in einem Diagramm $\Delta W/p$ gegen h und extrapoliert gegen $h=0$ kann $\gamma_{l,g}$ auch auf graphische Weise erhalten werden. Ein wichtiger Vorteil der Methode ist, dass die Dichte der Flüssigkeit nicht bekannt sein muß. Die Schwierigkeit des Verfahrens ist in jedem Fall die Bedingung $\Theta=0$ zu erfüllen. In manchen Fällen wird empfohlen die Plattenoberfläche anzuschleifen um die Rauigkeit zu erhöhen, was Θ verringert. Beim Messen von Flüssigkeiten mit hoher $\gamma_{l,g}$ ist es günstig, die Platte aus Pt oder Pt/Ir zu wählen (bisweilen findet man als Vorschlag Glas (Quarz), Glimmer, auch andere Metalle wie Nickel). Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Wilhelmy-Platte aus angerauhtem Platin verwendet.

Die für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen des Lipidverhaltens an der Wasser/Luft-Grenzfläche wird als sogenannte Druck-Flächenisotherme dargestellt. Hierzu wird der Lateraldruck π in Abhängigkeit von der Fläche pro Molekül untersucht. Mit Hilfe der Wilhelmy-Plattenmethode wird die Oberflächenspannung γ der Lipidschicht gemessen. Der Lateraldruck des Lipidfilms ist durch

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

Gleichung 62

gegeben. γ_0 entspricht der Oberflächenspannung des reinen Wassers (72,8 mN m⁻¹ bei 20°C). Bei praktischen Messungen gilt bei Kontaktwinkeln der Wilhelmy-Platte ungleich 0° folgende allgemeine Gleichung:

$$F = 2\gamma(d + w) \cos \Theta$$

Gleichung 63

F ist die auf die Platte wirkende Kraft, Gravitation und Boyeneffekt (Auftrieb) können vernachlässigt werden), w ist die horizontale Breite und d die Dicke der Wilhelmy-Platte und Θ der Kontaktwinkel der Tripellinie (Platte, Flüssigkeit und Gas/Luft). Für ein komplett benetzbares Medium und hinreichend dünnen Wilhelmy-Platten ($d \ll w$) ist die Änderung der Oberflächenspannung durch

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2w}$$

Gleichung 64

Ähnlich zu dreidimensionalen System bilden die Moleküle an der Wasser/Luft-Grenzfläche verschiedene Phasen, die sich in verschiedenen Ordnungsparametern unterscheiden. Diese können als 2D Gas, 2D Flüssigkeiten (liquid expanded phase (LE)), 2D Flüssigkristalle (liquid condensed phase (LC)) usw. bezeichnet werden. Die Verteilung der Phasen kann durch verschiedene optische Verfahren sichtbar gemacht werden. So z.B. durch Fluoreszenzmikroskopie oder Brewsterwinkelmikroskopie (siehe oben).

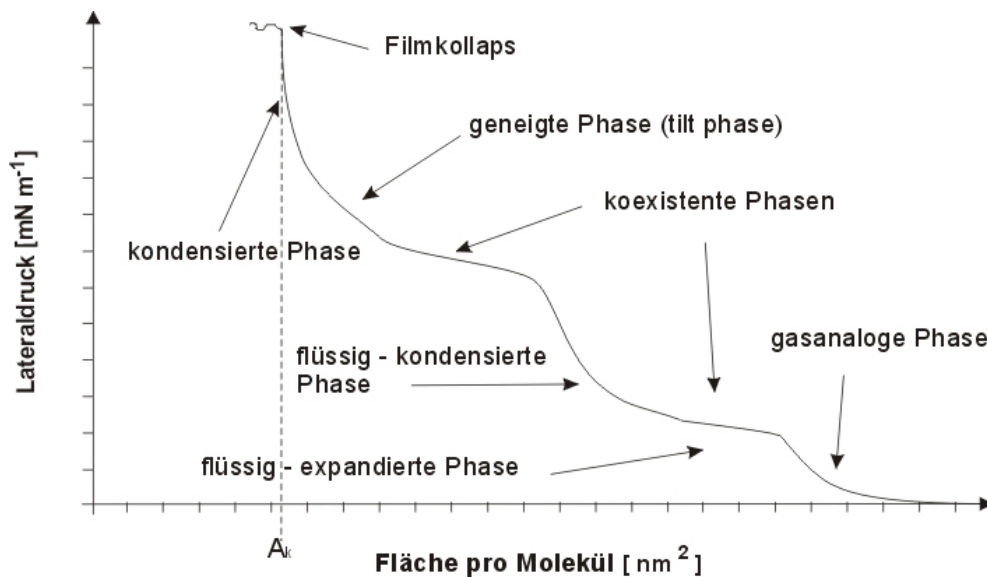


Abbildung 93 Schematische Darstellung einer typischen Druck-Flächen-Isotherme einer molekularen Monoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche.

Der Zustand einer Monoschicht wird in Druck-Flächen-Isothermen dargestellt. Diese können für unterschiedliche Substanzen verschieden aussehen. Gut untersucht wurde das Verhalten von relativ einfachen amphiphilen Molekülen wie langkettigen Alkoholen, Aminen oder Säuren. ^[1299, 1300] Fettsäuren, Phospholipide und verwandte Verbindungen zeigen auf Wasser oft folgende Phasen: ^[1301, 1302]

Gasförmig (G)

Die Zustandsgleichung für die „Gasphase“ ist $\pi\sigma = kT$. Die Fläche, die ein Molekül zur Verfügung hat, ist viel größer als Molekülgröße. Sie kann daher ohne Phasenübergang unendlich ausgedehnt werden. Komprimiert man den Film, kommt es zum Phasenübergang 1. Ordnung zum L-Zustand.

Flüssige Filme (L)

Hier kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den Molekülen. Man unterscheidet mindestens zwei Typen flüssiger Filme:

Flüssig ausgedehnt (LE, *liquid expanded*): Extrapoliert man die π - σ Graphen zu Null π weisen sie auf eine Fläche, die größer ist, als die Molekülgröße. Langkettige Kohlenwasserstoffe mit polarer Kopfgruppe (z.B. Säuren, Alkohole) zeigen eine Fläche von etwa 40-70 Å². Die Zustandsgleichung ist oft vom van-der-Waals-Typ.

Geneigte Phase (*tilted phase*): Hier kommt es zur Ausbildung relativ fester Filme mit Wassereinlagerung zwischen den Kopfgruppen. Die Moleküle, die bisher flach auf der Wasseroberfläche lagen stoßen aneinander und richten sich mit zunehmender Kompression auf. π - σ Graphen sind dadurch typischerweise linear.

Feste Filme (S, *liquid condensed*)

Im festanalogen Zustand ist kein Wasser mehr zwischen den Kopfgruppen vorhanden und es folgen lineare π - σ Graphen deren Extrapolation zu Null π ergibt eine Fläche die mit dem Molekülquerschnitt übereinstimmt (z.B. bei langkettigen Fettsäuren 20.5 Å²). Die Filme besitzen in diesem Zustand eine hohe Kompressibilität und können als kondensiert-fest betrachtet werden.

Der Phasenübergang zwischen der flüssig-ausgedehnten und der flüssig kondensierten (festen) Phase ist ebenfalls ein Phasenübergang 1. Ordnung. Neben diesen Übergängen existieren noch

eine Reihe Übergänge höherer Ordnung in der expandierten und der kondensierten Phase (siehe oben).^[1100, 1303]

Die Form der Druck-Flächen-Isothermen hängen stark von der Temperatur, den Eigenschaften der Subphase (Lösungsmittel, Ionenstärke...) und der Natur der Amphiphile ab. Bezüglich der letzten Eigenschaft ist auf den starken Einfluß der Kettenlänge auf die Phasenübergangstemperaturen hinzuweisen. Reduziert man die Kettenlänge einer Fettsäure um eine Methylengruppe entspricht die etwa einer Temperaturerniedrigung von 5-10°C. Auch die Natur der Kopfgruppen beeinflusst das Phasenverhalten. Beispielsweise zeigen Phosphatidylethanolamine auf Grund ihrer starken Wasserstoffbrückenbindung eine höhere Phasenübergangstemperatur als Phosphatidylcholine. Zusätzlich muß besonders darauf hingewiesen werden, daß bei bestimmten, kritischen Temperaturen die Phasenübergänge 1. Ordnung nicht notwendiger Weise beobachtet werden.^[1303]

Die Druck-Flächen-Isothermen von Polymeren oder Proteinen zeigen oft keine abgegrenzten Phasen. Selbst bei sehr kleinen Filmdrucken ist das Verhalten nicht ideal. Es hängt stark von der spezifischen Beschaffenheit des Polymers ab. Von Polymere mit amphiphilen Charakter lassen sich meist relativ gut Druck-Flächen-Isothermen messen.^[1304] Bei anderen Polymeren können die Isothermen oft irreversiblen Charakter besitzen.

4.15 Neutronenreflektometrie

Allgemeine Einführung

Die Eigenschaften des Neutrons erlauben es dem Neutronenstrahl analog zum Licht-, Röntgen- oder Elektronenstrahl reflektiert, gestreut und absorbiert zu werden. Dabei sind Neutronen in der Lage tief in das Untersuchungsmaterial einzudringen, mit den Atomkernen wechselzuwirken und auf Grund ihres magnetischen Dipolmoments auch die Untersuchung der magnetischen Eigenschaften im Untersuchungskörper zu erlauben. Zusätzlich können mit Neutronen – anders als bei der Röntgenstrahlung, auch leichte Elemente (z. B. Wasserstoff) nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Neutronenstrahltechniken lassen sich daher die **Struktur**, die **Dynamik** der Atombewegung und die **Zusammensetzung/Aufbau** des Untersuchungsmaterials analysieren.

Unter den oberflächenanalytischen Untersuchungsmethoden haben Neutronenstreu- und Reflektionstechniken für die Charakterisierung von strukturierten und nichtstrukturierten **Mehrschichtsystemen auf molekularer Ebene** eine besondere Bedeutung erlangt.^[1305, 1306] Die Anwendung der Neutronenreflektometrie erstreckt sich auf ein weites Feld physikalischer,

chemischer und biologischer Fragestellungen die von der Charakterisierung molekular dünner Schichten^[1307] bis zu komplexen biologischen Molekülen^[1308] reichen. Ein Vorteil den die Reflektometrie bietet, ist die Möglichkeit die Grenzflächenmorphologie bezüglich des Dichteprofiles, der Grenzflächenrauigkeiten und der lateralen Korrelation der analytischen Betrachtung zugänglich zu machen.

Für allgemeine strukturelle Charakterisierungen können verschiedene Methoden herangezogen werden. Eine Charakterisierung kann bereits in-situ, zum Beispiel bei Aufdampfprozessen mit Hilfe von Auger-Spektroskopie, LEED (Low Energy Electron Diffraction), RHEED (Reflection High Energy Electron Diffraction) oder auch mit Hilfe von STM (Scanning Tunneling Microscopy) erfolgen. Die genannten Techniken haben aber gemeinsam, daß sie sehr stark oberflächensensitiv/beschränkt sind (bezüglich der direkt zugänglichen Oberflächenmorphologie). Sie sind nur sehr bedingt in der Lage Informationen über tieferliegende Grenzflächen oder Interdiffusionsschichten liefern zu können, wie sie insbesondere für die Charakterisierung biomimetischer Schichtsysteme wünschenswert sind.

Neben diesem gravierenden Nachteil sind die Meßbedingungen der eben beschriebenen in-situ-Techniken oft nicht mit den Umweltbedingungen biomimetischer Systeme vereinbar. Außerdem liefern die obigen in-situ-Techniken nur sehr bedingt quantitative Informationen über Oberflächenstrukturen. Andere oberflächensensitive Methoden wie die Anwendung von AFM-Methoden (siehe oben) oder des SFA (engl. Surface Force Apparatus) liefern ebenfalls keine Einblicke in tiefere/ verborgene Grenzflächen.

Möchte man Schichtsysteme auf atomarem Niveau quantitativ charakterisieren, so bieten sich Streumethoden unter Verwendung von Röntgen- und Neutronenstrahlung zur Bestimmung von statistischen Parametern an. Nur sie erlauben es derzeit die Morphologie vergrabener Grenzflächen hinreichend zu beschreiben. Für die Anwendung, etwa bei magnetischen Dünnschichtsystemen oder bei biologischen Schichtsystemen wie Membranen, bietet die Neutronenstreuung Vorteile gegenüber der Röntgenstreuung.

Um die besonderen Möglichkeiten der Anwendung von Neutronen, vor allem im Gegensatz zu Röntgenstreu/reflektionsexperimenten zu verstehen und aufzuzeigen werden nun die Eigenschaften des Neutrons diskutiert um nachfolgend auf die Grundlagen der Streuung einzugehen. Die gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Beantwortung der Frage, welche Strahlungsart für die Beantwortung des Aufbaus von biomimetischen Membranen, vor allem von Beispielen mit großer vertikaler Enkopplung von der Oberfläche mittels flexibler kohlenhydratmodifizierter Polymere, herangezogen werden kann. Im Anschluss wird auf die Erzeugung von Neutronenstrahlen und deren Detektion eingegangen,

da die hier möglichen Alternativen einen bedeutsamen Einfluß auf den Meßaufbau zur Analyse von Schichtsystemem in molekularen Dimensionen ausüben. Die für die Durchführung solcher Messungen essentiellen theoretischen Grundlagen der Reflektion werden dann mit dem für die Reflektometrie notwendigen Meßaufbau und -vorgang abschließend behandelt.

Eigenschaften des Neutrons^[1309]

Neutronen und Photonen sind beide Elementarteilchen, unterschieden sich aber im Aufbau. Während das Photon punktförmig ist, ist das Neutron aus drei Quarks und Gluonen aufgebaut. Der Vergleich der beiden für die Beantwortung der inneren Struktur von Materialien bevorzugten Sonden – Neutron und Photon sind Tabelle 7 dargestellt:

Neutronen		Röntgen (Photon)
3 Quarks und Gluonen $m_n = 1.675 \cdot 10^{-27} \text{ kg} \approx 1 \text{ u}$ 0 1/2 $\mu_n = \gamma \cdot \mu_N; \gamma = -1.91 \mu_N = 5 \cdot 10^{-27} \text{ J/T}$	Elementarteilchen: Masse Ladung Spin magnetisches Dipolmoment	punktförmig 0 0 1 0
Schrödingergleichung (Materiewelle) $\underline{p} = m \cdot \underline{v} = \hbar \underline{k} \quad ; \quad p = h/\lambda$ $E = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} =: k_B T$	Welle: Impuls Energie	Maxwellgleichungen (elektromagnetische Welle) $\underline{p} = \hbar \underline{k} \quad ; \quad p = h/\lambda$ $E = h \cdot v = hc/\lambda$
$\lambda [\text{\AA}] = \frac{4000}{v[m/s]}$ $E[\text{meV}] = \frac{81.8}{\lambda^2[\text{\AA}^2]} = 0.086 T[K]$	praktische Werte	$E[\text{keV}] = \frac{12.4}{\lambda[\text{\AA}]}$
"thermische" Neutronen (300 K) $E = 25 \text{ meV}$ $\lambda = 1.8 \text{ \AA}$ $v = 2200 \text{ m/s}$	Beispiele	$\lambda = 1 \text{ \AA} \hat{=} E = 12.4 \text{ keV}$
- <i>Kernreaktor</i> Kernspaltung: $n + {}^{235}\text{U} \rightarrow 3n + X + Y$ MeV - <i>Spallationsquelle</i> "Verdampfung" $p + X \rightarrow 10n + X$ (GeV) MeV → anschließende "Moderation"	Quellen	- <i>Röntgenröhre</i> Bremsstrahlung + charakt. Linien - <i>Synchrotronstrahlungsquelle</i> transversale Beschleunigung relativistischer geladener Teilchen
- <i>Kernstreuung</i> starke Wechselwirkung am Atomkern - <i>magnetische Streuung</i> magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit Magnetfeld ungepaarter Elektronen ...	Wechselwirkung mit Materie	- <i>elektromagnetisch</i> - Thomson-Streuung (elastische Ladungsstreuung an e^-) - Compton-Streuung (inelastische Ladungsstreuung an e^-) - Photoeffekt (Absorption an Kanten) ...

Tabelle 7 Gegenüberstellung der Neutronen- und Röntgen(Photonen)eigenschaften^[1310]

Auf der räumlichen Skala und der Energieskala der Festkörperforschung und der Erforschung „weicher“ Materie spielt die innere Struktur des Neutrons keine bedeutende Rolle. Hier kann

das Neutron ebenfalls als punktförmiges Teilchen betrachtet und der Streuprozess im Wellenbild beschrieben werden. Die Wellenlänge des Neutrons liegt im Bereich interatomarer Abstände und ihre kinetische Energie ist vergleichbar mit der von Atomen im Feststoff. Neutronen sind also ungeladene Teilchen die relativ schwache Wechselwirkungen mit der Materie eingehen.

Thermische Neutronen (siehe unten) sind verhältnismäßig harmlos, da ihre Energie bei etwa 0,01 eV liegt und damit wesentlich kleiner ist, als die der Röntgenstrahlung (10^3 - 10^4 eV). Ihre ionisierende Wirkung auf biologische Systeme ist daher gering. Sie werden von der Materie im allgemeinen nur geringfügig absorbiert. Erfolgt aber eine Absorption, führt dies zur Bildung radioaktiver Kerne.

Die Bezeichnung kalte, thermische und heiße Neutronen bezieht sich auf deren Energie. Folgende Tabelle^[1309] faßt die dazugehörigen Größen zusammen:

	Energie (meV)	Temperatur (K)	Wellenlänge (nm)
kalt	0,1-10	1-120	0,4-3
thermisch	5-100	60-1000	0,1-0,4
heiß	100-500	1000-6000	0,004-0,1

Grundsätzlich besitzen Neutronen sowohl Teilchen- als auch Welleneigenschaften. Zur Beschreibung des Streuprozesses müssen die Wechselwirkungsmechanismen der Strahlung mit dem Festkörper bekannt sein.

Neutronen gehören zu den Baryonen und wechselwirken mit den Atomkernen aufgrund der starken Wechselwirkung. Im Festkörper ergibt sich trotzdem eine sehr geringe Streuwahrscheinlichkeit aufgrund der Tatsache, daß die Wellenlänge thermischer Neutronen sehr viel größer ist als der Kernradius. Das Streuzentrum kann daher auch als punktförmig angenommen werden, das heißt es ergibt sich eine isotrope (sogenannte S-Wellen-) Streuung. Die genaue Form der Wechselwirkung von Neutronen mit Kernmaterie stellt immer noch ein aktives Forschungsgebiet der Kern- und Hochenergiephysik dar. Im Rahmen der hier dargestellten Betrachtungen kann das Wechselwirkungspotential in einfacher Form betrachtet werden:

$$V(\underline{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m_n} b \cdot \delta(\underline{r} - \underline{R})$$

Gleichung 65

Gleichung 65, das sogenannte Fermi'sche Pseudopotential, drückt die Tatsache aus, daß der Streuer punktförmig ist (die Reichweite der Kernkraft ist ~ 1 fm und damit sehr viel kleiner als die Neutronenwellenlänge). Die δ -Funktion in der Gleichung beschreibt, daß das Neutron mit dem Ortsvektor \underline{r} nur eine Wechselwirkung am Ort \underline{R} des Kerns erfährt. Die Streulänge b ist ein Maß für die Streuwahrscheinlichkeit und charakteristisch für einen bestimmten Atomkern. Die Bedeutung des Fermi-Pseudopotentials liegt darin, daß sich damit die Streuung thermischer Neutronen am Festkörper im Rahmen der Bornschen Näherung (Vernachlässigung von Doppelstreuung, da diese üblicherweise sehr schwach ist) beschreiben läßt (siehe nachfolgende Abschnitte).

Neben der Wechselwirkung mit dem Atomkern besitzt das Neutron durch seinen Spin ein magnetisches Dipolmoment und ist in der Lage dadurch mit dem Magnetfeld ingepaarter Elektronen wechselwirken. Dieser Effekt spielt im Rahmen der Betrachtungen dieser Arbeit keine Rolle

Zusammenfassend soll noch auf einige ganz wesentliche Unterschiede zwischen Neutronen- und Röntgenstreuung am Festkörper hingewiesen werden, die dazu führen, daß sich die beiden Sonden ergänzen. In Abbildung 94 wird die Kernstreuung der Neutronen mit der Ladungsstreuung von Röntgenstrahlen am selben Atom verglichen.

Die Darstellung zeigt den totalen Streuquerschnitt für einige ausgewählte Elemente schematisch als Kreisfläche. In dieser anschaulichen Form stellt die Fläche ein Maß für die Streuwahrscheinlichkeit dar. Es ist ersichtlich, daß die Streuung von Röntgenstrahlung am Atom proportional zur Anzahl der Hüllenelektronen ist. Aus diesem Grund nimmt der totale Streuquerschnitt stetig mit der Kernladungszahl zu. Daraus resultiert der extrem schwache Kontrast zwischen benachbarten Elementen (etwa Eisen und Nickel in Abbildung 94). Daneben ist ein Wasserstoffatom mit nur einem Elektron gegenüber Metallatomen praktisch unsichtbar. Durch die Streuung am Kern spielt der detaillierte Aufbau des Kerns eine wesentliche Rolle. Benachbarte Elemente können daher sehr stark unterschiedliche Streuquerschnitte aufweisen. Die große Abhängigkeit der Streuwahrscheinlichkeit vom Kernaufbau führt dazu, daß die Streuwahrscheinlichkeit für verschiedene Isotope ein und desselben Elements sehr unterschiedlich ausfallen kann, wie Abbildung 94 zeigt. Für

Neutronen ist Wasserstoff durchaus kein schwacher Streuer mehr und etwa vergleichbar mit Titan. Die hohe Absorption einiger Materialien (z.B. Cd, B und Gd) muß z. B. bei der Verwendung von Trägermaterialien und Bauteilen berücksichtigt werden. Unter systematischer Ausnutzung dieser unterschiedlichen Kontrastverhältnisse können nun komplementäre Informationen an ein und derselben Probe mit Hilfe von Röntgen- und Neutronenstrahlung erhalten werden.

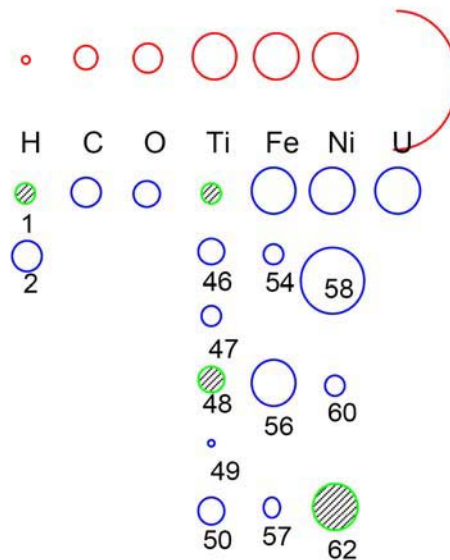


Abbildung 94 Darstellung^[1310] der totalen Streuquerschnitte von Röntgen- und Neutronenstrahlen. Die roten Kreise symbolisieren die Werte für Röntgenstrahlen, die blauen Kreise stellen die Streuquerschnitte der Neutronenstrahlen dar. Die Kreisflächen sind proportional zum Streuquerschnitt, bei den schraffierten Isotopen (Neutronenstreuung) tritt ein zusätzlicher Phasensprung von π auf.

Grundlagen der Streuung^[1309, 1310]

Eine Einführung in die Thematik der Neutronenstreuung kann bei Russel^[1311] gefunden werden. Im Gegensatz zu Röntgenstrahlen (hier wird die Lage des verschobenen Schwerpunktes der entsprechenden Elektronendichte des Atoms bestimmt) werden Neutronen am Kern gestreut. Die Streuung des Neutrons am Kern kann durch den Streuquerschnitt σ beschrieben werden und wird oft in der Einheit barn angegeben (engl. barn = Scheune ...“can't hit the side of a barn“, 1 barn = 10^{-28} m² – beruht auf einem alten Physikerwitz). Der Streuquerschnitt ist äquivalent zur effektiven Fläche die durch den Kern repräsentiert wird den das Neutron passiert. Trifft das Neutron auf diese Fläche wird es isotrop, das heißt gleichmäßig in alle Richtungen gestreut. Die Streuung ist isotrop, da die Reichweite des Kernpotentials bezogen auf die Wellenlänge des Neutrons sehr klein ist und der Kern somit effektiv ein Punktstreuer ist. Röntgenstrahlen werden hingegen nicht isotrop gestreut, da sie an der diffusen Elektronenhülle der Atome gestreut werden deren Größe im Bereich der Wellenlänge der

Röntgenstrahlen liegt. Da die Dimension des Streuzentrums (Atomkern) etwa 10^5 mal kleiner ist, als der Abstand zwischen den Streuzentren, besteht Materie für das Neutron überwiegend aus leerem Raum. Dies erklärt die vorzügliche Tiefensensitivität des Neutronenstrahls. Folgendes Beispiel vermag dies zu illustrieren: Die Abschwächung die thermische Neutronen beim Durchtritt einer 1mm dicken Aluminiumfolie erfahren ist gerade 1 %. Im Gegensatz dazu werden 99 % aller Photonen des Röntgenstrahls unter gleichen Bedingungen absorbiert. Allerdings sei an dieser Stelle bemerkt, daß die Intensität leistungsstarker Synchrotronröntgenstrahlung bei 10^{18} Photonen pro Sekunde und mm^2 liegt, während leistungsstarke Neutronenstreuexperimente mit 10^4 Neutronen pro Sekunde und mm^2 in der selben Energiebandbreite auskommen müssen. Neutronenstreu/reflektionstechniken sind durch den geringen Neutronenfluß und die geringe Wechselwirkung mit der Materie signallimitierte Methoden. Daß diese Messungen trotz dieser Limitierung durchgeführt werden liegt in der Tatsache begründet, daß keine andere Methode in der Lage ist die gleiche Strukturinformationen zu liefern.

Die Streuung am Kern ist ein quantenmechanischer Prozeß. Formal wird sie als Wellenfunktion des Atomkerns und des Neutrons beschrieben. Die Wellenfunktion des Neutrons hat, wie der Name impliziert die Form einer Welle als Funktion die sinoidal in Raum und Zeit oszilliert. Das Quadrat der Amplitude der Wellenfunktion beschreibt die Wahrscheinlichkeit das Neutron an diesem Punkt anzutreffen. Die Neutronen die für Streuexperimente verwendet werden haben üblicherweise eine Energie, die vergleichbar ist mit der von Atomen in einem Gas/Gemisch wie Luft. Damit ist nicht überraschend, daß sie etwa die selbe Geschwindigkeit wie diese aufweisen, die etwa bei einigen Kilometern pro Sekunde liegt. Die Quantenmechanik lehrt, daß die Wellenlänge des Neutrons invers proportional zum Betrag der Neutronengeschwindigkeit ist. Neutronen die für Neutronenstreuexperimente verwendet werden besitzen Wellenlängen λ im Bereich weniger Å. Für die Beschreibung bietet es sich an den Neutronenvektor k einzuführen der auf folgende Weise mit der Wellenlänge korreliert ist:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}$$

Gleichung 66

Der Vektor k zeigt dabei entlang der Neutronentrajektorie. Die Vektoren v und k sind daher kollinear und durch Gleichung 67 verbunden.

$$\frac{hk}{2\pi} = mv$$

Gleichung 67

Hierin ist h das Planck'sche Wirkungsquant ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), m die Masse des Neutrons ($m_n = 1,67495 \cdot 10^{-27}$ kg) und mv der Impuls des Neutrons. Unter der Annahme, daß zu einem definierten Zeitpunkt das auf einen fixen Atomkern einfallende Neutron durch die Wellenfunktion $e^{ik \cdot r}$ beschrieben wird, (diese beschreibt das Neutron als planare Welle mit Einheitsamplitude ausgedrückt durch den Ortsvektor r), ist das Quadrat der Wellenfunktion 1. Das heißt, daß das Neutron mit derselben Wahrscheinlichkeit irgendwo im Raum angetroffen werden kann, aber den definierten Impuls $mv = hk/2\pi$ besitzt. Die Knotenpunkte der Welle – das sind die Positionen an denen die Phase $k \cdot r$ gleich $n\pi$ ist (n ist eine ganze Zahl) – repräsentieren die ebenen Wellenfronten in Abbildung 95.

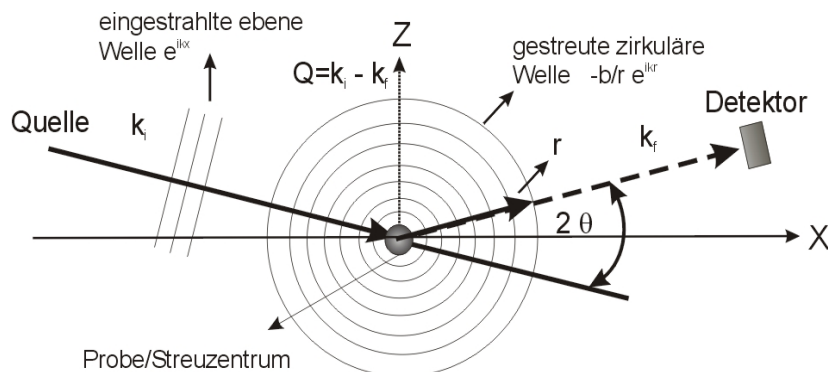


Abbildung 95 Typische Streugeometrie: Ein Neutronenstrahl trifft auf ein einzelnes Streuzentrum in x -Richtung und kann als ebene Welle $e^{ik \cdot x}$ mit Einheitsamplitude beschrieben werden. Da das Neutron das Streuzentrum als Punkt „sieht“, ist die Streuung isotrop. Das hat zur Folge, daß sich der gestreute Neutronenstrahl in Form sphärischer Wellenfronten mit der Amplitude b/r im Raum ausbreitet (als Kreise dargestellt).

Abbildung 95 zeigt die typische Streugeometrie, wie sie im folgenden angenommen wird. Ist die Ausdehnung der Quelle und der Probe sehr viel kleiner als der Abstand zwischen Quelle und Probe bzw. zwischen Probe und Detektor, dann ist die Beschreibung der Streuung in der sogenannten Fraunhofer'schen Näherung gerechtfertigt, bei der einfallende und ausfallende Wellen durch ebene Wellen beschrieben werden.^[1312]

Der $1/r$ -Teil des Amplitudenvektors ergibt bei der Quadrierung einen Intensitätsabfall von $1/r^2$. Mit zunehmendem Abstand vom Streuzentrum, der auftritt während die gestreute

Wellenfront an Größe zunimmt (sich vom Streuzentrum entfernt), wird die Intensität rasch kleiner.

Im Rahmen der obigen Betrachtungen müßte die Amplitude der Wellenfunktion der Neutronenwelle (die Größe mit der die e-Funktion multipliziert wird) so gewählt werden, daß das Quadrat der Amplitude die Wahrscheinlichkeit angibt mit der ein Neutron an der Position r zu finden ist, die mit der Anzahl der im verwendeten Strahl befindlichen Neutronen konsistent sein muß. Da für die weiteren Betrachtungen aber das Verhältnis der Amplituden für die einfallende und die ausfallende Welle von Interesse ist, kann der Betrag für die einfallende Amplitude vorerst gleich eins gesetzt werden.

Wie groß ist aber nun der Betrag der Amplitude der gestreuten Welle? Der Betrag der Amplitude der gestreuten Welle hängt von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Neutron und Atomkern ab. Da das gestreute Neutronenwelle isotrop ist, kann seine Wellenfunktion als

$$-\frac{b}{r} e^{ikr}$$

Gleichung 68

beschrieben werden wenn die Streuung im Ursprung unseres Koordinatensystems stattfindet. Die sphärischen Wellenfronten des gestreuten Neutrons sind in Abbildung 95 durch Kreise angedeutet. Die Konstante b wird als Streulänge des Atomkerns bezeichnet und ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem streuenden Atomkern und dem Neutron. Das Minuszeichen in der Wellenfunktion bedeutet, daß b eine positive Zahl ist, wenn die Wechselwirkung zwischen Kern und Neutron abstoßend ist.

Da wir das Streuzentrum als starr fixiert annehmen ist die Wechselwirkung elastisch, das heißt, es findet kein Energieaustausch zwischen Neutron und Streuzentrum statt. Der einfallende und der ausfallende Strahl (Welle) werden dann vollständig durch den Wellenvektor k_i (k_f) beschrieben, der senkrecht auf den Ebenen gleicher Phase steht. Für dessen Absolutwert gilt:

$$k_i = \frac{2\pi}{\lambda} = k_f (\text{elastisch})$$

Gleichung 69

Streng müßte die Zeitabhängigkeit $e^{i\omega t}$ mit einbezogen werden. Da aber die Streuung elastisch ist, ist der Faktor für die einfallende und die ausfallende Welle gleich und eliminiert sich somit aus dem Ausdruck.

Der Streuvorgang am Kern hängt wie oben angedeutet von der Eigenschaft des Atomkerns, und damit mit der atomaren Zusammensetzung des Moleküls bzw. der gesamten Probe ab. Die charakteristische Größe des Atomkerns ist seine Streulänge b die im Idealfall nicht von der Energie des eingestrahlten Neutrons abhängt. Für einige Kerne variiert die Streulänge aber der Energie des eingestrahlten Neutrons, da die Atome der Probe mit Energien, die dicht an der von angeregten Kernzuständen liegen, während dem Streuprozess angeregt werden. Dieses Resonanzphänomen führt zu, komplexen Werten für b . Der Realteil entspricht der Streuung des Neutrons, während der imaginäre Teil die Absorption des Neutrons durch den Kern beschreibt. Gewöhnlicherweise treten diese Resonanzeffekte bei Energien auf, die oberhalb der Energieskala liegt, die für Strukturuntersuchungen angewendet wird.

Streulängen b (Einheiten: fm) nehmen für Neutronen nicht monoton mit Kernmasse zu und muß experimentell bestimmt werden. Im Gegensatz dazu läßt sich der Röntgenstreu­faktor f_0 (auch als atomarer Streufaktor oder atomarer Formfaktor bezeichnet) nach der Formel

$$f_0 = 2,85 \cdot 10^{-5} Z_i$$

Gleichung 70

berechnen, wobei Z_i die Ordnungszahl des Elements i ist (b besitzt dann die Einheit Å).^[1313]

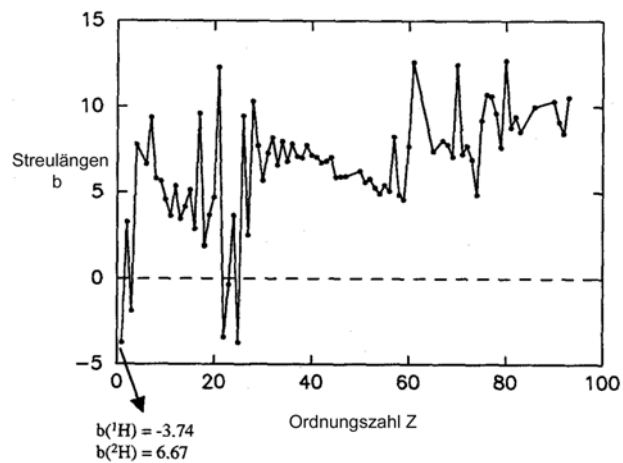


Abbildung 96 Abhängigkeit der Streulängen (Neutronen) von der Ordnungszahl^[1314]

Abbildung 96 zeigt, daß die Streulänge der Neutronen nur langsam und unregelmäßig zunimmt. Verschiedene Isotope desselben Elements können ganz unterschiedliche Streulängen aufweisen, so daß man einen gewichteten Mittelwert verwendet. Manche Kerne weisen Resonanzeffekte auf, die zu einer Phasenverschiebung von 180° führen; was sich in einer negativen Streulänge ausdrückt (die dann in Fouriersynthesen zu negativen Peaks führt). Das Element Vanadium hat $b \approx 0$ und streut somit extrem schwach (es kann z.B. für Behälter verwendet werden, die neutronendurchlässig sein sollten). Im Vergleich zu den Neutronenstreulängen sind die Neutronenstreu Faktoren für Kernladungszahlen von 1-100 um den Faktor 1-300 größer.^[1314] In Abbildung 97 ist das Verhalten von Neutronen- und Röntgenstrahl bezüglich ihres Streuverhaltens in Abhängigkeit vom Beugungswinkel gezeigt. Die Intensität des Neutronenstrahls nimmt mit zunehmendem Beugungswinkel kaum ab, da der Neutronenstrahl nur am punktförmigen Kern gestreut wird, das Röntgenphoton aber an der diffusen Elektronenhülle. Die langsame Abnahme der Streukraft mit steigendem Beugungswinkel ermöglicht Messungen bei hoher Auflösung.

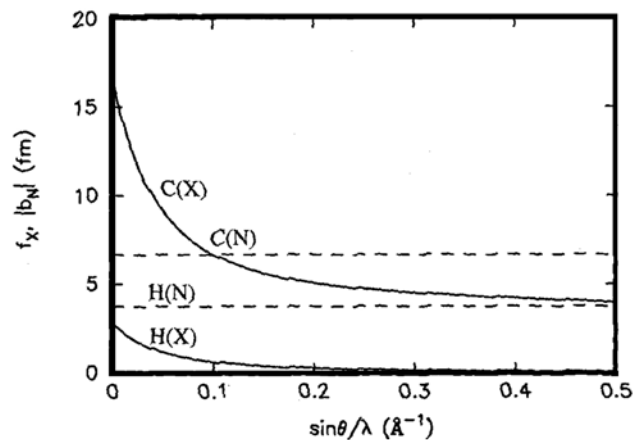


Abbildung 97 Abnahme des atomaren Streufaktors der Röntgenstrahlung (durchgezogene Linie) und der Streulänge der Neutronenstrahlung (unterbrochene Linie) in Abhängigkeit vom Beugungswinkel^[1314]

Das Streuverhalten hängt aber noch von weiteren Parametern ab. Man unterscheidet neben elastischer und inelastischer Streuung (auf diese wird weiter unten näher eingegangen) noch kohärente und inkohärente Streuung. Von Kohärenter Streuung spricht man, wenn eine Neutronenwelle mit der Probe als Einheit wechselwirkt, so daß die von verschiedenen Atomkernen gestreuten Wellen miteinander interferieren. Dieser Typ der Streuung hängt von den relativen Abständen zwischen den Atomen ab und liefert Informationen über die Struktur des Materials. Elastische kohärente Streuung gibt Auskunft über die Struktur im

Gleichgewichtszustand, während die inelastische kohärente Streuung Informationen über die kollektiven/korrelierten Bewegungen der Atome, (z.B. Vibrationswellen im Kristallgitter) hervorrufen. Von inkohärenter Streuung wird gesprochen, wenn die Neutronenwelle mit jedem Kern in der Probe unabhängig wechselwirkt, so daß die gestreuten Wellen nicht miteinander in Interferenz treten. Kohärente Streuung hängt von der Richtung von Q ab. Es addieren sich daher nur die Intensitäten der einzelnen Streuzentren.

Ist mehr als ein Element vorhanden kann dieser Zustand eine Unordnung in der Struktur des Materials erzeugen und dadurch zur inkohärenten Streuung beitragen, wodurch die Untergrundstreuung erhöht wird. Der Zusammenhang der Streulänge b (z.T. auch als Streufaktoren bezeichnet) und der Streukraft σ (auch als Streuquerschnitt oder Gesamtstreuung bezeichnet) ist durch die einfache Beziehung $\sigma=4\pi b^2$ gegeben, so als wäre die Streulänge der halbe Kernradius den das Neutron wahrnimmt. Bezeichnet man die Gesamtstreuung als σ , die kohärente Streuung mit S und die inkohärente Streuung mit s , so gilt

$$\sigma = 4\pi \sum (w_i b_i)^2; S = 4\pi \left(\sum w_i b_i \right)^2 = 4\pi b_{av}^2; s = 4\pi \left\{ \sum w_i b_i^2 - \left(\sum w_i b_i \right)^2 \right\}$$

Gleichung 71

summiert über alle Isotope bei relativer Häufigkeit w_i der Isotope i . Durch die Bildung eines Zwischenzustandes zwischen Neutron und Wasserstoffkern kommt es gerade beim häufigsten Element Wasserstoff aber auch zur Spinkohärenz. Da beide den Spin $\frac{1}{2}$ tragen können, kann der Zwischenzustand einen Gesamtspin von 0 oder 1 tragen. Es läßt sich zeigen, daß die relativen Häufigkeiten bei $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ liegen. Bezeichnet man die Streulängen der Zustände mit parallelem und antiparallelem Spin mit b_+ und b_- , ergeben sich für $b_+=1,08 \cdot 10^{-12}$ cm und $b_-=-4,74 \cdot 10^{-12}$ cm folgende Werte:

$$\sigma = 4\pi \left[\frac{3}{4} (1,08)^2 + \frac{1}{4} (4,74)^2 \right] = 81,6 \text{ barn}$$

$$S = 4\pi \left[\frac{3}{4} (1,08) + \frac{1}{4} (-4,74) \right]^2 = 1,8 \text{ barn}$$

$$b = \frac{3}{4} (1,08) + \frac{1}{4} (-4,74) \times 10^{-12} = -0,375 \times 10^{-12} \text{ cm}$$

$$s = (81,6 - 1,8) = 79,8 \text{ barn}$$

Es zeigt sich, daß die Untergrundstreuung bei Wasserstoff etwa 40 mal so hoch ist wie die kohärente Streuung. In der Praxis ist diese Analyse zu oberflächlich und der Wert nicht ganz so hoch. Bei anderen Elementen ist er vernachlässigbar. Eine genauere Analyse, die Gitterschwingungen berücksichtigt, zeigt, daß Tieftemperaturmessungen die Effekte lindern (in der Praxis bestätigt). Es kann aber durchaus dazu kommen, daß deuterierte Verbindungen

verwendet werden müssen (Werte für D: $b_+ = 0,952 \times 10^{-12}$ und $b_- = 0,097 \times 10^{-12}$ cm; $\sigma = 7,6$ barn, $S = 5,6$ barn, $s = 2,0$ barn, $b = 0,667 \times 10^{-12}$ cm). Im Falle von inelastischer inkohärenter Streuung ist man zusätzlich in der Lage die Eigenkorrelationen, z.B. Diffusion zu messen.

Nuclide	σ_{coh}	σ_{inc}	Nuclide	σ_{coh}	σ_{inc}
^1H	1.8	80.2	V	0.02	5.0
^2H	5.6	2.0	Fe	11.5	0.4
C	5.6	0.0	Co	1.0	5.2
O	4.2	0.0	Cu	7.5	0.5
Al	1.5	0.0	^{36}Ar	24.9	0.0

Tabelle 8 Tabelle mit Beträgen den kohärenten und inkohärenten Streukraft σ ^[1315]

Wenn Neutronen an Materie gestreut werden kann sich sowohl der Impuls, als auch die Energie des Neutrons ändern. Die Streuung ist dann nicht notwendigerweise elastisch da sich die Atome der Materie sich zu einem gewissen Grad im Raum bewegen. Die Atome können zurückgestoßen werden, oder, wenn sie sich zum Zeitpunkt der Streuung in Bewegung befinden, können sie Energie an das Neutron abgeben oder von ihm aufnehmen. Der Gesamtimpuls und die Gesamtenergie bleiben dabei erhalten. Anhand von Gleichung 67 ist leicht zu erkennen, daß der Betrag des Impulses den das Neutron während der Kollision (der Impulsübertrag) überträgt

$$\frac{h}{2\pi} Q = \frac{h}{2\pi} (k_i - k_f)$$

Gleichung 72

ist. k_i ist dabei der Wellenvektor der eingestrahnten Neutronenwelle und k_f der Wellenvektor der gestreuten Welle. Der Betrag

$$Q = k_i - k_f$$

Gleichung 73

siehe Abbildung 95, wird als Streuvektor bezeichnet. k_i und k_f schließen dabei den Beugungswinkel (Streuwinkel) 2θ ein. Die vektorielle Beziehung zwischen den drei Größen in Gleichung 73 kann mit Hilfe eines sogenannten Streudreiecks bildlich dargestellt werden.

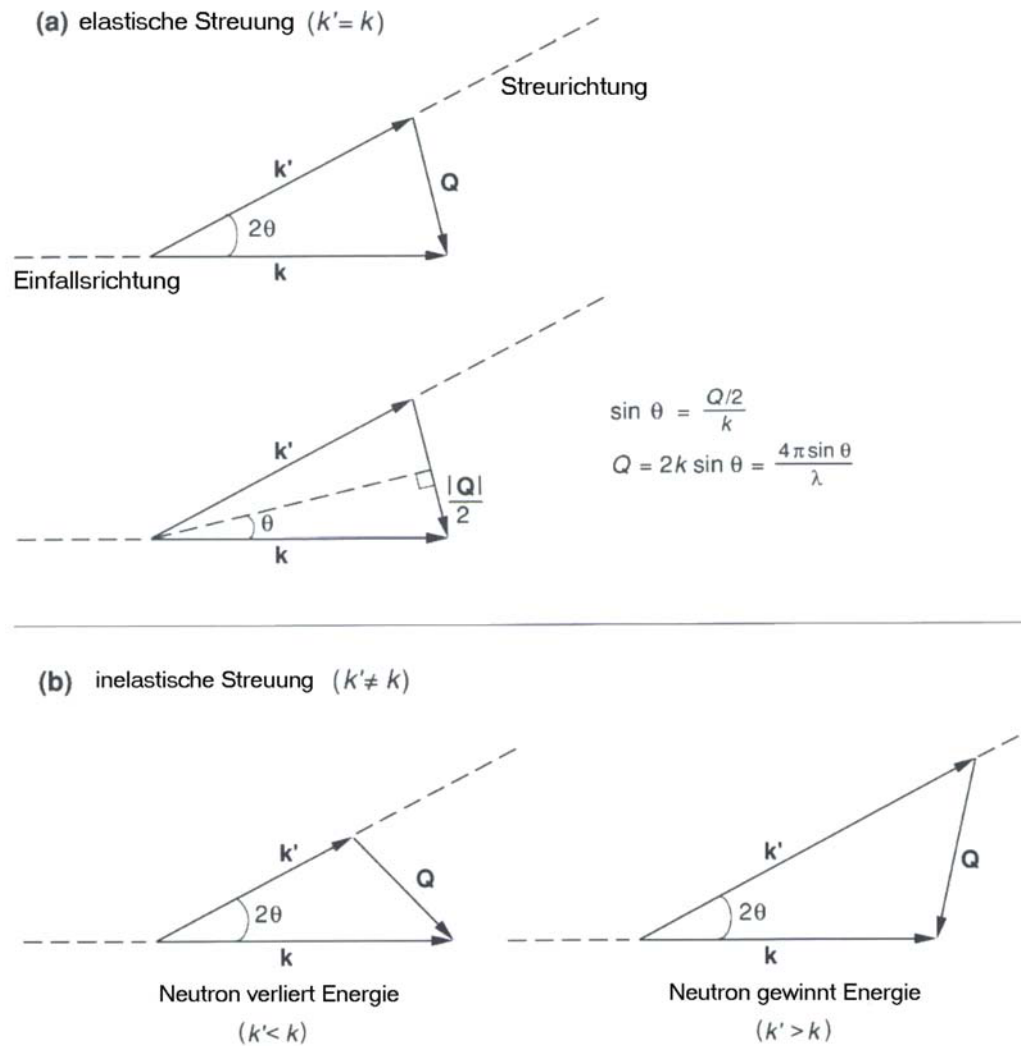


Abbildung 98 Streudreiecke für elastische und inelastische Streuung

Die Streudreiecke zeigen, daß der Betrag und die Richtung von Q durch den Betrag der Wellenvektoren der einfallenden und ausfallenden Neutronenwelle und den Winkel 2θ bestimmt ist. hQ (Gleichung 72) gibt den Impulsübertrag bei der Streuung von der Probe auf das streuende Teilchen an. Wie in Abbildung 98 gezeigt erlaubt die Anwendung trigonometrischer Operationen für den Fall der elastischen Streuung die Abhängigkeit Q 's von θ und λ zu formulieren. Es ergibt sich somit der Ausdruck

$$Q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

Gleichung 74

für den Absolutwert von Q aus Gleichung 73. Die einfachste Beschreibung erhält man, wenn die Wechselwirkung zwischen Probe und Strahlung sehr klein ist. In diesem Fall kann die Mehrfachstreuung innerhalb der Probe und die Schwächung des Strahls beim Probendurchgang vernachlässigt werden. Die Beschreibung des Streuprozesses in dieser Näherung wird als kinematische Streutheorie^[1312] bezeichnet. Quantenmechanisch ist die kinematische Streutheorie äquivalent zu einer Beschreibung im Rahmen der Störungstheorie erster Ordnung, der sogenannten ersten Born'schen Näherung.^[1316]

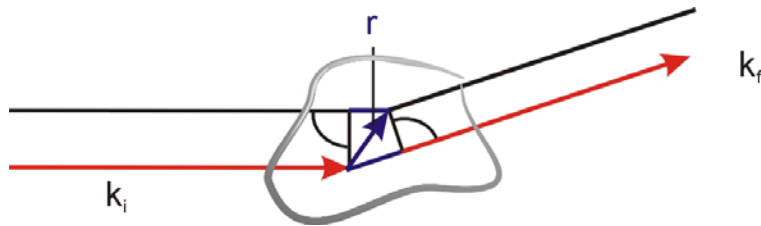


Abbildung 99 Schema zur Herleitung der Phasendifferenz bei der Streuung

Nach Abbildung 99 ergibt sich die Phasendifferenz einer am Ort r innerhalb der Probe gestreuten Welle relativ zu einer am Ursprung des Koordinatensystems gestreuten Welle zu

$$\text{Phasendifferenz: } k_f \cdot r - k_i \cdot r = Q \cdot r$$

Gleichung 75

woraus sich die Bedeutung des Streuvektors Q ergibt. Nun sei die Amplitude der am Ort r gestreuten Welle gegeben durch die Streukraftdichte $\rho_s(r)$. Dann ist die Gesamtamplitude A der gestreuten Welle durch ein integrieren über das Probenvolumen in der Form :

$$A = \int \rho_s(r) \cdot e^{iQ \cdot r} d^3 r$$

Gleichung 76

Schließlich ist die im Detektor nachgewiesene Intensität proportional zum Betragsquadrat der Streuamplitude. Es ist noch wichtig zu bemerken, daß bei der kinematischen Beugung die

Streuamplitude durch die Fouriertransformierte der Streukraftdichteverteilung der Probe gegeben ist:

$$I \sim |A|^2 ; A = F[\rho_s(r)]$$

Gleichung 77

Gleichung 77 impliziert, daß sich aus der Streuamplitude die Streukraftdichteverteilung der Probe durch Fourierrücktransformation bestimmen läßt.

Leider ist die Meßgröße die im Detektor nachgewiesene Intensität. Bildet man das Betragsquadrats geht die Phaseninformation verloren.

Dieses sogenannte Phasenproblem führt dazu, daß eine eindeutige Rekonstruktion der Streukraftdichteverteilung im allgemeinen nicht möglich ist. In der Praxis wird dann so vorgegangen, daß die Streukraftdichteverteilung modelliert, die gestreute Intensität berechnet und mit der gemessenen Intensität verglichen wird. Durch Variation der Modellparameter wird eine möglichst optimale Übereinstimmung zwischen gemessener und gerechneter Intensitätsverteilung angestrebt.

Es sollte erwähnt werden, daß die hier mit einfachen Argumenten motivierte Gleichung 77 selbstverständlich im Rahmen einer Greens-Funktionalmethode quantenmechanisch exakt hergeleitet werden kann.^[1310, 1312, 1316]

Sonden für die Untersuchung von Materie mit Streumethoden

Welche Art von Strahlung für die Untersuchung eines Systems in Frage kommt hängt von verschiedenen Faktoren ab:

1. Soll eine atomare Auflösung erzielt werden, muß die Wellenlänge der verwendeten Strahlung im Bereich der interatomaren Abstände a , das heißt bei etwa 1 \AA , liegen. Die Größenordnung ergibt sich aus der Bedingung, daß die Differenz der Streuphasen von benachbarten Atomen in der Größenordnung von 2π liegen soll, da unter diesen Bedingungen maximale Interferenz erhalten wird ($Q \cdot a \approx 2\pi$). Im Fall der Weitwinkelbeugung ist der Betrag von Q mit dem Betrag von k_i vergleichbar. Es ergibt sich $\lambda \approx a$.
2. Aussagen über die interne Struktur im atomaren Bereich, insbesondere von Schichtsystemen und Systemen mit lateralen Strukturen, bzw. Rauigkeiten in

- diesem Größenbereich erfordern den Einsatz einer Strahlung die durch eine geringe Absorption ausgezeichnet ist um als Volumensonde einsetzbar zu sein.
3. Der Grad der Interpretierbarkeit einer Sonde ist ein wichtiges Kriterium für die Wahl der Sonde/verwendeten Strahlung. So soll die Sonde keine inneren Freiheitsgrade aufweisen, die beim Streuvorgang ihre Energie mit dem streuenden System austauschen können. Zusätzlich wird die Interpretierbarkeit von Beugungsspektren durch Mehrfachstreuung stark eingeschränkt. Aus diesem Grund erfolgt die Forderung nach einer Sonde mit einer geringen Wechselwirkung um den Streuvorgang im Rahmen der ersten Born'schen Näherung beschreiben zu können.
 4. Magnetische Materialien können mit Sonden untersucht werden die mit den lokalen magnetischen Momenten in Wechselwirkung tritt.
 5. Untersuchungen des Spektrums der Elementaranregungen einer Probe werden begünstigt, wenn die Energie der anregenden Strahlung in der Größenordnung der Anregungsenergien des Festkörpers liegt, wodurch die Energieänderung beim Streuprozeß leicht meßbar wird.

Unter Berücksichtigung der obigen Forderungen folgt, daß es im wesentlichen drei Arten von Strahlung gibt, die für Streuuntersuchungen von Schichtsystemen einsetzbar sind:

- Neutronen (als Materiewellen)
- Röntgenstrahlen (als elektromagnetische Wellen)
- Elektronen (Materiewellen)

Unter den drei Strahlungsformen gibt es jedoch erhebliche Unterschiede, bezüglich ihrer Eignung zur Untersuchung von Schichtsystemen im allgemeinen und ultradünnen Systemen im besonderen. Elektronen verletzen die Forderung nach einfacher Interpretierbarkeit, da die Wechselwirkung der Elektronenstrahlen mit dem Untersuchungskörper durch die verhältnismäßig starke Coulombwechselwirkung zustande kommt. Es kommt verstärkt zu Mehrfachstreuungsprozessen. Die relativ starke Wechselwirkung führt auch dazu, daß die Tiefenempfindlichkeit stark herabgesetzt ist, da das Elektron schnell absorbiert wird.

Röntgenstrahlung mit einer Energie von einigen keV bis zu einigen hundert keV eignet sich sehr gut für diastische Untersuchung von Schicht- und Festkörperstrukturen da die Wellenlänge

im Bereich der interatomaren Abstände liegt. Dasselbe ergibt sich für sogenannte thermische Neutronen, das heißt Neutronen mit einem Temperaturäquivalent der kinetischen Energie von etwa 300 K. Der wesentliche Unterschied zu den Röntgenstrahlen, deren Energie im keV-Bereich liegt, ist, daß die Energie thermischer Neutronen mit etwa 25 meV im Bereich der Anregungsenergien des Festkörpers liegt. Aufgrund dieser Eigenschaft hat sich die inelastische Neutronenstreuung als die Methode schlechthin etabliert, um Gitterschwingungen, Spinwellen oder diffusive Prozesse in Festkörpern zu untersuchen. Neutronen wirken durch ihre niedrige Energie nichtdestruktiv auf im Vergleich zu anorganischen Festkörpern empfindlichere Kohlenwasserstoffschichten wie sie im Falle von Lipidmembranen vorliegen. Im Gegensatz dazu können Hochfluß-Synchrotron-Röntgenstrahlen organische Filme zerstören.

Abschließend muß für die Sondenwahl in Betracht gezogen werden, daß sich die Wechselwirkung von Röntgen- und Neutronenstrahlung mit Materie auf Grund ihrer unterschiedlichen Streuprinzipien (siehe auch unten Eigenschaften des Neutrons) stark unterscheiden. Röntgenstrahlen werden an der Elektronenhülle gestreut, daher ist ihre Wechselwirkung mit leichten Elementen sehr schwach. Neutronen wechselwirken dagegen mit dem Atomkern. Die Kernkräfte besitzen aber nur eine sehr kurze Reichweite im Bereich von 10^{-15} m. Soweit es das Neutron betrifft, ist damit feste Materie ein überwiegend leerer Raum, da das Streuzentrum (Atomkern) typischerweise 100.000 mal kleiner ist, als der Abstand zwischen zwei solcher Zentren.

Ein großer Vorteil der Neutronenstreuung ist die geringe Absorption der Neutronen in den meisten Festkörpern (zum Beispiel monokristallines Silizium oder Quarz). Dies erlaubt Neutronen dicke Substratschichten zu durchdringen um verborgene fest-flüssig-Grenzflächen zu untersuchen.

Neutronenquellen

Zur Durchführung von Neutronenstreu- -diffraktions- und -reflektionsexperimenten benötigt man einen Neutronenstrahl hinreichender Intensität. Neutronenquellen sind vergleichsweise schwach, d.h. die Signalintensität ist niedrig, so daß häufig lange Meßzeiten notwendig sind. Die für solche Experimente verwendeten Neutronen werden im wesentlichen durch zwei verschiedene Quellen bereitgestellt. Man unterscheidet Kernreaktoren (z.B. ILL, Grenoble) und Spallationsquellen (z.B. LANSCE, Los Alamos, USA; ISIS, Oxford, England).

In Kernreaktoren werden schwere Atomkernen mit thermischen Neutronen unter Freisetzung von thermischen Neutronen gespalten (Reaktor) während die Zersplitterungsreaktion (Spallation) durch verschiedene hochenergetische Projektile erfolgen kann. Bei der Spaltung

werden besonders neutronenreiche Atomkerne wie Uran-235 durch Einfang langsamer Neutronen instabil und brechen unter Aussendung von zwei bis drei schnellen Neutronen auseinander. Dabei wird insgesamt Energie frei. Die freigesetzten Neutronen sind also hauptsächlich schnelle bzw. energiereiche Neutronen, die jedoch durch umgebende Moderatoren zum thermischen Gleichgewicht gebracht werden können. Je nach Temperatur des Moderators werden unterschiedliche Wellenlängen erreicht:^[1317]

Thermische Neutronen, 1,5 Å, schweres Wasser bei etwa 100°C; heiße Neutronen, 0,5 Å, Graphit bei 2500°C; kalte Neutronen, 5 Å, flüssiger Wasserstoff. Die abgebremsten Neutronen können eine neue Spaltreaktion auslösen.

Die Spallation ist nur mit hochenergetischen geladenen Teilchen möglich. Wenn man Atomkerne mit Protonen hoher Energie beschießt, dann lösen die energiereichen Teilchen mehrstufige Kaskadenprozesse aus, bei denen Nukleonen, Mesonen und Gammastrahlung emittiert werden (Abbildung 100). Die Kerne werden durch diese Prozesse schließlich so stark aufgeheizt bzw. angeregt, dass sie in einem Verdampfungsprozess eine große Anzahl von Neutronen abdampfen.

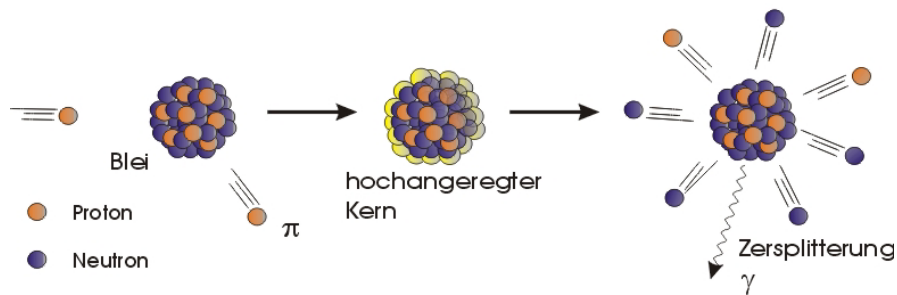


Abbildung 100 Spallationsprozeß: Unter Zersplitterung des Kern werden Elementarteilchen freigesetzt.

Da dabei insgesamt Energie verbraucht wird, kommt es nicht zu einer Kettenreaktion. Abhängig von der Energie des primären Protons und vom Targetmaterial, das heißt die mit Protonen beschossene Platte, werden etwa 10 mal mehr hochenergetische Neutronen pro Proton frei als bei der Kernspaltung pro Neutron, wobei im letzteren Fall stets ein Neutron zur Aufrechterhaltung der Kettenreaktion benötigt wird. Das Spektrum der Verdampfungsneutronen ist einem Spaltspektrum sehr ähnlich. Dadurch ist es wie bei einem Reaktor möglich, die Neutronen mit Wasser in einem relativ kleinen Volumen auf thermische Energien abzubremsen und so eine Neutronenquelle zu erhalten. Der Wärmeumsatz pro nutzbarem Neutron ist bei der Spallation deutlich geringer als bei der Kernspaltung. Bei der Kernspaltung müssen 200 MeV pro nutzbarem Neutron aus dem Kernbrennstoff weggekühlt

werden, wogegen bei der Spallation nur 25 MeV/Neutron im Target anfallen. Dennoch ist auch bei der Spallation eine Kühlung der Umgebung (Moderatoren, Abschirmung und Strukturmaterialien) erforderlich.

Etwa 1,5 verwendbare Neutronen werden bei jedem Kernspaltungsereignis in einem Nuklearreaktor frei, wohingegen etwa 25 verwendbare (19-50) Neutronen durch Spallation für jeden 1-GeV Protoneinschlag auf ein Schwermetall-Target (z.B. W, U, Pb, Hg, Ta) erzeugt werden die in der Regel nicht monochromatisiert werden. Neben Wolfram werden auch andere Elemente verwendet. Quecksilber hat z. B. den Vorteil, daß es durch seine große Kernmasse (120 Neutronen und 80 Protonen) eine große Anzahl an Neutronen enthält und durch seinen flüssigen Charakter bei Raumtemperatur einerseits die Energie besser dissipativ ableiten kann und keine Strukturschäden erfährt im Gegensatz zu festen Probetargets.

Durch elastische Streuung an leichten Teilchen werden die MeV Neutronen moderiert, das heißt in den meV-Bereich gebracht da für Neutronenstreuexperimente Neutronen mit einer Energie von weniger als 1 eV verwendet werden. Am besten wäre Wasserstoff, dieser besitzt aber eine hohe Absorptionsfähigkeit für Neutronen. Daher verwendet man auch Deuterium, dessen Absorption wesentlich geringer ist.

Am LANSCE (Los Alamos Neutron Scattering Center) wo die in dieser Arbeit präsentierten neutronenreflektometrischen durchgeführt wurden, werden die Neutronen durch den Spallationsprozeß erzeugt.

Im linearen Teilchenbeschleuniger „Linac“ werden 20 H^- (ein Proton plus zwei Elektronen) Pulse pro Sekunde erzeugt (800 MeV, etwa 800 μsec lange Pulse, der durchschnittlicher Strom liegt bei ca. 100 μA). Jeder Puls besteht aus Wiederholungen von 270 nsec Anzeit und 90 nsec Pause. Die Pulse werden in den Protonenspeicherring (PSR) mit einer Periode von 360 nsec injiziert. Eine dünne Kohlenstofffolie strippt die Elektronen um die H^- zu H^+ umzuwandeln. Von den so produzierten Protonen werden etwa $3 \cdot 10^{13}$ Protonen pro Puls auf ein sogenanntes Split-Target aus zwei 10 cm (Durchmesser) Zylindern aus Wolfram (Wolfram, engl. tungsten) gelenkt. Jedes der etwa 10^{13} Protonen pro Puls erzeugt im Durchschnitt 19 Spallations-Neutronen mit einer Energieverteilung von beinahe 0 bis etwa 800 MeV.

Die erzeugten Neutronen weisen damit im Schnitt eine zu hohe Energie auf und müssen in einen Energiebereich von unter 1 eV gebracht werden. Dies geschieht mit der Hilfe sogenannter Moderatoren. Im Moderatormaterial stoßen die Neutronen mit den Kernen des Moderatormaterials zusammen und geben auf diese Weise einen Großteil ihrer Energie ab.

Am LANSCE werden flüssiger Wasserstoff und Wasser (Raumtemperatur) als Moderatoren verwendet.

Detektion/Nachweismethoden

Neutronen sind nicht ionisierend, daher vermitteln sie keinen direkt nachweisbaren Effekt und machen indirekte Nachweismethoden notwendig. Die Detektion von Neutronen ist wegen ihrer geringfügigen Wechselwirkungen mit der Materie schwierig. Für den Detektionsprozess müssen Elemente verwendet werden die gegebenenfalls nach Isotopenanreicherung, Neutronen gut absorbieren. Im $^{10}\text{BF}_3$ -Gasrohr (nach $^{10}\text{B} + \text{n} \rightarrow ^7\text{Li} + ^4\text{He} + \gamma$) wird zum Beispiel das Füllgas ionisiert, was zu Ladungsimpulsen führt. In einem Szintillationsdetektor wird ^6Li -Glas nach $^6\text{Li} + \text{n} \rightarrow ^4\text{He} + ^3\text{He}$ und emittiert Teilchen die durch einen aktivierten Phosphor detektiert werden. Neue Entwicklungen beider Typen zu Flächendetektoren (auch image plates oder CCD's, vgl. RSA) erweitern die Detektionsmöglichkeiten. Die Effizienz nimmt mit zunehmender Neutronenenergie ab. Die Art der Nachweismethode richtet sich unter anderem an ihrer Energie:

Schnelle Neutronen (im MeV-Bereich) können durch Stöße mit p-haltigen Substanzen nachgewiesen werden.

Thermische Neutronen (Energien im meV-Bereich):

1. Aktivierung durch n – Einfang (z.B. n- γ Reaktionen in Au,In)
2. Kernreaktionen und anschließender Nachweis der (geladenen) Reaktionsprodukte –
üblich in der Neutronenstreuung: Geiger Müller Zählrohr
 - a) BF_3 : $\text{B}^{10} (\text{n}, \alpha) \text{Li}^7 + 2.79\text{MeV}$
 - b) He^3 : $\text{He}^3 (\text{n}, \text{p}) \text{H}^3 + 0.765\text{MeV}$ (die Ionisation erfolgt durch das gebildete Tritium, diese Art von Detektor wurde am LANSCE verwendet, 70% der Neutronen werden absorbiert, wenn das Produkt aus Gasdruck, Dicke und Neutronenwellenlänge $16 \text{ atm}\cdot\text{cm}\cdot\text{\AA}$ ist)

Nachweiswahrscheinlichkeiten ca. 95% (hängt von λ ab, $\lambda \propto 1/v$)

3. Szintillationszähler: ZnS (Photomultiplier)

Für Dynamische Messungen spielt die Art der spektroskopischen Detektionsmethode die entscheidende Rolle für die Zeitauflösung (Tabelle 9). Die Energieauflösung der Spektrometer wird üblicherweise in eV angegeben und läßt sich in die Frequenz meßbarer Anregung bzw. deren charakteristische Zeit umrechnen.

< 1 meV, ~ 1 ps, ~ 10 GHz	Flugzeitmethoden
< 1 μ eV, ~ 1 ns, ~ 10 MHz	Rückstreuung
< 1 neV, ~1 μ s, ~10 kHz	Spinechospektroskopie
Phononen im Einkristall	3-Achsen-Spektroskopie

Tabelle 9 Zusammenhang der Zeitauflösung mit den Detektionsmethoden

Für die am LANSCE mit dem SPEAR durchgeführten Messungen wurde die Flugzeitmethode angewandt. Dies hat die folgenden Vorteile:

- Streuwinkel fest (Vorteil z.B. bei Druckzellen)
- $|k|$ wird variiert (kein Monochromator) über die Zeit (zuerst kommen die raschen, dann die langsameren Neutronen)
- bessere Nutzung der Quelle (keine Monochromatorverluste)
- Auflösung umso besser, je größer Abstand zur Quelle

bei der Flugzeitmethode gilt folgender Zusammenhang:

Bragg-Gleichung:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda$$

Gleichung 78

Mit den beiden Gleichungen

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Gleichung 79

und

$$v = \frac{L}{t}$$

Gleichung 80

ergibt sich:

$$t = \frac{2ml}{h} d \sin \theta$$

Gleichung 81

Wobei m und v die Masse und Geschwindigkeit des Neutrons sind; L die Länge des Flugwegs und t die Zeit die das Neutron braucht die Länge des Flugwegs zurückzulegen. L ist eine Detektorkonstante, h und m sind Konstanten, womit:

$$t \propto d$$

Gleichung 82

ist! Somit werden die Abstände der einzelnen Streuzentren über die Zeit, die die Neutronen brauchen um zum Detektor zu gelangen diskriminiert. Der größte Fehler dieser Messung resultiert aus der Ungenauigkeit des Ursprungs, von welchem die Neutronen ausgehen. Damit ist der Fehler von der Länge der Flugröhre/Flugweg abhängig. Je länger dieser wird, umso kleiner der Fehler der Flugzeitmessung. Legt zum Beispiel ein Neutron der Wellenlänge 1 \AA in etwa 2 ms einen Weg von 10 m zurück; ist die moderne Zähllektronik in der Lage, die Pulse und Geschwindigkeiten auseinanderzuhalten (Auflösung $\approx 1 \text{ \mu s}$, entspricht $\Delta\lambda/\lambda \approx 0.01\%$).^[1314] Dabei korreliert der Zeitpunkt, wenn das Neutron im Detektor ankommt, auf bekannte Weise mit der Wellenlänge. Es ist üblich, den Neutronenstrahl zu untermoderieren (d.h. nicht ganz das thermale Gleichgewicht erreichen zu lassen), damit auch Neutronen höherer Energie zur Verfügung stehen. Die Neutronenflüsse sind wesentlich höher als bei Atomreaktoren, und es bestehen gute Chancen, diese durch verbesserte Technik noch um zwei Zehnerpotenzen zu erhöhen.^[1309]

Das Problem molekularer Schichtsysteme – Theorie der Reflektometrie^[1309, 1310]

Warum sind Informationen über die einzelnen Schichten eines biomimetischen Membransystems so wichtig?

Lipidmembranen sind, wie in Kapitel 3 gezeigt, Lipiddoppelschichten die in Wechselwirkung mit verschiedenen Phasen stehen, lateral und vertikal. Biomimetische Membranen weisen unter Umständen zusätzliche laterale Phasengrenzen, bedingt durch den experimentellen Aufbau der Meßanordnung (z.B. Meßzelle) auf. Jede dieser Schichten setzt sich aus anderen Molekülen oder gar supramolekularen Aggregaten zusammen. Die Anordnung der Atome an der Oberfläche eines Körpers /Phase unterscheidet sich von der in seinem Innern (das „Innere“ läßt sich als „nicht mit einer anderen Phasengrenze in Wechselwirkung stehend“ definieren). Die genaue Kenntnis der Oberflächengeometrie ist sehr wichtig, da von der geometrischen Struktur die chemischen und die elektronischen Eigenschaften der Oberfläche entscheidend abhängen

und somit Art, Stärke und Dynamik der Wechselwirkung mit den anderen Komponenten der Phasengrenze definieren.

Wie und warum lassen sich nun Neutronenstrahlen zur Untersuchung gerade dieser Eigenschaften heranziehen? Betrachten wir zunächst spezielle Methoden wie Neutroneneigenschaften ausgenutzt werden können um Informationen über den Aufbau eines Systems zu erhalten. Aus der Einführung in die Grundlagen der Neutronenstreuung wird deutlich, daß Neutronen an Atomkernen gestreut werden und sich als gestreute Neutronenwelle sphärisch im Raum ausbreiten. Liegen verschiedene Streuzentren im Raum vor, gehen von diesen nach Wechselwirkung mit dem Neutronenstrahl gestreute Wellen aus, die miteinander interferieren. Es bildet sich eine Wellenfront der gestreuten Wellen mit bestimmten Vorzugsrichtungen bezüglich ihrer Ausbreitung im Raum aus. Dabei hängt die Ausbreitungsrichtung und das Interferenzmuster von der Symmetrie des Gitters und der Gitterabstände ab. Steht der Streuvektor Q senkrecht auf der Fläche die von den Atomen der Streuebene aufgespannt wird, und ist sein Betrag ein ganzzahliges Vielfaches von $2\pi/d$, beobachtet man Intensitäten die größer als Null sind. Die Werte für Q ($Q=n(2\pi/d)$) bei denen Diffraction auftritt, hängen wie folgt von λ und θ ab, und sind durch die Bragg'sche Beziehung

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Gleichung 83

gegeben. Die Bragg'sche Beziehung korreliert somit den Streuwinkel 2θ mit dem Abstand der Gitterebenen d wie es in Abbildung 101 dargestellt ist.

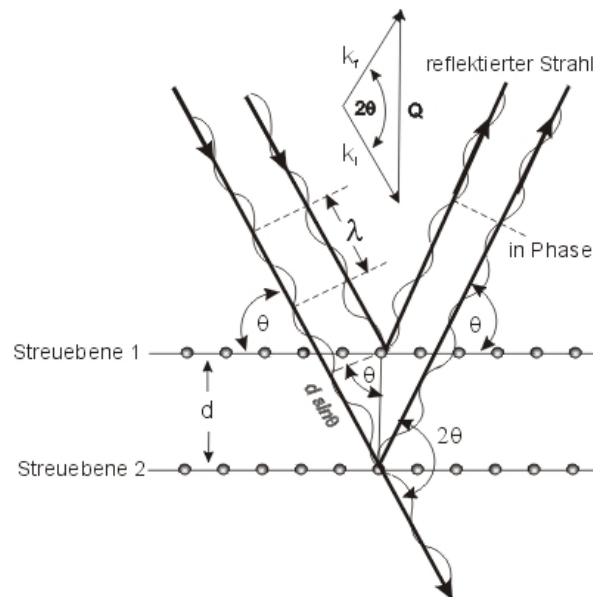


Abbildung 101 Der Gangunterschied einer gestreuten Neutronenwelle - Bragg'sche Beziehung

Die Bragg'sche Beziehung ist die Beschreibung der Weglängenunterschiede zwischen Wellen die an benachbarten Gitterebenen gestreut werden. Um konstruktive Interferenz zu erzielen, muß der Weglängenunterschied ein ganzzahliges vielfaches von λ sein. In der Praxis bedarf dies der genauen Orientierung des Kristalls. Bei der Pulverdiffraktometrie erübrigt sich das Problem, da ein Teil der Kristalle im statistisch vorliegenden „Orientierungsgemisch“ die für eine konstruktive Interferenz notwendige Orientierung aufweisen.

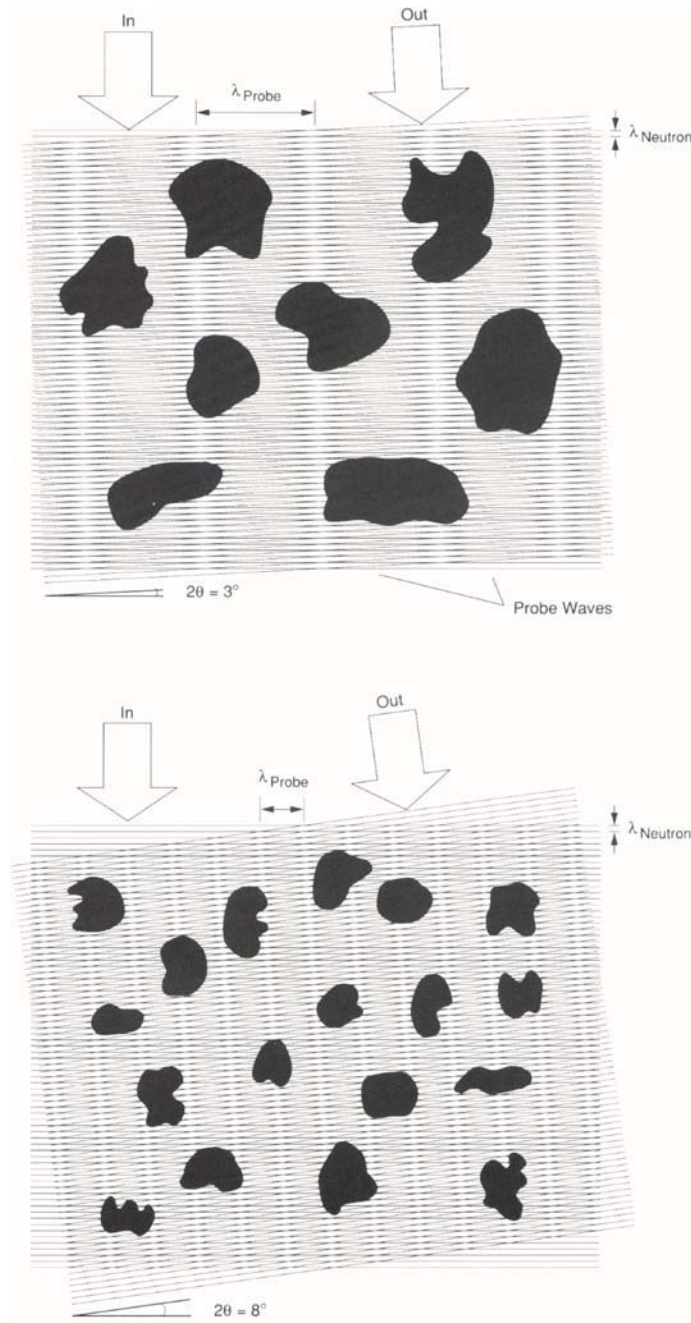


Abbildung 102 Detektion großer Strukturen - SANS^[1309]

Die Untersuchung großer Strukturen (beispielsweise Polymere, DNA) kann als nächster Schritt hin zur Untersuchung großflächiger Schichtsysteme betrachtet werden. Welche zusätzlichen Parameter hier eine Rolle spielen, läßt sich am Beispiel großer Strukturen in Abbildung 102 zeigen.

Neben Techniken wie der eben beschriebenen Diffraktometrie, bei der die innere Struktur eines Kristalls bei Erfüllung der Bragg'schen Beziehung analysiert werden kann, ist die Untersuchung großer Strukturen unter den gleichen experimentellen Bedingungen (Wellenlänge, Einfallswinkel) nicht möglich. Dies liegt daran, daß Strukturinformationen mit Hilfe der elastischen kohärenten Streuung nur gewonnen werden können, wenn die zur Untersuchung angewandte Wellenlänge in der Größenordnung der zu untersuchenden Struktur liegt. Um Informationen mit Hilfe der kohärenten elastischen Streuung zu erhalten kann die Wechselwirkung zwischen ein- und ausfallender Welle ausgenutzt werden. Abbildung 102 zeigt wie die ein- und die ausfallender Welle eine „Probenwelle“ generieren die an Moiré-Streifen erinnern. Man kann die Wellenlänge von λ_{Probe} verändern, indem der Winkel (dies ist der Streuwinkel) zwischen ein- und ausfallender Welle geändert wird (oder durch Änderung der Neutronenwellenlänge). Anwendung trigonometrischer Grundsätze in Abbildung 102 zeigt, daß $\lambda_{\text{Probe}} = \lambda_{\text{Neutron}} / 2 \sin \theta$, so daß wenn λ_{Probe} im Falle der Kristallographie in der Größenordnung beachtbarer Streuebenen liegt, die Bragg'sche Beziehung erfüllt ist. Die Probewellenidee zeigt, wie Strukturen gemessen werden können die größer sind als die typischen interatomaren Abstände. λ_{Probe} muß durch Veränderung der Wellenlänge und des Streuvektors in die Dimension des Untersuchungskörpers gebracht werden. In der Praxis bedeutet dies, daß für die Untersuchung von Polymeren, Kolloiden oder Viruspartikeln Streuwinkel von weniger als 1° und Neutronenwellenlängen von 5 \AA erforderlich sind. Da der Streuwinkel sehr klein ist, bezeichnet man die Methode auch als Kleinwinkelstreuung SANS (engl. Small-Angle Neutron Scattering).

Wie kann man nun mit Hilfe von Neutronen Informationen über die Struktur von Oberflächen erhalten? Die Eigenschaft von Neutronen tief in das Untersuchungsmaterial eindringen zu können, ohne von der Oberfläche beeinflusst zu werden, macht es auf den ersten Blick unwahrscheinlich unter reflektometrischen Bedingungen mit Neutronen Oberflächeneigenschaften analysieren zu können. Trotzdem können Neutronen für Oberflächencharakterisierungen herangezogen werden, wenn Neutronenstrahl unter kleinem Winkel auf die zu untersuchende Oberfläche trifft. Die Struktur der zur Oberflächennormalen senkrecht stehenden verborgenen Schichten kann bis in einen Tiefenbereich von einigen Mikrometern untersucht werden.^[1318] Detaillierte theoretische Beschreibungen können in der Literatur gefunden werden.^[1311, 1319, 1320]

Das Neutron kann reflektiert, transmittiert oder gestreut werden. Zusätzlich kann jede der deBroglie Wellen die mit sich bewegenden Neutron assoziiert sind konstruktiv oder destruktiv mit anderen deBroglie Wellen interferieren. Oben wurde gezeigt, daß aufgrund der geringen Wechselwirkung von Neutronen mit Materie im allgemeinen von der sogenannten kinematischen Streutheorie ausgegangen werden kann, bei der sowohl die Schwächung des Primärstrahls durch die Streuung, als auch Mehrfachstreuungsprozesse vernachlässigt werden. Bei der Streuung von Neutronen an Oberflächen oder inneren Grenzflächen unter streifendem Einfall sind diese Annahmen nicht mehr gültig. Hierbei trifft die einfallende Welle unter sehr kleinem Glanzwinkel θ ($0 < \theta < \text{wenige Grad}$) auf die Probe. Wird die Intensität der unter gleichem Winkel θ "spekulär" reflektierten Welle gemessen, so spricht man von Reflektometrie. Werden Neutronen unter einem Ausfallswinkel $\theta' \neq \theta$ nachgewiesen, so spricht man von diffuser Streuung (Abbildung 103)

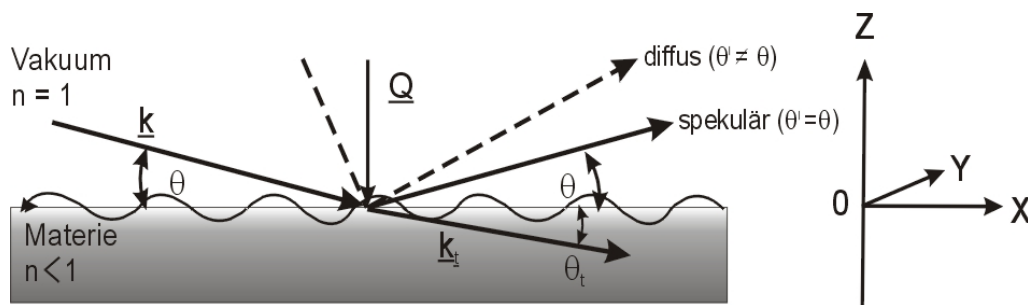


Abbildung 103 Streuung der Neutronen an einer Oberfläche unter kleinem Einfallswinkel. Einfallswinkel ist gleich Ausfallswinkel. Beide, wie auch der Transmissionswinkel sind nur anschaulich und viel zu groß wiedergegeben. Ist die Oberfläche ideal glatt, erhält man nur spekuläre Streuung (durchgezogene Linie), von einer rauhen Oberfläche zusätzlich diffuse Streuung (in Anlehnung an^[1310]).

Diese Methode ist aufgrund der Bedingung Einfallswinkel gleich Ausfallswinkel (d. h. der Streuvektor Q ist parallel zur Grenzflächennormale/ Z -Achse) nur empfindlich auf die senkrecht zur z -Achse gemittelte Streukraftdichteverteilung. Aufgrund des kleinen Beugungswinkels 2θ gilt: $|Q| \ll 2\pi/a$ (a ist dabei der Gittervektor). Der Streuvektor ist also sehr viel kleiner als ein reziproker Gittervektor, daher kann die atomare Struktur der Materie im Rahmen von Reflektometriemessungen vernachlässigt und die Materie als Kontinuum beschrieben werden.

Um den Vorgang an einer scharfen Grenzfläche zu beschreiben, müssen Wellenfunktionen gefunden werden die die eindimensionale Schrödinger-Gleichung erfüllen (da sich die Komponente des Neutronenwellenvektors die parallel zur Oberfläche orientiert ist, während des Streuprozesses konserviert ist). In Luft ist die Wellenfunktion an der Grenzfläche der betrachteten Schicht und der Luft durch

$$\psi(z) = e^{ik_i z} + r e^{-ikz}$$

Gleichung 84

beschrieben. Gleichsam können die Wellenfunktionen in der Schicht und dem Substrat durch

$$\psi(z) = A e^{ik_{\text{Schicht}} z} + B e^{-ik_{\text{Schicht}} z}$$

Gleichung 85

$$\psi(z) = t e^{ik_{\text{Substrat}} z}$$

Gleichung 86

beschrieben werden. Die k in den Gleichungen beschreiben dabei die Komponenten des Neutronenwellenvektors normal zur Oberfläche. In einem Medium, das in negativer z -Richtung unendlich ausgedehnt ist, entfällt die reflektierte Welle, das heißt die Amplitude B verschwindet. Die Amplitude der einfallenden Welle ist gleich eins, die der reflektierten Welle ist r und die der transmittierten Welle im Substrat t . Untersucht man die Neutronendichte an der Grenzfläche und wird die Reflektivität R als Verhältnis zwischen der Zahl der reflektierten zu den einfallenden Neutronen definiert, ist die Reflektivität einfach das Quadrat der Amplitude der reflektierten Welle. Die Herleitung für den Brechungsindex kann wie folgt vorgenommen werden:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m_n} \Delta + (V(r) - E) \right] \psi(r) = 0$$

Gleichung 87

Im Fall des streifenden Einfalls kann auf Grund des kleinen Betrages des Streuvektors (siehe oben) die Materie als Kontinuum angenommen werden. Das Wechselwirkungspotential $V(r)$ ergibt sich dann durch Volumenmittelung des Fermi-Pseudopotentials:

$$V(r) = \frac{1}{V} \int V_{\text{Fermie}}(r) d^3 r = \frac{2\pi\hbar^2}{m_n} \sum_j b_j \rho_j$$

Gleichung 88

Wobei ρ_j die Anzahldichte der Atomsorte j bezeichnet. Mit der Energie

$$E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_n}$$

Gleichung 89

Der einlaufenden ebenen Welle ergibt sich aus Gleichung 87 und Gleichung 88 die Wellengleichung

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m_n} \Delta + \left(\frac{2\pi\hbar^2}{m_n} \sum_j b_j \rho_j - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_n} \right) \right] \psi(r) = 0$$

Gleichung 90

Abschließend erhält man eine formal einfache Wellengleichung, wenn man den in Materie ortsabhängigen Wellenvektor $k_n(r)$ einführt:

$$\left[\Delta + k_n^2(r) \right] \psi(r) = 0$$

Gleichung 91

Der Brechungsindex ist über das Verhältnis von k_n zum Betrag des Wellenvektors im Vakuum k definiert. Aus den Gleichungen Gleichung 90 und Gleichung 91 ergibt sich

$$n = \frac{k_n}{k} = \sqrt{1 - \frac{\lambda^2}{\pi} \sum_j b_j \rho_j} \approx 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_j b_j \rho_j$$

Gleichung 92

wobei

$$k_n^2 = 4\pi \sum_j b_j \rho_j = 4\pi\beta$$

Gleichung 93

ist, mit der Streulängendichte β . Dabei ist der letzte Schritt dadurch gerechtfertigt, daß sich der Brechungsindex für Neutronen nur wenig von 1 unterscheidet.

Die Fresnel'schen Gleichungen: Lösung der Wellengleichung für eine scharfe Grenzfläche
 Definiert man die Reflektivität als das Verhältnis des Neutronenflusses im spekulär reflektierten Strahl zum einfallenden Neutronenfluß und entsprechend die Transmissivität als das Verhältnis des Neutronenflusses im transmittierten Strahl in Materie zum Neutronenfluß im einfallenden Strahl, so erhält man für die Fall der ideal glatten Grenzfläche die Fresnel'schen Formeln für die Reflektivität R und die Transmissivität T:

$$R = \left| \frac{\theta - n\theta_t}{\theta + n\theta_t} \right|^2$$

Gleichung 94

$$T = \left| \frac{2\theta}{\theta + n\theta_t} \right|^2$$

Gleichung 95

Brechungsgesetz und Totalreflektion In den Fresnel'schen Formeln Gleichung 94 und Gleichung 95 tritt neben dem Einfallswinkel θ der Winkel θ_t auf. Dieser wird vom Wellenvektor k_t der transmittierten Welle mit der Grenzfläche eingeschlossen. Den Zusammenhang zwischen θ und θ_t kann man leicht aus der Stetigkeitsbedingung für die Tangentialkomponenten des Wellenvektors $k_x = k_{tx}$ zusammen mit der Formel für den Brechungsindex $k_t = k \cdot n$ ableiten. Aus einfachen trigonometrischen Überlegungen ergibt sich dann das Snellius'sche Brechungsgesetz:

$$\frac{\cos \theta}{\cos \theta_t} = \frac{k_t}{k} = n$$

Gleichung 96

Wie aus Gleichung 92 hervorgeht, ist der Brechungsindex für Neutronen in einem Material mit positiver Streulänge kleiner als 1. Daher wird beim Übergang von Vakuum in Materie die Welle zur Grenzfläche hin gebrochen, wie in Abbildung 103 dargestellt ist. Brechung von Licht zeigt gerade das entgegengesetzte Verhalten. Wird der Einfallswinkel θ mehr und mehr verkleinert, so ergibt sich nach Gleichung 96 irgendwann der Fall, daß θ_t zu 0 wird. Für diesen Fall tritt kein Energiefluß in das Medium mehr auf. Vielmehr breitet sich eine exponentiell

quergedämpfte Welle (sogenannte evaneszente Welle) entlang der Oberfläche aus. Da kein Energiefluß in das Medium mehr stattfindet, wird die Welle totalreflektiert. Man spricht dann von externer Totalreflektion an der Grenzschicht zwischen Vakuum und Materie. Den Winkel, für den θ_t verschwindet, bezeichnet man als den Grenzwinkel für externe Totalreflektion θ_c . θ_c ergibt sich aus der Bedingung:

$$n < 1 \rightarrow \text{externe Totalreflektion für } \cos \theta_c = n$$

Gleichung 97

Mit Hilfe des Snellius'schen Brechungsgesetzes Gleichung 96 lassen sich die Fresnel'schen Formeln Gleichung 94 und Gleichung 95 darstellen als Funktion des Einfallswinkels θ alleine bzw. als Funktion des Betrags des Streuvektors Q .

Betrachtet man ein Vielschichtsystem, so kann man sich dieses aus Einzelschichten zusammengesetzt vorstellen. Bisher wurde die Reflektivität von Neutronenstrahlung nur an einer idealen Grenzfläche zwischen Vakuum und Materie behandelt. Der Formalismus läßt sich leicht für die Reflektivität eines Vielschichtsystems erweitern indem die Fresnel'schen Gleichungen an den verschiedenen Grenzflächen rekursiv angewendet werden. Untersucht man den Fall einer Einzelschicht der Dicke d und der Brechzahl n_1 auf einem unendlich dicken Substrat der Brechzahl n_2 , so kann unter Vernachlässigung der Brechung an der obersten Grenzfläche der Abstand der Interferenzmaxima durch die folgende Bedingung angegeben werden:

$$\lambda \approx 2d \cdot (\Delta\theta) \Rightarrow \Delta Q \approx \frac{2\pi}{d}$$

Gleichung 98

Das Reflektivitätsprofil $R(Q)$ enthält Informationen bezüglich des Streulängendichte Gradienten innerhalb der Grenzfläche^[1313] Der Dichtegradient wiederum enthält Informationen bezüglich der Dichte und Rauigkeit der Oberfläche. Die Betrachtung der diffusen Streuung erlaubt die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit^[1321]. Wenn wir die Grenzfläche in die XY-Ebene projizieren und die Z-Achse als Oberflächennormale dieser Fläche definieren, kann die Reflektometrie als tiefenprofilsensitive Technik des Streulängendichte Gradienten $dp(z)/dz$ betrachtet werden. Die Tiefenauflösung liegt bei etwa 1 nm. Auf Grund der drastischen Unterschiede zwischen den Streulängen von Wasserstoff und Deuterium, kann durch

Isotopenmarkierung die Kontrastabstimmung verschiedener Bestandteile des zu untersuchenden Systems ausgenutzt werden um gezielt einzelne Komponenten zu beobachten.^[1322] Vor allem die Untersuchung komplexer biologischer Moleküle und supramolekularer Architekturen profitiert von dieser Methode. Die Methode beruht darauf die Streuung der umgebenden Lösung der Streuung einer Komponente des zu untersuchenden Moleküls bzw. supramolekularen Verbandes anzugleichen, indem die Wasserstoffatome im Lösungsmittel oder der Komponente oder beiden mit Deuterium ausgetauscht werden. Die beobachtete Streuung wird dann nur von den nicht angepassten Komponenten hervorgerufen.

Das Zusammensetzungsprofil der Probe ist über eine Fouriertransformation mit der Reflektivität verknüpft und die Auflösung einer einzelnen Messung ist $1/Q_{\max}$ wobei Q_{\max} der maximale Wert für Q ist bis zu dem die Reflektivität gemessen werden kann (der größtmögliche Winkel, kleinste Wellenlänge). Die erreichbare Auflösung ist dann effektiv durch das niedrigste, meßbare Signal limitiert (je kleiner die Reflektivität, desto größer ist Q , desto größer der Winkel und die Auflösung).

Leider ist die Beziehung zwischen $R(Q)$ und $\rho(z)/dz$ nicht eindeutig und die „Achillesferse“ der Reflektometrie. Eine einzelne Reflektivitätsmessung kann nicht direkt in ein einziges, eindeutiges Streulängendichteprofil invertiert werden.^[1323, 1324] Daher kann experimentell kein eindeutiger Datensatz an Strukturparametern bezüglich einer Grenzflächen von einer Messung gewonnen werden. Dies ist das bekannte „Phasenproblem“ das in der Kristallographie auftaucht. Zusätzlich treten praktisch noch weitere Aspekte auf, die das Problem eine eindeutige Streulängendichte $\rho(z)$ von $R(Q)$ zu erhalten verstärken. Diese beruhen zum einen auf der Auflösung von Q , des natürlich auftretenden statistischen Rauschens in den $R(Q)$ -Daten (hier spielt die Konzeption der Neutronenquelle und des Meßaufbaus eine wichtige Rolle) und des eingeschränkten Bereiches über den $R(Q)$ gemessen werden kann eine Rolle (Q ist ja von λ und θ abhängig; auf Grund der Bedingungen für die Reflektion kann θ nicht frei gewählt werden und der Wellenlängenbereich den Neutronen besitzen dürfen, um für Reflektionsmessungen verwendet werden zu können ist ebenfalls eingeschränkt!!)

Praktisch wird die Reflektivität R der Probe bei zwei verschiedenen Winkeln gemessen. R hängt von Q ab, das wiederum von der Wellenlänge und dem Streuwinkel abhängt. Die Streueigenschaften hängen nur von Q und E ab, nicht von λ ! Die Reflektivität wird nur für zwei Werte gemessen und sonst konstant gehalten. Damit hängt Q nur noch von der Wellenlänge des Neutrons ab. Diese ist mit der Flugzeit korreliert und kann mit TOF-Methoden bestimmt werden. Da wie oben angedeutet, keine Eindeutige Lösung für die Beziehung der Streulängendichte der einzelnen Schichten erhalten werden kann, wird R mit

Hilfe von Approximationsmethoden simuliert und iterativ die berechneten Reflektivitätskurven an die experimentellen Daten angepasst.

Obwohl üblicherweise die optische Matrix verwendet wird um die Reflektivität zu berechnen, wird die Beziehung zwischen Reflektivität und Struktur der Grenzfläche besser mit analytischen Methoden im Rahmen der kinematischen Approximation ausgedrückt. Im einfachsten Fall, wenn ein Film mit ρ_1 und der Dicke d_1 zwischen zwei identischen Phasen eingeschlossen ist, beträgt seine Reflektivität:

$$R = \frac{16\pi^2}{Q_y^4} \left[4(\rho_1 - \rho)^2 \sin^2 \left(\frac{Q_z \tau}{2} \right) \right]$$

Gleichung 99

Offensichtlich ist die Reflektivität proportional zum Quadrat der Differenz zwischen der Streulängendichte ρ des Films und den umschließenden Phasen und invers proportional zur vierten Potenz des Streuvektors

Instrument/Meßaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neutronenreflektometrische Experimente am SPEAR (Surface Profile Analysis Reflectometer), einem speziellen Versuchsaufbau für die Untersuchung von Mehrschichtsystemen an Grenzflächen, am Manuel Lujan, Jr Neutron Scattering Center, Los Alamos, New Mexico, USA (MLNSC) bzw. LANSCE (Los Alamos Neutron Science Center) durchgeführt.

Standart Streutechniken lassen sich nicht auf ultradünne organische Systeme wie Lipidmembranen anwenden, da diese nur geringe Streuraten ergeben und einen substantiellen Hintergrundbeitrag besitzen. Es ist daher die Aufgabe einer oberflächensensitiven Streumethode die Signalintensität zu erhöhen, bzw. die diffuse thermale Streuung des Untergrunds auf ein Niveau zu reduzieren, das die Beobachtung des Oberflächensignals mit hinreichender Statistik erlaubt.

Neben dem speziellen Target-Design der Spallationsquelle, auf das in diesem Rahmen nicht näher eingegangen wird, ist die Führung und Selektion der Neutronen nachdem sie den Moderator verlassen entscheidend. Das Reflektometer verwendet zwei schmale Strahlen deren Form durch die Notwendigkeit diktiert wird, diese unter extrem kleinen Winkeln an einer Oberfläche zu reflektieren. Diese werden durch den Kollimator definiert. Führungsröhren, die üblicherweise aus dicken, rechteckigen Glasröhren bestehen sind durch eine Bespiegelung mit isotopenreinem ^{58}Ni in der Lage als Wellenleiter der Neutronen zu fungieren. Neutronen die

unter einem hinreichend kleinen Winkel auf die Spiegeloberfläche treffen, werden total reflektiert und werden innerhalb des Wellenleiters weiter zum Neutronenspektrometer geführt. Der Neutronenstrahl kann mit Hilfe von Spalten weiter bis zur gewünschten Divergenz kollimiert werden (die größte vertikale Divergenz beträgt $\pm 0,25^\circ$). In der horizontalen Richtung konvergiert am Detektor nach 12,4 m Abstand vom Moderator mit einer maximalen Winkeldivergenz von $0,45^\circ$.

Der weitere apparative Aufbau wird wesentlich von der Quellennatur des Neutronenstrahls bestimmt. Die oben unter dem Punkt Detektion angesprochene Flugzeitmethode bietet den Vorteil die von der Spallationquelle produzierten Neutronenpulse bezüglich ihrer Intensität effizient auszunutzen, da sie nicht auf einen monochromatischen Strahl angewiesen ist.

Um die Natur des von der Spallationsquelle erzeugten und modifizierten Neutronenstrahls und seine Verwendung im Experiment zu verstehen, ist es sinnvoll dem Strahlenverlauf von der Quelle bis zur Probe zu betrachten. Dadurch wird der Vorteil ein Flugzeitdetektion deutlich. Jeder Puls enthält Neutronen eines ganzen Wellenlängen- und Energiebereichs. Die Neutronen mit der höchsten Energie besitzen die kürzeste Wellenlänge während die Neutronen mit der geringsten Energie die größte Wellenlänge besitzen und die längste Flugzeit benötigen (Abbildung 104).

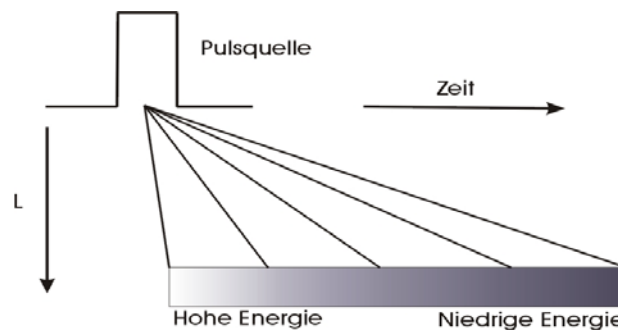


Abbildung 104 Zusammenhang zwischen Flugzeit und Energie

Da thermische Neutronen eine hinreichend geringe Geschwindigkeit besitzen, um ihre Differenz mit moderner Zähllektronik auf einer Wegstrecke von wenigen Metern auflösen zu können. Jeder erzeugte Neutronenpuls enthält Neutronen aller thermischen Energien. Sie werden daher bezüglich ihrer Energie aufgetrennt, wenn sie eine Flugstrecke von einigen Metern zurücklegen. Neutronen hoher Energie erreichen daher die Probe zuerst. Die Flugzeit, oder Time of Flight Methode (TOF) erlaubt es thermische Neutronen der im Puls vorliegenden Energien für das Streu- oder Reflektionsexperiment zu nutzen, große Bereiche des reziproken Raums bei einer stationären Messung zu erfassen, und somit den Datensatz wesentlich

schneller aufzunehmen. Zusätzlich besitzt diese Methode den Vorteil, daß der Detektor nicht zwangsweise bewegt werden muß.

Zwei Energiebereiche die die Meßung stören können nicht mit Hilfe von Flugzeitexperimenten ausgeblendet werden. Zum einen sind dies der bei jedem Puls verwendbarer thermischer Neutronen gebildete Blitz von hochenergetischen Neutronen und Gammastrahlen, der beim Auftreffen des Protonenpulses auf die Spallationsquelle gebildet wird. Zum anderen sind dies die extrem langsamen Neutronen, die mit den schnelleren Neutronen des Vorgängerpulses überlappen (Abbildung 106).

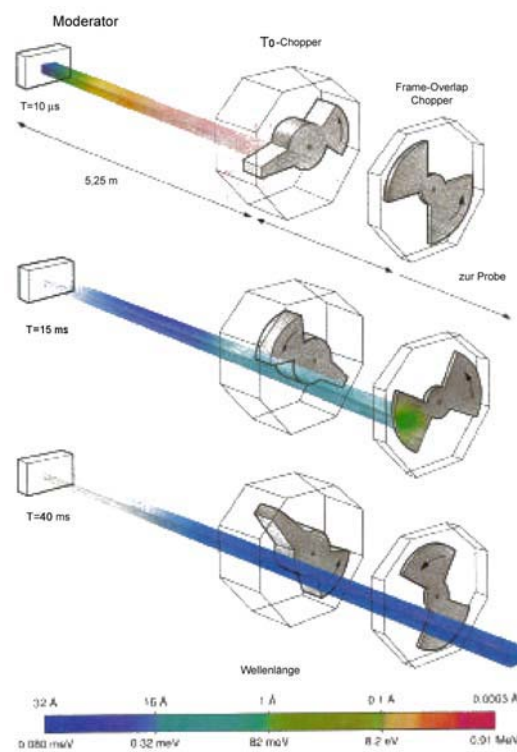


Abbildung 105 Funktion des T₀-Choppers und des Frame-Overlap-Choppers^[1309]

Es kann nur wenig getan werden, um die Tatsache zu ändern, daß die Freisetzung der gewünschten thermischen Neutronen von der Bildung von hochenergetischen Neutronen und Gammastrahlung begleitet wird, wenn der Protonenpuls die Spallationsneutronenquelle trifft. Das Problem des hochenergetischen Teilchen- und Strahlenblitzes kann mit Hilfe des T₀-Choppers/Strahlenschneiders herabgesetzt werden. Das Bauteil trägt diesen Namen, da es zum Zeitpunkt T₀, zu dem der Protonenpuls die Spallationsquelle trifft, den Strahlengang blockiert. Da sich die hochenergetischen Neutronen und die Gammastrahlung so schnell ausbreiten, daß

sie praktisch zum gleichen Zeitpunkt zu dem der Protonenpuls die Quelle trifft, auch schon am Spektrometer ankommen, können sie auf diese Weise aus dem Strahlengang entfernt werden. Abbildung 105 den T_0 -Chopper in Funktion. Er besteht aus einer 30-40 cm dicken Nickellegierung und rotiert in Synchronisation mit dem Protonenpuls. Die Neutronen werden dabei eher gestreut als absorbiert weshalb das Bauteil stark abgeschrimmt werden muß. Der Puls verwendbarer Neutronen passiert den Chopper sobald er sich weitgenug gedreht hat. Durch den T_0 -Chopper wird also die Hintergrundstrahlung deutlich minimiert.

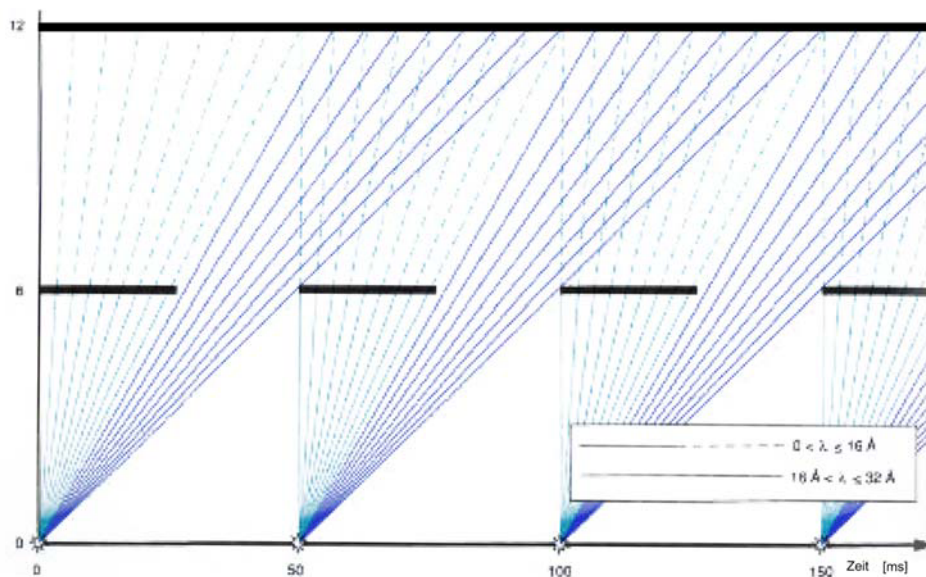


Abbildung 106 Jeder einzelne Protonenpuls der die Spallationsquelle trifft, erzeugt ein Spektrum an Neutronen unterschiedlicher Energie/Flugzeit (kleine Sterne auf der x-Achse). Mit zunehmender Flugzeit kommt es aber zur Überlappung von langsamen Neutronen des Vorgängerpulses mit schnellen Neutronen des nachfolgenden Pulses. Die zu langsamen Neutronen werden daher mit Hilfe eine Frame-Overlap Choppers entfernt (schwarze horizontale Balken verdeutlichen diesen Zeitbereich).^[1309]

Der zweite oben angesprochene Bereich der die Meßung negativ negativ beeinträchtigt, ist der Anteil langsamer Neutronen niedriger Energie.

Die Neutronen die durch jeden moderierten Puls erzeugt werden beginnen ihren Flug zum Detektor zum gleichen Zeitpunkt der im Bereich von Millisekundenbruchteilen liegt. Da die Neutronen eine unterschiedliche Geschwindigkeit besitzen, benötigen sie zum Erreichen des Detektors unterschiedlich lange Zeitspannen. Um eine Überlappung der Neutronen unterschiedlicher Geschwindigkeiten verschiedener Pulsfolgen am Detektor zu vermeiden, die die Flugzeitmessung verfälschen würden, wird am LANCSE die vorteilhafte Pulsfolge mit relativ langen Abständen von 50 msec gewählt. Die zu langsamen Neutronen werden mit Hilfe

eines mechanischen (propellerartigen) Strahlenschneider (Frame-Overlap Chopper) ausgeblendet, wie er in Abbildung 105 und Abbildung 106 dargestellt ist.

Mit Hilfe des polychromatischen Strahls kann nun ein großer Bereich des Streuvektors Q_z gemessen werden, ohne den Winkel des einfallenden Strahls zu variieren. In der Praxis erlaubt diese Meßanordnung Messungen mit einer minimalen Reflektivität von etwa $5 \cdot 10^{-7}$ mit guter Statistik innerhalb von 3 Stunden durchzuführen. Für zeitabhängige Experimente können Reflektivitäten von etwa $5 \cdot 10^{-3}$ innerhalb von 5 Minuten erhalten werden.

SPEAR-Spezifikationen: SPEAR ist ein Flugzeit Neutronenreflektometer das in der Lage ist das Isotopdichtenprofil von dünnen Schichten (im Bereich von 5-3000 Å) in verschiedenen Umgebungsbedingungen (Medien) zu messen. Hierzu wird ein nichtpolarisierter Neutronenstrahl zur Untersuchung von fest/fest, fest/flüssig und fest/gasförmig und flüssig/gasförmig Grenzflächen verwendet. Der durch einen flüssigen Wasserstoffmoderator moderierte Neutronenstrahl bietet einen Neutronenfluß von $9,5 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei einem Protonenstrom von 100 mikro A. Der Abstand der Probe vom Moderator beträgt 8,73m und der Abstand vom Moderator zum Ordela Model 1202N linear positionssensitiver ^3H Detekt 12,4m.

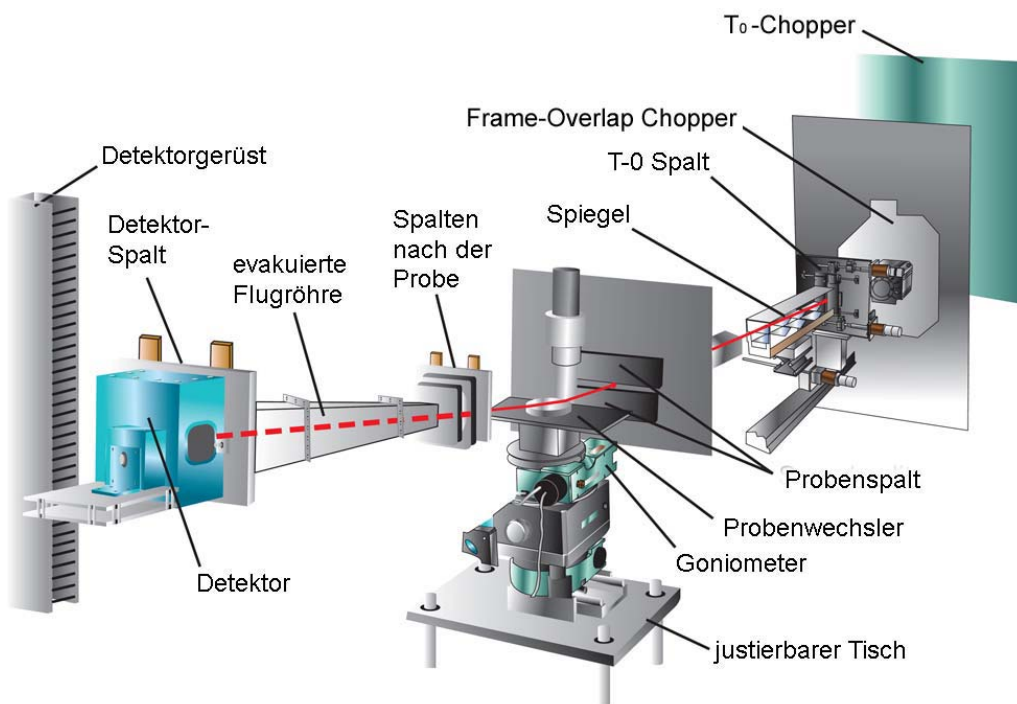


Abbildung 107 Meßaufbau des SPEAR (Surface Profile Analysis Reflectometer)

<i>SPEAR Spezifikationen</i>	
Abstand vom Moderator zum Detektor	12·40 m
Wellenlängenfenster bei 20 Hz	$1 < \gamma < 16 \text{ \AA}$ und $16 < \gamma < 32 \text{ \AA}$
Q-Bereich (flüssige Probe)	$0,006 < Q < 0 \cdot 15 \cdot \text{\AA}^{-1}$
Querschnitt des Strahls an der Probenposition (maximale Probengröße)	3 mm Höhe x 30 mm Breite
Moderator	Teilweise gekoppelter flüssiger Wasserstoff bei 20 K
Neutronenfluß an der Probeposition bei 100 μA	$2 < \gamma < 6 \cdot \text{\AA}$ $\sim 7,0 \times 10^7 \text{ n/cm}^2/\text{s}$ $6 < \gamma < 16 \cdot \text{\AA}$ $\sim 1,5 \times 10^6 \text{ n/cm}^2/\text{s}$
Detektoren	Lineare ^3He positionssensitive Detektoren
Minimum-Reflektivität	$< \sim 10^{-7}$
Probenumgebung	fest/flüssig Grenzflächenmesszellen, LB-Trog
Experimentdauer	5 Minuten bis zu 6 Stunden

Table 10 Tabellarische Zusammenfassung der SPEAR-Spezifikationen

4.16 Differential Scanning Kalorimetrie (DSC)

Die Differentialkalorimetrie, oder englisch als *Differential Scanning Calorimetry* DSC bezeichnet, ist eine einfache Methode die zur Untersuchung thermisch induzierter Zustandsänderungen von nieder- und makromolekularen Verbindungen in Substanz oder im Lösungsmittel angewendet wird. ^[1325] Die Betrachtung von Phasenübergängen und damit indirekt auch molekularen Beweglichkeiten ermöglichen die Untersuchung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen unter Teilchen und Teilchenverbänden unterschiedlicher Komplexität. Da viele Phasenübergänge auch in architektonisch geordneten, supramolekularen Aggregaten, zum Beispiel bei Vesikeln und anderen Membranformen auftreten, ist die DSC für die Abschätzung molekularer Beweglichkeiten eine wichtige Methode. Sie dient der experimentellen Bestimmung und Verfolgung von Aggregations- und Hydratationsprozessen, Konformationsänderungen, Schmelzvorgängen, dem Einfluß des *pH*-Wertes, der Ionenstärke und des Lösungsmittels sowie kinetischen, Stabilitäts- und Reversibilitätsdaten. Die DSC eignet sich für die Charakterisierung von Phospholipidsystemen, um die Identität und Reinheit

der Substanzen, die thermo- und lyotrope Mesomorphie, den Einfluss des Vesikeltyps, der Kettenlänge und der Kopfgruppe, die Mischungseigenschaften sowie den Effekt von hydro-, amphi- und lipophilen Liganden zu untersuchen.^[1326]

Experimentell wird die Messung wie folgt durchgeführt: Die zu untersuchende Substanz wird in ein geschlossenes Aluminiumschälchen verbracht und in eine der beiden Heizpfannen im Messtopf gelegt. Auf die zweite Heizpfanne wird ein leeres Aluminiumschälchen gelegt.

Dann werde die beiden Schälchen mit konstanter Geschwindigkeit aufgeheizt. Kommt es zur Temperaturdifferenz zwischen Referenz und Probe, wird diese durch Zuführung zusätzlicher Wärme kompensiert. Während einer endothermen Umwandlung muß der Probe zusätzlich Wärme zugeführt werden, um die Heizrate konstant zu halten. Dies wird als positiver Ausschlag in der gegen die Temperatur aufgetragenen Funktion der Wärmestromdifferenz (dH/dT) zwischen Probe und Referenz registriert.^[1327] ^[1328] Schmelzpunkte zeigen sich als endotherme Peaks, Glasübergänge als Stufe. Phasenumwandlungen von Lipiden zeigen sich ebenfalls als Stufen oder z.B. bei der Hauptphasenumwandlung von DPPC von P_β nach L_α als scharfer Peak. Negative Peaks treten bei exothermen Umwandlungen wie z.B. Kristallisation in Erscheinung. Die Peakform und die Halbwertsbreite stellen ein Maß für die Kooperativität der Umwandlung dar.^[1329] Die Fläche unter dem Umwandlungspeak ist der Umwandlungsenthalpie ΔH_u proportional. ΔH_u kann nach Eichung des Gerätes mit einer Substanz bekannter Schmelzwärme (z.B. Zinn) bestimmt werden. Die partielle Enthalpieänderung nach der Temperaturentspricht der Änderung der Wärmekapazität ΔC_p . Einer der verschiedenen Beiträge zu ΔC_p ist der Grenzfläche der dem Wasser ausgesetzten hydrophoben Strukturen proportional. Sie liefert daher Informationen über die Wechselwirkung der hydrophoben und hydrophilen Segmente mit Wasser.^[61]

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p$$

Gleichung 100

Die Reaktionsenthalpie ΔH ist nach dem 1. Hauptsatz der Thermodynamik von der Temperatur T , dem Druck p und der Zusammensetzung ξ abhängig ($H = H(T, p, \xi)$). Sie kann beim Vorliegen chemischer Reaktionen auch mit Hilfe der DSC über die Wärmekapazität bestimmt werden. – Die partielle Ableitung der Enthalpieänderung nach der Temperatur entspricht der Änderung der Wärmekapazität ΔC_p . Gleichung 100 zeigt die Verknüpfung der Reaktionsenthalpie ΔH durch die van't Hoff-Beziehung:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\partial \Delta H}{RT^2}$$

Gleichung 101

Nach der van't Hoff-Beziehung kann die Gleichgewichtskonstanten K nach bestimmt werden, indem ΔH aus ΔC_p nach Gleichung 100 berechnet wird und ΔH in die umgeformte Gleichung 101 eingesetzt wird, wobei R die Gaskonstante ist.

Zur praktischen Durchführung wurden einige Milligramm des zu untersuchenden Lipids in einem Aluminiumtiegel eingewogen. Die Messungen wurden an einem Mettler DSC30-Gerät durchgeführt. Die Heizrate beträgt 10 K/min und als Temperaturbereich wurde –100 bis 100 °C gewählt. Zur Bestimmung des Tg wurde der Wendepunkt des Kurvenverlaufs beim zweiten Aufheizen mittels eines Auswerteprogrammes (Mettler TA72AT.1) bestimmt.



„Die Welt ist in zwei Klassen eingeteilt,
in diejenigen, die das Unglaubliche glauben,
und diejenigen, die das Unglaubliche tun“
Oscar Wilde

Präsentierte Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit hat die Entwicklung neuartiger biomimetischer Membranen und der dazu notwendigen Methoden zum Ziel. Mit ihrer Hilfe soll die Untersuchung der molekularen Schrittfolge biologischer Prozesse mit erhöhter Spezifität ermöglicht werden.

Biomimetische Systeme sind auf Grund der Komplexität ihrer biologischen Vorbilder nur schwer strukturell and kompositorisch zu definieren - auch wenn die beabsichtigte Applikation spezifisch definierbar ist. Trotz 30 Jahren intensiver Forschung ist die Mimese vieler Membranprozesse noch in ihren Anfängen. Der Aufbau bioäquivalenter Membranmimikrie bedarf immer noch immenser Anstrengungen um Membranprozesse in ihrem komplexen Wechselspiel auf molekularer Ebene funktionell und strukturell zu verstehen und den Anforderungen des biomimetischen Systems entsprechend an die künstliche Meßanordnung zu adaptieren. Folglich teilt sich die Dissertation in zwei Abschnitte auf. Im ersten Abschnitt, der die Kapitel 3 und 4 umfaßt, wurden die zum Verständnis der für die Entwicklung von Membranmimikrie notwendigen Grundlagen und Methoden (im Feynman'schen Sinne: – „nur was ich nachbauen kann habe ich auch verstanden“) herausgearbeitet und definiert. Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 5 bis 7) werden Synthese, Aufbau, Anwendung und Charakterisierung der in Kapitel 2 und 3.3 definierten biomimetischen Membranen beschrieben, (Abbildung 108).

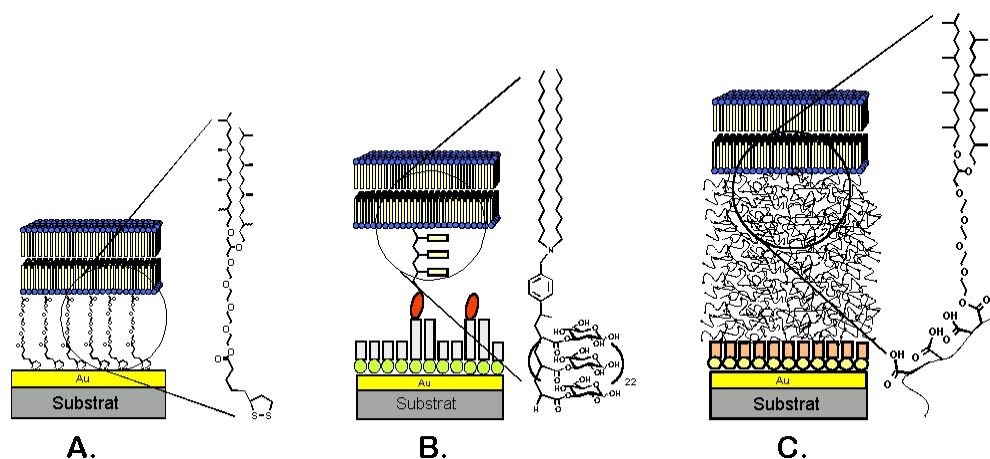


Abbildung 108 Die in dieser Arbeit entwickelten tBLMs: A) DPTL (2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin-tetraethylenglykol-tBLM) in Kapitel 5. B) LGP (Lipo-Glycopolymer-tBLM), in Kapitel 6. C) PPPMASA-tBLM (tBLM basierend auf elektrophilen Plasmapolymernetzwerken) in Kapitel 7.

Die Herausforderungen sind vielschichtig – das Ziel besteht nicht in erster Linie in der Synthese neuer Verbindungen, sondern in der „Synthese“ komplexer Funktionen!

Ein neues Membranmodell, basierend auf dem neu entwickelten 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylenglykol-D,L- α -liponsäureester, ist zusammen mit zahlreichen Anwendungen in den Veröffentlichungen I bis VIII im 5. Kapitel beschrieben. Es erlaubt erstmals die Ausbildung von zellmembrananalogen elektrischen und fluiden Membraneigenschaften bei einer Oberflächenentkopplung der Membran von etwa 2 nm auf der Grundlage eines Einkomponenten-SAMs.

Basierend auf den Veröffentlichungen IX und X ist im 6. Kapitel ein tBLM-Design beschrieben das es erlaubt mit Hilfe von kohlenhydratmodifizierten Lipopolymeren cytoskelettanaloge Submembranräume zu erzeugen. Erstmals konnte eine Festkörperentkopplung der Lipidmembran von mehr als 6 nm auf der Grundlage einer molekularen Monoschicht mit guten elektrischen Eigenschaften erreicht werden. Hervorzuheben ist das für die polyfunktionelle Verbindungsklasse der Lipo-Glycopolymere entwickelte Schema zur kovalenten Oberflächenanbindung spezifisch orientierter supramolekularer Membranarchitekturen durch die Kombination von LB-Technik und photochemischer Oberflächenanbindung auf Metallfilmen.

Große Entkopplungsabstände zwischen Membran und Sensoroberfläche (10 bis 50 nm) sind mit den in den Publikationen XI-XV beschriebenen Plasmapolymernetzwerken möglich. Plasmapolymere unterscheiden sich in Aufbau und Synthese stark von den vorangegangenen Spacersystemen. Während die erstgenannten Systeme in erster Linie auf oberflächengebundenen singulären Spacerketten vertikaler Orientierung beruhen, sind Plasmapolymere je nach Polymerisationsbedingungen unterschiedlich stark vernetzte Polymernetzwerke. Daher ist deren Quellverhalten und der zur Verfügung stehende laterale Raum vom Vernetzungsgrad und der Kettendichte abhängig. Anwendungen im Bereich der tBLMs und Biosensoren/Chips in Kapitel 7 beschrieben.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Glycolipidsynthesen sind Bestandteil einer zukünftigen Publikation, da sie nicht zum Aufbau von tBLMs im Rahmen dieser Arbeit herangezogen wurden (Beispielsweise DPGT mit β -1,3 GlucTrisaccharid als Partialstruktur eines Laminarans und Phytanyl - α -1,4-Heptamaltose).

Anmerkung: Die in den Kapiteln 5-7 entwickelten Synthesestrategien und beschriebenen Synthesen stehen in chronologischer Wechselbeziehung mit den biophysikalischen Charakterisierungen einzelner Endverbindungen und Teilmotiven. Durch die wechselseitigen Beziehungen von Synthese und Anwendung (biophysikalische Charakterisierung) der Verbindungen und der Modifikation einzelner Verbindungen entspricht die Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht der chronologischen Reihenfolge der Experimente. Die

Entwicklung der 3 verschiedenen Konzepte zum Aufbau unterschiedlich stark vertikal entkoppelter tBLMs erfolgte parallel zur Entwicklung und Synthese der Lipidmotive. Dadurch war es nicht möglich alle Lipidmotive beliebig mit den Membran/Spacer-Konzepten zu kombinieren.

5 Archaea-analoge Thiolipide mit Tetraethylenglykol-Spacer (DPTL)

Biomimetische Membranen die in der Lage sind die biologische Membran in mehreren ihrer charakteristischen Eigenschaften (Kapitel 3) bioäquivalent nachzubilden, sind bis zum heutigen Tag eine Herausforderung. Besonders die Ausbildung hochohmiger, und gleichzeitig fluider Membranen ist schwierig. Das einzige, vormalig beschriebene festkörpergestützte Membransystem, das in dieser Hinsicht bioäquivalente Eigenschaften aufweist, ist ein von Cornell et al. beschriebenes Mehrkomponentensystem.^[80] Es wird aus ethanolischer Lösung unter spontaner Membranbildung durch Verdünnung in einem Schritt auf der Sensoroberfläche präpariert. Gravierende Nachteile dieses Modellsystems liegen in der komplexen Mischung einer Vielzahl von Komponenten die den synthetischen Aufwand wesentlich erhöhen, sowie den Aufbau und die Charakterisierung des Membransystems komplizieren und die exakte Definition der Membranzusammensetzung nur eingeschränkt erlauben. Zusätzlich ermöglicht diese Präparationsmethode nicht den Einbau von Membranproteinen via Proteoliposomen. Das in diesem Kapitel beschriebene Membransystem soll helfen diese Einschränkungen zu überwinden.

Um das Ziel einer kovalent an Substrate gebundenen biomimetischen Membran zu realisieren, muß eine Lipiddoppelschicht präpariert werden, die zum einen die elektrisch dichten Eigenschaften der biologischen Membran erreicht und andererseits den Einbau von Membranproteinen in funktioneller Form erlaubt. Um beide Ziele zu erreichen ist es notwendig, daß sich die Membran im flüssigkristallinen Zustand (L_{α}) befindet, in dem eine hinreichende Beweglichkeit der hydrophoben Ketten gegeben ist. Hierzu sind zwei verschiedene Ansätze denkbar. Zum einen könnte ein Lipid zur Anbindung an die Oberfläche verwendet werden, das aggregierend auf die Lipide seiner Umgebung wirkt (quasi Gelzustand) und dadurch die Membran stabilisiert. Hierzu ist es notwendig, diese Lipide in Konzentrationen $\ll 1\%$ auf der Oberfläche anzubinden um laterale bewegliche Lipide zwischen den Aggregationskeimen zu erhalten. Aus Flächenbelegungen mit hydrophober Gruppen von $\ll 1\%$ resultieren aber üblicherweise Kontaktwinkel $< 70^\circ$, die eine effektive Vesikelfusion zur Membranbildung stark erschweren (Kapitel 3.2.3.3). Liegt die Phasenübergangstemperatur

oberhalb der Raumtemperatur und sind mehr als zwei hydrophobe Ketten an einen Ankerpunkt zur kovalenten Anbindung an die Oberfläche gebunden, wird dieser Effekt verstärkt. Zusätzlich erniedrigen die Alkylketten mit zunehmender Kettenlänge die Fluidität. Dieser Zusammenhang führte zu dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Ausschluß für die Verwendung solcher Motive für die angestrebten tBLM-Eigenschaften.

Als Motiv mit dem größten Potential wurde in Kapitel 3.3 das 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin auf Grund der analytischen Betrachtung extremophiler Organismen definiert. Es ist in besonderer Weise für den Aufbau hochhohmiger, fluider, selbstheilender Membranen im Format biomimetischer Membransensoren prädestiniert. Die hohe Mobilität der Phytanketten vermindert Membrandefekte in Zeitdomänen die zum passiven Ladungstransport über die Membran führen könnten. Sie beruht auf den Methylverzweigungen der Phytanylketten. Diese sorgen für eine lokale Störung der Membranpackung wodurch eine außergewöhnlich hohe Fluidität über den kompletten physiologisch bedeutsamen Temperaturbereich erzielt wird. Dies ist von Bedeutung, da auf geladene Gruppen innerhalb des oberflächengebundenen Lipids verzichtet werden soll und nichtionische Amphiphile im Vergleich zu ionischen Amphiphilen üblicherweise eine relativ hohe $T_K^{[1330, 1331]}$ (T_K = eutektische Kraft Temperatur)^[1332] aufweisen. Sie bezeichnet die Temperatur, oberhalb welcher ein hydratisierter, grenzflächenaktiver Stoff in ein flüssig-analoges molekulares Aggregat, wie z.B. Mizellen oder verschiedene Formen der flüssig-kristallinen Phase, übergeht. Diese flüssigen Phasen spielen eine besondere Rolle in Systemen grenzflächenaktiver Verbindungen/Wasser^[1333]. (Eutektikum = Gemenge zweier Stoffe, welche im festen Zustand nicht, im flüssigen Zustand aber vollständig ineinander mischbar sind. Eine Flüssigkeit, welche gerade die eutektische Zusammensetzung erreicht, erstarrt ohne Änderung der Zusammensetzung und hat die tiefste Erstarrungstemperatur).

Die Etherverknüpfung der Phytanketten zum Glycerin minimiert den passiven Ladungstransport. (siehe Kapitel 3.1.2.3.2) Es sind diese Eigenschaften die es den Archaea erlauben, unter extremen Umweltbedingungen zu Überleben. Das Resultat der in Kapitel 3 durchgeführten Analyse biologischer und biomimetischer Membranen spiegelt sich in der in Abbildung 109 dargestellten Verbindung 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylenglykol-D,L- α -liponsäureester (DPTL) wieder.

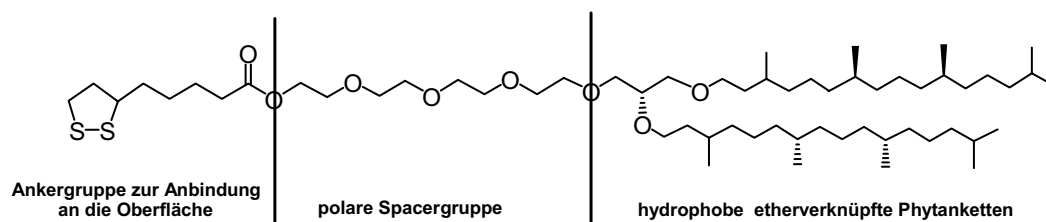


Abbildung 109 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylenglykol-D,L- α -liponsäureester, DPTL

DPTL weist im Bezug auf die in Abbildung 110 dargestellten Bestandteile der biomimetischen Membranen eine Reihe von Merkmalen auf, die in früheren tBLMs nicht berücksichtigt wurden. Alle Punkte 1-5 beinhalten kritische Faktoren welche die Qualität, Zuverlässigkeit und vertikale Entkopplung der Membrane ermöglichen oder verhindern.

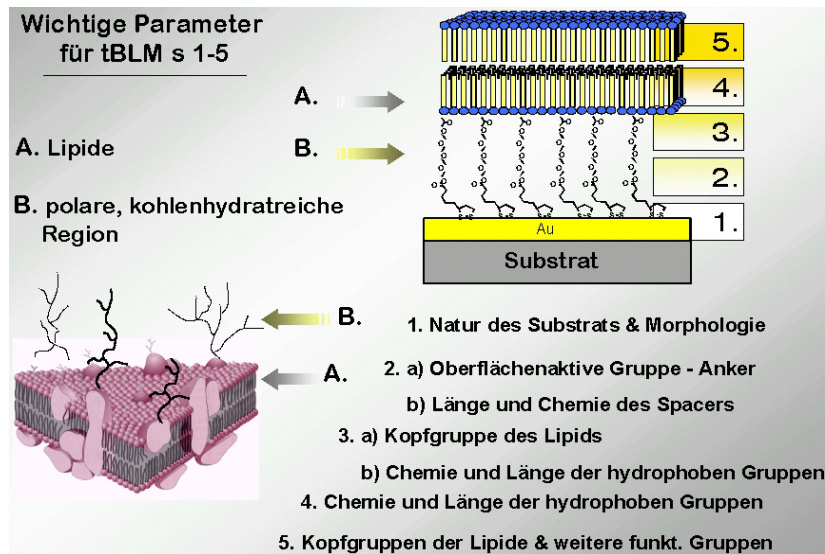


Abbildung 110 Wichtige Parameter für die Entwicklung biomimetischer Membranen. Die Übersetzung des natürlichen Systems (linke Seite) kann unter zwei Aspekten erfolgen. Zum einen kann der Spacer der biomimetischen Membran als cytosolisch/Cytoskelett Analogon oder als Analogon der EM betrachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist die chemisch/strukturelle Nähe des Spacers zur EM größer als zum intrazellulären Gerüst.

Im Rahmen der Publikationen I-III, VIII sind die Zusammenhänge dieser Eigenschaften und die Synthese von DPTL beschrieben. Im folgenden werden die Vorteile des DPTL-Designs aufgeführt, sowie die Synthese und die Eigenschaften der DPTL-tBLM herausgestellt, bevor Beispiele für den Einsatz der DPTL-tBLM skizziert werden.

5.1 Erwartete Vorteile des DPTL-Motivs auf Grundlage der Daten in Kapitel 3:

Hydrophober Bereich

- Verwendung von 2 Phytanketten: Vorteil hohe Fluidität, verstärkte hydrophobe WW zwischen den hydrophoben Gruppen durch zwei Phytanketten^[49] anstelle von einer^[80]
- Sehr stabil durch Etherverknüpfung zwischen den Phytanketten und dem Glycerin (Stabilität gegen Hydrolyse, Oxidation, pH, Temperatur)

- 2,3-*sn*-Glycerinmodifikation ist gegenüber der 1,2-*sn*-Glycerinmodifikation biologisch stabiler
- 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin bildet keine Fragmente die bei Abbau Signalcharakter (second messenger) aufweisen
- Elektrisch und chemisch dichteste Membranen durch Mobilität der Ketten und reduzierte Protonenleitfähigkeit der Etherverknüpfungen gegenüber Acylverknüpfungen (siehe Kapitel 3.1.2.3.2)
- Fluide Mono- und Doppelschichten (auch die Monoschicht/SAM weist hohe Widerstände auf, die eine Anwendung in der molekularen Elektronik interessant machen)

Spacerbereich

- Tetraethylenglykol (TEG) ist das Oligoethylenglykol (OEG), das unter allen Oligoethylenglykolen auf Grund seines großen „all-trans“-Konformationscharakters die größte Entkopplung (2 nm) zwischen Membran und Festkörper als oberflächengebundener SAM erlaubt (siehe besonders Publikation I)
- Da es die Geometrie von Ethylenglykolen erlaubt, sich in das Wasserstoffbrückennetzwerk des Wassers mit einbinden zu lassen, besitzen OEGs hydrophile Eigenschaften und können gut hydratisiert werden
- OEGs liegen als SAMs auf Gold in helikaler Konformation mit einer Fläche von 21,3 Å² pro Molekül vor, auf Silber besitzt der gleiche SAM eine all-trans Konformation mit einer Fläche von 18,4 Å² pro Molekül.^[1334] Diese Fläche entspricht etwa der eines Alkyl-SAMs, so daß beide Systeme optimal in vertikaler Weise kombiniert werden können.

Ankergruppenbereich

- Liponsäure, auch Thioctsäure, 2-Dithiolan-3-yl-pentansäure oder 1,2-Dithiocyclopentan-3-valeriansäure genannt, kann durch multiple Gold-Schwefel-Wechselwirkungen zu einer signifikanten Stabilitätserhöhung des SAMs beitragen^[981]
- Disulfide sind im Gegensatz zu freien Thiolen bei einer Handhabung unter atmosphärischen Bedingungen nicht oxidationsempfindlich
- Aus der Literatur ist bekannt, daß Disulfide selbstorganisierte Monoschichten bilden die sich nicht von SAMs unterscheiden die aus den entsprechenden Alkylthiolen gebildet sind

- Liponsäure trägt zusätzlich zum Tetraethylglykol 0,5 nm zur Oberflächenentkopplung bei
- Liponsäure kann nach der Reduktion zum Dithiol beispielsweise analog zu anderen Thiolen zur Kopplung an Maleimid-SAMs zur kovalenten Anbindung an andere Festkörperoberflächen als Gold verwendet werden^[947, 1335]
- Die nativ vorhandene Carboxylgruppe erlaubt die Anbindung von hydroxyl- oder aminoterminierten Lipidderivaten mit effizienten Standardkupplungsmethoden
- Liponsäure ist trotz seiner gegenüber Biotin herabgesetzten Affinität für Streptavidin ($K_a(\text{Biotin}) = 1 \cdot 10^{15} \text{ Mol}^{-1}$, $K_a(\text{Desthiobiotin}) = 2 \cdot 10^{12} \text{ Mol}^{-1}$ und $K_a(\text{Liponsäure}) = 1,4 \cdot 10^6 \text{ Mol}^{-1}$)^[1336, 1337] in der Lage an die in der Biosensorik verwendeten oberflächengebundenen Streptavidinmatrizes zu binden
- Zusätzlich ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten in der radiochemischen Diagnostik, da Liponsäure ein geeigneter Bindungspartner für das sehr thiophile $^{76}\text{As}(\text{III})$ ist,^[1338, 1339] das als neutronenarmer Kern Positronen (β^+) emittiert, die für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verwendet werden können^[1340]

5.2 Synthesestrategie des 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin-1-tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureesters (DPTL) und des Tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureesters (TEGL)

Die angestrebten Synthesestrategien sollen eine möglichst große Bandbreite an Applikationsmöglichkeiten der Lipid-Konjugate im Kontext biomimetischer Membranen erlauben. Das bedeutet, daß die Lipid-Konjugate erst zum Schluß mit der Ankergruppe modifiziert werden, um die spacerfunktionalisierten Lipide ohne Störung der Ankergruppe im Vergleich zu den natürlichen Lipiden zu charakterisieren und analog deren biologischen Vorbildes auch als freie Lipide beim Aufbau von biomimetischen Membranen anwenden zu können. Daneben soll die Strategie einerseits effizient und gut handhabbar sein, und andererseits die späte Einführung der hydrophoben Ketten erlauben, da die zukünftige Modifizierung mit schwer zugänglichen oder teuren Lipidmotiven (z.B. mit (2R,4R,6R,8R)-2,4,6,8-Tetramethyldecansäure mit minimalen Substanzmengen möglich sein soll. Die Synthesen sind in den Publikationen I, III, VII und VIII beschrieben.

Zusätzlich sollen die einzelnen präparativen Schritte auf der Sensoroberfläche, und die nachfolgende Anwendung der biomimetischen Membran für membranabhängige Fragestellungen, mit Hilfe biophysikalischer Methoden auf molekularer Ebene charakterisiert

werden können. Es ist daher sinnvoll die Komplexität der Membran im Bezug auf die Anzahl ihrer Komponenten auf zwei bis drei zu beschränken.

Den zuletzt genannten Bedingungen wird durch die in Kapitel 5.1 aufgeführten Designelemente/erwarteten Eigenschaften von DPTL Rechnung getragen.

Synthetisch wird das DPTL aus einem chiralen Glycerinbaustein, Tetraethylenglykol, Liponsäure und Phytol dargestellt (Abbildung 111).

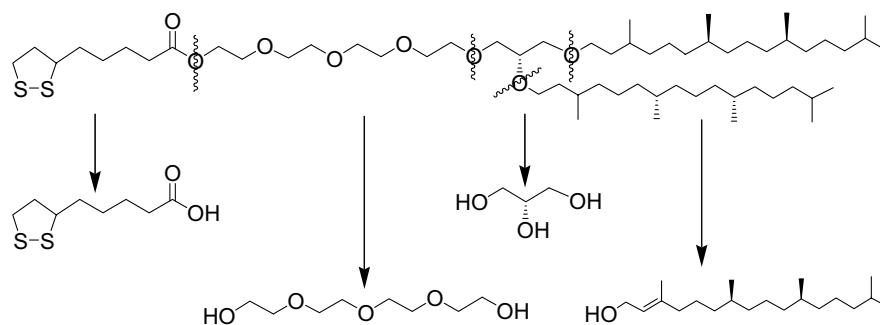


Abbildung 111 Retrosynthese von DPTL

Auf Grund der oben vorgegebenen Rahmenbedingungen ist der parallele Aufbau von DPTL-Partialstrukturen nur begrenzt möglich. Drei wesentliche Schritte können unterschieden werden. Die Synthese eines geschützten Tetraethylenglykol-1-sn-Glycerin-Bausteins der es erlaubt verschiedene Lipidketten einzuführen, die Synthese aktivierter Lipide/Phytanbromid und die abschließende Einführung der oberflächenaktiven Gruppe.

Die Synthese des chiralen, spacermodifizierten Glycerinbausteins und die Synthese der Lipidreste erfolgt zweckmäßig parallel. Zur Einführung der hydrophoben Phytanylketten bieten sich Phytanbromide an die in einem späten Schritt in das Spacer-Kopfgruppenfragment eingeführt werden. Phytanbromid wird in zwei Stufen erhalten. Im ersten Schritt hydriert man die Doppelbindung in Gegenwart von Katalysatoren, beispielsweise PtO_2 , (Adams-Katalysator) oder neutral gewaschenem Raney Nickel.

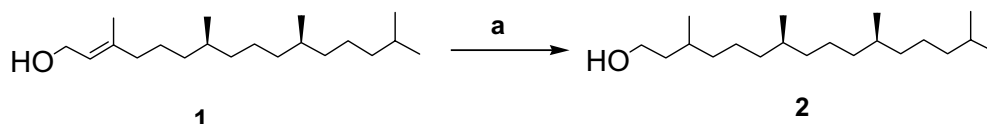


Abbildung 112 a) Hydrierung von Phytol (**1**) mit Adams-Katalysator in abs. Ethanol führt bei 40 °C unter Wasserstoffatmosphäre bei 70 bar Druck nach 10 Tagen zur Umsetzung zu Phytanol (**2**) mit 96% Ausbeute.^[1341] Wird der Ansatz mit Hilfe von Raney-Nickel bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre in Methanol für 3 Tage gerührt erfolgt ein quantitativer Umsatz zum Phytanol (**2**).

Das erhaltene Produkt ist ein Gemisch der beiden R/S Stereoisomere an der Position 3 des Phytangerüsts (3R/S,7R,11R,15-Tetramethylhexadecanol). Die Synthese des Phytanbromids

(3) erfolgt in einer appelanalogen Umsetzung von Phytanol (2) mit Triphenylphosphin und N-Bromsuccinimid (NBS) in Dichlormethan unter Eiskühlung, so daß die Temperatur bei der portionsweisen Zugabe von NBS unter 30 °C gehalten wird (Abbildung 113).

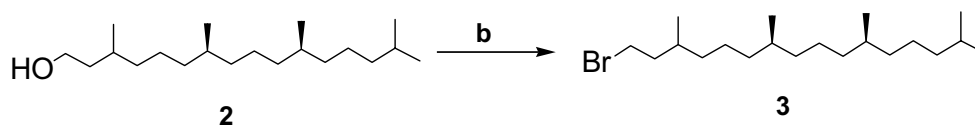


Abbildung 113 Bromierung von Phytanol (2) zu Phytanbromid (3); b) 1 Äquiv. Phytanol (2), 1,15 Äquiv. Triphenylphosphin, 1,06 Äquiv. NBS, Dichlormethan, T < 30 °C, 16 h, 81 %.

Parallel dazu wird der chirale Glycerin-Tetraethylglykol-Spacer aufgebaut. Hierzu soll ein *D*-Glycerin an der 2- und der 3-Position mit einer sauer spaltbaren Schutzgruppe synthetisiert werden, mit dem Ziel den so geschützten Baustein mit Tetraethylglykol zu modifizieren und eine zur Glycerin-Schutzgruppe orthogonale Schutzgruppe einzuführen die säurestabil ist. Eine gängige Methode zur Darstellung chiraler Glycerinbausteine nutzt *D*-Mannit als chiralen *D*-Glycerinvorläufer.^[1342]

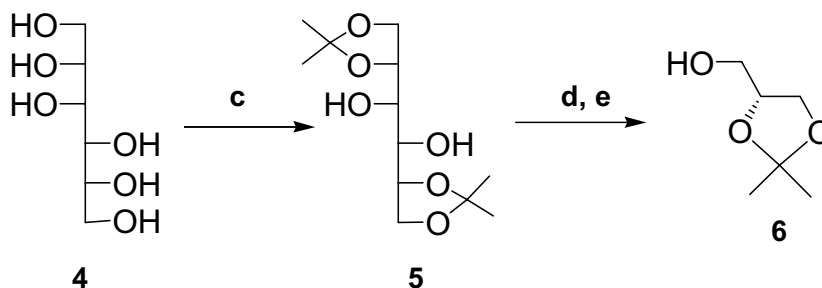


Abbildung 114 Stereoselektive Synthese eines 2,3-Isopropyliden geschützten *D*-glycerins;^[1342] c) 1,8 Äquiv. Zinkchlorid, 1 Äquiv. *D*-Mannit, Aceton, 2h, RT, d) 1 Äquiv. 5, 1 Äquiv. Natriumperiodat, Wasser/Dioxan, e) Das Rohprodukt von d) (instabiler Aldehyd) wird sofort in Lösung mit 1,5 Äquiv. Natriumborhydrid zu 6 umgesetzt, 0 °C, 20 min, 45 % über 3 Stufen.

D-Mannit kann mit Aceton unter Lewissäurekatalyse zum 1,2,5,6-Disopropyliden-*D*-Mannit (5) umgesetzt werden (Abbildung 114). Die terminale Einführung der Isopropylidenschutzgruppen erlaubt die symmetrische Spaltung von 5 unter Ausbildung von zwei identischen Isopropyliden geschützten Glycerinaldehyden. Da diese instabil sind werden sie nicht isoliert und direkt in einer Eintopfreaktion zum 2,3-Isopropyliden-*D*-glycerin 6 reduziert. Für die nachfolgenden Schritte bis zur Einführung der Ankergruppe/Liponsäure ist es

zur Steigerung der Ausbeute vorteilhaft unter absoluten Bedingungen zu arbeiten. Ausgehend von **6** wird nach Tosylierung mit TEG verethert. Alle Lösungsmittel und das als Base verwendete Pyridin werden unmittelbar vor der Verwendung getrocknet. **6** gelöst in Chloroform wird über frisch aktivierten Molsieb 3 Å getrocknet. 2,3-Isopropyliden-*D*-glycerin-1-*O*-tetraethylglykol (**8**) zeigt nur einen geringen Laufunterschied zu TEG. Es wird daher nicht isoliert und im Produktgemisch benzyliert. 2,3-Isopropyliden-*D*-glycerin-1-*O*-tetraethylglykolbenzylether (**9**) kann nun auf einfache Weise chromatographisch von den Nebenprodukten abgetrennt werden (Abbildung 115).

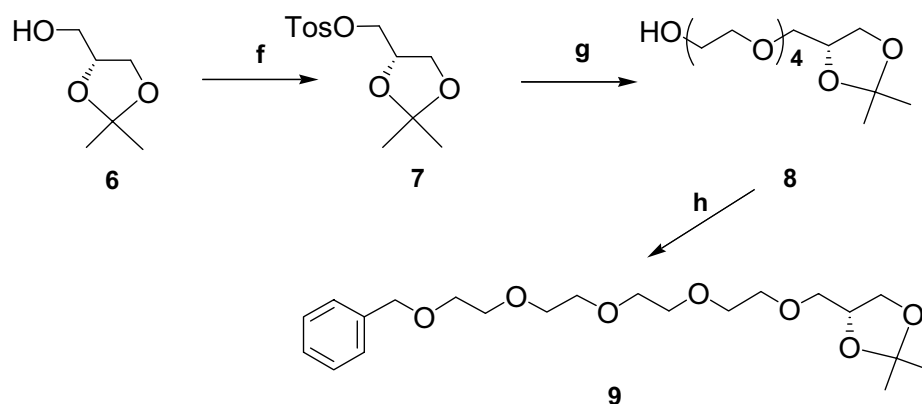


Abbildung 115 Synthese von 2,3-Isopropyliden-*D*-glycerin-1-*O*-tetraethylglykolbenzylether (**9**); f) 1 Äquiv. **6**, 1,9 Äquiv. TosCl, 3 Äquiv. Pyridin (über KOH getrocknet), Chloroform, 0 °C, 16 h, 87 %; g) 1 Äquiv. **7**, 20 Äquiv. getrocknetes TEG, 2,5 Äquiv. NaH, Dioxan (über CaH₂ getrocknet), kat. DMAP, Ar, 45-75 °C, 3 d; h) 2 Äquiv. NaH, 2,5 Äquiv. BnBr, kat. TBAI (Tetrabutylammoniumiodid), DMF, Ar, 0 → 20 °C, 2 d, 35 % (über beide Schritte g) und h))

Nachfolgende Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe mit saurem Ionenaustauscher DOWEX 50 WX8 liefert den entschützten Glycerinbaustein *D*-glycerin-1-*O*-tetraethylglykolbenzylether (**10**) mit einer Ausbeute von 89 % (Abbildung 116).

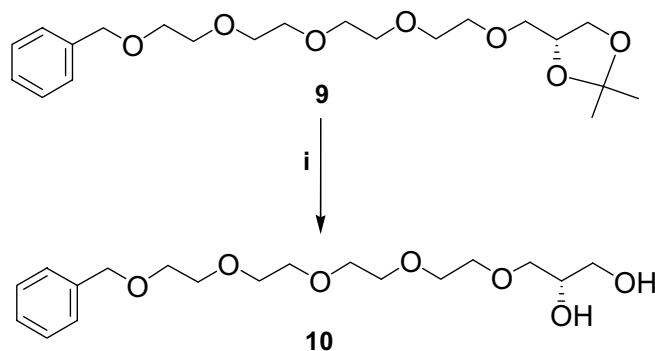


Abbildung 116 Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe; i) H₂O/THF, DOWEX 50 WX8, 50 °C, 18 h, 89 %.

Die Einführung der beiden Phytanketten erfolgt nach Deprotonierung von **10** mit NaH in DMF im doppelten Überschuß des Alkylierungsreagenz **3** (Abbildung 117). Trotz eines deutlichen Überschusses an **3** konnte die Reaktion nicht zu hohen Ausbeuten geführt werden. Auch Temperaturerhöhung veränderte die Ausbeute nicht wesentlich. Ein Vergleich mit anderen Lösungsmitteln wie DMSO und Basen, zum Beispiel KOH, wurde nicht durchgeführt. Da die Bildung von sich nicht weiter umsetzenden Monophytanyl-glycerin-1-*O*-tetraethylglykolbenzylether beobachtet werden kann vermutet werden, daß sowohl das kationische Gegenion, als auch das Lösungsmittel Einfluß auf die Substitutionsreihenfolge und damit auf die Produktverteilung nehmen.

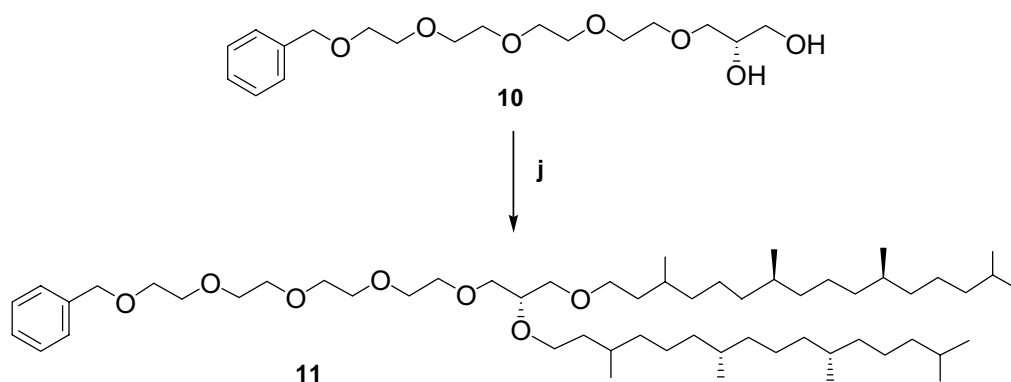


Abbildung 117 Einführung der Phytanketten: j) 1 Äquiv. **10**, 2,1 Äquiv. NaH, 4 Äquiv. **3**, DMF, Ar, Raumtemp., 4 d, 49 %.

Der erste interessante Membranbaustein wird durch hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers von Verbindung **11** erhalten (Abbildung 118). Die Länge der „Tetraethylglykol-Kopfgruppe“ liegt dabei etwas oberhalb der Länge des entsprechenden PC-Rests in DiPhyPC, wenn ein isoprenoides Acyl-PC betrachtet wird. Untersuchungen mit den im Kapitel 6 vorgestellten Lipo-Glycopolymeren (LPG) zeigen jedoch keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den beiden Verbindungen bei der lateralen Verdünnung der LPGs. Daher wird für Versuche mit Lipo-Glycopolymeren auf das kommerziell erhältlich DiPhyPC zurückgegriffen. Verbindung **12** (Abbildung 118) wird auf Grund der außergewöhnlich guten Membraneigenschaften von 2,3-Di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureester (DPTL)/Verbindung **13** ausschließlich für die Synthese von tBLM-Bausteinen mit oberflächenreaktiver Ankergruppe verwendet.

Der letzte Schritt in der DPTL-Synthese ist die Veresterung von **12** mit Liponsäure. Diese kann mit guter Ausbeute durch Aktivierung der Carboxylgruppe der Liponsäure mit einem

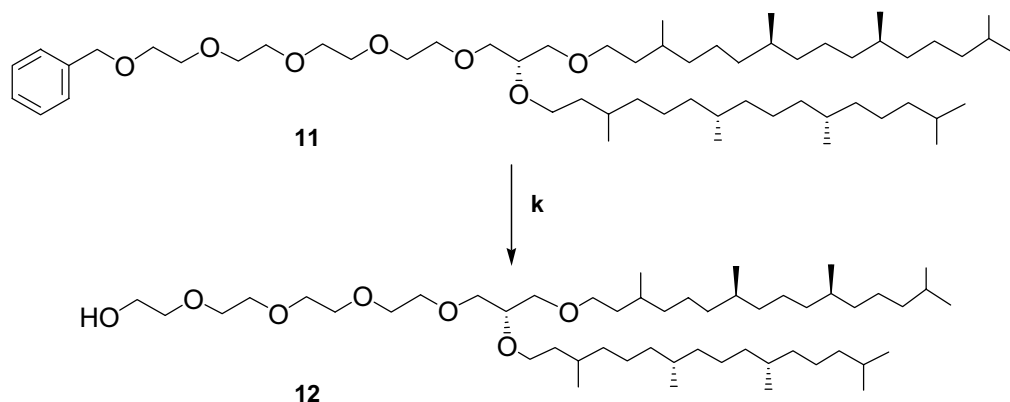


Abbildung 118 Hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers; k) THF, MeOH, H₂, 0,3 Äquiv. Pd/C, Raumtemp, 30 min quant.

Carbodiimid, erreicht werden. Die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) erlaubt es den entstehenden Harnstoff durch Extraktion zu entfernen. Bei der Verwendung von Liponsäure ist darauf zu achten, daß Liponsäure eine instabile Verbindung ist, und unter UV-Licht Einstrahlung und bei höherer Temperatur rein oder in Lösung zur Ausbildung scherlöslicher Elastomere neigt.^[1343]

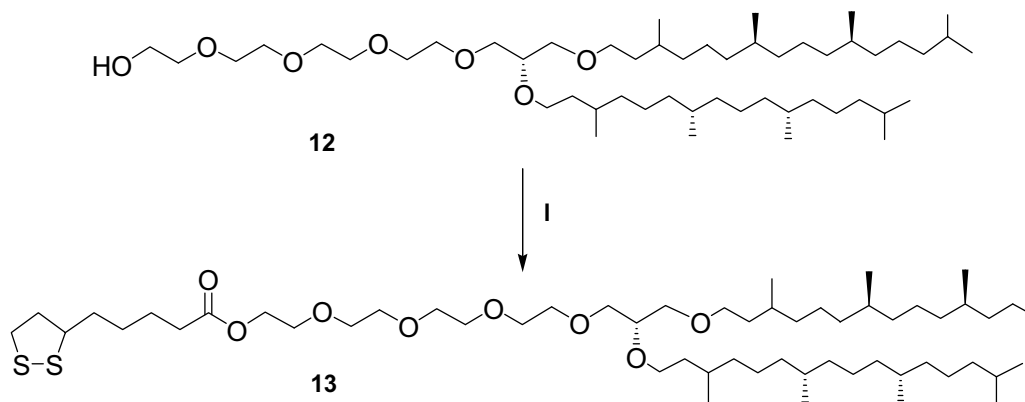


Abbildung 119 Kondensation/Veresterung von 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylglykol mit Liponsäure; l) 1 Äquiv. 12, 5 Äquiv. Liponsäure, 6,6 Äquiv. EDC, kat. DMAP, CH₂Cl₂, Ar, 1 d, 60 %

Bei der Endverbindung 2,3-Di-O-phytanyl-*sn*-glycerin-1-tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureester (**13**) konnte diese Neigung zur Ausbildung von Poly- oder Oligomeren allerdings nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zum Tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureester (TEGL), der als lateraler Spacer zur Reduktion der Lipidpackungsdichte entwickelt wurde. Synthetisch wird es aus Liponsäure und Tetraethylglykol erhalten. Die

Trennung vom im Überschuß zugesetzten TEG mittels chromatographischer Methoden führt zu signifikanten Verlusten, wenn reines Material erhalten werden soll.

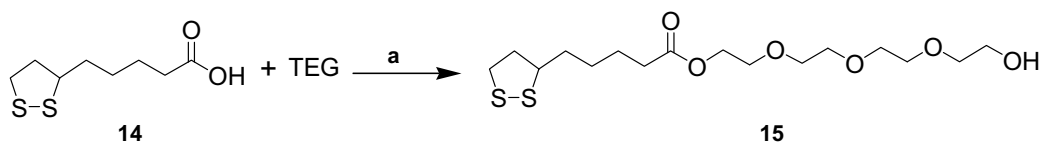


Abbildung 120 Synthese von Tetraethylglykol-D,L- α -liponsäureester (TEGL); a) 1 Äquiv. Liponsäure, 1 Äquiv- DCC (Dicyclohexylcarbodiimid), 3 Äquiv. TEG (getrocknet), 1,5 Äquiv. NaH, CH₂Cl₂, kat. DMAP, Raumtemp., 2 d, 28 %.

Die erhaltene Verbindung ist schon nach kurzer Zeit zähviskos, auch wenn sie unter Lichtausschluß und Ar gelagert wird und nur zur Substanzentnahme dem Tageslicht ausgesetzt wird. Eine massenspektroskopische Analyse der löslichen Komponenten zeigt nur das M⁺-Signal der gewünschten Verbindung **13** und keine Hinweise auf oligomere oder polymere Verbindungen.

5.3 Biomimetische Membranen basierend auf DPTL

Im folgenden wird die Präparation biomimetischer Membranen im Format der tBLM mit DPTL als distaler Lipidkomponente beschrieben. Dabei werden die einzelnen Parameter und Komponenten der tBLM, wie sie in Abbildung 110 dargestellt und in Kapitel 5.1 zusammengefaßt sind berücksichtigt. Durch nichtkovalente Assemblierung der freien Lipide der proximalen Membranhälfte zum supramolekularen Membrankomplex wird die Membran mit Hilfe grenzflächenchemischer Methoden komplettiert. Hierzu wird die Fusion von Vesikeln bevorzugt. Eine mögliche Adaption der Membraneigenschaften durch laterale Verdünnung der DPTL-Monoschicht und die Variation der Lipidzusammensetzung der proximalen Lipidschicht sind ebenfalls Gegenstand dieses Kapitels. Abschließend wird das Potential der DPTL-tBLM für den Einbau von funktionellen Membranproteinen anhand verschiedener Beispiele diskutiert.

Die Ziele, die mit dem DPTL-Motiv erreicht werden sollen, lassen sich wie folgt definieren:

- 1) Es sollen elektrisch dichte tBLMs auf Goldoberflächen präpariert werden, deren Widerstand im Bereich von mehreren M Ω liegt, bei Kapazitäten < 1 μ F

- 2) Die distale tBLM-Monoschicht soll sich aus einer Molekülspezies konstituieren lassen um einen definierten und einfach zu charakterisierenden Systemaufbau zu ermöglichen
- 3) Die Entkopplung der Membran von der Festkörperoberfläche soll 1-5 nm betragen
- 4) Die Membran soll selbstheilende Eigenschaften besitzen und das Studium von elektrisch aktiven oder potentialabhängigen Proteinen erlauben

Im ersten Schritt wird eine DPTL-Monoschicht auf möglichst homogenen Goldoberflächen assembliert. Um die resultierenden molekular dünnen Schichten und Membranen mit molekularer Auflösung charakterisieren zu können, werden die Goldoberflächen auf hochbrechendes LaSFN9-Glas aufgedampft. Da sich hierbei polykristalline Goldoberflächen bilden, werden die Träger anschließend bei 650 °C getempert um Gold (111)-Oberflächen zu erzeugen. Zur Assemblierung des DPTLs wird eine Lösung von 1mg/mL DPTL in Chloroform hergestellt und der frisch präparierte Goldträger zur Ausbildung eines dicht gepackten DPTL-SAMs für 24 h in diese Lösung eingetaucht. Das überschüssige, anhaftende DPTL wird mit Chloroform abgespült. Für andere Träger und Goldoberflächen wird die gleiche Präparationsschrittfolge durchgeführt.

In den nächsten Abschnitten werden die Experimente zur Ausbildung und Charakterisierung von DPTL-tBLMs im Hinblick auf die oben angeführten Ziele auf der Grundlage der Publikationen I-III und VIII beschrieben.

DPTL-Monoschichten zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Fluidität aus. Diese drückt sich auch in der tiefen Phasenübergangstemperatur aus die mit Hilfe der Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSC) zu < -80 °C bestimmt.

Für die effiziente Entkopplung der Lipiddoppelschicht von der Festkörperoberfläche ist die Struktur und Polarität des Spacers maßgebend. Von allen bisher in der Literatur beschriebenen polaren Spacermolekülen besitzt Polyethylenglykol (PEG), bei Kettenlängen unter 11 Repetiereinheiten auch als OEG bezeichnet, die günstigsten Eigenschaften. PEG besitzt gegenüber anderen Polyethern/Polyalkyloxiden wie Polymethylenoxid und Polypropylenoxid die größte Hydrophilie. Polymethylenoxid und Polypropylenoxid sind sogar als hydrophob zu bezeichnen, da sie nicht in Wasser löslich sind. Die gute Wasserlöslichkeit hängt mit der guten Hydratisierbarkeit des Ethersauerstoffs und dessen Orientierung bzw. strukturellen Präsentation

zusammen, die augenscheinlich nur beim PEG auftritt. Die Sauerstoffabstände innerhalb der PEG-Kette lassen sich gut in die tetraedrische Wassergitterstruktur einbauen, so daß eine gute strukturelle Übereinstimmung zwischen der Anordnung der Wassermoleküle und des Polymers besteht.^[1344] XPS-Messungen zeigten Sauerstoff-Sauerstoff-Abstände zwischen Nachbarmolekülen von 2,85 Å, die direkt mit dem Sauerstoff-Sauerstoff-Abstand einer PEG-Kette innerhalb einer cis-Anordnung korrelieren.^[1345] Die strukturelle/konformatorische Variabilität der PEG-Kette erlaubt darüber hinaus eine genügende Variabilität der Ethersauerstoffabstände, um deren "Einbau" in die Wasserstruktur anstelle von Wassersauerstoffatomen auch zwischen den nächst näheren Nachbarn zu erlauben. *Ab initio* Rechnungen zeigen, daß PEG in helikaler Konformation gegenüber Wasser amphiphiles Verhalten zeigt, PEG in der all-trans Konformation dagegen nicht.^[1346] Die Löslichkeit von Verbindungen in Wasser wird also stark von der Geometrie der Verbindung bestimmt. Dadurch ist es möglich auch hydrophobe Stoffe vergleichsweise gut in Wasser zu lösen, wenn sie elektronegative Atome enthalten die in der Lage sind mit dem Wasserstoffbrückennetzwerk assoziative Wechselwirkungen einzugehen.^[1347]

Die Bestimmung der Struktur der DPTL-Monoschicht erfolgt mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie unter RAIRS-Bedingungen (Reflection Absorption IR Spectroscopy) mit p-polarisiertem Licht bei einem Einfallswinkel von 85 °.

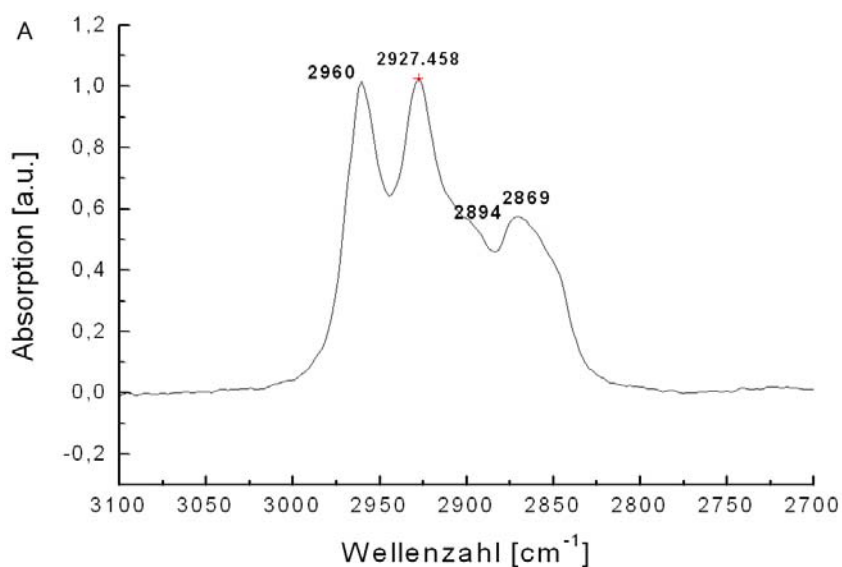


Abbildung 121 RAIRS DPTL-Spektrum im Bereich von 2700-3100 cm⁻¹ gemessen in trockener Luft

Die beobachteten Signale sind in Abbildung 121 und Abbildung 122 dargestellt. Die Signale zwischen 2800-3000 cm⁻¹ gehören zu den C-H-Steckschwingungen der Phytanketten,^[1348] werden aber durch die überlappenden C-H-Streckschwingungen des Oligoethylglykol-

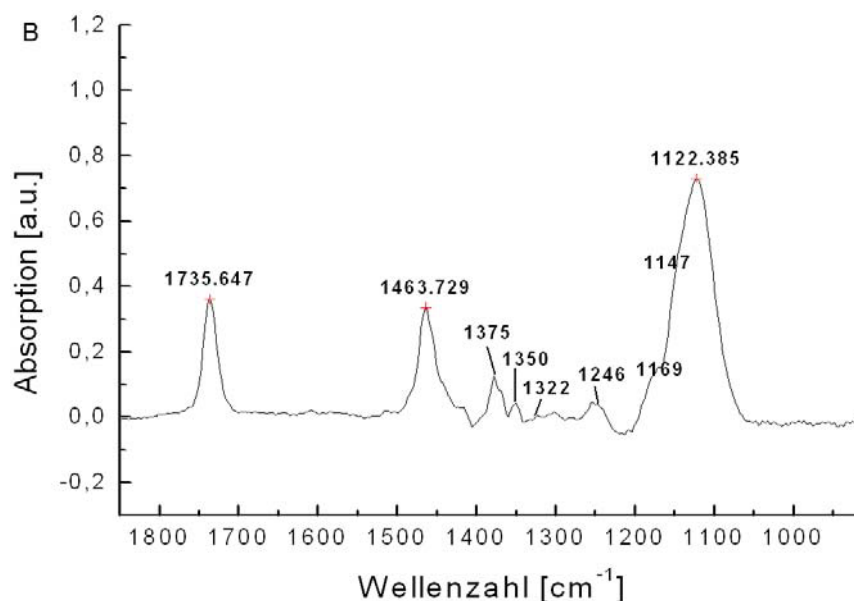


Abbildung 122 RAIRS DPTL-Spektrum im Bereich von 900-1800 cm⁻¹ gemessen in trockener Luft

Segments kompliziert. Kristallines OEG wird durch die Schulter bei 2894 cm⁻¹ repräsentiert. Bei 1735 cm⁻¹ wird das Signal der senkrecht zur Oberfläche orientierten C=O-Streckschwingung der Esterbindung beobachtet. Detailliertere Informationen über die Struktur der OEG-Spacer-Komponente können aus dem Wellenzahlbereich zwischen 950-1500 cm⁻¹ abgeleitet werden (Abbildung 122). Ein Vergleich mit literaturbekannten RAIRS und IRSE (Infrared Spectroscopic Ellipsometry) Daten macht die signifikanten Unterschiede den OEGs deutlich und zeigt, daß PEG-Segmente mit Kettenlängen von 5, 6 und 7 Ethylglykoleinheiten einen hohen Grad an Ordnung aufweisen.^[1091, 1346, 1349] Ein Maximum wird hierbei für das Hexaethylglykol erreicht.^[1091, 1349] Ordnung bedeutet in diesem Zusammenhang die Ausbildung einer 7/2 Helix, die Charakteristische Signale bei 966, 1116, 1243, 1345 und 1460 cm⁻¹ liefert. Das Octamer auf der anderen Seite zeigt ein Verhalten, das auf eine Mischung von helikaler und unstrukturierter Konformationen schließen läßt. Was sich unter anderem durch eine Schulter bei 1130 cm⁻¹ ausdrückt.

Die Signale für das Tetraethylglykolderivat zeigten in der eben genannten Veröffentlichung Anzeichen ungeordneter Konformationen durch eine starke Bande bei 1143 cm⁻¹ die der (C-O-C)-Streckschwingung zugeordnet werden kann. Ein Vergleich mit den RAIRS-Banden der DPTL-Monoschicht in Abbildung 122 läßt das Vorhandensein helikaler Komponenten erwarten. Allerdings gibt es signifikante Abweichungen. So fehlt beispielsweise die Bande bei 966 cm⁻¹. Starke Banden treten bei 1122 cm⁻¹ mit Schultern bei 1147 und 1169 cm⁻¹, als auch bei 1463 cm⁻¹ auf. Diese sind im Gegensatz zu den anderen OEGs zu höheren Wellenzahlen

verschoben. Die Bande bei 1122 cm^{-1} paßt perfekt in die Serie der Spektren der 1-Thiooligoethylglykole.^[1091] Diese beginnt bei 1116 cm^{-1} für das Heptamer, 1118 cm^{-1} für das Hexamer, 1120 cm^{-1} für das Pentamer und die hier gefundenen 1122 cm^{-1} für das Tetramer des DPTL. Allen vorangegangenen OEGs wird eine überwiegend helikale Struktur zugeschrieben. Damit ist auch für das Tetramer im DPTL von einer zumindest teilweisen helikalen Struktur auszugehen. Es ist beschrieben, Tetraethylglykol (TETET) eine „all-trans“-Konformation einnimmt,^[1091] die zu einer maximalen Streckung der Spacerkette mit maximaler Entkopplung der Membran von der Oberfläche führen würde. Allerdings führt die „all-trans“-Konformation zu einer planaren Struktur die im Gegensatz zur helikalen Konformation weniger stark von Wasser benetzt wird.

Schichtdickenmessungen mittels SPS an Luft und in 0,1 M NaCl sollen zusätzliche Hinweise auf die Struktur liefern. Die Auswertung der SPS-Daten ergibt eine DPTL-Schichtdicke an Luft zwischen 2,9 und 3,6 nm die in wäßriger 0,1 M NaCl-Lösung auf 4,5 bis 5,1 nm ansteigt. Die theoretische Schichtdicke beträgt einen SAM-Neigungswinkel von 30° etwa 4,2 nm.

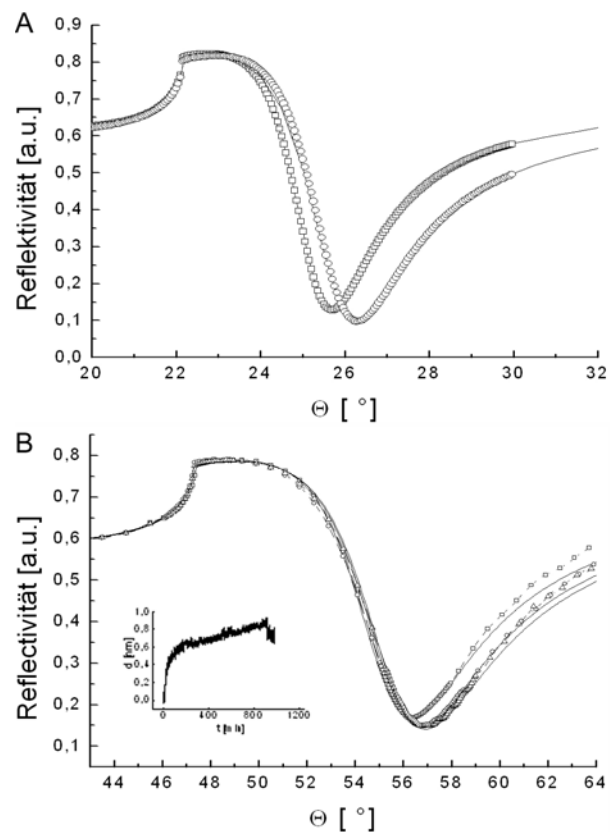


Abbildung 123 Oberflächenplasmonenresonanzspektren: A) reiner Goldträger (\square), Goldträger mit DPTL-SAM (\circ) beide gegen Luft, B) reiner Goldträger (\square), Goldträger mit DPTL-SAM vor dem Kontakt mit 0,1 M NaCl (\circ) und nach Quellung (\triangle), eingefügter Graph: Kinetik des Quellvorgangs.

Bei maximaler Streckung des Moleküls liegt dessen Gesamtlänge bei 4,7-4,8 nm. Abweichungen der Schichtdicken lassen sich durch die Einnahme verschiedener Konformationen erklären. Die im Gegensatz zur DPTL-Schicht in wässriger Umgebung reduzierte Schichtdicke paßt zu der auf Grund der IR-Daten vermuteten gestörten helikalen Struktur. Da diese als Nukleationskeim für Wasser dient^[1346] kann die DPTL-Monoschicht Wasser aufnehmen was zu Konformationsänderungen führt. Da unter diesen Bedingungen die gestreckte Konformation mit theoretisch maximaler Schichtdicke erreicht wird ist davon auszugehen, daß die helikalen Konformationselemente verringert werden und eine mit der „all-trans“-Konformation vergleichbare Struktur eingenommen wird. Da diese nicht gut von Wasser solvatisiert wird, kann die Wasserkonzentration in der gestreckten Schicht abnehmen. Diese Möglichkeit wird durch bisher nicht veröffentlichte Neutronenreflektometrie- und XPS-Daten gestützt die keine signifikanten Wasserkonzentrationen im Spacerbereich zeigen.

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse vor den eigentlichen Experimenten zum Membranaufbau die laterale Dichte des DPTLs auf der Goldoberfläche zu bestimmen. LB-Experimente zeigen, daß die DPGT (DPTL ohne Liponsäure) im festanalogen Zustand eine Fläche von 65 \AA^2 einnimmt. Die Packungsdichte auf der Goldoberfläche wird mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Die Integration des Peaks der reduktiven Desorption (Abbildung 124) liefert eine Fläche von 51 \AA^2 , die geometrisch nicht möglich ist.

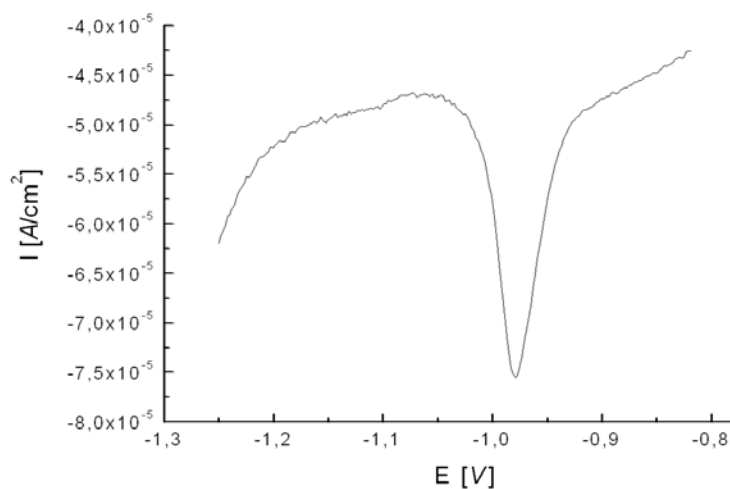


Abbildung 124 Reduktive Desorption von DPTL durch cyclische Voltammetrie des SAMs auf einer templatabgeformten Goldschicht (TSG) in 0,5 m KOH zwischen 0,1 und -1,25 V gegen eine Ag|AgCl|NaCl(sat.) Referenzelektrode bei einer Scanrate von 20 mV/s.

In Zusammenarbeit mit J. Kunze und J. Lipkowski wird dieser Effekt in Publikation VIII näher untersucht. Es kann gezeigt werden, daß die Ladungszahl und damit die ermittelte molekulare

Fläche potentialabhängig ist. Daher wird bei der Auswertung der reduktiven Desorption ein Fehler gemacht, wenn von einer konstanten, für die Desorption notwendigen Ladung von -2 für ein DPTL-Molekül ausgegangen wird. Zur Bestimmung der für die Desorption notwendigen Ladung wird eine Vielzahl von Experimenten mit Ausbildung der DPTLSchicht durch SAM-Bildung und LB-Transfer zur genauen Bestimmung der Belegungsdichte durchgeführt.

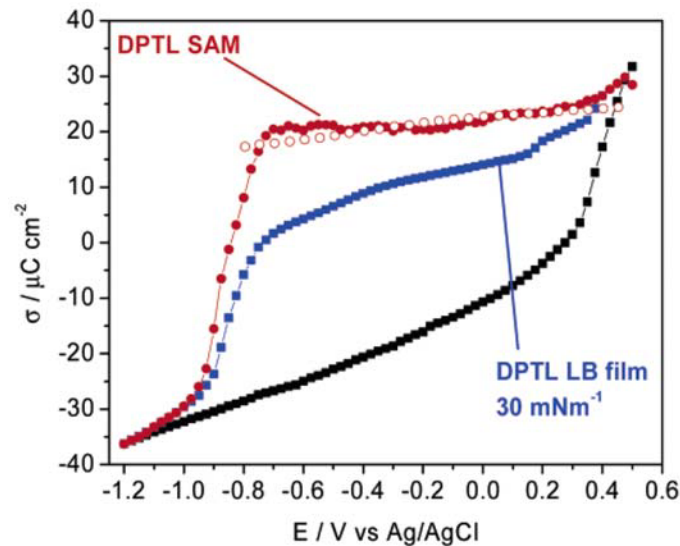


Abbildung 125 Ladungsdichten σ_M aufgetragen gegen das Potential auf einer Au (111)-Elektrode. Die untere Kurve (■) zeigt den Verlauf der Ladungsdichte auf der Goldoberfläche ohne DPTL in 0,1 M NaF. (●),(○) DPTL-SAM unterschiedliche Zyklen, (■) DPTL-LB-Film

Die Bestimmung der Ladungsdichte in Abbildung 125 zeigt deutliche Unterschiede zwischen der DPTL-Monoschicht die unter Standard-Assemblierungsmethoden gebildet wird (DPTL-SAM) und der DPTL-Schicht, die durch LB-Übertrag gebildet wird (DPTL-LB-Film). Die Kurven werden durch Chronocoulometrieexperimente erhalten. Zur Bestimmung der absoluten Ladungsdichten wird nur ein einziger Potentialschritt von $E = -0,8$ V bis $-1,2$ V durchgeführt. Dieses Experiment ist durch die roten, offenen Kreise dargestellt. Im Gegensatz dazu zeigt der durch die roten Kreise dargestellt Kurvenverlauf die konsekutive Desorption/Readsorption des Films. Die kleinen Unterschiede zwischen beiden Kurven zeigen, daß mehrfache Desorption/Readsorption.Zyklen sich nicht auf die Integrität des Films auswirken. Die schon erwähnten Unterschiede zwischen DPTL-SAM und DPTL-LB-Film lassen sich auf die unterschiedliche Packungsdichte der DPTL-Schichten zurückführen. Alle drei Kurven laufen bei vollständiger Desorption des DPTLs zusammen. Das Plateau der DPTL-SAM Kurve im Bereich zwischen -700 und $+400$ mV in Abbildung 125 weist auf eine sehr kleine Kapazität des Films hin. Die Fläche zwischen der Ladungsdichtekurve der DPTL-Schichten und der

reinen Goldoberfläche gegen den Elektrolyten korrespondiert mit dem Oberflächendruck des adsorbierten Films gemäß der Gleichung 102:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma = \int_{E=-1200}^E \sigma_M dE - \int_{E=-1200}^E \sigma_{M_0} dE = \int_{E=-1200}^E \Delta\sigma_M dE$$

Gleichung 102

γ_0 und γ sind dabei die Oberflächenenergien und σ_M und σ_{M_0} die Ladungsdichten in der Abwesenheit und Gegenwart der DPTL-Monoschichten auf der Festkörperoberfläche und $\Delta\sigma_M = \sigma_M - \sigma_{M_0}$. Der Oberflächendruck ist in gegen die Potentialkurven der SAMs und LB-Filme aufgetragen, wie in Abbildung 126 gezeigt. Der annähernd glockenförmige Verlauf wird mit einem Maximum bei 0,5 V beobachtet. Dieses Potential entspricht der maximalen Adsorption von DPTL auf der Au (111)-Elektrodenoberfläche (E_{\max}). Der Oberflächendruck zeigt bei maximaler Adsorption E_{\max} signifikante Unterschiede zwischen dem durch spontane Selbstanordnung gebildeten DPTL-SAM und der durch LB-Übertrag präparierten DPTL-Monoschicht. Letztere wurde unterhalb des Kollapspunktes (≈ 34 mN/m) bei 30 mN/m und einer molekulare Fläche von etwa 112 \AA^2 übertragen. Diese Fläche ist größer als die erwartete Minimalfläche pro DPTL-Molekül. Der höchste Oberflächendruck kann für den DPTL-SAM mit $\Pi = 467$ mN/m berechnet werden. Der DPTL-LB-Film zeigt einen weitaus niedrigeren maximalen Wert von $\Pi = 327$ mN/m.

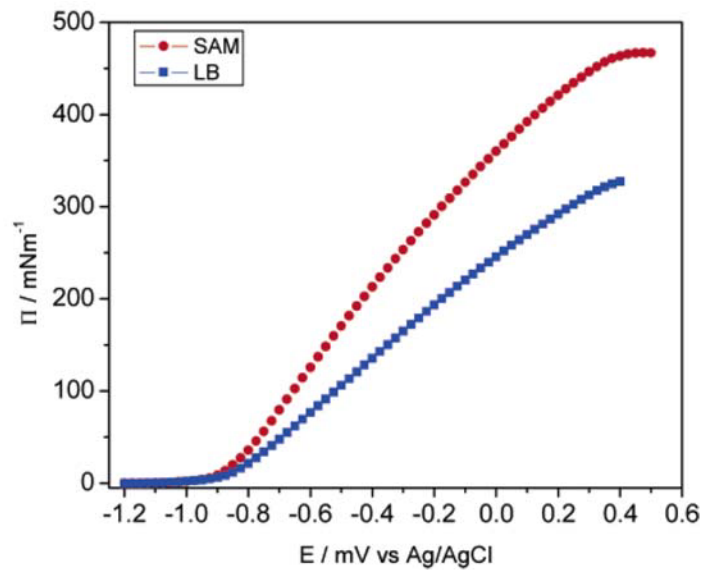


Abbildung 126 Oberflächendruck Π aufgetragen gegen das Potential E , berechnet von den Ladungsdichtekurven. (●) DPTL-SAM, (■) DPTL-LB-Film.

Der maximale Oberflächendruck ist damit eine Größenordnung größer als der maximale Filmdruck von DPTL an der Wasser-Luft-Grenzfläche, der bei $\Pi \approx 34$ mN/m bei einer Fläche von 100 \AA^2 liegt. Die Differenz zwischen dem Oberflächen/Filmdruck and der Gold-Lösungsgrenzfläche und der Wasser-Luftgrenzfläche beruht auf der Ausbildung einer starken Gold-Thiol Chemisorption.

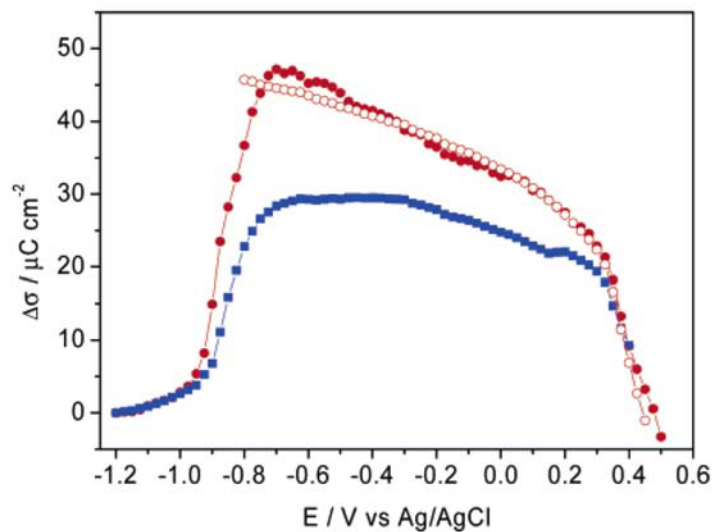


Abbildung 127 Auftragung der Ladungsdichtedifferenz gegen das Potential. (■) zeigt den Verlauf der Ladungsdichte auf der Goldoberfläche ohne DPTL in 0,1 M NaF. (●),(○) DPTL-SAM unterschiedliche Zyklen, (■) DPTL-LB-Film

Bildet man die Differenz der beiden DPTL-Kurven mit der DPTL-freien Referenzkurven in Abbildung 125, erhält man den in Abbildung 127 dargestellten Kurvenverlauf. Diese Kurve zeigt eine Änderung der Ladungsdichte durch die Adsorption der DPTL-Moleküle. Das positive Vorzeichen zeigt einen positiven Ladungsfluß zur Elektrode an, während DPTL an die Goldoberfläche chemisorbiert.

$$l = -\frac{1}{F} \left(\frac{\Delta\sigma}{\Delta\Gamma} \right)_E = -\frac{1}{\Gamma} \left(\frac{\partial\Pi}{\partial E} \right)_\Gamma$$

Gleichung 103

Ist die Packungsdichte bekannt, kann Ladungszahl pro adsorbierten DPTL-Molekül mit Hilfe von Gleichung 103 berechnet werden. Es ist hilfreich festzustellen, daß l die integrale Form der Ladungszahl bei konstantem Elektrodenpotential darstellt und auch als „Elektrosorptions-

Valenz“ bezeichnet wird. Die mit Hilfe von Gleichung 103 berechneten Ladungszahlen werden gegen das Potential aufgetragen und ergeben die in Abbildung 128 dargestellten Graphen.

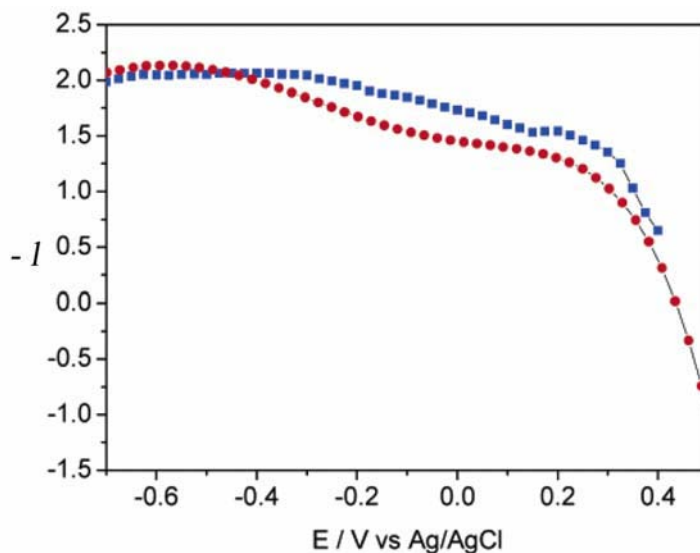


Abbildung 128 Ladungszahl pro adsorbierten Molekül für den (■) DPTL-LB-Film und berechnete Datenpunkte für den (●) DPTL-SAM

Die Berechnungen sind auf $E > -0,7$ V beschränkt wo angenommen werden kann, daß alle DPTL-Moleküle die mit der LB-Methode übertragen wurden an der Oberfläche verbleiben. Es zeigt sich, daß die Ladungszahl stark vom Potential abhängt. Innerhalb eines kleinen Potentialbereichs zwischen $-0,7$ V und $-0,3$ V ist die Ladungszahl gleich -2 . Für Potentiale größer als $-0,3$ V nimmt der absolute Wert der Ladungszahl aber signifikant ab. Extrapoliert man die Daten ergibt sich für $l=0$ bei $E \sim 0,5$ V. Die in Publikation VIII detailliert beschriebenen quantitativen Modellrechnungen zeigen eindeutig, daß obwohl in der Tat zwei Elektronen zum DPTL fließen, um es zu desorbieren, die tatsächlich gemessene Ladungszahl pro Molekül kleiner als zwei werden kann. Als erklärende Zusammenfassung kann festgestellt werden, daß der Grund für dieses unerwartete Verhalten auf einer weiteren Triebkraft beruht, die zur Desorption beiträgt. Diese zusätzliche Triebkraft ist die Arbeit, die gegen die durch den Kondensator gespeicherte Energie aufgewendet wird. Ist die Elektrode mit einem SAM bedeckt, ist im Gegensatz zur wasserbedeckten Goldelektrode weniger Energie gespeichert. Dieser Verlust an Wechselwirkungsenergie favorisiert den Austausch des SAMs gegen Wasser. Konsequenterweise wird die zur Desorption notwendige Energie geringer als die für den Redoxprozess notwendige Energie und die effektive Ladungszahl wird kleiner als die Zahl der Elektronen die an der Redoxreaktion teilnehmen, die im Falle von DPTL 2 beträgt.

Vorausgesetzt, daß die Ladungszahl für den DPTL-SAM gleich der Ladungszahl für den DPTL-LB-Film ist, kann mit Hilfe der l -Werte von Abbildung 128 und der $\Delta\sigma_M$ Werte aus Abbildung 127 die Packungsdichte berechnet werden, die mit der molekularen Fläche korreliert. Es ergibt sich eine Fläche von 85 \AA^2 mit einer Ungenauigkeit von 9 \AA^2 die durch die Ungenauigkeit der LB-Kalibrierung der Flächen-Ladungsbeziehung bedingt ist. Die so bestimmte Fläche liegt etwa 20 % über der van der Waals-Fläche, ein physikalische sinnvolles Ergebnis. DPTL-SAM und LB-Filme können daher als relativ gut gepackt betrachtet werden.

Kontaktwinkel sind eine weitere Meßgröße, die qualitative Aussagen über die Packung und Oberflächenrauigkeit der DPTL-Monoschichten erlaubt. Es kann eine Abhängigkeit vom Goldkristallgitter/Oberflächenmorphologie und der Präparationsmethode festgestellt werden. Polykristallines Gold, wie es durch das Aufdampfen eines Goldfilms ohne tempern erhalten wird, liefert schwankende Werte! Dies ist auf die schwankende Zusammensetzung der beim Aufdampfprozess gebildeten Kristallgittertypen zurückzuführen.

DPTL-SAMs werden unter Standardbedingungen (1 mg/mL DPTL in Chloroform, 24 h Assemblierungsdauer) auf den unterschiedlichen Goldgittertypen präpariert.

Ein DPTL-SAM besitzt auf polykristallinem Gold einen Kontaktwinkel von 103° während die gleichen Assemblierungsbedingungen auf templatageformtem Gold (TSG) zu einem Kontaktwinkel von 110° führen. Deutlich geringer ist der Kontaktwinkel für DPTL-Filme die durch LB-Übertrag auf TSG-Trägern präpariert werden. Sie weisen einen niedrigeren Kontaktwinkel von 98° auf. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß DPTL-LB-Filme die geringste Packungsdichte aufweisen. Der Unterschied zwischen den beiden durch Assemblierung aus homogener Lösung präparierten DPTL-SAMs auf Gold (111) und TSG-Gold wird dagegen am besten durch die unterschiedliche Oberflächenmorphologie verbunden mit den unterschiedlichen energetischen Eigenschaften der Goldkristallgitter (siehe Kapitel 3.2.3.1 und 3.2.3.2) und der damit verbundenen Packung und Orientierung des SAMs erklärt.

Die elektrischen Eigenschaften der DPTL-Mono und Doppelschichten werden unter anderem durch das molekulare Profil der sie unterstützenden Oberflächen bestimmt.

Wie oben gezeigt führt eine Assemblierung von DPTL aus Chloroform nach 24 h zu einer dicht gepackten DPTL-Monoschicht. Erste Untersuchungen mit Au (111) Oberflächen zeigen nach Vesikelfusion Lipiddoppelschichtwiderstände im $M\Omega$ -Bereich und Kapazitäten $< 1 \mu\text{F}$. Allerdings können diese Werte nur bei weniger als 7 % der präparierten tBLMs erreicht werden. Da keine chemische Änderung der DPTL-Lösung festgestellt wird, und die Vesikelbildung und Fusion standardisiert ist, müssen andere Faktoren die Qualität des DPTL-SAMs mitbestimmen. Neben den erwähnten Faktoren wird nachfolgend die Analyse der

Goldträger vorgestellt, deren Oberflächeneigenschaften, eventuell großen Einfluß auf die tBLM-Qualität besitzen.

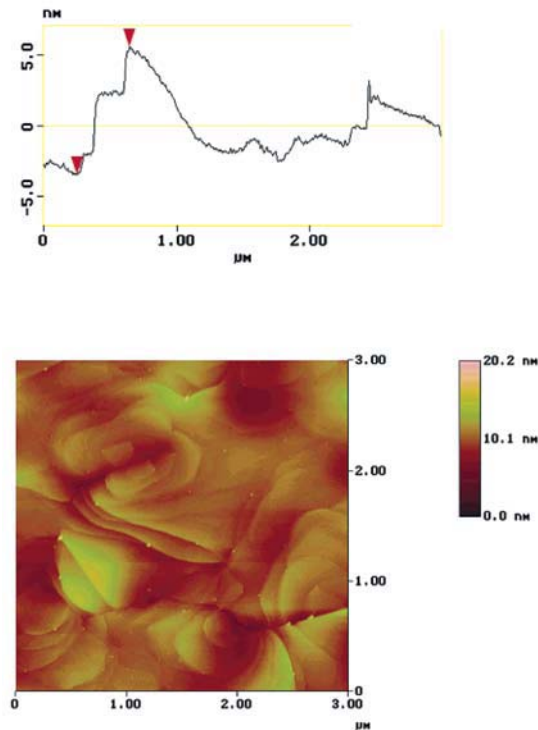


Abbildung 129 AFM-Untersuchung einer Gold (111)-Oberfläche; frisch gespaltener Glimmer (Mica) wird mit Gold bedampft und bei 650 °C getempert. Neben Oberflächenrauigkeiten von mehr als 5 nm mit steilen Stufen in molekularen Dimensionen werden beobachtet.

Um die Oberflächeneigenschaften der goldbedampften LaSFN9 Träger zu verstehen, werden die Oberflächen mit Hilfe des AFMs untersucht. Die Oberflächenanalyse der in den ersten Experimenten verwendeten Gold (111)-Oberflächen zeigt Oberflächenrauigkeiten von mehr als 5 nm mit steilen Stufen im Bereich molekularer Dimensionen (Abbildung 129).

Der Einfluß der Oberflächengeometrie/Rauigkeit der Goldoberflächen ist in Abbildung 130 gezeigt. Es wird deutlich, daß aufgedampft polykristallines Gold und das aus diesem präparierte Gold (111) eine Oberflächenrauigkeit von mehreren Nanometern aufweisen.

Die im Maßstab wiedergegebenen DPTL-Moleküle zeigen, daß es unter diesen Bedingungen an molekular steilen Kanten nicht zur Ausbildung dichter Monoschichten kommen kann, da die molekularen Dimensionen des DPTL dies nicht erlauben. Auch starke konformatorische Strukturänderungen vermögen dies nicht zu kompensieren. Da, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, wenige geringe Defekte ausreichen um die hochohmigen Eigenschaften der Membran zu annullieren, ist die hohe Quote schlechter DPTL-Präparationen auf Gold (111)-Trägern verständlich.

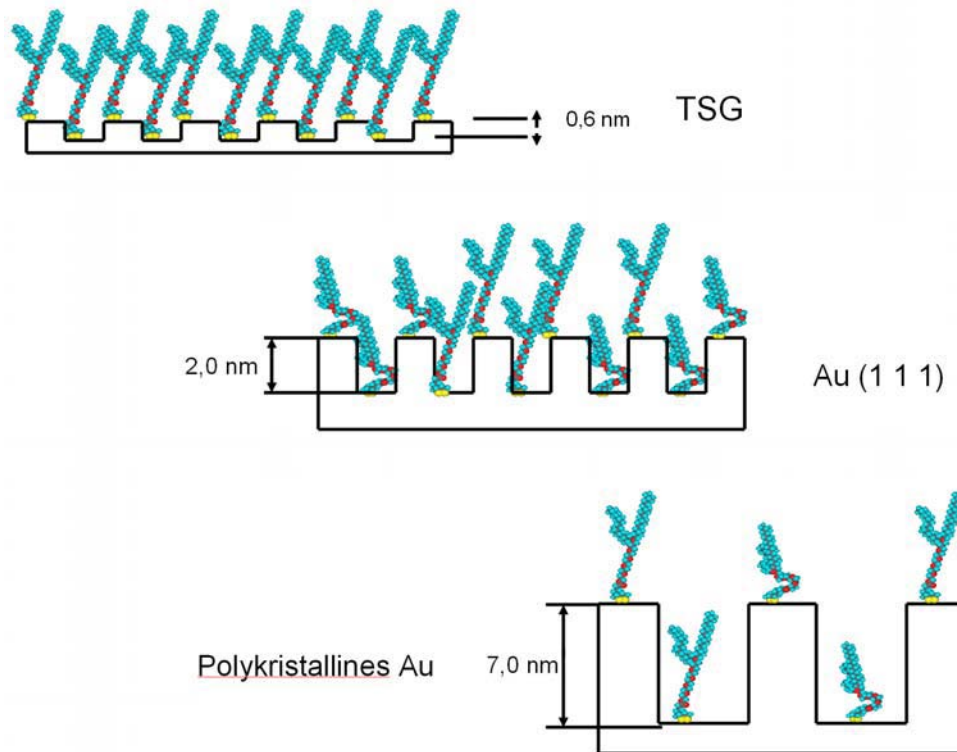


Abbildung 130 Schema zur Verdeutlichung des Einflusses der Oberflächenrauigkeit von Goldoberflächen auf die hydrophobe Wechselwirkung der oberflächengebundenen DPTL-SAMs an steilen Stufen.

Die gelegentlich auftretenden hochhohmigen Eigenschaften lassen sich durch große, flache Terrassen gekoppelt mit einer geringen Stufenhöhe zwischen den Terrassen erklären (mittlerer Bereich des Gold (111)-Profils in Abbildung 129).

Aus Abbildung 130 läßt sich ableiten, daß die Oberflächenrauigkeit deutlich unter 2 nm (der Spacerlänge) liegen muß, um reproduzierbare Resultate bei der Präparation hochhohmiger DPTL-Membranen zu erzielen. Die Präparation von sogenanntem templatabgeformten Gold mit Hilfe molekular glatter Templatoberflächen, stellt eine interessante Methode zur Präparation ultraglatte Goldoberflächen dar. Hierzu wird Gold auf molekular glatte Substrate, zum Beispiel frisch gespaltener Glimmer oder poliertes Silizium, mit Oberflächenrauigkeiten von etwa 0,5 nm aufgedampft. Nachfolgend werden diese mit der frisch aufgedampften Goldoberfläche mittels eines optischen Klebers der dem Brechungsindex des für die SPS notwendigen hochbrechenden LaSFN9-Glases entspricht, aufgeklebt. Der Siliziumträger oder das Glimmer-Substrat werden dann nach kurzem Quellen in THF vorsichtig entfernt. Zurück bleibt die von der Templatoberfläche abgebildete ultraglatte Goldoberfläche (AFM - Abbildung 131).

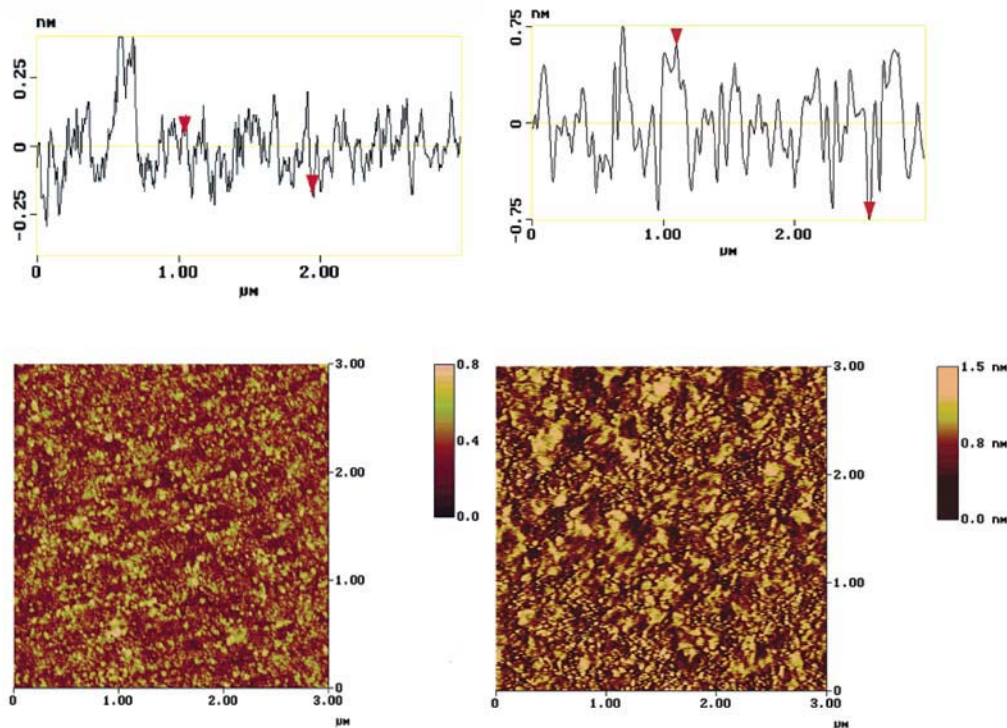


Abbildung 131 Templatabgeformtes Gold (TSG) mit Glimmer als Templat (links) und poliertes Silizium als Templat (rechts)

Der Prozess der TSG (*engl. template stripped gold*)-Trägerpräparation liefert Goldoberflächen mit Rauigkeiten die den geforderten Ansprüchen genügen. Es werden Oberflächenrauigkeiten im Subnanometerbereich erzielt. Die resultierenden DPTL-SAMs und tBLMs weisen hervorragende elektrische Eigenschaften auf und lassen sich in dieser Qualität durch die Verwendung von TSG-Trägern mit hoher Zuverlässigkeit präparieren.

Die Oberflächenrauigkeit einer Silizium-abgeformten TSG-Schicht mit DPTL-SAM ist in mit der reinen Oberfläche vergleichbar. Die Oberflächenrauigkeit steigt auch nach der Bildung des DPTL-SAMs kaum an und zeigt den Aufbau molekular glatter SAM-Oberflächen.

Bevor jedoch auf spezielle Beispiele eingegangen präsentiert werden, wird der Einfluß des Vesikeldurchmessers auf die Fusion an Hand von Quartzkristall-Mikrowaage (QCM-D)-Messungen analysiert.

Der Vesikeldurchmesser hat einen wichtigen Einfluß auf die Eigenschaften des Vesikel. Mit kleiner werdendem Durchmesser nimmt die Krümmung der Membranoberfläche und damit die Spannung des Vesikels zu. Die daraus resultierenden Unterschiede der für die Lipidkopf- und Schwanzgruppe zur Verfügung stehenden Fläche sind in Kapitel 3 an verschiedenen Stellen beschrieben.

Das Potential der QCM-D Messungen liegt darin, daß durch die simultane Bestimmung der Frequenzverschiebung und der Energiedissipation des SAM-modifizierten Quarzkristalls nach erfolgter Vesikelfusion Aussagen bezüglich der Schichtdickenänderung und der viskoelastischen und rheologischen Eigenschaften des Films möglich sind. Gerade die viskoelastischen und rheologischen Eigenschaften erlauben es zwischen fusionierten und adhäsiv gebundenen Vesikeln zu unterscheiden.^[689] Die Änderung der Frequenz des Quarzes liefert den Massenzuwachs der unter Anwendung der Sauerbrey-Gleichung die Berechnung der Schichtdicke (siehe Kapitel 4.5) erlaubt.

Abbildung 131 zeigt den zeitlichen Verlauf der Vesikelfusion mit DPhyPC-Vesikeln mit einem Durchmesser von 200 nm auf einem TSG-gestützten DPTL-SAM. Der obere Kurvenverlauf gibt die Änderung der Halbwertsbandbreite und damit die Energiedissipation wider. Im unteren Bereich ist die Frequenzverschiebung des Quarzkristalls vor und nach der Vesikelfusion dargestellt. Die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung liefert eine Schichtdickenänderung von 33 nm. Im Gegensatz zum erwarteten Schichtdickenzuwachs von etwa 3 nm liegt dieser Wert um einen Faktor 10 zu hoch. Zusammen mit der Analyse der Energiedissipation mit einer Bandbreite von 379 Hz entspricht dies den viskoelastischen Eigenschaften von physisorbierten Vesikeln^[1350]. Eine vollständige Fusion dieser DPhyPC-Vesikel findet nicht statt.

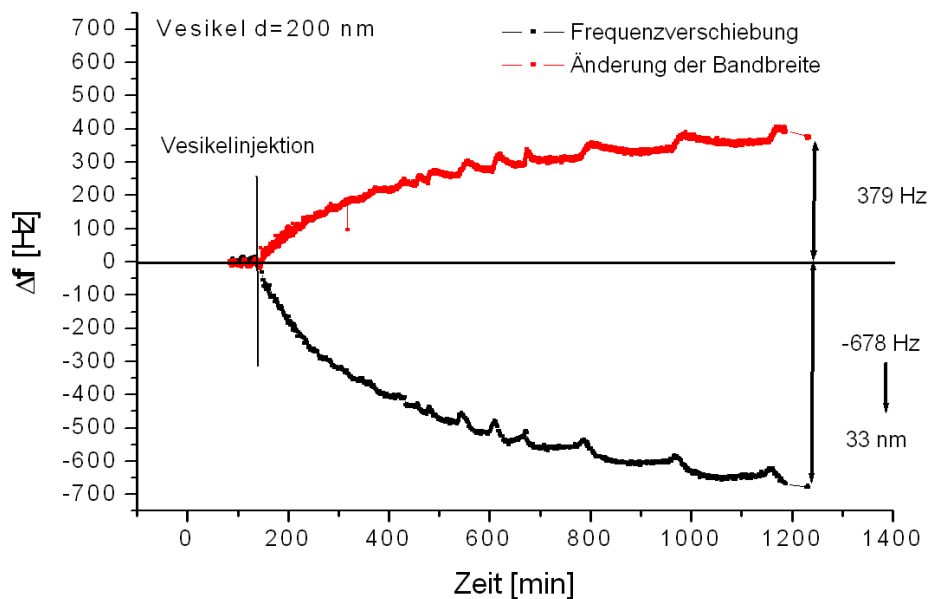


Abbildung 132 QCM-D Messungen zur Analyse der Schichtdickenänderung und Energiedissipation während der Fusion von $d=200$ nm DPhyPC-Vesikeln auf DPTL-SAMs. Obere rote Kurve – Energiedissipation; untere schwarze Kurve – Frequenzverschiebung durch den Massenzuwachs während der Vesikelfusion.

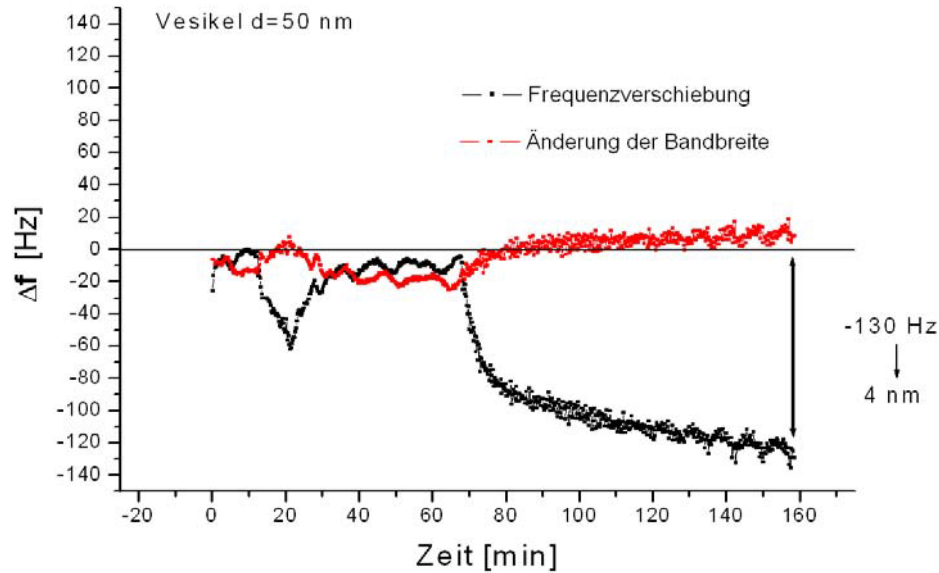


Abbildung 133 QCM-D Messungen zur Analyse des Schichtdickenänderung und Energiedissipation während der Fusion von $d=50$ nm DPhyPC-Vesikeln auf DPTL-SAMs. Obere rote Kurve – Energiedissipation; untere schwarze Kurve – Frequenzverschiebung durch den Massenzuwachs während der Vesikelfusion.

Im nächsten Experiment werden DPhyPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet. Deren Lipide sind auf Grund der geometrischen Verhältnisse unter einer weitaus höheren Spannung als Vesikel mit $d=200$. Es ist daher anzunehmen, daß deren Fusion effektiver verläuft. Abbildung 133 bestätigt diese Annahme. Die Frequenzverschiebung von 130 Hz entspricht einer Schichtdickenänderung von ca. 3 nm. Dieser Wert stimmt mit dem via SPS beobachteten Schichtdickenzuwachs von etwa 3,5 nm gut überein (Abbildung 134).

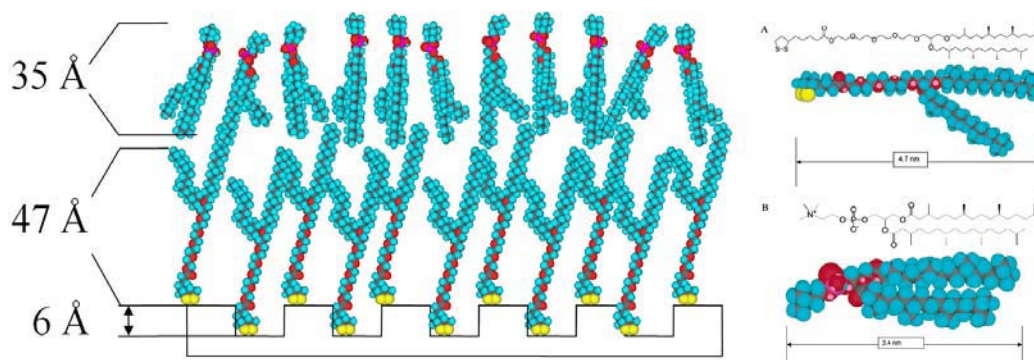


Abbildung 134 Geometrische Verhältnisse und Schichtdicken von DPTL-tBLMs

Wie in der Literatur beschrieben^[1350] ist die Energiedissipation für vollständig fusionierte Vesikel und der damit einhergehenden Ausbildung von physikalisch stark mit der Oberfläche gekoppelten Lipiddoppelschichten minimal. Die bei der Physisorption der Vesikel in

Abbildung 132 beobachtete starke Änderung der Halbwertbandbreite beruht auf den sehr viskoelastischen Vesikeln und der schwachen Kopplung der Vesikel mit der Oberfläche, was zu einer verstärkten Energiedissipation führt. Als Ergebnis kann festgestellt werden, daß die Verwendung von Vesikeln mit $d = 50$ nm zu einer Ausbildung von tBLMs mit minimaler Vesikeladsorption oder Hemifusion führt. Daher werden diese Vesikel in allen nachfolgenden Experimenten verwendet.

DPTL-tBLMs sind in erster Linie für das Studium von Ionentransportern und Ionenkanälen konzeptioniert. Ihre elektrischen Eigenschaften sind daher von grundlegender Bedeutung für das Studium dieser potentialabhängigen Prozesse.

Im letzten Teil dieses Kapitels werden die elektrischen Eigenschaften der DPTL-tBLMs, deren Modifizierungsmöglichkeiten und Anwendung für das Studium von Ionentransportern (Valinomycin) und Ionenkanälen (zum Beispiel Gramicidin und Ompf-Protein) beschrieben.

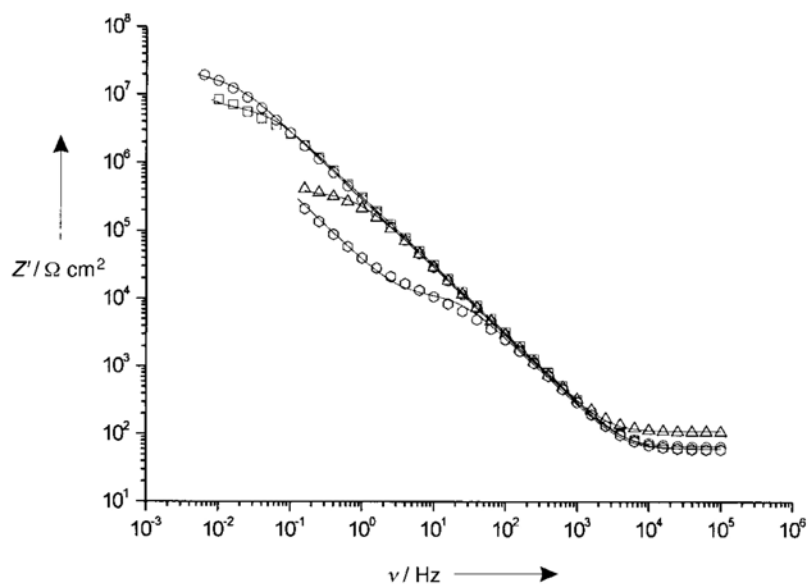


Abbildung 135 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie einer DPTL-Monoschicht auf einem TSG-Film vor (\square) und nach (\circ) Fusion von DPhyPC-Liposomen in 0.1 M KCl-Lösung sowie nach anschließender Zugabe von 0.1 mM Valinomycin (untere (\circ) Kurve) und nach Spülen mit 0.1 M NaCl-Lösung (\triangle). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die unter Verwendung des Ersatzschaltkreises (*Abbildung 137*) erhaltenen Daten die hier als Realteil der Impedanz (Z') aufgetragen gegen die Frequenz ν abgebildet sind.

Nach Optimierung der Präparationsmethoden und Materialien können nun DPTL-SAMs auf TSG-LaSFN9 trägern präpariert und mit hoher Zuverlässigkeit durch Fusionierung von DPhyPC-Vesikeln auf dem DPTL-SAM hochohmige Lipidmembranen präpariert werden, die Kapazitäten aufweisen, die dem biologischen Vorbild entsprechen. Vesikelfusions-

Experimente mit DPTL-LB-Filmen, übertragen bei 30 mN m^{-1} , führten nach Fusion von 50 nm DPhyPC-Vesikeln nur zu Membranwiderständen von $138 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ mit $C=0,44 \mu\text{F cm}^2$.

Die Ergebnisse der elektrochemischen Impedanz-Spektroskopie sind in Abbildung 135 und Abbildung 136 dargestellt. Aus den Spektren wird der Widerstand und die Kapazität der Lipidmono- und Doppelschicht berechnet.^[67, 869, 1351] Der Schaltkreis (Abbildung 137) setzt sich aus einem RC-Glied für den Lipidfilm, dem Widerstand der Elektrolytlösung und der Kapazität der an die Goldoberfläche angrenzenden diffusen Doppelschicht zusammen.

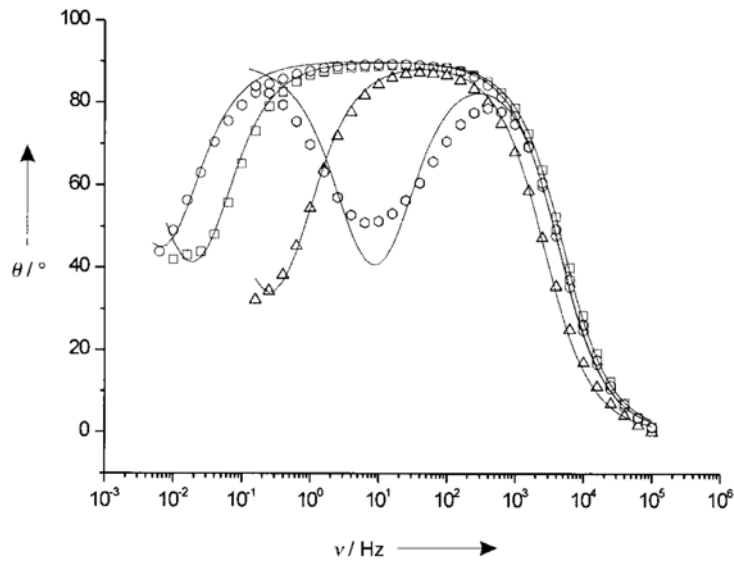


Abbildung 136 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie einer DPTL Monoschicht auf einem TSG-Film vor (□) und nach (○) Fusion von DPhyPC-Liposomen in 0.1 M KCl -Lösung sowie nach anschließender Zugabe von $0.1 \text{ mM Valinomycin}$ (untere (○) Kurve) und nach Spülen mit 0.1 M NaCl -Lösung (△). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die unter Verwendung des Ersatzschaltkreises (Abbildung 137) erhaltenen Daten die hier als Phasenverschiebung oder Phasenwinkel (θ) gegen die Frequenz ν aufgetragen sind.

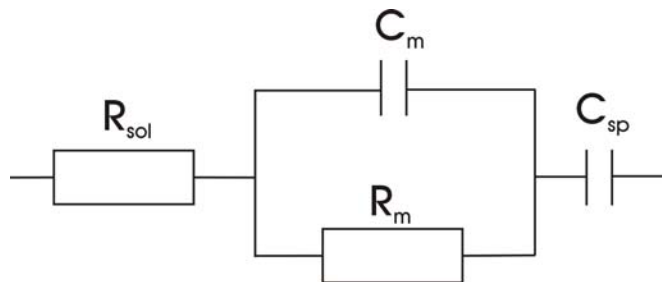


Abbildung 137 Ersatzschaltkreis der DPTL-tBLM; R (Elektrolytwiderstand), R_m (Membranwiderstand), C_m (Kapazität der Membran) und C_{sp} (Kapazität des Spacers und der Substratoberfläche)

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die für die tBLMs gemessenen Daten variieren zwischen 0.45 und 0.8 $\mu\text{F cm}^{-2}$ für die Kapazität, sowie zwischen 2 und 12 $\text{M}\Omega \text{cm}^2$ für den Widerstand und sind daher mit den Werten der BLMs vergleichbar. Weiterhin zeigen Abbildung 135 und Abbildung 136 den Effekt von Valinomycin einem Ionentransporter auf den Widerstand der tBLM in Gegenwart von Kaliumionen.

Transportproteine sind integrale Membranproteine die einer Vielzahl von Stoffen die Passage der Membranbarriere erlauben. Die Identifizierung von mehr als 360 Familien diverser Transporter unterstreicht die Bedeutung dieser Proteine für zelluläre Prozesse.^[1352] Transporter, Carrier und Translokatoren binden die zu transportierende Substanz unter Konformationsänderung und transportieren sie auf die andere Membranseite. Dort entlässt er sie wieder in das wäßrige Medium. Manche Transporter transportieren Moleküle eines Typs in einer Richtung (Uniports), andere arbeiten als Co-Transport-Systeme, das heißt. der Transport einer Molekülarart hängt vom gleichzeitigen oder nachfolgenden Transport einer zweiten Molekülarart ab. Die beiden Moleküle können in gleicher Richtung (Symport) oder entgegengesetzt (Antiport) transportiert werden. Alle Kanalproteine und viele Carrier-Proteine erlauben gelösten Molekülen den Membrandurchtritt nur passiv, also entlang des Potential oder Konzentrationsgefälles, ein Vorgang, den man Passiven Transport nennt. Entgegen einem Gradienten funktioniert der Transport nur aktiv, also ATP-abhängig. Unter der großen Vielfalt an Transportproteinen befinden sich sowohl relativ einfach gebaute Transporter auf Oligopeptidbasis, beispielsweise Valinomycin und solche die als molekulare Pumpen ihre Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten pumpen.^[1353] Valinomycin besitzt eine Monoschichtdicke von 0,68 nm.^[1354] Es kann auch als makrozyklischer Rezeptor aufgefaßt werden.^[1355] Valinomycin ist ein von *Streptomyces fulvissimus* produziertes Kalium-Ionophor-Antibiotikum,^[1356] das spezifisch Kaliumionen in seinem hydrophilen Innenraum einschließt, während das hydrophobe äußere den transmembranen Kaliumionentransport ermöglicht. Wie auch bei anderen Rezeptoren kommt es beim Valinomycin während der Komplexierung des Gastkations (bevorzugt K^+ oder NH_4^+) zu einer konformatorischen Änderung des Oligopeptids.^[1357, 1358]

Der Transport macht sich im Impedanzspektrum durch ein Abknicken des Kurvenverlaufs bemerkbar, der den Abfall des Widerstands in den $\text{k}\Omega$ -Bereich (Tabelle 11) anzeigt. Gleichzeitig nimmt die Kapazität der diffusen Doppelschicht einen Wert von etwa 5 $\mu\text{F cm}^{-2}$ an. Ähnliche Resultate werden auch von anderen Autoren beschrieben.^[67, 869, 1351, 1355]

	$C_{ }/\mu\text{F cm}^{-2}$ experimental	$R_{ }/\text{M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ experimental	d/nm experimental	d/nm calculated
DPTL, monolayer before vesicle spreading	0.55	1.75	4.7	4.7
Lipid bilayer after vesicle spreading	0.49	4.35	8.5	8
Lipid bilayer + valinomycin	0.64	0.0022		

Tabelle 11 Tabellierung der durch Simulation der elektrochemischen Impedanz-Spektren (Kapazität und Widerstand) und SPR-Messungen (Schichtdicke) erhaltenen Daten.

Der molekulare DPTL-tBLM Aufbau (Abbildung 138) erlaubt also trotz einer molekular dichten Packung im Bereich des DPTL-SAMs den effektiven Kaliumionentransport über die Membran.

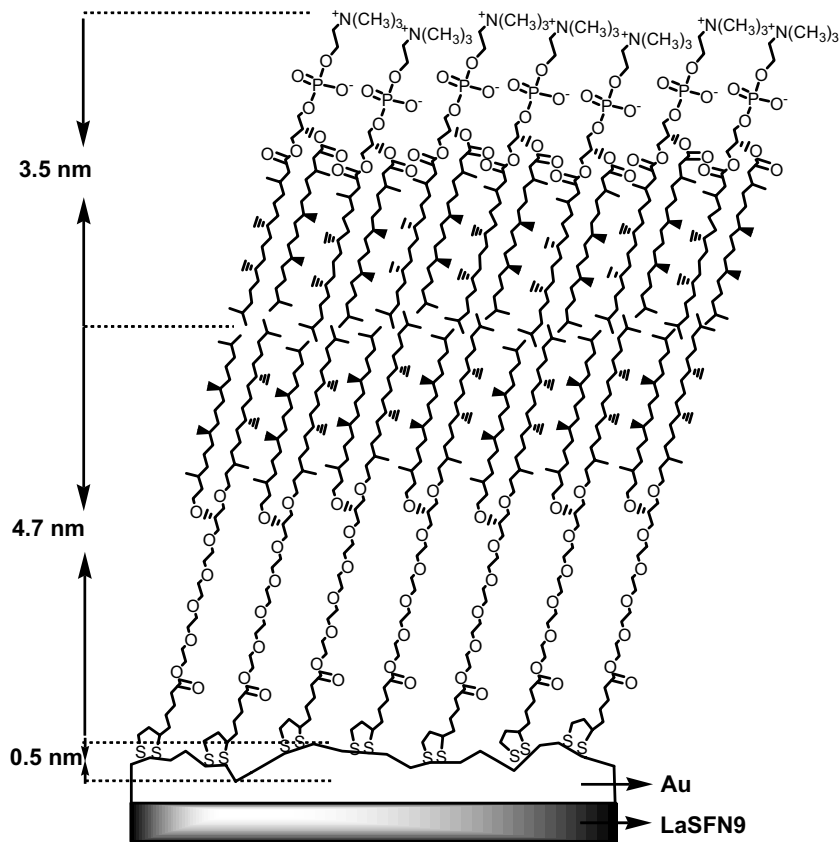


Abbildung 138 Idealisierter DPTL-tBLM Aufbau in molekularen Dimensionen mit DPhyPC als proximaler Membranhälfte.

Es kann daher auch eine hohe lokale Fluidität der tBLM geschlossen werden. Die beobachteten elektrochemischen Eigenschaften des durch Valinomycin vermittelten K^+ -Transports können mit Hilfe des Programms SPICE simuliert werden. Die Simulationen wurden von R. Naumann und D. Walz durchgeführt und sind neben experimentellen Daten in der Publikation IV aufgeführt.

Um das Potential des DPTL-tBLM näher zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen von Prof. Tibor Hianik in Bratislava, Slowakei und Prof. Rolando Guidelli und Frau Dr. Monicelli in Florenz, Italien weitere Präparationsmethoden und Transporter/Membranproteine untersucht.

Publikation V beschreibt die Wechselwirkung eines helikalen transmembranen Peptids, Acetyl-Lys₂-Leu₂₄-Lys₂-Amid (L₂₄) das an jedem Ende mit positiv geladenen Kopfgruppen terminiert ist. Es dient als Sonde um die viskoelastischen Membraneigenschaften zu untersuchen und die Flexibilität reiner DPTL-SAMs-DPhyPC – Membranen auf Gold zu untersuchen. Hierzu wird die Elektrostriktion als Methode angewendet. Die Elektrostriktion beschreibt die Deformation eines dielektrischen Mediums in Abhängigkeit eines angelegten elektrischen Feldes. In der gebräuchlichen Definition bezieht sich der Begriff der Elektrostriktion dabei nur auf den Anteil des Effekts, bei der die Deformation unabhängig von der Richtung des angelegten Feldes und proportional zum Quadrat des Feldes ist. Dies unterscheidet die Elektrostriktion vom piezoelektrischen Effekt, der die lineare Antwort der Deformation auf das Feld beschreibt.

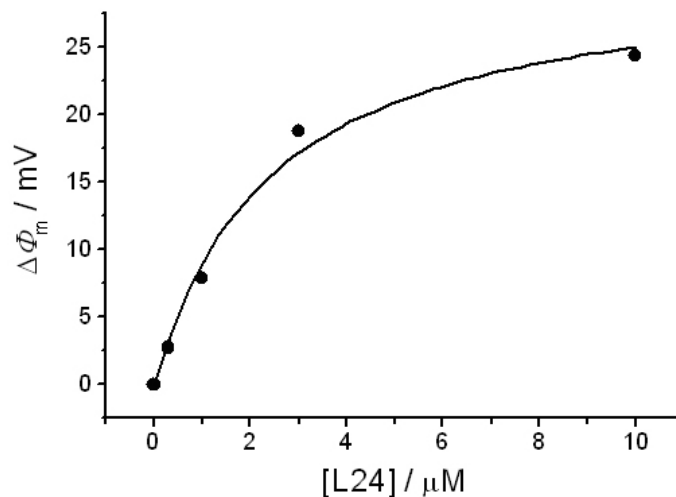


Abbildung 139 Änderung des Membranpotentials mit der Peptidkonzentration

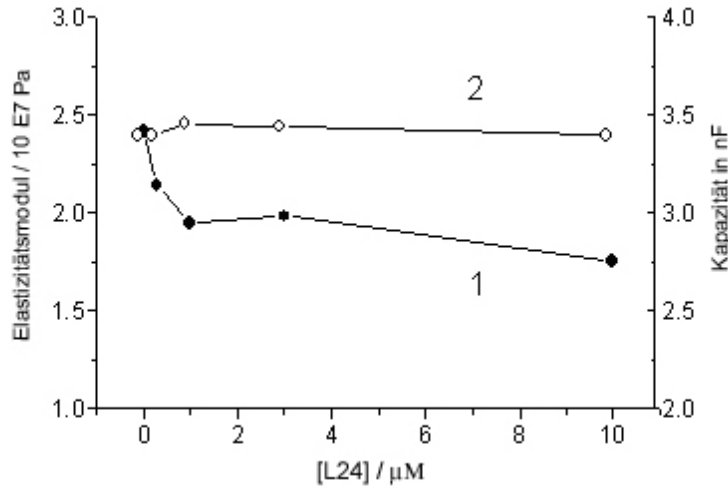


Abbildung 140 Elastizitätsmodul (1) und Kapazität der Membran (2) aufgetragen gegen die L_{24} -Peptid-Konzentration.

Adsorptionsexperimente von L_{24} zeigten für proximale DPhyPC/PS Membranen (Lipidverhältnis 10:1) ein Elastizitätsmodul von $(2,0 \pm 0,6) \times 10^7 \text{ Pa}$. Dieser Wert liegt signifikant über dem für BLM bekannten Elastizitätsmodul von $(3,5 \pm 0,8) \times 10^6 \text{ Pa}$, was auf Lösungsmittelsuren in der BLM zurückgeführt werden kann. Die in diesem Zusammenhang ebenfalls bestimmte spezifische Kapazität der DPTL-Membran liegt in Übereinstimmung mit den oben angegebenen Daten bei $0,76 \mu\text{F cm}^{-2}$. Die Wechselwirkung von L_{24} mit der Membran führt zu einer schrittweisen Neutralisation der negativen PS-Ladungen der Membranoberfläche und damit zu einer Reduktion des Oberflächenpotentials. Die absolute Änderung des Potentials (Abbildung 139) nimmt daher zu. Es kann festgestellt werden, daß L_{24} nicht in die Membran insertiert. Würde das Peptid insertieren, käme es durch die transmembrane Orientierung des zweiten kationischen Rests zu einer Zunahme des Membranpotentials, der nicht beobachtet wird. Die Wechselwirkung des Peptids mit der tBLM wird von einer Abnahme des Elastizitätsmoduls der Membran begleitet, während sich die Kapazität der Membran kaum ändert (Abbildung 140). Die Untersuchung zeigt, daß eine Insertion in den DPTL-Film nicht erfolgt. Möglicherweise auf Grund einer zu großen Packungsdichte.

Weiterführende Versuche auf Hg-Oberflächen sollten dieses Problem umgehen. Da ein Einbau von Gramicidin in unverdünnte DPTL-Monoschichten nicht beobachtet wird, werden Hg-Elektroden mit einem DPTL-SAM modifiziert. Nach erfolgter Vesikelfusion mit DOPC oder DPhyPC wird nach Zugabe von Gramicidin, Mellitin und dem bakteriellen äußeren Membranprotein OmpF ein selektiver Ionentransport beobachtet (siehe Publikation VI im

Anhang). Der möglich gewordene Ionentransport/Einbau der Ionenkanäle kann durch die Mobilität der DPTL-Moleküle auf dem fluiden Hg erklärt werden.

Um die laterale Dichte des DPTL-SAMs zu reduzieren, wird das oben beschriebene TEGL (15) als lateraler Spacer zusammen mit DPTL im Verhältnis 10:1 (DPTL/TEGL) für 24 h aus Chloroform auf TSG-Trägern assembliert (Publikation VII). Nachfolgende Vesikelfusion mit 50 nm Vesikeln DPhyPC/CholesterinDPhyPG im molaren Verhältnis 6:3:1 führt zur Ausbildung hochohmiger Membranen (Tabelle 12 und Tabelle 13). Zuerst wird die Wechselwirkung von Mellitin auf die Membran mit gemischtem DPTL/TEGL-SAM untersucht.

Durch die Vergrößerung des lateralen Raumes innerhalb der Lipidschicht, wird die Leitfähigkeit zwischen zwei Kettenenden größer als die Leitfähigkeit zwischen Metalloberfläche und Alkylkettenende.^[1359] Eine effiziente Wechselwirkung innerhalb der hydrophoben Membranareale ist daher notwendige Voraussetzung für die Ausbildung hochohmiger Membranen.

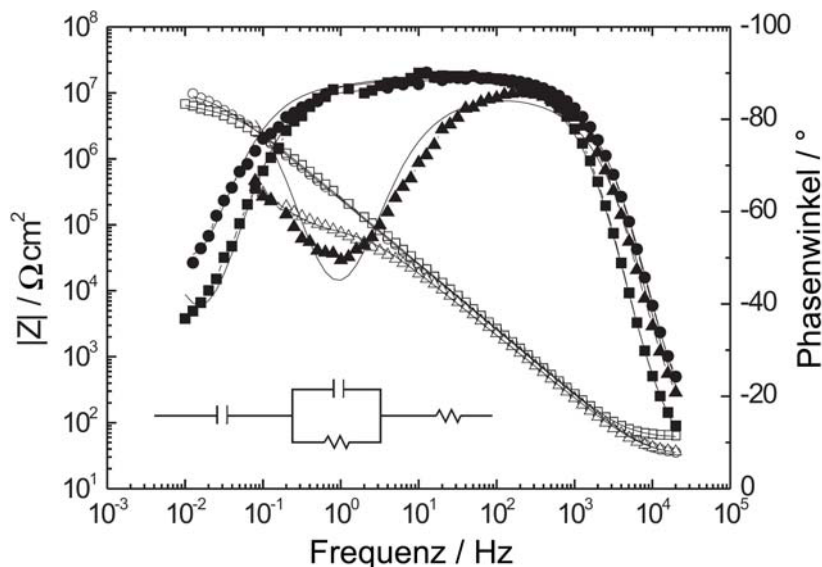


Abbildung 141 Elektrochemische Impedanzspektren der gemischten SAM-DPTL Membran in Pufferlösung (140 mM NaCl, 6 mM KCl, 10mM HEPES) vor (□, ■) und nach Vesikelfusion (○, ●) und Zugabe von Mellitin (△, ▲) mit einer finalen Konzentration von 4,57 μM .

Tabelle 12 zeigt die starke Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit durch Mellitin nachdem die Membran durch TEGL lateral verdünnt wurde. Nach erfolgter Zugabe von Mellitin wird eine Reduktion des Membranwiderstands von 7,4 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$ auf 60 $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ beobachtet. Die

Membrankapazität ändert sich nur geringfügig. Mellitin (26 AS) ist im Bienengift enthalten und in seiner entzündungshemmenden Wirkung 100 mal wirksamer als Hydrocortison.

Oberfläche	$R_m/M\Omega\text{ cm}^2$	$A_{CPE}/(F\text{ cm}^{-2})^\alpha$	α	$C_{in}/\mu F\text{ cm}^{-2}$
SAM	5.1	0.88	0.98	3.2
Lipiddoppelschicht	7.4	0.73	0.99	5.0
Lipiddoppelschicht mit Melittin	0.062	1.1	0.95	4.8

Tabelle 12 EIS-Simulationsparameter für die Daten aus **Abbildung 141**, αA_{CPE} ist der Fit-Parameter der von der ZVIEW Fit-Routine erhalten wird. α ist der Verteilungsparameter der Zeitkonstanten. Für $\alpha=1$ wird CPE ein reiner Kondensator.

Im nachfolgenden Experiment wird der Einbau von Gramicidin untersucht. Gramicidin ist ein Pentadekapeptid grampositiver Bakterien. Es durchspannt die Membran halb. Um einwertige Ionen über die Membran zu transportieren, müssen zwei Kanalhälften dimerisieren. Dazu ist eine laterale Fluidität der Membran erforderlich. Zusätzlich muß der laterale Raum für den Kanal zur Verfügung stehen. Experimente mit reinen DPTL-SAM zeigen keinen Ionentransport über die Membran. Im Gegensatz zu reinen DPTL-SAMs sind die oben beschriebenen gemischten SAMs in der Lage den Einbau von Gramicidin zu ermöglichen. Die

Oberfläche/Puffer	$R_m/M\Omega\text{ cm}^2$	$C_m/\mu F\text{ cm}^{-2}$	$C_{in}/\mu F\text{ cm}^{-2}$
SAM ^a	2.1	1.1	3.4
Lipiddoppelschicht ^a	8.7	0.74	5.1
Lipiddoppelschicht mit Gramicidin			
Puffer A	0.036	0.98	3.3
Puffer B	0.053	0.99	3.2
Puffer C	0.25	0.88	3.0

^a Messung in Puffer KCl (50 mM), HEPES (10 mM) pH 7.4 (Puffer A)

Tabelle 13 Widerstand und Kapazitäten der DPTL/TEGL-Membran, simuliert mit Hilfe der Daten aus **Abbildung 142** (Puffer B = 100 mM Na⁺; Puffer C = 50 mM (CH₃)₄N⁺).

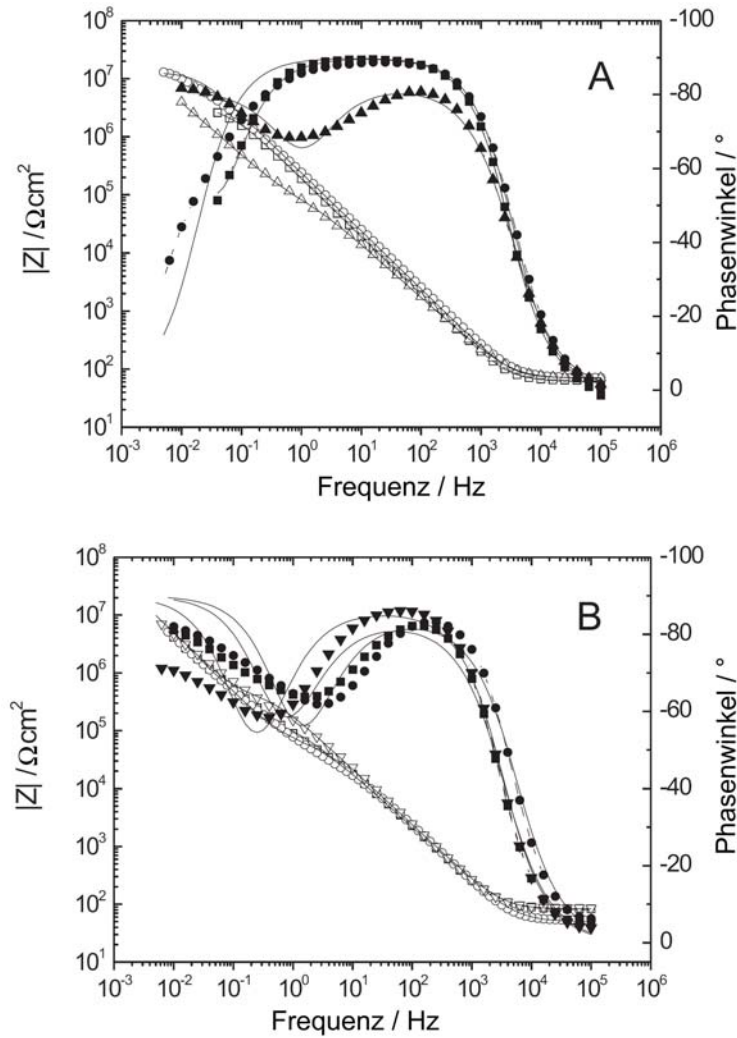


Abbildung 142 A) Elektrochemische Impedanzspektren der gemischten SAM-DPTL Membran in Pufferlösung A (50 mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4) vor (\square , \blacksquare) und nach Vesikelfusion (\circ , \bullet) und Zugabe von Melittin (\triangle , \blacktriangle) mit einer finalen Konzentration von $4,57 \mu\text{M}$. B) Elektrochemische Impedanzspektren der gemischten SAM-DPTL Membran in Pufferlösung A (50 mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4) (\square , \blacksquare), Pufferlösung B (100 mM NaCl, \circ , \bullet) und Pufferlösung C (50 mM $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$, \triangle , \blacktriangle).

Die Auswertung der Daten, dargestellt in Tabelle 13, zeigt den schon zuvor bei Valinomycin für unverdünnte DPTL-Membranen und für Melittin bei gemischten DPTL/TEGL-SAM Membranen beobachteten Abfall des Membranwiderstands von $8,7 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ auf einen niedrigen $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ Wert. Der um Faktor 5 höher liegenden Widerstand für Puffer C liegt am großen Ionenradius des quaternären Ammoniumsalzes (schlechter Transport).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß DPTL die von ihm erwarteten Eigenschaften in Gänze erfüllt. Es ist in der Lage die Membran mit maximaler Elongation des TEG-Spacers

mit einer Membran-Oberflächenentkopplung von mehr als 2 nm zu entkoppeln. IR-Untersuchungen zeigen, daß TEG im Fall von DPTL-SAMs in der Lage ist unterschiedliche Konformationen einzunehmen. In wäßriger Lösung streckt es sich komplett. Anfänglich schwankende Werte für die elektrischen Daten der tBLM konnten auf unzureichende Eigenschaften der Goldoberfläche zurückgeführt werden. Es kann gezeigt werden, daß hochohmige Membranen präpariert werden können, wenn die Goldoberflächenrauigkeit kleiner ist als die Spacerlänge. Die Präparation der tBLM erfolgt in effizienter Weise, wenn kleine gespannte Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet werden. QCM-D Messungen zeigen, daß große Vesikel zur Adsorption neigen und nicht vollständig fusionieren. Die unverdünnten DPTL-Membranen zeigen eine gute geringe lokale Fluidität, die den Valinomycin vermittelten K^+ -Transport über die Membran erlaubt. Gramacidin und größere Kanäle sind in reinen DPTL-SAM Membranen nicht aktiv, bzw. werden nicht funktionell eingebaut. Verwendet man eine fluide Elektrode, z.B. Quecksilber, oder verdünnt DPTL lateral mit TEG, können Ionenkanäle funktionell eingebaut werden. Der Anteil an TEG liegt in der Lösung bei 10 %, auf der Oberfläche werden 20 % durch Desorptionsexperimente gefunden. Da Oligoethylenglykole (OEG) die Vesikelfusion fördern^[1360], ist eine effiziente tBLM Präparation möglich.

**„Erfahrungen sind wie Maßarbeit, sie
passen nur dem der sie macht“
Carlo Levi ital. Arzt und Schriftsteller**

6 Lipo-Glycopolymer gestützte tBLM

Gestützte Lipiddoppelschichtmembranen, basierend auf Ethylenglycol-Oligomeren, können in effizienter Weise für die Präparation fluider, hochohmiger biomimetischer Membranen herangezogen werden. Das im vorangegangenen Kapitel beschriebene DPTL erlaubt die Ausbildung biomimetischer Membranen mit fluiden und elektrischen Eigenschaften, vergleichbar mit dem biologischen Vorbild. Zusätzlich zeichnen sie sich durch eine lange Lebensdauer von mehreren Tagen bis Wochen aus.

Betrachtet man die Möglichkeiten zur lateralen Verdünnung der oberflächengebundenen Lipide oder die vertikale Entkopplung von der Festkörperoberfläche, so sind dem Aufbau definierter Spacer-Schichten mit herkömmlichen Makromolekülen enge Grenzen gesetzt (siehe Publikation X). Mit dem Ziel Systeme aufzubauen, die möglichst nur auf einem (unimolekularen) von der Festkörperoberfläche bis zur Membran reichenden Spacer beruhen, müssen zusätzliche Anforderungen an die Membrankomponenten und die Präparationsmethoden der Membrankonstitution gestellt werden. Unimolekulare Spacer erlauben eine vergleichsweise einfache und effiziente Kontrolle der lateralen Ankerlipid/Spacer-Dichte, schichtweise aufgebaute Systeme dagegen, z.B. durch LB-Multischichten, haben häufig ungünstige Oberflächenmorphologien, werden oft nur durch ionische Wechselwirkungen stabilisiert und erlauben oft keine hinreichende Kontrolle über die lateralen Freiräume des Submembranraumes.

Ein Vergleich mit dem biologischen Vorbild der Zelle erlaubt es, im Hinblick auf die Membranarchitektur, unter Einbezug der Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett und der Glycocalix/extrazellulären Matrix (ECM), neue Ansätze zum Aufbau fluider, hochohmiger Membranen mit großer vertikaler Entkopplung der Membran (> 6 nm, siehe Publikation X) zu definieren.

In Anlehnung an das biologische System können zwei Bereiche der Membranwechselwirkung unterschieden werden. Die Wechselwirkung mit der Glycocalix/ECM und die Wechselwirkung mit dem Cytoskelett. Analysiert man das biologische Vorbild, wird deutlich, daß das Cytoskelett komplex aufgebaut ist. Es besteht aus sich dynamisch auf- und abbauenden Polymeren und supramolekularen Strukturen. Einige bewirken eine zur Membranoberfläche senkrecht stehende Deformation der Membran, andere Komponenten besitzen auch lateral

kovalent Wechselwirkungen. Auf Grund des komplexen und dynamischen Aufbaus, ist die strukturelle und funktionelle Mimese des Cytoskeletts im vergleichsweise statischen biomimetischen System kaum möglich. Außerdem stellen der sphärische Zellaufbau und der aktive Membranfluß (vesikulärer Lipidaustausch) besondere zelluläre Rahmenbedingungen dar, die bei der tBLM nicht gegeben sind. Der chemische und strukturelle Aufbau des Cytoskeletts ist daher in dieser Form kein optimales Vorbild für gestützte Membranen.

Die Analyse der Glycocalix/ECM in Kapitel 3 zeigt, in welchem umfassenden Maß die Zellen unterschiedlicher Organismen ihre Glycocalix/ECM in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung an ihre Funktion und die Umweltbedingungen angepaßt haben. Für die Konstitution biomimetischer Membranen sind die funktionelle und strukturelle Rolle der Glycocalix/ECM-Glycoproteine und Glycolipide mit langen, eindimensional elongierten Glycopeptid oder Kohlenhydratstrukturen, von besonderem Interesse. Solche Strukturen erstrecken sich teilweise über 100 nm vertikal von der Membranoberfläche. Zu diesen Beispielen gehören beispielsweise Mucine. Glycocalix/ECM-Strukturelemente weisen oft keine signifikante kovalente Lateralvernetzung auf und stellen daher interessante Modelle für die Membranbiomimese dar. Andere Varianten, beispielsweise das Peptidoglycan der grampositiven und –negativen Bakterien sind ebenfalls bekannt, aber auf Grund ihres Aufbaus (laterale Vernetzung) nicht primäres Ziel der funktionellen Mimese im Rahmen dieser Arbeit (auf Ausnahmen und deren Begründung wird am Ende dieses Kapitels und in Kapitel 7 verwiesen).

Die bisher etablierten Spacer-Architekturen umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Polymermotive. Ringsdorf und Sackmann entwickelten die Idee Makromoleküle als “hydrophiles Kissen” zur Entkopplung der Membran von der Festkörperoberfläche zu verwenden.^[45, 1361] Seitdem wurde eine Vielzahl polymergestützter biomimetischer Membranen entwickelt. Sie reichen von physisorbierten Makro/Biomakromolekülen^[147, 1362-1373] und Lipiden bis zu kovalent angebondenen Makromolekülen mit physisorbierten oder kovalent angebondenen Lipiden^[857, 858, 1374-1380]. Die Anwendung von Copolymeren mit multiplen Ankergruppen zeigt, daß diese Konfiguration das System zu sehr einschränkt und solche Systeme keine ausreichend kontrollierbaren Membranarchitekturen erlauben.^[1379]

Alle oben zitierten Beispiele erreichen nicht die zuvor definierten Ziele. Insbesondere sind bisher keine biomimetischen Membranen bekannt, die nicht auf LB-Multischichten beruhen und eine Membran-Festkörperentkopplung von mehr als 6 nm erreichen. (Auch LB-Multischichten die in diese Größenordnung vorstoßen besitzen meist unzureichende elektrische Eigenschaften).

6.1 Design und erwartete Vorteile des Lipo-Glycopolymer-Motivs basierend auf der Literaturanalyse in Kapitel 3 und 6

Generell stellen die Eigenschaften makromolekularer Spacer zahlreiche Herausforderungen an deren Verwendung als Spacer. So nehmen sie mit zunehmender Kettenlänge eine Knäuelstruktur ein, die stark vom Lösungsmittel sowie dem Molekulargewicht und der Kettenlängenverteilung abhängt. Wechselwirkungen zwischen den Ketten beeinflussen dabei die Struktur und Stabilität der molekular dünnen Filme. Schon kleine, in der Literatur beschriebene lipidfunktionalisierte makromolekulare Spacersysteme mit weniger als 100 Repetiereinheiten erreichen nicht mehr als 40 % ihrer theoretisch maximal möglichen Schichtdicke. Beispiele schließen polare Polymere wie Polyethyloxazoline ($n=50$, 3-3,5 nm)^[854] und PEG2000 ($n=45$, 4,9 nm)^[1090] mit ein. Stark gestreckte Konformationen treten bei diesen Polymeren für die angegebenen Kettenlängen nicht auf. Zufällige Konformationen, die zur Bildung von Polymerknäulen führen und nicht durch sekundäre inter- und/oder intramolekulare Wechselwirkungen in gestreckter Form stabilisiert werden können, stellen ein Haupthindernis für das Erreichen großer Membran-Festkörperoberflächenentkopplung dar. Moleküle größerer Polarität mit dem Potential stabilisierende Wasserstoffbrücken auszubilden stellen ein erfolgversprechendes Modell zur Lösung dieses Problems dar. Zwei weitere Kriterien sind die thermodynamische und mechanische Stabilität der Membran. Voraussetzungen dafür sind:

- 1) Die vollständige Benetzung zwischen der Festkörperoberfläche und dem hydratisierten makromolekularem Spacer und zwischen Membran und dem hydratisierten Spacer.^[1087, 1089]
- 2) Die Wechselwirkung zwischen Membran und Festkörperoberfläche muß abstoßend sein um eine Entnetzung zu verhindern.^[53]
- 3) Nichtspezifische Kontakte zwischen den Lipiden und der Oberfläche durch van der Waals Wechselwirkungen (bis zu 3 nm effektiv) müssen unterdrückt werden.^[53]

Von allen bekannten makromolekularen Systemen ist die Glycocalix/ECM der Zelle eines der effizientesten Systeme diese Anforderungen zu erfüllen. Die Kohlenhydrate der Glycocalix halten einen vergleichsweise hohen osmotischen Druck aufrecht, der einen stabilen Zell-Zell-Abstand zwischen 10 und 100 nm erlaubt.^[53] Zur gleichen Zeit erreichen sie eine hohe

Stabilisierung innerhalb der Glycocalix/ECM durch kooperative Wasserstoffbrückenbindungen. Daher sollte ein kohlenhydratmodifizierter Spacer die notwendigen stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen und innerhalb der Spacerketten für gestreckte Kettenkonformationen ermöglichen.

Theoretische Berechnungen mit CS Chem 3D Ultra (CambridgeSoft, Version 9.0) zeigen, daß mindestens 12 β -1,4 verknüpfte Monosaccharide notwendig sind um einen 6 nm langen Spacer zu erhalten. Neben der aufwendigen Synthese von Dodecasacchariden ist bekannt, daß Glycolipide mit mehr als vier β -1,4 verknüpften Monosacchariden nichtfunktionale Aggregate mit Phasenübergangstemperaturen (T_m) von über 160°C bilden.^[1381] Um diese Probleme zu umgehen, wird ein neues Lipo-Glycopolymer (LPG) entwickelt – Abbildung 143 – (Publikationen IX und X die Grundlage dieses Kapitels sind).

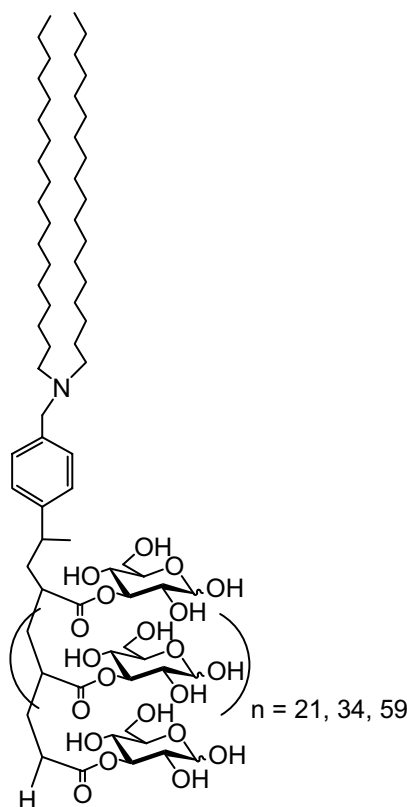


Abbildung 143 Struktur des neu entwickelten Lipo-Glycopolymere (LGP, 42-44) mit den drei im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Kettenlängen/Molekulargewichten.

Da langkettige Polysaccharide keine günstigen Eigenschaften aufweisen und eine aufwendige Synthese erfordern bietet sich die Polymerisation kohlenhydratmodifizierter Monomere unter den Bedingungen der kontrollierten radikalischen Polymerisation an. Die kontrollierte radikalische Polymerisation erlaubt eine enge Molekulargewichts/Kettenlängenverteilung, um

eine optimale Wechselwirkung der Lipide innerhalb der Membran zu erlauben. Basierend auf einem Polyacrylatgerüst mit β -3-O-verknüpfter Glucose wird das neue Lipid-Spacer-Molekül in Abbildung 143 entworfen. Eine Literaturstudie zeigt, daß Glucose-Acrylat-Ester einen dynamischen exo/endo-Rotamer-Austausch bezüglich der Glucose-Acrylat Esterbindung aufweisen, die bei Methacrylaten auf Endorotamere beschränkt ist.^[1382] Acrylatseitenketten erlauben daher eine größere konformatorische Dynamik die bei der Stabilisierung gestreckter Ketten durch die Einnahme energetisch günstiger Konformationen im elongierten Zustand eine Rolle spielen kann. Daher eignet sich α -D-Glucofuranose-1,2,5,6-diisopropyliden-2-propenoat als Monomer für den Aufbau der Spacerkette das sich nach erfolgter Polymerisation durch saure Isopropylidengruppenabspaltung in die Repetiereinheit β -3-O-D-Glucofuranosylacrylat umsetzen läßt.

Als Lipidkomponente wird *N,N*-Dioctadecylamin gewählt, das es stabile LB-Filme^[1117] und fluide Membranen^[1118] ausbildet, bei der Polymerisationstemperatur von 105 °C chemisch stabil ist,^[1383] keinen bekannten Signalcharakter besitzt oder spezielle Proteinwechselwirkungen zeigt (im Gegensatz zu Lipiden zum Beispiel PE, PC, CL, PS, PG)^[1092, 1093] und kommerziell erhältlich ist. Das im vorangegangenen Kapitel beschriebene Diphytanylglycerinmotiv war zum Zeitpunkt der LGP-Synthese noch nicht im Hinblick auf seine Membraneigenschaften charakterisiert. DODA wird als Teil des radikalischen Initiators an das die radikalische Polymerisation startende Initiatorfragment gebunden und so als Kettenstarter in das Polymer eingeführt.

6.2 Synthese der Lipo-Glycopolymeren (LGP) und Ankersysteme

Analog der Synthesestrategie in Kapitel 5 soll die angestrebte Strategie der LGP-Synthese eine möglichst große Bandbreite an Applikationen der Lipid-Konjugate im Kontext biomimetischer Membranen erlauben. Das bedeutet, daß die Lipid-Konjugate nicht von vornherein mit einer Ankergruppe modifiziert werden sollen. Dadurch können die spacerfunktionalisierten Lipide ohne Störung der Ankergruppe im Vergleich zu den natürlichen Lipiden charakterisiert und als freie Lipide beim Aufbau von biomimetischen Membranen angewendet werden. Terminale oder prädefinierte Ankergruppen in polymeren Spacern stellen im Hinblick auf die Oberflächenanbindung und die Ausbildung der Membran bei bestimmten Substratmorphologien ohnehin einen kritischen Faktor dar, auf den unten im Detail eingegangen wird. Auch aus diesem Grund wird diese Variante vermieden.

Folgende Verbindungen werden für den Aufbau von glycopolymergestützten Membranen verwendet: Ein Lipo-Glycopolymer, Komponenten zur Ausbildung eines SAM bestehend aus einer photoreaktiven Verbindung, einem lateralen Verdünnerthiol und einer nukleophilen SAM-Komponente. Auf die Bedeutung der einzelnen Moleküle für die Membranpräparation wird im Kapitel 6.2 eingegangen.

Nukleophile SAM-Komponenten zur oberflächenchemischen Modifikation mit einer Photoaffinitätsverbindung: ω,ω' -Dithiobis(alkyl-1-amine)

ω,ω' -Dithiobis(alkyl-1-amine) werden mit zwei Alkylkettenlängen synthetisiert. Sie dienen der späteren Modifikation mit photoreaktiven Verbindungen auf der Festkörperoberfläche zur Anbindung der LGP. Synthetisch sind sie aus N-(ω -Bromoalkyl)phthalimiden zugänglich die sich aus Phthalimid und dem entsprechenden 1, ω -Dibromoalkan (Abbildung 144) darstellen lassen.

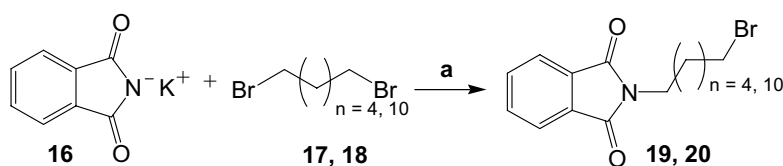


Abbildung 144 N-(ω -Bromoalkyl)phthalimide **19**, **20**: a) Ein Äquiv. Kaliumphthalimid **16**, 4 Äquiv. 1, ω -Dibromoalkan (hexyl **17** oder dodecyl **18**), DMF, 4 h refluxiert, N-(6-Bromohexyl)phthalimid, **19** (67%), N-(12-Bromododecyl)phthalimid, **20** (68%).

Anschließend werden die N-(Bromoalkyl)phthalimide mit Natriumthiosulfat zu den entsprechenden Bunesalzen umgesetzt und mit Iod zu den Disulfiden (**21**, **22**) oxidiert (Abbildung 145).

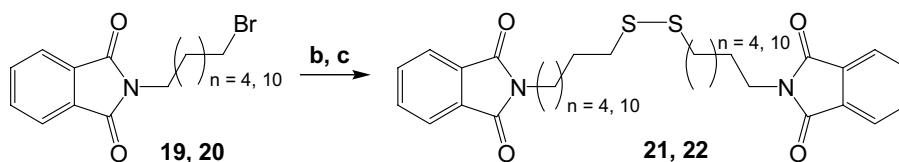


Abbildung 145 Synthese der N,N'-(Dithiodialkan- $\omega,1$ -diyl)bis[phthalimide]: b) Ein Äquiv. **19** oder **20**, 1.03 Äquiv. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, MeOH/ H_2O , 4 h refluxiert c) Die heiße Lösung wird portionsweise mit Iod oxidiert \rightarrow Raumtemp. N,N'-(Dithiodihexan-6,1-diyl)bis[phthalimid] **21** (55.2%); N,N'-(Dithiodidodecan-6,1-diyl)bis[phthalimid] **22** (77%);

Behandlung der Phthalimide **21** und **22** mit Hydrazin und nachfolgender Neutralisation mit HCl liefert die ω,ω' -Dithiobis(alkyl-1-amin)dihydrochloride als weiße Salze in guter Ausbeute (Abbildung 146).

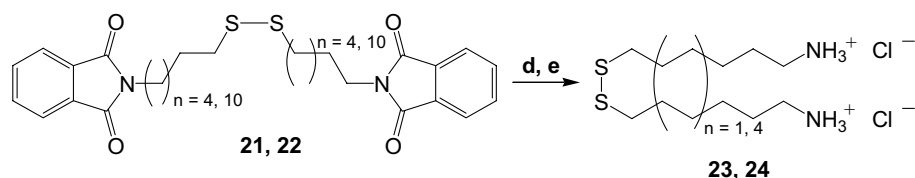


Abbildung 146 Synthese der ω,ω' -Dithiobis[alkan-1-amino]dihydrochloride **23**, **24**: d) Ein Äquiv. **21** oder **22**, 3 Äquiv. Hydrazinhydrat, refluxieren für 1 h; e) Neutralisation mit HCl, **23** (64 %), **24** (55 %).

6,6'-Dithiobis[hexan-1-amin]dihydrochloride (**23**) und 12,12'-Dithiobis[dodecan-1-amin]dihydrochlorid (**24**) werden nach der Kristallisation aus EtOH/Et₂O/AcOEt 1:2:2 neutralisiert und aus Et₂O/AcOEt 1:1 ausgefällt. Die erhaltenen Produkte werden in dieser Form zur Präparation der SAM verwendet.

Photoaffinitätsverbindungen

Um die Zahl der synthetischen Schritte zu minimieren werden die Dithiobisalkanamine auf der Festkörperoberfläche mit verschiedenen Photoaffinitätsverbindungen modifiziert. Zwei Verbindungen werden synthetisiert: 1) 4-Benzoylbenzoylchlorid **26** (Abbildung 147) und 2) 5-Azido-2-nitro-benzoesäurechlorid (ANB) **28** (Abbildung 148). Sie unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Reaktivität und ihren Aktivierungsmechanismus. Daher kann eine unterschiedliche Effektivität bei der LPG-Anbindung auf Goldoberflächen erwartet werden.

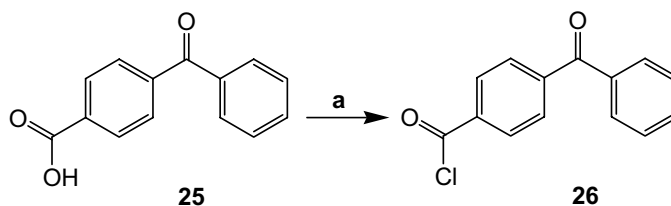


Abbildung 147 Synthese von 4-Benzoylbenzoylchlorid: a) 1,05 Äquiv. PCl₅, 1 Äquiv. 4-Benzoylbenzoesäure, Et₂O, Ar, RT, 10 min, **26** (94%).

Beide sind in sehr guter Ausbeute aus den entsprechenden Säuren und Phosphorpentachlorid zugänglich. Auf Grund ihrer Hydrolyseempfindlichkeit werden sie erst unmittelbar vor der Oberflächenmodifizierung hergestellt und frisch eingesetzt.

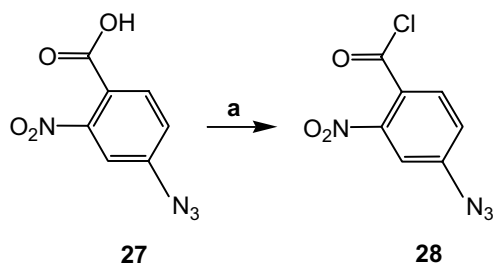


Abbildung 148 Synthese von 5-Azido-2-nitro-benzoesäurechlorid **28**: a) 1,05 Äquiv. PCl_5 , 1 Äquiv. 5-Azido-2-nitro-benzoesäure **27**, Et_2O , Ar, RT, 10 min, **28** (97%).

Biomimetische Membranen unterliegen im Umfeld der biomimetischen Meßanordnung starken Einschränkungen ihrer lateralen und vertikalen Freiheitsgrade. Die Einschränkungen sind im wesentlichen durch den molekularen Aufbau der oberflächengebundenen Lipide und die Eigenschaften der Festkörperoberfläche bestimmt. Sie führen zusammen mit den Voraussetzungen zur Ausbildung intakter und fluider Membranen zu spezifischen Anforderungen an den Spacer. Da die Ausbildung fluider, hochohmiger Membranen eine effiziente Wechselwirkung der hydrophoben LGP-Komponenten und freien Lipide erfordert, sind große Abweichungen in den Spacerkettenlängen in Abhängigkeit von der Festkörperoberflächenrauigkeit eine ungünstige Voraussetzung zur Ausbildung qualitativ hochwertiger Membranen. Eine enge Molekulargewichtsverteilung ist bei Goldoberflächen mit einer Rauigkeit von wenigen Nanometern wünschenswert. Die angestrebten kohlenhydratmodifizierten Acrylate lassen sich effizient radikalisch polymerisieren. Üblicherweise führen Standardmethoden der radikalischen Polymerisation, z.B. mit AIBN als Initiator, zu einer Molekulargewichts-/Kettenlängenverteilung, die für biomimetische Membranen zu breit ist. Der Einsatz moderner Polymerisationsmethoden erlaubt es die radikalischen Polymerisation unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen, die Polydispersitäten (PD) < 1.2 ermöglichen. Eine besonders effiziente Methode auf der Basis von Alkoxyamin-Initiatoren mit α -Hydrido-Funktionalität wurde von Craig Hawker entwickelt.^[1384] Alkoxyamin-Initiatoren mit α -Hydrido Funktionalität besitzen gegenüber 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinoxyl (TEMPO) den Vorteil die Polymerisation eines breiten Spektrums an Monomeren zu Polymeren mit sehr guter PD zu erlauben.^[1384]

Zur Synthese der LGP wurde ein auf dem 2,2,5-trimethyl-4-phenyl-3-azahexan-3-yl-Oxy-Gerüst beruhender Alkoxyamin-Initiator verwendet. Da der die Polymerkette startende Initiator kovalent an das erste Monomer gebunden bleibt, ist es zweckmäßig diesen mit der Lipidkomponente zu funktionalisieren. Wie oben beschrieben, wird hierzu DODA eingesetzt, das neben günstigen Membraneigenschaften auch synthetisch stabil ist und sich effizient in das 2,2,5-trimethyl-4-phenyl-3-azahexan-3-yl-Oxy-Gerüst einführen läßt (Abbildung 149). Die drei

in Abbildung 143 dargestellten LGP mit einer mittleren Zahl von **23**, **36** und **61** Repetiereinheiten wurden während eines Forschungsaufenthalts bei Craig Hawker am IBM Almaden, San Jose, USA synthetisiert. Sie sind Teil der zusammen mit H. Götz veröffentlichten Publikation IX, die noch weitere Polymere beinhaltet die von H. Götz und E. Harth dargestellt wurden, sich aber nicht für den Aufbau von tBLM mit den oben definierten Zielen eignen (z.B. Glyco-lipocopolymere, diese und weitere Verbindungen sind Gegenstand der Dissertation von A. Reisinger-Friebis, Mainz, 2006).

DODA-substituierter Alkoxyamin-Initiator:

Ausgehend von 2,2,5-Trimethyl-3-[1-(4'-chloromethyl)phenylethoxy]-4-phenyl-3-azahexan^[1384] in Chloroform wird *N,N*-Dioctadecylamin (DODA) im Überschuß zugegeben und in hoher Ausbeute an das Initiatorgerüst gekuppelt. 2,2,5-Trimethyl-3-[1-(4'-dioctadecylamin)phenylethoxy]-4-phenyl-3-azahexan wird nach flash-chromatographischer Aufarbeitung rein erhalten. Die Vorstufe **29** und das ebenfalls für die Polymerisation verwendete freie Nitroxid^[1384] wurden dankenwerter Weise vom Arbeitskreis von Craig Hawler zur Verfügung gestellt.

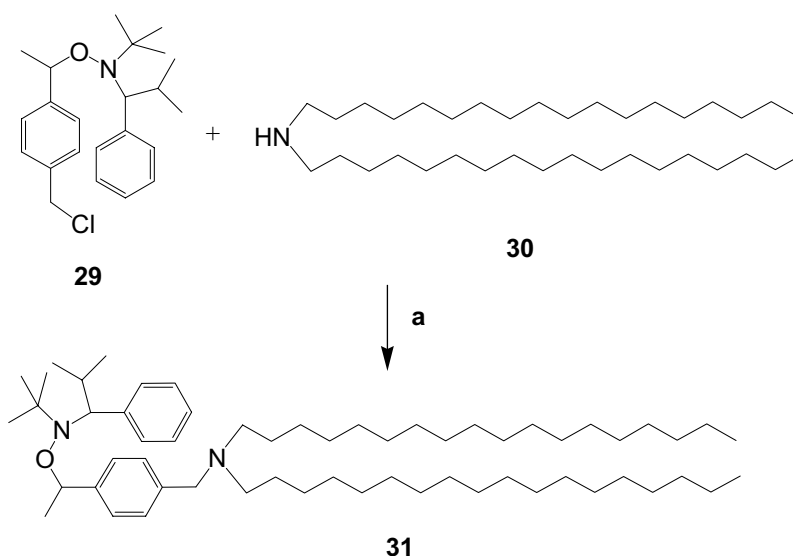


Abbildung 149 Synthese des DODA-modifizierten Alkoxyamin-Initiators: a) Ein Äquiv. 2,2,5-Trimethyl-3-[1-(4'-chloromethyl)phenylethoxy]-4-phenyl-3-azahexan **29**^[1384] 3,8 Äquiv. *N,N*-Dioctadecylamin (DODA, **30**), CHCl₃, 60 °C, 24 h, **31** (98 %).

Synthesen des kohlenhydrathaltigen Acrylat Monomers:

α -D-Glucofuranose-1,2,5,6-diisopropyliden-2-propenoat wird in Anlehnung an Ouchi et al.^[1385] aus einem Äquivalent 1,2,5,6-diisopropyliden- α -D-glucofuranose in Aceton mit wäßriger 5 N NaOH als Base und 3,2 Äquivalenten Acryloylchlorid bei 0 °C und einer Reaktionsdauer von 3 h in 35 % Ausbeute synthetisiert.

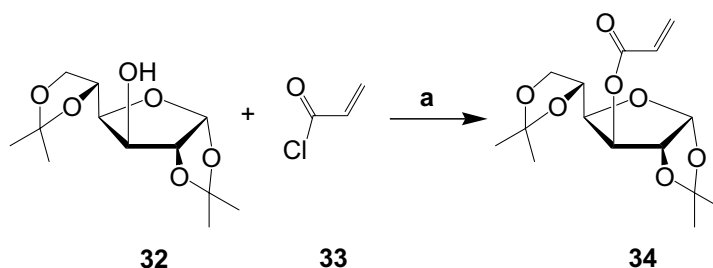


Abbildung 150 Synthese des kohlenhydratmodifizierten Acrylats α -D-Glucofuranose-1,2,5,6-diisopropyliden-2-propenoat^[1385]: b) Ein Äquiv. 1,2,5,6-diisopropyliden- α -D-glucofuranose, Aceton, 5 N NaOH, 3,2 Äquiv. Acryloylchlorid, 0 °C, 3 h, **34** (35 %).

Synthese der Lipo-Glycopolymere durch kontrollierte radikalische Polymerisation:

α -D-Glucofuranose-1,2,5,6-diisopropyliden-2-propenoat **34** wird in DMF mit den entsprechenden stöchiometrischen Äquivalenten 2,2,5-Trimethyl-3-[1-(4'-dioctadecylamin)phenylethoxyl]-4-phenyl-3-azahexan **31** (Alkoxyamin) und 0,04 Äquiv. des entsprechenden Nitroxids **35** (bezogen auf das Alkoxyamin) entgast und unter Argonatmosphäre bei 105 °C für 40 h polymerisiert. Dabei läßt sich die Kettenlänge gut über das Verhältnis des Initiators zum Monomer einstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in erster Linie Homopolymere mit einem Molekulargewicht zwischen 5900 und 15000 Dalton mit einer Polydispersität zwischen 1.16 und 1.27 dargestellt.

Das zusätzlich zugegebene Nitroxid **35** dient zum Abfangen freier radikalischer Kettenenden um Nebenreaktionen wie Disproportionierungen und Rekombination zurückzudrängen. Das zu Beginn der Polymerisation entstehende Nitroxidradikal rekombiniert immer wieder mit dem freien radikalischen Kettenende, an dem die Polymerisation, das heißt der Angriff auf das freie Acrylatmonomer stattfindet. Die homolytische Spaltung der C-ON-Bindung erfolgt bei erhöhter Temperatur. Daher ist es möglich, das entstandene Polymer, nachdem das Monomer komplett aufgebraucht ist, nach Absenkung der Temperatur als „endverkapptes“ bzw. inaktives/„schlafendes“ Nitroxid zu isolieren. Dieses kann bei Bedarf gegen Wasserstoff ausgetauscht, oder für weitere Polymerisationen mit anderen Monomeren oder Monomermischungen eingesetzt werden. Die sonst für dieses System übliche Standardpolymerisationstemperatur von 125 °C musste auf 105 °C reduziert werden, da die

Kohlenhydratseitenkette bei höheren Temperaturen nicht stabil ist. Die Reaktionslösung wird nach erfolgter Polymerisation mit THF verdünnt und das Polymer in einer 20/3 Mischung aus Methanol und Wasser gefällt. Die Produkte **36-38** werden in Ausbeuten von 61 %, 58 % und 64 % erhalten.

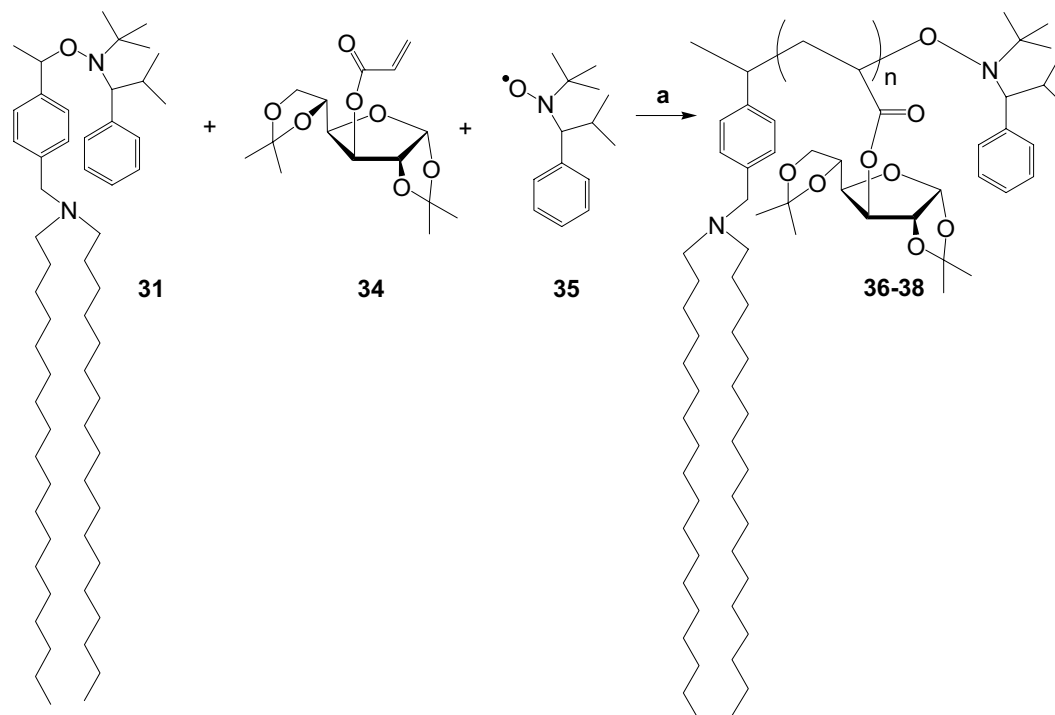


Abbildung 151 Kontrollierte radikalische Polymerisation von **34** mit **31** und **35**: a) **31** und **34** in ihren stöchiom. Verhältnissen, 0,04 Äquiv. **35** (zu **31**), DMF, 105 °C, 40 h, 58-64 %.

Austausch des Alkoxyaminkettenendes gegen Wasserstoff:

Der hydrophobe Charakter des aromatischen Nitroxidkettenendes ist für eine Vorzugsorientierung des Polymers mit DODA als hydrophoben Zentrum problematisch. Da die tertiäre Butylgruppe zusammen mit dem Isopropyl- und dem aromatische Rest sterisch anspruchsvolle Reste darstellen, ist davon auszugehen, daß sie auch im Fall einer Inkorporation in die Membran das Verhalten des Lipo-Glycopolymers analog bolaamphiphiler Verbindungen beeinflussen. Diese Tendenz steht einer maximalen Elongation des Glycopolymer-Spacers diametral entgegen, so daß das Nitroxid gegen Wasserstoff substituiert wird. Das entsprechende Poly[1,2,5,6-Di(isopropyliden)- α -D-glucofuranose-2-propenoat] **36-38** mit terminalem Nitroxidterminus (inaktives/„schlafendes“ radikalisches Kettenende) und

Tributylzinnhydrid wird in wasserfreiem Toluol gelöst, wobei das Alkoxyaminkettenende bei erhöhter Temperatur gegen Wasserstoff substituiert wird (Abbildung 152).

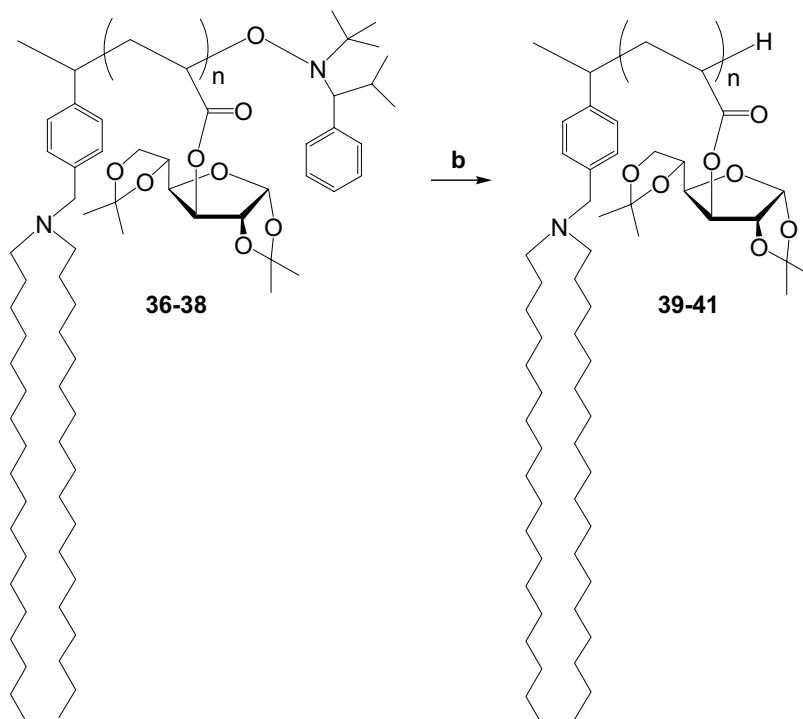


Abbildung 152 Austausch des inaktiven/“schlafenden“ Initiator-Kettenendes gegen Wasserstoff: Ein Äquiv. 36-38, 20 Äquiv. Tributylzinnhydrid, Toluol, Ar, 105 °C, 5 h, 86-88 %.

Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen vom Lipo-Glycopolymer

Die amphiphilen Eigenschaften der Lipo-Glycopolymere werden von dem Verhältnis des DODA-haltigen Molekülfragments und der Kettenlänge des Glycopolymers bestimmt. Um die Ausbildung von Wasserstoffbrücken inter- und intramolekular zu erlauben, ist es notwendig die Isopropylidenschutzgruppen quantitativ zu spalten. Hierzu muß das Lipo-Glycopolymer in Lösung gehalten werden, um eine vorzeitige Fällung zu vermeiden. Dies gelingt für alle drei beschriebenen Lipo-Glycopolymere (**42-44**) mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) und Wasser im Verhältnis 9:1. Nach 30 min Reaktionszeit werden NMR-spektroskopisch keine Isopropylidenschutzgruppen mehr nachgewiesen. Im Anschluß wird die Lösung mit Toluol verdünnt und dreimal unter jeweiliger Toluolzugabe lyophilisiert. Die Lipo-Glycopolymere **42-44** werden als weiße Feststoffe erhalten (Abbildung 153). Sie werden vorzugsweise mit Chloroform/Methanol/Wasser-Mischungen im Verhältnis 9:3:1 in definierten Konzentrationen von etwa 1 mg/ml gelöst. Die Lösungen eignen sich für das Spreiten der Lipo-Glycopolymere an der Wasser-Luftgrenzfläche um LB-Experimente durchzuführen.

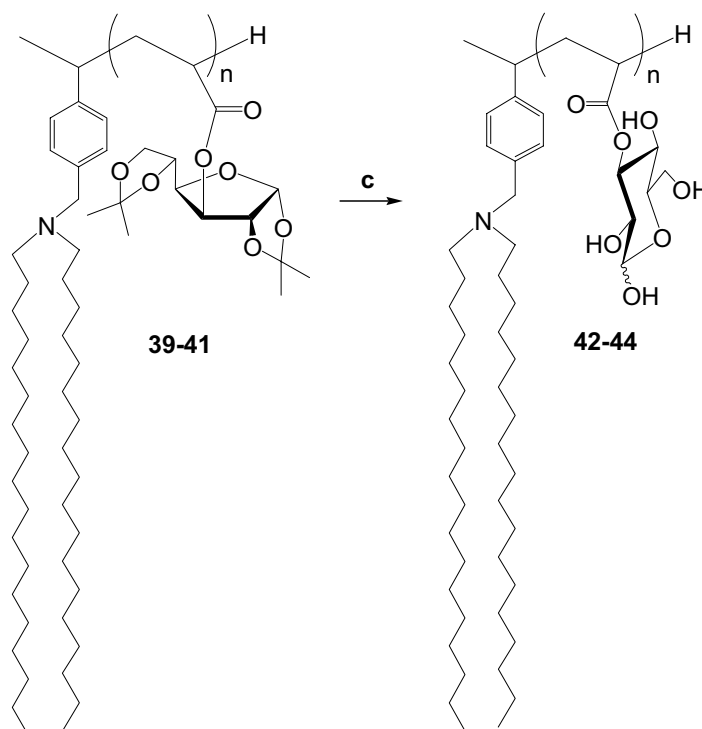


Abbildung 153 Isopropylidenschutzgruppenspaltung: Polymere **39-41**, TFA/Wasser 9:1, RT, 30 min, 92-96% **42-44**.

6.3 Biomimetische Membranen basierend auf Lipoglycopolymeren (LGP)

Ein großer Nachteil der derzeitigen tBLM-Systeme ist der limitierte submembrane Raum, der unter anderem durch die vertikale Entkopplung von der Festkörperoberfläche bestimmt wird. Derzeitige polymergestützte tBLM-Systeme, die auf einer unimolekularen Spacerkomponente beruhen, erreichen keine effektive Membran-Oberflächenentkopplung von mehr als 5 nm, noch sind sie in der Lage hinreichende elektrische Eigenschaften bei guter Membranfluidität zu ermöglichen. Als Richtgröße werden Widerstände von mindestens mehreren $M\Omega\text{ cm}^2$ angesehen um einen passiven Ladungs- oder Stofftransport über die Membran zu unterdrücken. Um diese Limitierungen zu überwinden wird in diesem Kapitel eine neues polymergestütztes tBLM-System auf der Basis von Lipo-Glycopolymeren vorgestellt, das in Publikation X beschrieben ist. Im Rahmen dieser Arbeit werden LGPs mit M_n 9000 (LGP9000) beschrieben. LGPs mit M_n 5900 wurden ebenfalls synthetisiert, sind aber mit einer maximalen theoretischen Schichtdicke von 5,2 nm (gefunden werden 5,1 nm) unterhalb der beabsichtigten Entkopplung von mehr als 6 nm. LGPs mit M_n 15000 werden auf Grund ihrer ungenügenden Löslichkeit und ihrer Filminstabilität an der Wasser-Luft-Grenzfläche nicht als tBLM-Baustein verwendet.

Die Notwendigkeit, für große (6 nm und mehr) vertikale Entkopplungen mit definierbarer lateraler Spacerdichte, resultiert aus verschiedenen biologischen und biophysikalischen Anforderungen. Beispielsweise: 1) Für die Akkommodation der cytoplasmatischen Untereinheiten von Membranproteinen innerhalb der biomimetischen Membran benötigt das Protein neben den rein sterisch notwendigen 3 nm, die beispielsweise für den cytoplasmatischen Teil von GPCRs angenommen werden können,^[1386] noch eine hydrophile Schicht zwischen dem der Festkörperoberfläche zugewandten Proteinfsegment und der Festkörperoberfläche. In der Summe sind somit mindestens 5 nm notwendig. 2) Die Reduktion des Förster-Energietransfers^[56] (wichtig für die Anwendung von Fluoreszenzsonden und Photoaffinitätssonden in der Nähe von Metalloberflächen). 3) Die Kompensation für nanoskopische Oberflächenrauigkeiten die oft gute elektrische tBLM-Eigenschaften verhindern.^[57]

Neben der vertikalen Entkopplung und der elektrischen Dichtigkeit, wird ein besonderes Augenmerk auf die lokale Fluidität gelegt. Sie ist nicht mit der makroskopisch beobachtbaren Fluidität identisch, wie sie beispielsweise durch FRAP-Experimente bestimmt werden kann. Die lokale Fluidität zeigt sich in der funktionellen Membranwechselwirkung von Ionentransportern und Membranproteinen. Für deren Funktion ist nach erfolgter Proteininkorporation eine lokale Fluidität zur Akkommodation von Konformationsänderungen der Membranproteine und das Aufrechterhalten einer elektrisch dichten Membran ausschlaggebend. Makroskopische Fluiditäten über weite Distanzen (mehrere μm) stellen eher einen Spezialfall der biologischen Membran dar. Experimente, besonders mit Nervenzellen, zeigen klar, daß eine makroskopische Fluidität auch unter „Nicht-Raft-Zuständen“ bei vielen funktionellen Membranzuständen nicht auftritt. Ein gutes Beispiel hierzu sind die durch Cytoskelett, Membranproteine und ECM konstituierten Mikroareale, wie sie am Beispiel des Picket-Fence-Modells diskutiert werden.^[1387] Obwohl in diesen Fällen keine makroskopische Fluidität beobachtet wird, sind diese Membranen elektrisch dicht und lokal fluide.

Im Rahmen des in Kapitel 6.1 diskutierten LGP-Designs sind diese Anforderungen durch die Wahl der LPG- und SAM-Komponenten berücksichtigt. Zusätzlich wird eine neue photochemische Methode zur kovalenten Immobilisierung von komplexen supramolekularen Architekturen mit definierter Orientierung auf metallischen Oberflächen aus wässriger Lösung präsentiert. Diese Methode besitzt ein interessantes Potential für zukünftige Anwendungen im Bereich von Protein-Nano-Arrays und der Bionanotechnologie im Allgemeinen.

Wie oben beschrieben beruht die Ausbildung von hochdefektfreien tBLM grundsätzlich auf der effizienten dynamischen Wechselwirkung der hydrophoben Lipiddomänen.^[57] Das Problem ein polyfunktionelles Polymer mit nukleophilen Seitengruppen segmentspezifisch, das heißt an

einem speziellen Kettenabschnitt, an eine aktivierte Festkörperoberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu immobilisieren bedarf einer neuen Strategie. Insbesondere, da sich die terminalen Segmente weder im Bezug auf die funktionellen Gruppen, noch in der sterischen Zugänglichkeit der Repetiereinheiten von anderen Segmenten des Polymers unterscheiden. Diese führt vor allem bei den Lipo-Glycopolymeren zu einer Herausforderung an die grenzflächenchemischen Präparationsmethoden, um die Lipo-Glycopolymeren im hydrophilen Terminusbereich kovalent an die Oberfläche anzubinden.

Das Problem wird durch eine Kombination grenzflächenchemischer Methoden und oberflächenchemischer Derivatisierung von SAM-Goldoberflächen gelöst: Ein Langmuir-Blodgett-Trog (LB-Trog) wird verwendet, um das LGP an der Wasser-Luft-Grenzfläche zu orientieren und in dieser Orientierung auf ein Festkörpersubstrat zu übertragen. Diese Methode erlaubt es die hydrophoben DODA-Lipid-Gruppen in Form eines ausgedehnten hydrophoben 2D-Netzwerk anzuordnen. Durch die Verkleinerung der Trogoberfläche mit beweglichen Barrieren orientieren sich mit steigendem Oberflächendruck die Glycopolymerketten der LPG in zunehmendem Maß senkrecht zur Oberfläche. Dadurch wird eine Streckung der LGP-Ketten erzielt. Der Langmuir-Blodgett-Transfer des vororientierten LGP-Films auf die Goldoberfläche des Sensorsubstrates erlaubt es den Lipoglycopolymeren ihre Länge und Konformation zu adaptieren, um eine intakte DODA-Lipidschicht zu erhalten und gleichzeitig die Oberflächenrauigkeit der Goldoberfläche auszugleichen. Außerdem ermöglicht es diese Methode das Lipo-Glycopolymer mittels einer Repetiereinheit an die reaktive Festkörperoberfläche zu binden, die unter diesen Bedingungen der Oberfläche zugewandt ist. Da dies nicht notwendigerweise der terminale Rest ist, erhält das System zusätzliche Freiheit energetisch günstige Anordnungen einzunehmen. Dies erlaubt die kovalente Immobilisation einer gestreckten Glycopolymerkonformation die sich schon an der Wasser-Luft-Grenzfläche durch laterale Wechselwirkungen stabilisiert während die distale Membranhälfte eine optimale Lipidwechselwirkung aufweist; Zustände die unter den Bedingungen der SAM-Bildung thiolmodifizierter Lipopolymere nicht möglich sind.

Zur Abschätzung der möglichen Packungsdichten der LPG auf der Festkörperoberfläche und der möglichen Elongation der LGP, werden Druck-Flächenisothermen aufgezeichnet. Zusätzlich eignet sich die LB-Methode zur Charakterisierung der LGP an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Um die Stabilität der Monoschicht zu überprüfen ist die isoperimetrische Bestimmung der zeitlichen Änderung des Oberflächendruckes bei konstanter Barrierenposition möglich. LGP9000-Filme sind bei 35 mN m^{-1} über einen Zeitraum von 40 min stabil (Druckschwankungen innerhalb der Messungenauigkeit). Die gewählte Zeitspanne liegt oberhalb des für den LB-Übertrag benötigten Zeitrahmens.

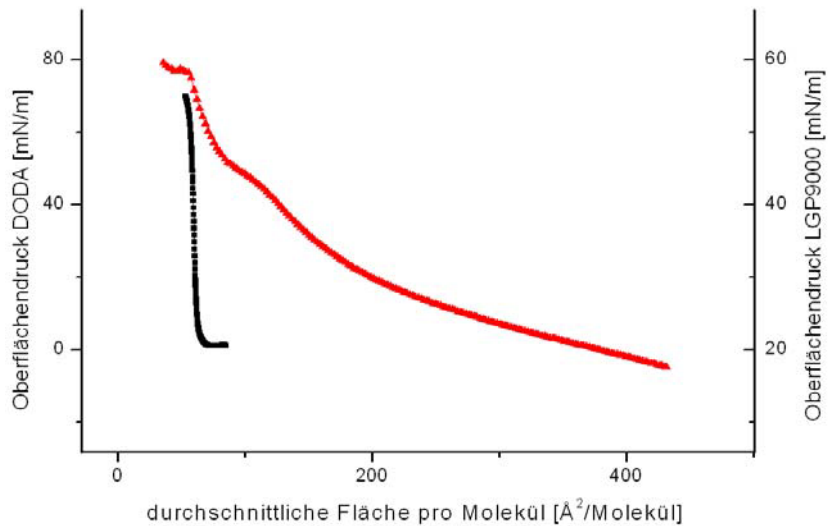


Abbildung 154 Druck-Flächen-Isothermen von DODA (■), und LGP9000 (▲)

Abbildung 154 vergleicht die Druck-Flächenisothermen von DODA und LGP9000. Bei hohem Oberflächendruck nimmt das LGP9000 eine molekulare Fläche von etwa 58 \AA^2 ein. Dieser Wert entspricht etwa der minimalen Fläche eines DODA-Moleküls (55 \AA^2). In der Literatur ist die DODA-Fläche mit 52 \AA^2 pro Molekül beschrieben.^[1388] Diese Fläche ist groß genug um die Monomereinheit der Glycopolymerkette abzudecken, da die molekulare Fläche einer Monosaccharideinheit bei etwa $40 - 50 \text{ \AA}^2$ liegt.^[1389, 1390] Eventuelle Unterschiede in der molekularen Fläche des Glycopolymers in Abhängigkeit von der Position der Zuckeranbindung an das Acrylat oder der anomeren Konfiguration sind in der Literatur anhand von Glycolipiden beschrieben. Es wurde gefunden, daß die Konfiguration bei Glycolipiden ab einer Kettenlänge von etwa C12 bezüglich der Kopfgruppenfläche keine Rolle mehr spielt.^[1391]

Da der Oberflächendruck einer biologischen Membran bei etwa 35 mN/m liegt^[1392] wird der LB-Übertrag des LGPs bei $35-40 \text{ mN/m}$ durchgeführt. Bei diesem Druck besitzt LGP9000 eine Fläche von etwa $120-150 \text{ \AA}^2$ pro LGP. Der Übertrag oberhalb der flüssig-kondensierten Phase erlaubt es gestreckte, aber noch flexible Glycopolymer-Spacer zu übertragen. Überraschenderweise erreichen die unter diesen Bedingungen übertragenen LGP-Monoschichten immer noch Entkopplungsabstände nahe der theoretisch maximal möglichen Streckung der Glycopolymerkette (siehe Tabelle 14 am Ende des Kapitels). Die bei DPPC gefundene statische Ausbildung von topographischen Membranrauhigkeiten unterhalb des Übergangs zwischen fluider und kondensierter Phase^[1393] sollte durch die Lipid-Spacer-Wahl unterdrückt werden, da DODA – Alkylamine in der Lage sind Membrandefekte auszuheilen.^[1115]

Durch die Verwendung polar-protischer Lösungsmittel für die Präparation von LGP-Lösungen und den LB-Transfer der LPGs müssen besondere Anforderungen an den reaktiven SAM gestellt werden. Da der LB-Übertrag je nach Übertragungsgeschwindigkeit etwa 30 min dauert und das SAM-beschichtete Festkörpersubstrat vor dem Übertrag in die wässrige Subphase getaucht werden muß um den LGP mit dem polaren Terminus auf das Substrat zu übertragen, können keine stark elektrophilen SAM-Termini, wie etwa Säurechloride verwendet werden. Andererseits sind die Hydroxylgruppen der Kohlenhydratseitengruppen in wässriger Lösung bei pH 7 nur schwache Nucleophile. Aus diesen Gründen werden die oben beschriebenen photoaktiven Verbindungen 4'-Benzoylbenzoylchlorid (**26**) und 5-Azido-2-nitrobenzoesäurechlorid (**28**) synthetisiert, um gemischte SAM mit Aminoterminus in einem Schritt wahlweise mit **26** oder **28** zu funktionalisieren. Photoaktive Verbindungen, wie die hier beschriebenen Benzophenon- und Nitro-Aryl-Azid-Derivate, besitzen den Vorteil ohne vorherige UV-Aktivierung in wässriger Lösung inert zu sein. Außerdem erlaubt es ihre hohe Reaktivität im aktivierten Zustand LGP über mehrere Reaktionswege kovalent an die Oberfläche zu binden.

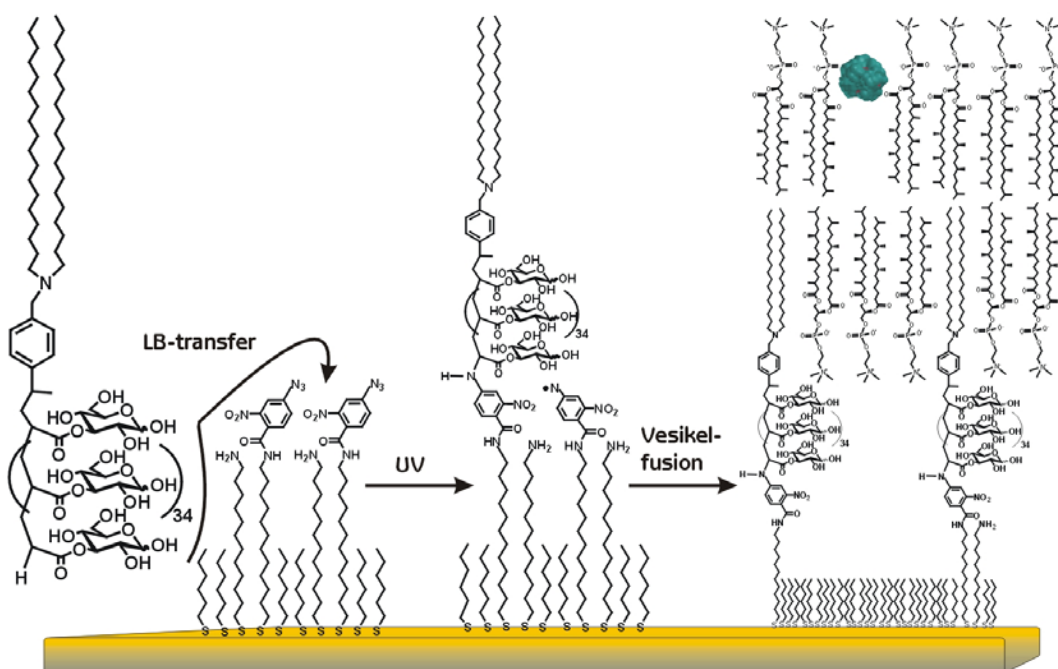


Abbildung 155 Aufbau des photochemisch an die Goldoberfläche gebundenen LGP9000 mit nachfolgender Ausbildung der Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion und anschließendem Funktionalitätstest mit dem Iontentransporter Valinomycin.

Photoreaktive SAMs werden in zwei Schritten präpariert. Zuerst wird ein gemischter SAM aus 1-Mercaptohexan und den C₆ oder C₁₂-Bisaminodisulfiden **23** oder **24** präpariert und mit den

photoreaktiven Säurechloriden **26** oder **28** funktionalisiert (Abbildung 155 linkes Bild). Gemischte SAM werden aus zwei Gründen verwendet. Erstens ist bekannt, daß die Reaktivität der Endgruppen dicht gepackter SAM stark abnimmt.^[1394] Die Verminderung der Reaktivität wird in erster Linie durch Wechselwirkungen der funktionellen Endgruppen innerhalb der Monoschicht^[1395] und sterische Hinderung^[1396] hervorgerufen. Neben der Reaktivität ändert sich der pH-Wert von basischen und sauren Endgruppen in SAMs oft erheblich, und kann sich um 2-5 Größenordnungen ($\Delta \text{pH} = 2-5$!) ändern^[1394]. Zweitens verhindern SAM-Komponenten mit einer Alkylkettenlänge $< C_8$ die Ausbildung hochhoher Monoschichten. 1-Mercaptohexan bildet SAMs mit geringer lateraler Ordnung und ermöglicht eine Reduktion des Widerstands.

SAMs aus 1-Mercaptohexan/6,6'-Dithiobis[hexan-1-amin] (**23**) im Verhältnis 10:1 bis 100:1, funktionalisiert mit den photoreaktiven Säurechloriden **26** oder **28** zeigten keine kovalente Immobilisierung von LGPs auf der Sensoroberfläche. Es ist bekannt, daß die metallische Oberfläche zusätzliche elektromagnetische Energiedissipationskanäle für die nichtstrahlende Deaktivierung photoaktiver Verbindungen über evaneszente Nahfeldkomponenten ermöglicht,^[1397] die innerhalb der ersten 5 nm oberhalb der Goldoberfläche beinahe 100 % betragen können.^[1398] Für einen C_6 -Anker ergibt sich eine Länge von 1,3 nm, die bei einem üblichen SAM-Neigungswinkel von 30° für die photoaktive Gruppe auf einen Abstand von 1,1 nm sinkt. Bei ungünstiger Drehung des Aromaten kann der Abstand des Azids zur Oberfläche sogar auf $< 0,6$ nm abfallen! Daher wird für dieses System von einem effizienten Quenchprozess ausgegangen, der keine ausreichende Aktivierung des photoreaktiven SAM-Terminus erlaubt. Andererseits wurde gezeigt, daß die Fluoreszenz auf metallischen Oberflächen nicht vollständig deaktiviert wird, wenn die Alkylkettenlänge mehr als 6 Methyleneinheiten beträgt. In diesem Fall konnte eine lineare Zunahme der Fluoreszenz mit zunehmender Alkylkettenlänge beobachtet werden.^[1399] Im nächsten Schritt wird daher das System 1-Mercaptohexan/12,12'-Dithiobis[dodecan-1-amin] (**24**) im Verhältnis 100:1 getestet. Eine Mikrophasenseparation der funktionellen Amino-Termini wird durch einen Kettenlängenunterschied von mehr als 5 Methyleneinheiten zwischen den beiden SAM-Komponenten sichergestellt,^[985] der zu einer molekularen Verteilung der länger-kettigen Verbindung^[986] ohne Clusterbildung führt^[987]. Diese säulenartige SAM-Morphologie erlaubt eine effiziente Aktivierung der terminal gebundenen ANB-Reste unter Anbindung der LGPs innerhalb von 5 min bei Wellenlängen > 300 nm, vergleichbar mit Versuchsbedingungen die für Photoaffinitätsexperimente mit ANB in Lösung beschrieben sind.^[1400] Die kurze Belichtungszeit

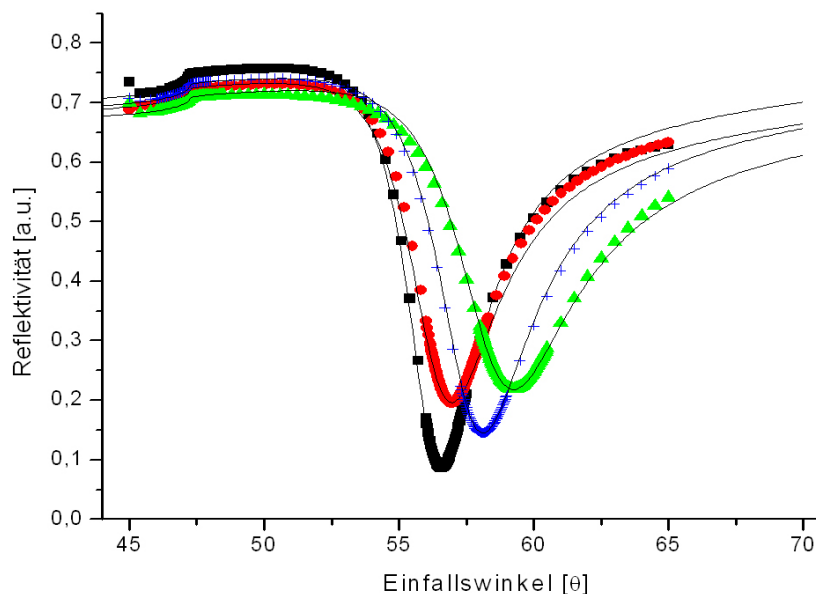


Abbildung 156 Oberflächenplasmonenspektroskopie: SPS-Kurven zur Bestimmung der Schichtdicken; LaSFN9-Glasträger mit 50 nm Goldschicht – Referenz (■), gemischter SAM (●), gemischter SAM mit ANB und LPG9000 nach Belichtung vor Extraktion (▲) und nach Extraktion mit Ethanol (+); Daten siehe Tabelle 14.

von 5 min wurde gewählt, um die literaturbekannte Oxidation der für die Verankerung des SAMs auf der Goldoberfläche notwendigen Thiole zu minimieren.^[1401] Obwohl Benzophenon im angeregten Tripletzustand nicht mit Wasser reagiert und auch im Gegensatz zu den meisten Carbenen und Nitrenen keine Umlagerungen eingeht,^[1276] ist es in der Lage präferentiell mit relativ unreaktiven C-H-Bindungen in der Gegenwart von Wasser und Nukleophilen zu reagieren.^[1402] Weitere Vorteile von Benzophenon sind seine chemische Stabilität und seine Aktivierung bei relativ langen Wellenlängen (350-360 nm). Gleichwohl zeigte sich ANB im Rahmen dieser Arbeit reproduzierbarere Resultate. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Aktivierung der beiden photoreaktiven Verbindungen sein. Während Benzophenon aus dem angeregten Zustand einfach zum Ausgangszustand relaxieren kann (insbesondere da ein strahlungsloser Förster Energietransfer^[1403] zur Goldoberfläche bei einer Entkopplung von 2,0 nm immer noch sehr effektiv ist) kann ein Arylazid nach erfolgter Aktivierung und Abspaltung von Stickstoff zum Nitren nicht zur Ausgangsverbindung relaxieren. Arylazide wurden zuerst von Fleet als Photocrosslinker im biologischen Kontext beschrieben.^[1404] Die meisten Nitrene reagieren mit gesättigten Kohlenwasserstoffen unter Insertion in Einfachbindung zwischen beiden Kohlenstoffatome oder Addition an Dobi unter dreiringbildung.^[1405] Außerdem verlängern elektronenziehende Substituenten wie Nitrogruppen und Polyfluorverbindungen die Lebensdauer von Singulett-Arylnitrenen auf einige zehn bis zu einigen hundert Nanosekunden, sie reagieren effektiv mit C-H und N-H Bindungen und bilden

kovalente Addukte aus.^[1406-1411] ANB reagiert in erster Linie über das Triplett-Nitren, das in der Lage ist mit der Acrylathauptkette oder der Kohlenhydratseitenkette zu reagieren (Abbildung 155),^[1412] ohne eine Umlagerung zum Didehydroazepin zu zeigen, das für eine effiziente Reaktion mit Aminogruppen notwendig ist^[1335]. Andere Versuche zeigen die Bildung von Arylhydroxylamin^[1413] das die Anbindung der Kohlenhydratseitenkette über deren reduzierendes Ende als alternativen Reaktionsweg in Abbildung 155 erlauben würde.

Abbildung 156 zeigt die SPS-Daten zur Kontrolle des schrittweisen Schichtaufbaus. Die absolute Länge der Verbindungsachse Schwefel-Azid beträgt 2,3 nm. Bei einem Neigungswinkel des SAMs von 30° ergibt sich eine Entfernung von der Goldoberfläche von 2,0 nm. Betrachtet man die Schichtdicken der angebundenen LGP9000-Schichten so trägt der ANB-funktionalisierte SAM mit 3,0 nm zur Gesamtschichtdicke bei. Die gemessene Gesamtschichtdicke einschließlich der LGP9000-Schicht, beträgt 11,5 nm ± 1,5 nm und liegt damit nahezu exakt beim theoretischen Maximum von 12,0 nm für ein komplett gestrecktes LGP9000 (CS Chem 3D Ultra (CambridgeSoft, Version 9.0) in Abbildung 156). Die Analyse der SPS-Daten zeigt, daß nach 16 h Ethanolextraktion mindestens 50 % der LGPs kovalent an die Oberfläche gebunden sind. Berücksichtigt man, daß nach erfolgter Extraktion sich der Neigungswinkel der LPGs ändert, kann ein weitaus höherer Wert vermutet werden. Erstaunlicherweise ist LGP9000 in der Lage auch bei einem LB-Übertrag bei 35 mN/m und der dabei auf Grund der molekularen Fläche von etwa 120-150 Å² pro LGP nicht erwarteten vollständigen Streckung des Glycopolymer diesem Wert sehr nahe zu kommen. Dies kann als Indiz für die intra- und intermolekulare Stabilisation des Glycopolymer-Spacers durch Wasserstoffbrücken gewertet werden. Im Gegensatz zum PEO, das bei einem Molekulargewicht unter 10.000 Dalton als PEG bezeichnet wird,^[1414] kommt es zwar auch zu PEG-Lipidpolymer analogen Wechselwirkungen bei denen ein komplexes Wechselspiel zwischen hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken zwischen Wasser und PEG und PEG-PEG-Wechselwirkungen vorliegt^[1415-1417], doch sind die im Fall von LGP zu erwartenden Wasserstoffbrückenbindungen im Gegensatz zu PEG in der Lage den Spacer effizient zu stabilisieren.

Ein Problem liegt in der Präparation gemischter Lipidmembranen, in denen nur ein kleiner Teil der Lipide kovalent an die Oberfläche gebunden ist, und der größte Teil der Lipide beweglich ist. Das gewählte Verhältnis von 1-Mercaptohexan/12,12'-Dithiobis[dodecan-1-amin] (24) von 100:1 führt rein rechnerisch zu einer effektiven Aminoalkylthiolkonzentration von etwa 2 %. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Membranpräparationen wurden aber auch mit höheren Konzentrationen bis zu 10 % effektiver Aminoalkylthiolkonzentration durchgeführt. Die Qualität der Membran zeigte innerhalb dieses Bereichs keine signifikante Änderung.

Verdeutlich man daher die mittlere Verteilungsdichte der SAMs mit photoreaktiver Funktionalität von etwa 5 % in Abbildung 157, so wird die starke Einschränkung des lateralen

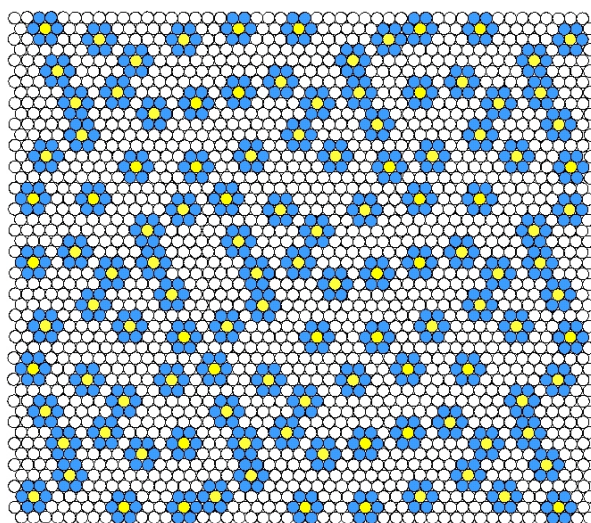


Abbildung 157 Schematische Darstellung einer LPG-Monoschicht mit hexagonaler Packung. Die gelben Kreise symbolisieren kovalent an die Oberfläche gebundene LGPs, die um diese hexagonal angeordneten Lipide (als blauer Kreis dargestellt) stehen mit diesen im direkten Kontakt und sind in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Das Bild verdeutlicht, daß auch wenn die Lipide zweiter Ordnung (weiße Kreise) als völlig mobil betrachtet werden, starke Einschränkungen für eine makroskopische Lipiddiffusion vorliegen. Diese ist durch den makromolekularen Charakter und der LPG reduziert.

Bewegungsfreiraumes anschaulich. Die elektrochemischen und fluiden Eigenschaften der LPG-tBLM sind daher von besonderem Interesse.

Der finale Schritt der Membranpräparation liegt nach erfolgter photochemischer Anbindung des LGP9000-Films in der Komplettierung der proximalen Membranhälfte durch Vesikelfusion. Hierzu werden Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhyPC)-Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet. Dieser Vesikeldurchmesser hat sich bei der DPTL-tBLM-Präparation in Kapitel 5 bewährt. Die Vesikelfusion verläuft auf Grund der relativ hydrophoben LGP-SAM-Schicht zufriedenstellend. Der mit ANB funktionalisierte SAM hat einen fortschreitenden Kontaktwinkel von 93° , während der zurückziehende Kontaktwinkel 90° beträgt. Nach der Funktionalisierung mit LGP verringern sich beide Kontaktwinkel geringfügig. Der fortschreitenden Kontaktwinkel beträgt nun 89° , der zurückziehende Kontaktwinkel 80° . Die auftretende Hysterese kann mit einer zunehmenden Oberflächenrauigkeit und einer nicht molekular dichten Packung der hydrophoben Gruppen erklärt werden. Es werden hochohmige tBLMs mit exzellenter Oberflächenentkopplung und lokaler Fluidität erhalten. Sie werden mit Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPS)

(Abbildung 156) und Elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS) (Abbildung 158) charakterisiert. Die Impedanz-Spektren erlauben es die Kapazität und den Widerstand der Lipid-Mono- und Doppelschichten durch Simulation der Daten gemäß des Äquivalentschaltkreises in Abbildung 158 zu berechnen. [67, 869, 870]

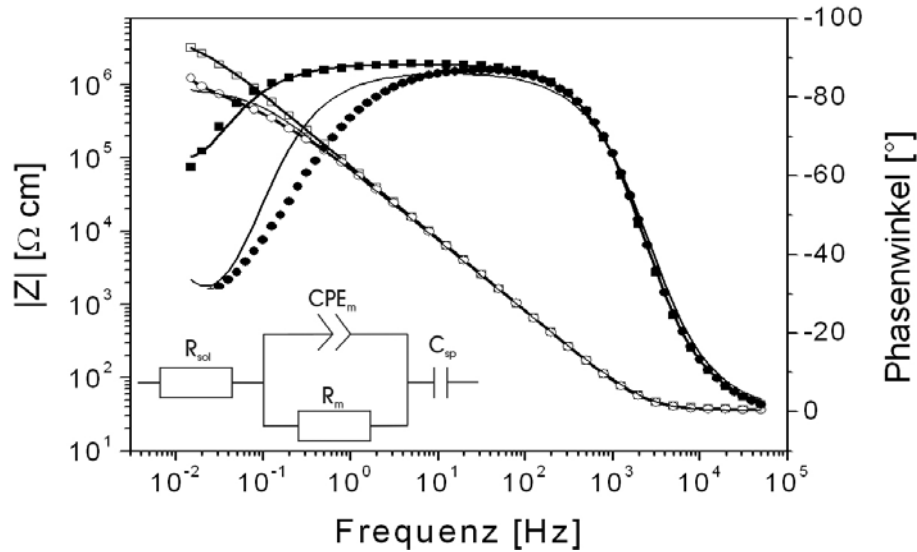


Abbildung 158 EIS-Analyse (Bode-Plot) der LGP9000 Monoschicht vor (●), (○) und nach Vesikelfusion (□), (■). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die simulierten Daten. Die Impedanz Z ist gegen die Frequenz aufgetragen und durch (○), (□) symbolisiert; der Phasenwinkel, aufgetragen gegen die Frequenz ist mit (●), (■) symbolisiert. Unten links ist der für die Simulation verwendete Ersatzschaltkreis abgebildet.

Der Äquivalentschaltkreis besteht aus einem RC-Glied, das die Lipidmono- oder Doppelschicht repräsentiert, einem konstanten Phasenelement CPE_{mem} und Widerstand R_{mem} der Membran, dem Widerstand der Elektrolytlösung R_{sol} und der Kapazität des Spacers C_{sp} welche die diffuse Doppelschicht in Nachbarschaft zur Goldoberfläche mit einschließt. Der Bode Plot in Abbildung 158 zeigt eine signifikante Zunahme des Membranwiderstand vom der LGP-Monoschicht zur Doppelschicht-Membran. Die charakteristischen Eigenschaften sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die gemessenen Daten variierten für die LGP9000 Membran üblicherweise zwischen 1 to 3 $M\Omega\text{ cm}^2$ während einzelne Experimente Werte weit über 10 $M\Omega\text{ cm}^2$ für den Membranwiderstand erreichten. Die Reproduzierbarkeit solch hoher Werte ist auf Grund des komplexen und mehrstufigen Aufbaus der tBLM sehr schwierig. Sie stimmen daher recht gut mit denen der BLM überein. Die Funktionalität der Membran, die lokale Fluidität und die Reservoirigenschaften des Submembranraumes wurden mit Hilfe des Ionentransporters Valinomycin, einem kaliumionophoren Antibiotikums aus *Streptomyces fulvissimus*,^[1356] untersucht. Valinomycin transportiert wie in Kapitel 5 beschrieben selektiv Kalium über die

Membran, indem es dieses in seinem hydrophilen Inneren einlagert, während sein hydrophobes Äußeres den transmembranen Kaliumtransport ermöglicht. Hierzu ist eine fluide Membran notwendig. Ein spezifischer Membrantransport macht sich durch eine Zunahme der Leitfähigkeit bzw. Abnahme des Widerstands bemerkbar. Der Widerstand fällt dann in den $k\Omega$ -Bereich ab. In der Gegenwart einer 0,1 M Kaliumionenkonzentration kann eine Widerstandsabnahme bis zu drei Größenordnungen beobachtet werden, die mit vormalig publizierten Werten übereinstimmt.^[57] Die durchschnittliche Entkopplung der Membran von der Goldoberfläche beträgt 11,5 nm, wovon etwa 3 nm auf den SAM entfallen.

	$R_{\text{m}}/M\Omega \text{ cm}^2$ experimentell	$A_{\text{CPE}}/$ (F cm^{-2}) ^a	α	d/nm experimentell	d/nm berechnet
binärer SAM	1.4±0.5	2.0±0.1	0.96	2.5±0.2	2.5
Azide funktionisierter Binärer SAM	0.05±0.01	8.0±3	0.96	3.0±0.1	3.0
Lipo-glycopolymer, Monoschicht vor Vesikelfusion	0.76±0.1	2.7±0.2	0.96	11.5±1.5	12
Lipid-Doppelschicht Nach Vesikelfusion	2.1±1.0	2.5±0.2	0.98	14.5±2	14.5
Lipid-Doppelschicht + Valinomycin	0.01±0.002				

Tabelle 14

Tabellarische Zusammenfassung der charakteristischen Werte der LGP9000 gestützten Membran. Die Simulationsparameter der EIS-Daten (Membrankapazität und Widerstand) werden von den Spektren in Abbildung 158 erhalten, A_{CPE} ist der Simulationsparameter für das CPE das von der ZVIEW Simulationsroutine erhalten wird. α repräsentiert den Verteilungsparameter der Zeitkonstante, für $\alpha=1$, wird CPE ein rein kapazitives Element. Die SPR-Daten (Messung der Schichtdicken) werden mit Molekülgrößen verglichen die durch Simulation der Moleküle mit CS Chem3D Pro erhalten werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die photochemische Immobilisierung von funktionell orientierten supramolekularen Architekturen auf Goldoberflächen angewendet werden kann. Die resultierenden tBLMs erreichen große vertikale Entkopplungen der Membran von der Festkörperoberfläche, die mehr als 14 nm betragen. Daraus folgt ein durch den Glycopolymer-Spacer aufgespannter Submembranraum mit einer Entkopplung von etwa 8,5 nm. Der funktionelle Ionentransport von Kaliumionen durch Valinomycin verdeutlicht eine ausreichende lokale Fluidität, die mit einem guten Membranwiderstand kombiniert ist. Das System kommt im Gegensatz zu DPTL (Kapitel 5) ohne die aufwendigere Präparation von

ultraglattem Gold aus und eröffnet neu Möglichkeiten im Bereich der biokompatiblen Systeme. Das neue LGP-tBLM-System stellt durch seine große vertikale Schichtdicke, Stabilisierung der Glycopolymerschicht und seinen elektrischen Eigenschaften ein interessantes System für die molekulare Elektronik und andere bionanotechnologische Anwendungen dar.

„Der letzte Schritt der Vernunft ist es
anzuerkennen, daß es unendlich viele
Dinge gibt, die über sie hinausgehen“
Pensée Nr.188 Blaise Pascal

7 Plasmapolymere als Spacer für tBLMs

Die in den Kapiteln 5 und 6 beschriebenen biomimetischen Membranmodelle besitzen ausgezeichnete elektrische und fluide Eigenschaften. Der funktionelle Einbau von Membranproteinen/Transportpeptiden ist bei lateraler Verdünnung des Thiolipid-SAM mit nicht lipidfunktionalisierten Spacermolekülen (Kapitel 5), bzw. Lipo-Glycopolymer(LGP)-tBLMs (Kapitel 6) möglich. Der cytosolanaloge Submembranraum ist jedoch auch bei der Anwendung der LGP-tBLMs durch die molekularen Eigenschaften und Präparationsmethoden derzeit auf eine vertikale Entkopplung von etwa 10-15 nm beschränkt. Da die Bereitstellung von Spacer-Architekturen mit einer vertikalen Entkopplung zwischen Membran und Sensoroberfläche von mehr als 10 nm unter Beibehalt sehr guter elektrischer Eigenschaften (einige $M\Omega\text{ cm}^2$) und guter Fluidität mit den derzeitigen literaturbeschriebenen Verbindungen und Präparationsmethoden nicht erreicht wird, ist die Entwicklung neuer Spacer-Architekturen notwendig.

Ein wesentliches Problem bei Oberflächenentkopplungen von mehr als 10 nm liegt beim Einsatz polymerer Spacersysteme in der Tertiärstruktur von Lipid-Oligo/Polymeren mit terminaler Oberflächenfixierung, bzw. die fehlende Anwendbarkeit entsprechend langer LPGs (Kapitel 6). Oberflächenverankerte Langmuir-Multischichtsysteme erlauben zwar prinzipiell eine iterativ vergrößerbare Spacerschichtdicke und erreichen Schichtdicken von etwa 9 nm mit guten Widerstandswerten von etwa $2,5 M\Omega\text{ cm}^2$, besitzen aber nur Diffusionskonstanten von $0,1 \mu\text{m cm}^2$.^[144] Die lateral zur Verfügung stehenden Freiräume lassen sich allerdings kaum wirkungsvoll kontrollieren. Da die Eigenschaften dickerer Filme nicht beschrieben sind und die verwendeten „Zellulose-Bürsten“ zu einem hohen Grad mit hydrophoben Gruppen modifiziert sind die einen hohen Anfangswiderstand liefern, entsprechen diese Systeme nicht dem hier verfolgten Prinzip hydrophiler Spacer. Das zuvor von den gleichen Autoren beschriebene hydrophilere System erreicht dagegen nur Widerstände von $0,5 M\Omega\text{ cm}^2$.^[877]

7.1 Plasmachemische Stoffumwandlungen – definierte Architekturen

Plasmachemische Polymerisationsmethoden stellen auf Grund mehrerer Merkmale interessante Möglichkeiten zur Entwicklung einer neuen Spacergeneration dar. Biomimetische Membranen

mit großer Spacerschichtdicke sollen eine partielle kovalente Anbindung von Lipiden über hydrophile Spacermoleküle an die Sensoroberfläche erlauben und eine geringe Oberflächenrauigkeit im Bereich weniger Nanometer aufweisen. Die Plasmapolymersation elektrophiler Monomere erlaubt die Ausbildung von elektrophilen Polymerschichten mit eben diesen Merkmalen. Die Vorteile dieser eher exotischen Methode und ihre Anwendung im Rahmen des tBLM-Konzepts werden in Kapitel 7.2 beschrieben. Bevor allerdings auf die Anwendung im Rahmen der tBLM-Architekturen eingegangen wird, soll die eher unbekanntete Methode der plasmachemischen Stoffumwandlung eingeführt werden.

Plasmachemische Stoffumwandlungen sind sowohl in der Natur als auch bei technischen Prozessen von Bedeutung.^[1418-1420] Ein Plasma (*gr. das „Gebilde“*), ist ein Gemisch freier Elektronen, positiven Ionen und Neutralteilchen eines Gases die sich durch ständige Wechselwirkung untereinander und mit Photonen in verschiedenen Anregungszuständen befinden. Der Plasmazustand wird auch als 4. Aggregatzustand bezeichnet und ist quasineutral, das heißt, ein Plasma hat im Mittel die gleiche Anzahl positiver und negativer Ladungen. Es ist diamagnetisch und besitzt eine große elektrische Leitfähigkeit. Plasmen werden durch Stoßionisation mit Elektronen oder durch eine Gasentladung erzeugt, wobei auch Laser, radiofrequente elektromagnetische Felder, nukleare Reaktionen und Schockwellen zur Erzeugung eines Plasmas führen können.^[1418] Bekannte Beispiele für Plasmavorgänge findet man angefangen bei alltäglichen Erscheinungen wie zum Beispiel Gewitter, elektrische Funken und Neon-Reklameröhren.

Chemische Reaktionen im Plasma elektrischer Entladungen sind seit mehr als 200 Jahren bekannt. Wichtige historische Meilensteine waren:^[1421]

- Synthese von H₂O in der H₂/O₂-Funkenentladung (H. Cavendish 1781)
- Fixierung des Luftstickstoffs in der Funkenentladung (H. Cavendish 1784, J. Priestley 1785)
- Erster Ozonistor (W. v. Siemens 1857)
- Erste industrielle Erzeugung von Stickoxiden in der Bogenentladung (Birkeland-Eyde-Prozeß 1905)
- Erstes industrielles Hochleistungsplasmatron zur Synthese von Acetylen (Hüls-Prozeß 1940)

Gegenwärtig gewinnen sowohl thermische als auch nichtthermische Plasmen bei der Stoffumwandlung und der reaktiven Oberflächenbehandlung (Plasmaätzen, Plasmabeschichten) zunehmend an Bedeutung.

Man unterscheidet zwei Arten von plasmachemischer Stoffumwandlung, die thermische Plasmachemie und die nichtthermische Plasmachemie. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine radiofrequente elektromagnetische Anregung zur Erzeugung eines sogenannten kalten Plasmas bei niedriger Monomerkonzentration angewandt (das Monomer wird mit niedriger Konzentration in ein niedriges Restvakuum eingespeist).



Abbildung 159 Reaktor für die Plasmapolymersation in einem in Betrieb. Das leuchtende Plasma wird durch ein radiofrequentes elektromagnetisches Wechselfeld von 13,56 MHz erzeugt.

Details der Methode sind in Publikation XI und der darin zitierten Literatur beschrieben.

7.2 Biomimetische Membranen (tBLMs) auf der Basis von plasmapolymersiertem Maleinsäureanhydrid

Die in Kapitel 7.1 erwähnten Merkmale der Plasmapolymersation werden nun im Bezug auf die Anwendung im Rahmen der tBLM Präparation zusammengefasst. Das Ziel Polymerschichten/Spacer mit molekular ebenen Oberflächen zu synthetisieren erfordert eine stabile Kopplung der polymeren Spacerschicht an die Festkörperoberfläche, einen definierten Schichtzuwachs zur Steuerung der Schichtdicke und reaktive Gruppen in der polaren Polymerschicht die eine nachträgliche Anbindung von Lipiden erlauben. Idealerweise soll die

Polymerschicht auf Grund ihrer Eigenschaften die Möglichkeit bieten, Lipide nur an der Oberfläche einzuführen.

Der Plasmaprozess führt zur Anregung neutraler Moleküle die eine Reihe reaktiver Spezies (Ionen, Radikale, angeregte Zustände) liefert. Er ist daher in der Lage Monomere zu aktivieren, die mit klassischen Methoden nicht oder nur als Copolymere polymerisiert werden können. Ein solches Beispiel ist Maleinsäureanhydrid. Maleinsäureanhydrid kann nicht mit klassischen Methoden homopolymerisiert werden, sondern nur durch energiereiche Strahlung (Aussetzen von Röntgenquellen oder UV-Strahlung). In der Literatur sind daher in erster Linie Copolymere beschrieben, die auf klassischen oder plasmachemischen Weg synthetisiert werden.^[1422]

Folgende Eigenschaften machen Maleinsäureanhydrid (MASA) als Monomer für die Plasmapolymerisation von tBLM-Spacern interessant:

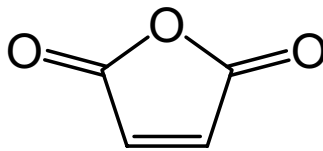


Abbildung 160 Chemische Struktur von Maleinsäureanhydrid

- A) MASA lässt sich im radiofrequenten Plasma über die Doppelbindung polymerisieren
- B) Plasmapolymerisiertes MASA besitzt eine hohe Dichte an reaktiven, elektrophilen Anhydridgruppen (Maleinsäureanhydrid (Rate 9,96) hydrolysiert 10 mal schneller als Bernsteinanhydrid (Rate 1) und Essigsäureanhydrid (Rate 0,99))
- C) Die Anhydride können mit nucleophilen Lipidtermini kovalent modifiziert werden
- D) Nicht mit Lipid funktionalisierte Anhydride hydrolysieren im wässrigen Medium unter Ausbildung stark polarer COOH-Gruppen – interessant für die Bildung polarer Spacer
- E) Die Art des Plasmas (kontinuierlich oder als Pulssequenz) erlaubt in Abhängigkeit der zur Plasmaerzeugung eingestrahlten Leistung die Einstellung der Polymerfilmeigenschaften: Grad des Erhalts der funktionellen Gruppen, Stärke der Polymernetzung und der damit einhergehenden Quelleigenschaften/lateralen Freiräume.
- F) Die Schichtdicke lässt sich über die Polymerisationsdauer in einem Bereich von etwa 10-15 nm als untere Grenze der Schichtdicke, und 50-60 nm als obere Grenze mit geringer Oberflächenrauigkeit im Bereich weniger nm einstellen

Alle hier beschriebenen Experimente sind Gegenstand der Publikationen XI-XV im Anhang dieser Arbeit.

Für die Anwendung von MASA als tBLM Spacer werden müssen folgende Punkte untersucht / sichergestellt werden, sie sind Gegenstand von Publikation XI:

- 1) Der Einfluß der Polymerisationsbedingungen auf den Erhalt der Anhydridfunktion
- 2) Einfluß der Polymerisationsbedingungen auf die Polymerisation und die Vernetzung der Polymerketten
- 3) Stabile Anbindung der Polymerschicht an die Festkörperoberfläche
- 4) Ermittlung von optimalen Reaktionsbedingungen zur Anbindung von Lipiden und anderen nukleophilen Molekülen
- 5) Charakterisierung des plasmapolymersierten MASA und seiner Modifikationen

Ryan et al. beschrieben als erste, daß der Grad des Erhalts der Anhydridfunktion durch die Einstellung der Pulssequenz gesteuert werden kann. Die gepulste Plasmapolymersation (*engl. pulsed plasma polymerization engl.*, DC, $DC = t_{on} / (t_{on} + t_{off})$) kann durch die Steuerung der Peak-Leistung den Erhalt der reaktiven Anhydridfunktion beeinflussen um unterschiedliche stark vernetzte plasmapolymersierte MASA zu erhalten.^[1423] Wird das Polymer durch gepulste Plasmapolymersation synthetisiert, wird es als PPPMASA abgekürzt. Da die im Plasma gebildeten reaktiven Spezies nicht nur durch Anregung der Doppelbindung polymerisieren, sondern auch über radikalische Zustände Abstraktions-, Insertions- und Rekombinationsreaktionen eingehen, können die kurzkettigen, in der Gasphase gebildeten Oligomere auf der Oberfläche vernetzt werden. Es scheint daher möglich, daß PPPMASA durch die Ausbildung eines Netzwerkes auf Gold oder Siliziumoberflächen hinreichend stabil die Oberfläche bedeckt.

Erste Experimente werden unter literaturbeschriebenen Standardpolymerisationsbedingungen ausgeführt.^[1423, 1424] Die eingestrahelte Peakleistung liegt bei 100 W, der DC bei 1/40 ($t_{on} + t_{off}$ in ms/ms). Die erhaltenen Polymerfilme von 20 – 40 nm Schichtdicke zeigen unter wäßrigen

Bedingungen nur eine geringe Stabilität. Schon nach wenigen Minuten lösen sich makroskopisch mit bloßem Auge erkennbare dünne Polymerfilmsegmente von der Oberfläche. Die PPPMASA-Schicht muß daher kovalent an die Oberfläche gebunden werden. Hierzu werden Allylthiole oder Silane auf den Gold- oder Siliziumträgern (letztere eignen sich im besonderen Maße für die nachfolgend beschriebenen IR-Untersuchungen der Polymere) assembliert. Polymerisiert man MASA auf die so modifizierten Träger, ist die PPPMASA-Schicht auch in Wasser stabil (Messungen mit dem Oberflächenprofilometer - siehe Kapitel 4 - zeigen gleichbleibende Schichtdicken mit Schwankungen unter 5 %).

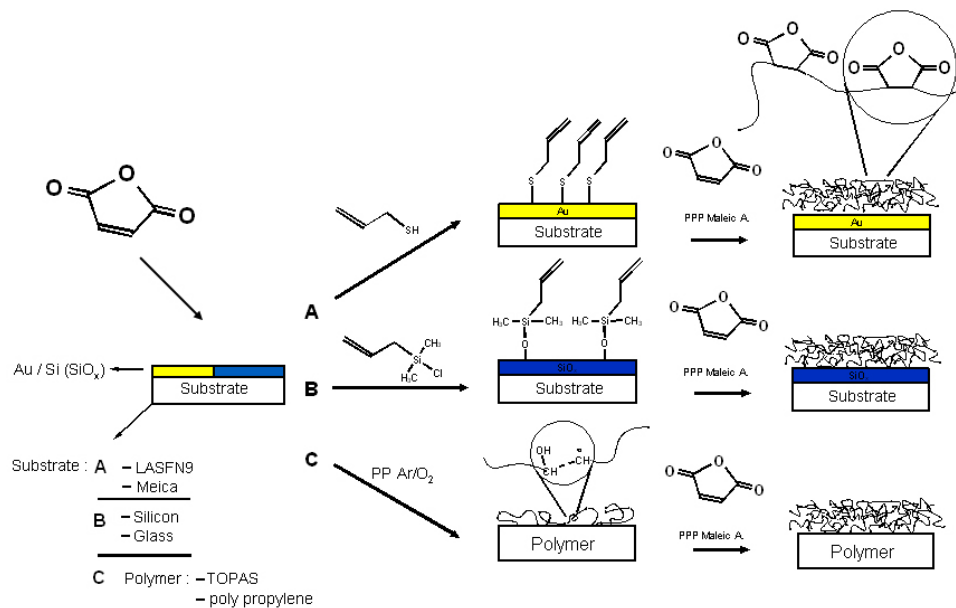


Abbildung 161 Oberflächenmodifikation von Gold- und Siliziumträgern mit allylterminierten SAMs zur kovalenten Immobilisierung von PPPMASA-Polymerfilmen

Analog zu den verwendeten Gold- und Siliziumträgern ist es möglich polymere Träger aus „Kunststoffen“, zum Beispiel Polypropylen, Polystyrol oder TOPAS, kovalent mit PPPMASA zu modifizieren (Publikation XIII). Hierzu wird der polymere Träger zuerst bei erhöhter Leistung für eine Minute einem kontinuierlichen Ar/O₂ Plasma ausgesetzt, um die Oberfläche zu aktivieren. Anschließend Polymerisation von MASA unter den oben angegebenen Bedingungen erlaubt die kovalente Anbindung von PPPMASA Schichten.

Um den Einfluß der Polymerisationsbedingungen auf die PPPMASA-Filme zu untersuchen, wird MASA mit verschiedenen Pulssequenzen auf die SAM-beschichteten Träger polymerisiert. IR-Messungen zeigen, daß bei niedriger Äquivalenzleistung mit einem DC von 1/40 eine hervorragende Retention der Anhydridfunktion erreicht wird. Die beiden

niedermolekularen Verbindungen Maleinsäureanhydrid (Monomer) und Bernsteinsäureanhydrid (chemische Struktur der Repetiereinheit des PPPMASA) zeigen deutlich die Retention der Anhydridfunktion. Diese wird durch die beiden Banden bei 1780 cm^{-1} und 1860 cm^{-1} charakterisiert. Wie für zyklische Anhydride typisch, ist hier die Bande bei 1860 cm^{-1} schwach, während die Bande bei 1780 cm^{-1} stark ausgeprägt ist.

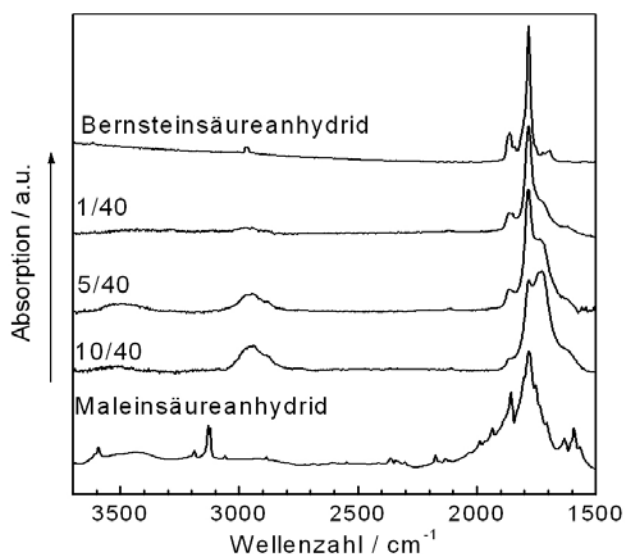


Abbildung 162 IR-Spektren von Maleinsäureanhydrid (Monomer), Bernsteinsäureanhydrid (Repetiereinheit des PPPMASA) und den bei verschiedenen Pulssequenzen polymerisierten MASA-Plasmapolymere

Abbildung 162 zeigt die Abnahme der Banden der zyklischen Anhydridfunktion, mit längeren t_{on} -Zeiten. Die eingestrahlte Leistung führt verstärkt zu Nebenreaktionen und einem deutlichen Rückgang der Anhydrid-Bande, wenn die Pausen zwischen den längeren t_{on} -Zeiten konstant gehalten werden.

Analytische Methoden sind für oberflächengebundene PPPMASA limitiert. Da auf Grund mangelnder Löslichkeit und des makroskopischen Probencharakters Messungen in homogener Lösung nicht möglich sind, wird die Anwendung Grenzflächenanalytischer Methoden notwendig. Neben der IR-Spektroskopie bieten sich Messungen mit dem Oberflächenprofilometer, AFM und Kontaktwinkelmessungen an. Zusätzlich können XPS und Elektrochemische Impedanzspektroskopie die schwierige Analyse der oberflächengebundenen Plasmapolymere komplettieren.

Mit Hilfe der XPS ist eine Aussage über die chemische Zusammensetzung, bzw. das Vorhandensein von Elementen in dezidierten Bindungszuständen und deren stöchiometrischen Verhältnis möglich.

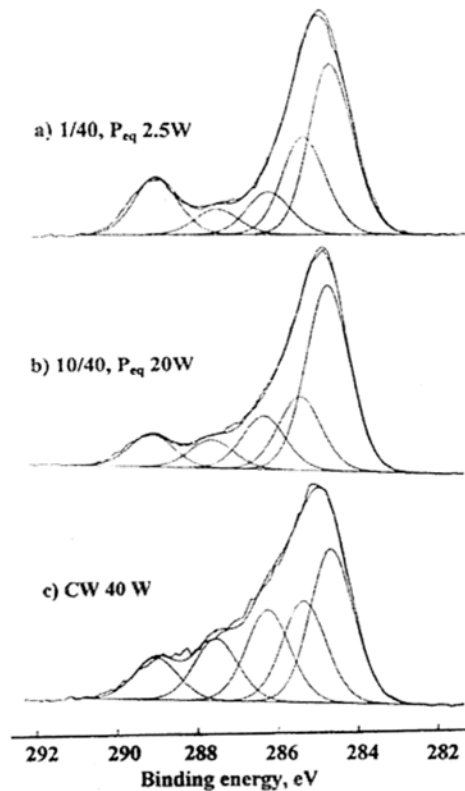


Abbildung 163 XPS C(1s) Spektren von PPPMASA, polymerisiert mit unterschiedlichen Pulssequenzen oder kontinuierlicher Plasmaanregung (continuous wave, cw)

Anhand der XPS-Spektren in Abbildung 163 könne die Verhältnisse zwischen C/O berechnet werden. Nach der Plasmapolymersation bei 1/40, 100 W ist die totale Sauerstoffkonzentration mit $O/C = 0,33$ gegenüber $O/C = 0,43$ im Monomer leicht reduziert. Die anderen Bedingungen zeigen allerdings schwankende Werte zwischen 0,27 und 0,35, was auch auf postplasmatische Reaktionen der Träger und während dem kurzen Kontakt mit der Atmosphäre nach entfernen der Träger aus dem Reaktor erklärt werden kann. Die in Abbildung 163 dargestellte Erhöhung der cw-äquivalenten Energiezufuhr während der Polymerisation (P_{eq}) zeigt eine signifikante Verbreiterung der Signale des alpha-Kohlenstoffatoms. Im gleichen Maß geht der Anteil des C(O)O-Peaks bei hohen Energien zurück, der sowohl das Anhydrid Signal, als auch mögliche Ester oder auch Carbonate (wenn vorhanden) einschließt.

Hochauflösende XPS-Spektren erlauben die spezifische Analyse des Einflusses der Polymerisationsbedingungen auf die chemische Beschaffenheit der PPPMASA-Filme (Abbildung 163 und Abbildung 164). Es können fünf verschiedene C-O-Bindungstypen festgestellt werden (Tabelle 15). Die C(O)N-Bindungsbildung kann eindeutig nachgewiesen werden.

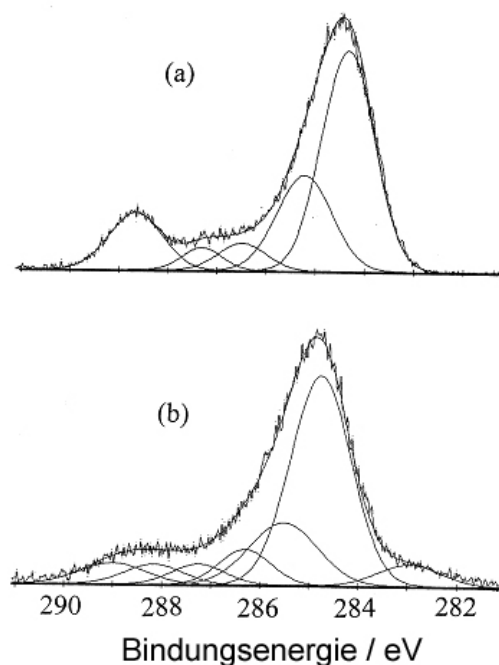


Abbildung 164 Hochaufgelöste XPS-Spektren C(1s) von PPPMASA mit a) DC 1/40, 100 W, frisch und b) nach erfolgter Reaktion mit Decylamin

Funktionelle Gruppe	?	<u>C</u> -C	<u>C</u> -C-O	<u>C</u> -O	<u>C</u> =O	<u>C</u> (O)N	<u>C</u> (O)O
Bindungsenergie in eV	282.8	284.6	285.5	286.7	287.5	288.1	288.9
Relative Peakflächen							
vor Extraktion	-	52.3	23.9	5.9	4.1	-	13.8
nach Extraktion	5.9	53	18.0	7.7	4.6	4.9	5.9

Tabelle 15 Relative Verteilung der funktionellen Gruppen anhand der XPS Profile aus **Abbildung 164** (PPPMASA 1/40, 100 W, vor und nach Reaktion mit Decylamin).

Bevor näher auf die chemische Modifizierung mit Decylamin eingegangen wird, soll die Veränderung der PPPMASA-Filme an Luft betrachtet werden (Abbildung 165). Die beiden Abbildungen zeigen deutlich die Bedeutung der eingestrahelten Leistung. Niedrige Energie bei kontinuierlicher Plasmaanregung führt zu ähnlichen Ergebnissen wie 100 W-Peaks kurzer Dauer und ausreichend langen Pausen zwischen den Peaks. Schon nach einem Tag an Luft, wird eine signifikante Hydrolyse des Anhydrids beobachtet. Über längere Zeitspannen von einer Woche zeigt es sich, daß der CW-Film, evtl. auf Grund eines höheren Vernetzungsgrades nicht vollständig hydrolysiert. Ein Effekt der bei höheren Energien beobachtet wird.

Eine Untersuchung der frisch polymerisierten PPPMASA-Schichten mit elektrochemischen Methoden zeigt, daß die Annahme eines höheren Vernetzungsgrades kombiniert mit einer verstärkten Degradation der Anhydridfunktion angenommen werden kann (Abbildung 166).

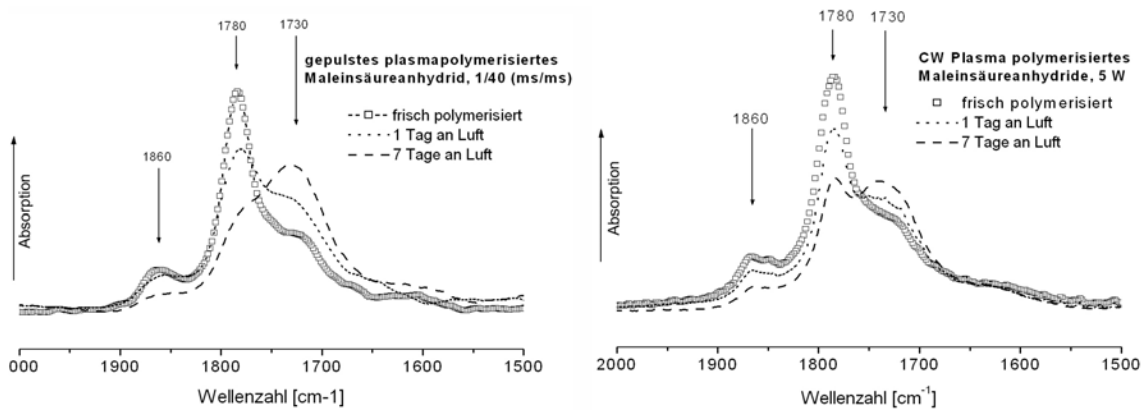


Abbildung 165 FT-IR Spektren der Hydrolyse von plasmapolymersierten MASA-Filmen. Linke Abbildung, Polymerisation durch gepulstes Plasma, 1/40, 100 W, rechte Abbildung 5 W CW-Plasma

Der Einfluß der Polymerisationsparameter, und damit der Eigenschaften der PPPMASA-Filme auf das elektrochemische Verhalten von PPPMASA-Filmen ist beachtlich. Während 10/40 und CW-Plasmen nur eine geringe zeitliche Änderung ihrer elektrischen Eigenschaften zeigen, kann für das 5/40 und 1/40 ein zweiphasiges Verhalten beobachtet werden. Nach einer starken, anfänglichen Abnahme der Impedanz erreichen diese Filme sehr niedrige Werte. Sie scheinen komplett hydrolysiert zu werden. Aus der Steigung ist die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse ableitbar. Zuerst werden die äußeren Anhydride hydrolysiert, bevor das Wasser weiter in den Film vordringt.

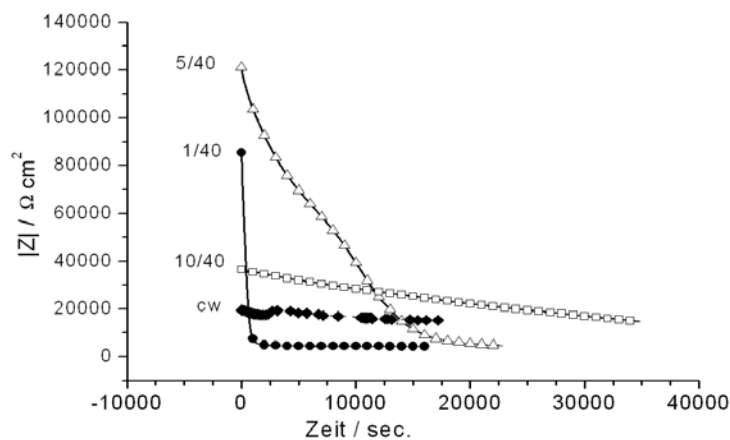


Abbildung 166 Änderung der Impedanz Z mit fortschreitender Hydrolyse von PPPMASA in 0,1 M KCl

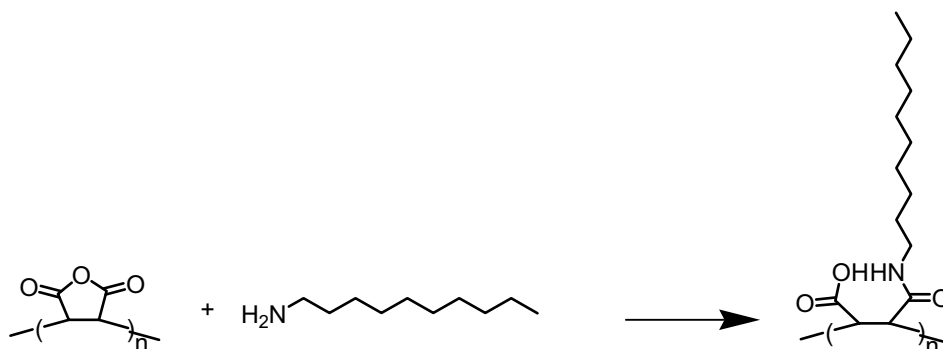


Abbildung 167 Schematische Darstellung der Reaktion von Decylamin mit PPPMASA

Die Reaktion von Decylamin mit PPPMASA verläuft schnell. Die Änderung des Kontaktwinkels ist eine einfache Methode zur Verifikation der Reaktion. Frisches PPPMASA zeigt einen Kontaktwinkel von etwa 57 ° (fortschreitender, 47 ° zurückziehender Kontaktwinkel). Nach der Funktionalisierung erhöht sich der Kontaktwinkel auf 93 °.

Die kovalente Modifikation kann neben der Analyse der XPS-Peaks (Abbildung 164) auch IR-spektroskopisch verfolgt werden (Abbildung 168).

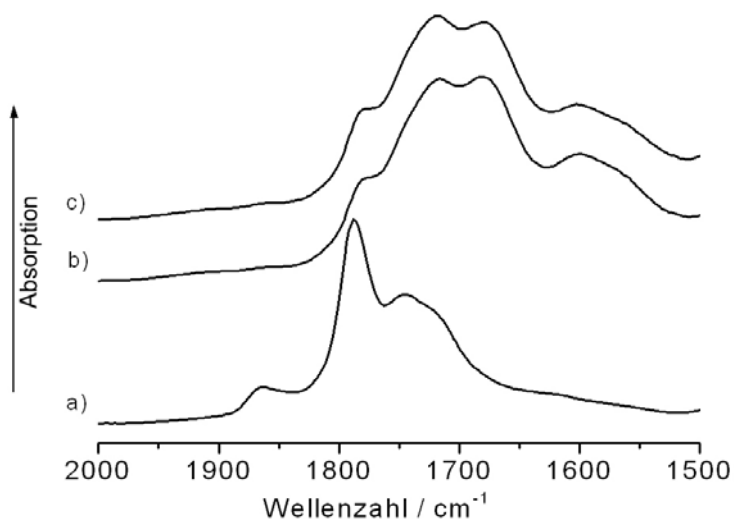


Abbildung 168 FT-IR-Spektren von PPPMASA, 1/40, 150 W (a); nach Reaktion mit Benzylamin (b) und Decylamin (c)

Beide primären Amine zeigen die Ausbildung einer Amidbindung. Die Bande bei 1730 cm⁻¹ repräsentiert die Carboxylgruppe. Die Peaks bei 1680 cm⁻¹ und 1600 cm⁻¹ repräsentieren die Amidbanden I und II. Die Intensität der Carboxyl- und der Amid I-Bande zeigt die bei einer Aminolyse der Anhydridgruppe zu erwartende, vergleichbare Intensität beider Banden. Eine komplette Umsetzung der Anhydridfunktion findet auf Grund der leichten Vernetzung nicht

statt. Die zusammen mit K. Bender und A.T. A. Jenkins durchgeführten, calciumvermittelten Vesikelfusionen auf reinen, prähydrolysierten PPPMASA-Filmen (Publikation XIV) oder Decylamin modifizierten PPPMASA-Filmen (Publikation XV) zeigt nur ungenügende elektrische Eigenschaften mit Widerständen von einigen $k\Omega$ bei Kapazitäten um $1 \mu F cm^2$.

Eine Anbindung von Lipiden über die Calcium-Chelatbindung führt zwar zu stabilen Wechselwirkungen zwischen PS-haltigen Membranen und dem PPPMASA-Film, sie erlaubt jedoch nicht die Ausbildung hochohmiger Membranen. Auch die Fluidität wird durch die ionische Wechselwirkung merklich reduziert (von $17 \mu m^2 s^{-1}$ auf $2 \mu m^2 s^{-1}$). Da Calcium in eine Reihe physiologischer Funktionen^[1425] der Signaltransduktion^[1426], von der Apoptose bis zur Nervenleitung^[1427] involviert ist, erscheint eine definierte Modifikation des an die proximale Membran anschließenden Submembranraumes mit Calciumionen für eine allgemeine Anwendbarkeit der Membran ungünstig.

Eine interessante Anwendung der PPPMASA-Filme besteht in der kovalenten Anbindung biologischer Moleküle für den Aufbau von Biosensoren (Publikationen XII und XIII). Als Beispiel wird die Präparation eines PNA-Chips (PNA = Peptide Nucleic Acide) für das Studium der DNA-Hybridisierung beschrieben. Hierzu werden PPPMASA-Filme mit Amino- oder Amid-terminierter PNA modifiziert (Abbildung 169).

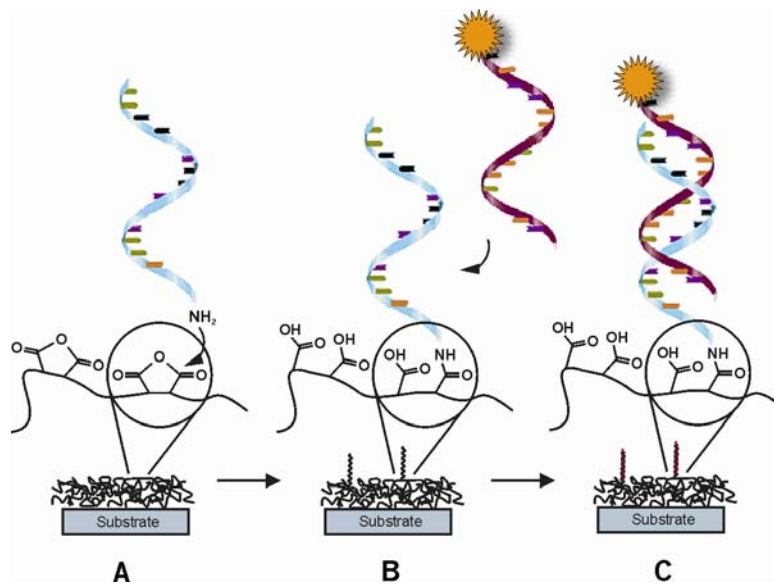


Abbildung 169 PPPMASA-Filme für die Immobilisierung von Biomolekülen

Die DNA-Hybridisierung kann auch als Sonde für die kovalente Anbindung von Submonolagen aus wässrigem Medium mikromolarer Lösungen über eine terminale

Amino/Amid-Gruppe herangezogen werden. Da die Hybridisierung mit Hilfe fluoreszenzfunktionalisierter DNA analysiert wird, kann durch hohe Sensitivität der Fluoreszenzanalyse auch bei geringer lateraler Modifikationsdichte mit amin- oder amid-funktionalisierter PNA die Reaktion nachgewiesen werden. Trotz der geringen Nukleophilie der Amide ist deren Reaktion mit Anhydriden in der Literatur bekannt.^[1428-1430] Sie führt im Fall von PNA zu einer stabilen Anbindung der PNA an die PPPMASA-Oberfläche die nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann, wie durch Kontrollexperimente mit prähydrolysierten PPPMASA Filmen und COOH-terminierten SAMs gezeigt wird (Publikation XII).

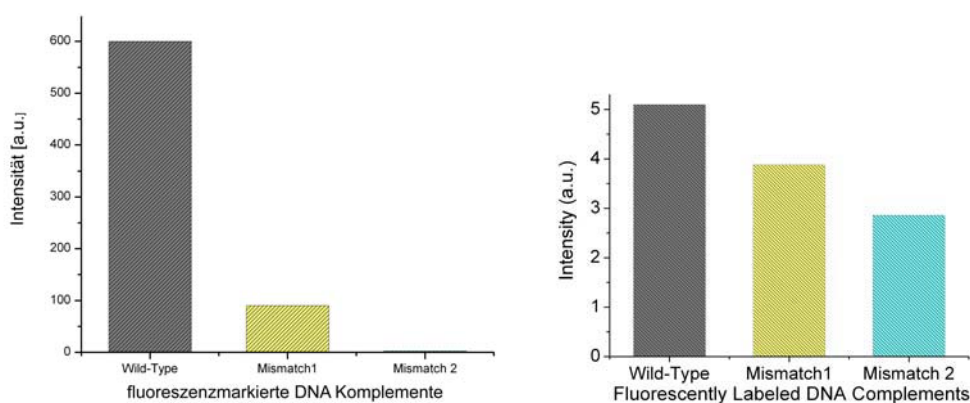


Abbildung 170 Fluoreszenzintensitäten gemessen auf Polypropylenträgern modifiziert mit PPPMASA, modifiziert mit amino-terminierter PNA (linkes Bild) und amid-modifizierter PNA (rechtes Bild)

Ein weiteres Novum dieser Arbeit ist die Anwendung der Plasmapolymersation zur Funktionalisierung anderweitig inerte Polymere. Die Funktionalisierung von Polypropylen im Plasma (mit Vinylmonomeren)^[1431] ist zwar beschrieben, bezieht sich aber auf Modifikationen während des Herstellungsprozesses. Die Einführung funktioneller Gruppen auf makroskopischen Polymeroberflächen wurde bisher noch nicht beschrieben. Abbildung 170 zeigt die unterschiedlich starken Signale für 0, 1 oder 2 Basenfehlpaarungen. Die Intensität der amino-PNA funktionalisierten PPPMASA ist mit der anderer 2D-Oberflächenmatrices (z. B. Streptavidin/Biotin) vergleichbar. Im Unterschied zu den aminotermintierten PNAs im linken Graph der Abbildung 170 sind die Signalintensitäten für die amid-terminierten-PNA Chips in Abbildung 170 rechts um einen Faktor 100 kleiner. Auch ist die Diskriminierung zwischen den einzelnen Basenfehlpaarungen deutlich minimiert. Durch die oben schon erwähnten Kontrollexperimente mit COOH-SAMs und prähydrolysierten PPPMASA kann aber von einer selektiven Bindung der amid-PNA ausgegangen werden.

Zusammenfassung: Plasmachemische Reaktionen besitzen zum Aufbau reaktiver Polymernetzwerke als neuartige Cytoskelettanaloge ein interessantes Potential für zahlreiche Anwendungen. Da die Präparation elektrisch dichter Membranen mit den beschriebenen Methoden nicht erreicht wird, sind weitere Anstrengungen notwendig um die Membraneigenschaften zu verbessern. Allerdings zeigt das System interessante fluide Eigenschaften mit guten Erholungsraten bei FRAP-Experimenten mit sehr hohen Diffusionskonstanten von etwa $17 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die elektrischen Eigenschaften liegen mit Widerständen von wenigen $\text{k}\Omega$. Sind fluide Membraneigenschaften von Bedeutung, ist die PPPMASA-gestützte Membran auf Grund ihrer großen Membran-Oberflächenentkopplung und ihrer einfachen Präparation ein interessantes System. Biosensorische Applikationen, bei denen auf billigen Plastik-Substraten effektiv nukleophile Biomoleküle oder Sonden angebunden werden müssen, sind ideale Anwendungsgebiete für die elektrophilen PPPMASA-Systeme.

**„Wenn eine verzweifelte Situation ein
besonderes Können erfordert, dann
bringt man dieses Können auch auf,
obwohl man vorher keine Ahnung
davon hatte.**

Napoleon I.

**„Gott erhört Dich vielleicht nicht nach
Deinem Willen, aber er erhört Dich zu
Deinem Heil“**

Augustinus von Hippo

8 Diskussion & zukünftige Perspektiven

Diskussion

Biomimetische Systeme, besonders modellhafte Nachbildungen komplexer biologischer Systeme, stellen immer noch hohe Anforderungen an das analytische und intuitive Verständnis des biologischen Vorbilds, ohne das eine effiziente Biomimese kaum möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Modelle zur funktionellen Mimikie biologischer Membranen erarbeitet. Um den Rahmen der notwendigen Faktoren und Komponenten für das biomimetische Membranmodell abzustecken, wurde in Kapitel 3 das biologische Vorbild so weit wie möglich analytisch im Bezug auf Zusammensetzung, Organisation und Funktion betrachtet.

Der methodische Zusammenhang zwischen kleinen Molekülen und biologischen Einheiten (von Biomakromolekülen zu funktionellen Kompartimenten) ist Gegenstand der chemischen Biologie. Zur Berücksichtigung des Einflusses der lokalen und globalen Organisation im Sinne geometrischer und temporaler Effekte verlangen realitätsnahe Detailstudien deren Berücksichtigung. Dies kann anhand deduktiver, aber ausreichend komplexer hierarchischer Modellsysteme (Einbeziehung multipler Komponenten mit der Möglichkeit diese geometrisch und temporal in dynamischer Weise koppelbar zu gestalten) mit Multikomponentencharakter und supramolekularem Aufbau vorgenommen werden.

Viele der in Kapitel drei aufgezeigten Zusammenhänge sind für das Verständnis der Membran von essentieller Bedeutung, konnten aber nicht alle im Rahmen dieser Arbeit adressiert werden.

Neben der für das DPTL-System in Kapitel 5 als Präambel formulierten Maxime der einfachen, auf einer singulären SAM-Komponente beruhenden tBLM (mit nachfolgender Komplettierung der Membran durch Vesikelfusion, stehen im Rahmen dieser Arbeit vor allem das Erreichen von biologisch relevanten Membranwiderständen im Bereich von mehreren $M\Omega\text{ cm}^2$ und das Erreichen einer guten lokalen Fluidität im Vordergrund. Eine lokale Fluidität ist für das Ausheilen temporärer Membrandefekte notwendig, und für die Membranproteinfunktion von

Ionenkanälen) hinreichend. Vorausgesetzt der zur Verfügung stehende laterale Raum ist für die geometrische Aufnahme des Proteins in die Membran ausreichend. Das zweite große Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Hierarchie unterschiedlich stark (weit) von der Festkörperoberfläche entkoppelter Membranen. Auf Grund von geometrischen Einschränkungen, der molekularen Dynamik langer Molekülketten und Grenzen in der Präparation komplexer supramolekularer Membranarchitekturen, mussten 3 verschiedene Konzepte erarbeitet werden um Entkopplungsabstände von 0-50 nm zu erzielen. Alle vorgenannten Ziele wurden erreicht. Lediglich die elektrischen Eigenschaften der PPPMASA-gestützten Membranen mit vertikalen Membran-Oberflächen Entkopplungen zwischen 10 und 50 nm bedürfen unbedingter Verbesserung.

Ein wichtiger Meilenstein, besonders der vorgestellten DPTL-Systeme, ist die Realisierung zweier fundamentaler Eigenschaften der biologischen Membran – elektrische Dichtigkeit und Fluidität. Gekoppelt mit neuen Wegen zu ihrer Konstitution konnte die tBLM-Präparation mit einem minimalen Set an Komponenten realisiert werden. DPTL ist in der Lage die Membran mit maximaler Elongation des TEG-Spacers mit einer Membran-Oberflächenentkopplung von mehr als 2 nm zu entkoppeln. IR-Untersuchungen zeigen, daß TEG im Fall von DPTL-SAMs in der Lage ist unterschiedliche Konformationen einzunehmen. In wäßriger Lösung streckt es sich komplett. Anfänglich schwankende Werte für die elektrischen Daten der tBLM konnten auf unzureichende Eigenschaften der Goldoberfläche zurückgeführt werden. Es kann gezeigt werden, daß hochohmige Membranen präpariert werden können, wenn die Goldoberflächenrauigkeit kleiner ist als die Spacerlänge. Die Präparation der tBLM erfolgt in effizienter Weise, wenn kleine gespannte Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet werden. QCM-D Messungen zeigen, daß große Vesikel zur Adsorption neigen und nicht vollständig fusionieren. Die unverdünnten DPTL-Membranen zeigen eine gute geringe lokale Fluidität, die den Valinomycin vermittelten K^+ -Transport über die Membran erlaubt. Gramacidin und größere Kanäle sind in reinen DPTL-SAM Membranen nicht aktiv, bzw. werden nicht funktionell eingebaut. Verwendet man eine fluide Elektrode, z.B. Quecksilber, oder verdünnt DPTL lateral mit TEG, können Ionenkanäle funktionell eingebaut werden. Da Oligoethylenglykole (OEG) die Vesikelfusion fördern^[1360], ist eine effiziente tBLM Präparation möglich. Die erzielten Widerstände liegen im hohen ein- bis zweistelligen $M\Omega$ -Bereich, die Kapazität entspricht mit $0,5 \mu F cm^{-2}$ ebenfalls der biologischen Membran.

Für das in Kapitel 6 eingeführte Lipo-Glycopolymer kann festgestellt werden, daß die photochemische Immobilisierung von funktionell orientierten supramolekularen Architekturen auf Goldoberflächen angewendet werden kann. Die resultierenden tBLMs erreichen große

vertikale Entkopplungen der Membran von der Festkörperoberfläche, die mehr als 14 nm betragen. Diese Abstände auf der Grundlage einer monomolekularen Verbindung werden bisher von keinem Anderen Molekül erreicht. Es wurde gefunden, daß die fehlende oder unzureichende intra- und intermolekulare Stabilisierung der Spaceketten bei literaturbekannten Lipopolymeren zu einer instabilen Polymerkonformation führt die geometrisch unvorteilhafte Knäulstrukturen einnimmt. Durch die Entwicklung eines kohlenhydratmodifizierten Polymers für eine effektive Stabilisierung der Ketten durch Wasserstoffbrückenbindungen konnten gestreckte Polymerkonformationen stabilisiert werden. Erstmals konnte diese große vertikale Entkopplung erreicht, gleichzeitig aber auch die elektrischen Werte im Bereich des biologischen Vorbilds gehalten werden. Daraus folgt ein durch den Glycopolymer-Spacer aufgespannter Submembranraum mit einer Entkopplung von etwa 8,5 nm. Der funktionelle Ionentransport von Kaliumionen durch Valinomycin verdeutlicht eine ausreichende lokale Fluidität, die mit einem guten Membranwiderstand kombiniert ist. Das System kommt im Gegensatz zu DPTL (Kapitel 5) ohne die aufwendigere Präparation von ultraglattem Gold aus und eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich biokompatibler Systeme. Das neue LGP-tBLM-System stellt durch seine große vertikale Schichtdicke, Stabilisierung der Glycopolymerschicht und seinen elektrischen Eigenschaften auch ein interessantes System für die molekulare Elektronik und andere bionanotechnologische Anwendungen dar.

Ein besonderes Augenmerk ist auf die Präparationsmethode zu richten, um energetisch günstige, gestreckte Lipo-Glycopolymerketten am Glycopolymerterminus nur mit oberflächennahen Repetiereinheiten zu binden und damit Oberflächenrauigkeiten auszugleichen. Um dies zu erreichen musste ein neues Präparationsschema entwickelt werden. Es zeigte sich, daß die Vororientierung der LGPs auf dem LB-Trog, gefolgt von einem LB-Übertrag auf einen mit einem photoreaktiven SAM funktionalisierten Träger, nach Belichten des Systems zu einer Verlässlichen kovalenten Anbindung der supramolekularen LGP-Architektur führt. Dieses Konzept ist auf die Konstruktion anderer molekularer Systeme mit definierten Vorzugsorientierungen übertragbar.

Große Membran-Oberflächenentkopplungen konnten mit Hilfe plasmapolymersierter elektrophiler Polymere erreicht werden. Filmdicken von 50 nm sind mit homogener Oberfläche und Rauigkeiten im Bereich von Nanometern möglich.

Plasmachemische Reaktionen besitzen zum Aufbau reaktiver Polymernetzwerke als neuartige Cytoskelettanaloge ein interessantes Potential für zahlreiche Anwendungen. Da die Präparation elektrisch dichter Membranen mit den beschriebenen Methoden nicht erreicht wird, sind weitere Anstrengungen notwendig um die Membraneigenschaften zu verbessern. Allerdings zeigt das System interessante fluide Eigenschaften mit guten Erholungsraten bei FRAP-

Experimenten mit sehr hohen Diffusionskonstanten von etwa $17 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die elektrischen Eigenschaften liegen mit Widerständen von wenigen $\text{k}\Omega$ wie Messungen zusammen mit K. Bender zeigen (Publikation XV). Sind fluide Membraneigenschaften von Bedeutung, ist die PPPMASA-gestützte Membran auf Grund ihrer großen Membran-Oberflächenentkopplung und ihrer einfachen Präparation ein interessantes System. Erstmals konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe dieser Methode inerte Polymere/Plastikträger (zum Beispiel Polypropylen und TOPAS) in effizienter Weise kovalent mit reaktiven Polymeroberflächen modifiziert werden. Dies eröffnet neue Wege für den Einsatz günstiger Trägermaterialien und der generellen Modifikation von Kunststoffoberflächen. Biosensorische Applikationen, bei denen auf billigen Plastik-Substraten effektiv nukleophile Biomoleküle oder Sonden angebunden werden müssen, sind ideale Anwendungsgebiete für die elektrophilen PPPMASA-Systeme.

Ausblick:

Die in den 90er Jahren weiter entwickelten Modelle der Membrandomänen sind im nächsten Schritt mit den Wechselwirkungen der Membran mit dem Cytoskelett zu kombinieren, wobei die in dieser Arbeit eingeführten verschiedenen Tether- bzw. Spacersysteme interessante Perspektiven für diverse mechanische kovalente und nichtkovalente Wechselwirkungen ergeben können.

Zukünftig Modifikationen zur Verbesserung der tBLM-Eigenschaften für deren Anwendung im Bereich des Studiums von Membranproteinen (besonders von potentialabhängigen Proteinen) sind im Bereich des hydrophilen Submembranraumes, des Einbaus von Membranproteinen und der hydrophoben Lipidkomponente notwendig. Als Schwerpunkte sollten in erster Linie die Weiterentwicklung der Spacerarchitekturen und Methoden zum funktionellen Einbau von Membranproteinen gesetzt werden. Einhergehend mit diesen Studien ist die Adaption des Lipidmotivs wahrscheinlich. Obwohl die Vergrößerung des lateralen Submembranraumes mit neuen Lipidmotiven für bestimmte Anwendungen Vorteile bringen kann, liegen die größten Herausforderungen in der Bereitstellung submembraner Phasen mit großen vertikalen Entkopplungsabständen zwischen Sensoroberfläche und Membran und neuen Methoden zum Einbau von Membranproteinen. Daher werden zuerst sinnvolle Ansätze und deren potentiellen Probleme diskutiert, bevor die beiden erstgenannten Punkte behandelt werden.

Neue Lipidmotive- die Vermittlung von Fluidität bei gleichzeitiger Vergrößerung des lateralen Submembranraumes:

Zieht man die Verwendung eines oligomeren Diphytanylglycerinmotivs zur Vergrößerung des freien lateralen Submembranraumes in Betracht, sind folgende Punkte zu berücksichtigen: 1) Die Chiralität der Glycerinbausteins hat Einfluß auf die Orientierung der Ketten, nichtstereoselektive Synthesen induzieren daher eventuell Störungen der Wechselwirkungen

zwischen den einzelnen Ketten auf schwer zu reproduzierende Weise, so daß instabilisierende Membranwechselwirkungen resultieren. Das gleiche kann auf die Stereochemie der Methylverzweigungen an Position 3 des Phytangerüsts zutreffen. Um eine geeignete Orientierung des Lipidmotivs zu erlauben, sind die Spacer und die Ankergruppe zu optimieren, um eine funktionelle Anordnung des Lipid-SAMs auf der Oberfläche zu erzielen.

Hydrophilie und Transmembrane Lipide stellen eine bei Extremophilen anzutreffende Strategie zur Erhöhung der Membranstabilität und –Dichtigkeit dar. Ihr Einsatz ist in kleine Mengen bei bestimmten Präparationsmethoden hilfreich. Hohe Anteile müssen die lateralen Bedürfnisse von Membranproteinen berücksichtigen

Bedenkt man die komplexen, gekoppelten Prozesse der biologischen Membran und deren dynamisches Verhalten an sich, und im Bezug auf die in ihr ablaufenden Prozesse, können die hier vorgestellten tBLMs nur als rudimentäre Instrumente betrachtet werden. Auch wenn sie erstmalig das Studium komplexer elektrisch aktiver Membranproteine in einem artifiziellen Membransystem mit bioäquivalenten Eigenschaften bezüglich der elektrischen Dichtigkeit und der Mikrofluidität in der Proteinperipherie der sie umgebenden Membranlipide erlauben, stellen sie erst den Beginn der Entwicklung dar.

Das Ziel dieser Arbeit besteht nicht in erster Linie in der Synthese neuer Verbindungen, sondern in der „Synthese“ komplexer Funktionen...

Literatur

- [1] Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 579.
- [2] Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 579.
- [3] Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, 28, 1167.
- [4] Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 433.
- [5] Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, 41, 850.
- [6] Kunz, H., *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4619.
- [7] Mülhaupt, R., *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, 47, 413.
- [8] Chen, C. M., Lubensky, T. C., Mackintosh, F. C., *Physical Reviews E* **1995**, 51, 504.
- [9] Kleinig, H., Sitte, P., Maier, U., *Zellbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [10] Singer, S. J., Nicolson, G. L., *Science* **1972**, 175, 720.
- [11] Singer, S. J., *Ann. Rev. Bioch.* **1974**, 43, 805.
- [12] Cooper, G. M., Hausman, R. E., *The Cell: A Molecular Approach* ASM Press, Washington, D.C, **2004**.
- [13] Naaby-Hansen, S., Waterfield, M. D., Cramer, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, 22, 376.
- [14] Nakai, K., *J. Struct. Biol.* **2001**, 134, 103.
- [15] Perkel, J. M., *The Scientist* **2002**, 16, 32.
- [16] Norgard-Sumnicht, K., Bai, X. M., Esko, J. D., Varki, A., Manzi, A. E., *Glycobiology* **2000**, 10, 691.
- [17] Watkins, S. M., *Isr. Med. Assoc. J.* **2000**, 2, 722.
- [18] Fitzgerald, D. A., *Scientist* **2002**, 16, 42.
- [19] Kolter, T., Sandhoff, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1532.
- [20] Liebe, B., Kunz, H., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1997**, 36, 618.
- [21] Leuck, M., Kunz, H., *Journal Für Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung* **1997**, 339, 322.
- [22] Kunz, H., Schultz, M., *Chim. Oggi-Chem. Today* **1998**, 16, 45.
- [23] Schiller, S., Diplomarbeit, Universität Mainz (Mainz), **1998**.
- [24] Keil, S., Claus, C., Dippold, W., Kunz, H., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2001**, 40, 366.
- [25] Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J. H., *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **1978**, 375, 219.
- [26] Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J., *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **1981**, 391, 85.
- [27] Sakmann, B., Neher, E., *Annu. Rev. Physiol.* **1984**, 46, 455.
- [28] Marron, B. E., Jayawickreme, C. K., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 395.
- [29] Vaschetto, M., Weissbrod, T., Bodle, D., Guner, O., *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, 6, 377.
- [30] Lutz, M. W., Menius, J. A., Choi, T. D., Laskody, R. G., Domanico, P. L., Goetz, A. S., Saussy, D. L., *Drug Discovery Today* **1996**, 1, 277.
- [31] D'Orazio, P., *Clin. Chim. Acta* **2003**, 334, 41.
- [32] Keusgen, M., *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 433.
- [33] Pearson, J. E., Gill, A., Vadgama, P., *Ann. Clin. Biochem.* **2000**, 37, 119.
- [34] Skladal, P., Macholan, L., *Chem. Listy* **1997**, 91, 105.
- [35] Rechnitz, G. A., *Electroanalysis* **1991**, 3, 73.
- [36] Lowe, C. R., *Trends Biotechnol.* **1984**, 2, 59.
- [37] Corcoran, C. A., Rechnitz, G. A., *Trends Biotechnol.* **1985**, 3, 92.
- [38] Schwalbe, H., Wess, G., *Chembiochem* **2001**, 3, 915.
- [39] Simonds, W. F., *J. Investig. Med.* **2003**, 51, 194.
- [40] Lummen, G., Rubben, H., *Urol. Int.* **2003**, 71, 1.
- [41] Lesney, M. S., *modern drug discovery* **November 2002**, 30.
- [42] Juliano, R. L., Daoud, S., Krause, H. J., Grant, C. W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1987**, 507, 89.

- [43] Daoud, S. S., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *33*, 307.
- [44] Ringsdorf, H., Schlarb, B., Venzmer, J., *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117.
- [45] Sackmann, E., *Science* **1996**, *271*, 43.
- [46] Erdelen, C., Haussling, L., Naumann, R., Ringsdorf, H., Wolf, H., Yang, J. L., Liley, M., Spinke, J., Knoll, W., *Langmuir* **1994**, *10*, 1246.
- [47] Naumann, R., Baumgart, T., Gräber, P., Jonczyk, A., Offenhäusser, A., Knoll, W., *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 25.
- [48] Naumann, R., Schmidt, E. K., Jonczyk, A., Fendler, K., Kadenbach, B., Liebermann, T., Offenhäusser, A., Knoll, W., *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 651–662.
- [49] Schiller, S. M., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H., Knoll, W., *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 219.
- [50] Knoll, W., Frank, C. W., Heibel, C., Naumann, R., Offenhäusser, A., Ruhe, J., Schmidt, E. K., Shen, W. W., Sinner, A., *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 137.
- [51] Naumann, C. A., Prucker, O., Lehmann, T., Ruhe, J., Knoll, W., Frank, C. W., *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 27.
- [52] Knoll, W., Morigaki, K., Naumann, R., Sacca, B., Schiller, S., Sinner, E.-K., in *Ultrathin electrochemical chemo- and biosensors: Technology and performance, Vol. 2* (Eds.: Mirsky, V. M., Wolfbeis, O. S.), Springer, **2004**, pp. 239.
- [53] Tanaka, M., Sackmann, E., *Nature* **2005**, *437*, 656.
- [54] Janshoff, A., Steinem, C., *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 433.
- [55] Miller, D. D., deRuijter, N. C. A., Emons, A. M. C., *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 1881.
- [56] Avrutsky, I., *Physical Review B* **2004**, *70*, 155416.
- [57] Schiller, S. M., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H., Knoll, W., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2003**, *42*, 208.
- [58] Hunter, P., *The Scientist* **2003**, *Feb. 24*, 20.
- [59] Wolkenhauer, O., *Brief Bioinform.* **2001**, *2*, 258.
- [60] Noble, D., *Bioassays* **2000**, *24*, 1155.
- [61] Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*, Second Edition ed., Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, **1992**.
- [62] Tomoaia-Cotisel, M., Stewart, L. C., Kates, M., Zsako, J., Chifu, E., Mocanu, A., Frangopol, P. T., Noe, L. J., Quinn, P. J., *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *100*, 41.
- [63] Mathai, J. C., Sprott, G. D., Zeidel, M. L., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27266.
- [64] Baumgart, T., Doktorarbeit, (Mainz), **2001**.
- [65] Marsh, D., *CRC handbook of lipid bilayers*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**.
- [66] Schmidt, E. K., Liebermann, T., Kreiter, M., Jonczyk, A., Naumann, R., Offenhäusser, A., Neumann, E., Kukol, A., Maelicke, A., Knoll, W., *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 585.
- [67] Peggion, C., Formaggio, F., Toniolo, C., Becucci, L., Moncelli, M. R., Guidelli, R., *Langmuir* **2001**, *17*, 6585.
- [68] Lang, H., Duschl, C., Vogel, H., *Langmuir* **1994**, *10*, 197.
- [69] Wagner, M. L., Tamm, L. K., *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1400.
- [70] Spinke, J., Blankenburg, R., Forster, S., Schmidt, M., Zoller, J., Ringsdorf, H., Knoll, W., *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 756.
- [71] Hausch, M., Zentel, R., Knoll, W., *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 174.
- [72] Theato, P., Preis, E., Brehmer, M., Zentel, R., *Macromol. Symp.* **2001**, *164*, 257.
- [73] Becucci, L., Guidelli, R., Liu, Q. Y., Bushby, R. J., Evans, S. D., *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10410.
- [74] Lang, H., Duschl, C., Gratzel, M., Vogel, H., *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 818.
- [75] Heyse, S., Ernst, O. P., Dienes, Z., Hofmann, K. P., Vogel, H., *Biochemistry* **1998**, *97*, 507.
- [76] Williams, L. M., Evans, S. D., Flynn, T. M., Marsh, A., Knowles, P. F., Bushby, R. J., Boden, N., *Langmuir* **1997**, *13*, 751.

- [77] Wiegand, G., Arribas-Layton, N., Hillebrandt, H., Sackmann, E., Wagner, P., *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4245.
- [78] Guidelli, R., Aloisi, G., Becucci, L., Dolfi, A., Moncelli, M. R., Buoninsegni, F. T., *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *504*, 1–28.
- [79] Sinner, E. K., Knoll, W., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 705.
- [80] Cornell, B. A., Braach-Maksvytis, V. L. B., King, L. G., Osman, P. D. J., Raguse, Wiczorek, L., Pace, R. J., *Nature* **1997**, *387*, 580.
- [81] Kahlweit, M., **1998**
- [82] Jarrell, H. C., Zukotynski, K. A., Sprott, G. D., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1998**, *1369*, 259.
- [83] Howard, R. E., Burton, R. M., *The Journal of the American Oil Chemists Society* **1968**, *45*, 202.
- [84] Menger, F. M., *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1104.
- [85] Gupta, R. S., *Theor. Popul. Biol.* **1998**, *54*, 91.
- [86] Woese, C. R., Fox, G. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 5088.
- [87] Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4576.
- [88] Iozzo, R. V., Murdoch, A. D., *FASEB J.* **1996**, *10*, 598.
- [89] Asthagiri, A. R., Lauffenburger, D. A., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *02*, 31.
- [90] Shyy, J. Y.-J., Chien, S., *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1997**, *9*, 707.
- [91] Stappert, J., Kemel, R., *Adv. Mol. Cell. Biol.* **1999**, *28*, 27.
- [92] Crockett-Torabi, E., *J. Leukocyte Biol.* **1998**, *63*, 1.
- [93] Nimni, *Collagen: Biochemistry, Biomechanics, Biotechnology*, CRC Press, London, **1988**.
- [94] Brown, J. C., Timpl, R., *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **1995**, *107*, 484.
- [95] Timpl, R., Brown, J. C., *BioEssay* **1996**, *18*, 123.
- [96] Schiller, S., *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, *28*, 137.
- [97] Panitch, A., Yamaoka, T., Fournier, M. J., Mason, T. L., Tirrell, D. A., *Macromolecules* **1999**, *32*, 1701.
- [98] Urry, D. W., Hugel, T., Seitz, M., Gaub, H. E., Sheiba, L., Dea, J., Xu, J., Parker, T., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* **2002**, *357*, 169.
- [99] Welsh, E. R., Tirrell, D. A., *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 23.
- [100] Mosher, *Fibronectin*, Academic Press, San Diego, **1988**.
- [101] Zeck, G., Fromherz, P., *Langmuir* **2003**, *19*, 1580.
- [102] Brekken, R. A., Sage, E. H., *Matrix Biol.* **2000**, *19*, 569.
- [103] Yoneda, A., Ogawa, H., Matsumoto, I., Ishizuka, I., Hase, S., Seno, N., *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 797.
- [104] Dertinger, S. K. W., Jiang, X. Y., Li, Z. Y., Murthy, V. N., Whitesides, G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12542.
- [105] Lekmine, F., Lausson, S., Pidoux, E., Segond, N., Roos, B., Treilhou-Lahille, F., Jeanne, N., *Mol. Cell. Endocrinol.* **1999**, *157*, 181.
- [106] Zagzag, D., Capo, V., *Histol. Histopathol.* **2002**, *17*, 301.
- [107] Elliott, J. T., Tona, A., Woodward, J. T., Jones, P. L., Plant, A. L., *Langmuir* **2003**, *19*, 1506.
- [108] Gath, U., Hakvoort, A., Wegener, J., Decker, S., Galla, H. J., *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, *74*, 68.
- [109] Kazuno, M., Tokunaga, T., Oshika, Y., Tanaka, Y., Tsugane, R., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, U., Nakamura, M., *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 502.
- [110] Weinstein, E. J., Bournier, M., Head, R., Zakeri, H., Bauer, C., Mazzarella, R., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2003**, *1637*, 207.
- [111] Merkel, R., Simson, R., Simson, D. A., Hohenadl, M., Boulbitch, A., Wallraff, E., Sackmann, E., *Biophys. J.* **2000**, *79*, 707.
- [112] Ruddies, R., Goldmann, W. H., Isenberg, G., Sackmann, E., *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1993**, *22*, 309.

- [113] Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21749.
- [114] Gu, J., Sumida, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 27090.
- [115] Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M., *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart - New York, **1997**.
- [116] Scheffers, D.-J., Pinho, M. G., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 585.
- [117] Sleytr, U. B., *Int. Rev. Cytol.* **1978**, 53, 1.
- [118] Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., Sara, M., Springer, Berlin, **1988**.
- [119] Sleytr, U. B., Plohberger, R., in *Electron Microscopy at Molecular Dimensions* (Eds.: Baumeister, W., Vogel, W.), Springer, Berlin, **1980**, pp. 46.
- [120] Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., Sara, M., *Mol. Microbiol.* **1993**, 10, 911.
- [121] Murray, R. G. E., in *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Eds.: Beveridge, T. J., Koval, S. V.), Plenum, New York, **1993**, pp. 3.
- [122] Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., Sara, M., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1999**, 38, 1035.
- [123] Beutler, B., Poltorak, A., *J. Endotoxin Res.* **2000**, 6, 269.
- [124] Reeves, P. P., Wang, L., in *Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes, Vol 1, Vol. 264*, **2002**, pp. 109.
- [125] Demchenko, A. V., Wolfert, M. A., Santhanam, B., Moore, J. N., Boons, G.-J., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6103.
- [126] Whitfield, C., *Trends Microbiol.* **1995**, 3, 178.
- [127] Valvano, M. A., *Front. Biosci.* **2003**, 8, S452.
- [128] Hansson, J., Oscarson, S., *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4, 535.
- [129] Mansson, M., Hood, D. W., Li, J. J., Richards, J. C., Moxon, E. R., Schweda, E. K. H., *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 808.
- [130] Fenton, M. J., Golenbock, D. T., *J. Leukocyte Biol.* **1998**, 64, 25.
- [131] Psychrembel, W., de Gruyter, Berlin,; New York, **1990**.
- [132] Yethon, J. A., Whitfield, C., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 5498.
- [133] Mayeux, P. R., *J. Toxicol. Environ. Health* **1997**, 51, 415.
- [134] Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 2. Aufl. ed., Garland, New York, **1989**.
- [135] Hughes, R. C., *Membrane Glycoproteins*, Butterworths, London, **1976**.
- [136] Neufeld, E. F., Ashwell, G., *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum, New York, **1980**.
- [137] Lowe, B., Varki, A., *Essent. Glycobiol.* **1999**, 253.
- [138] Tanner, W., *Glyco- and Cellbiology*, Springer, Heidelberg, **1994**.
- [139] Gumbiner, B. M., *Cell* **1996**, 84, 345.
- [140] Amano, K., *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, 14, 105.
- [141] Baer, H., Kabat, E. A., Knaub, V., *J. Exp. Med.* **1950**, 91, 105.
- [142] Gustafson, I., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 30, 13.
- [143] Sigl, H., Brink, G., Seufert, M., Schulz, M., Wegner, G., Sackmann, E., *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1997**, 25, 249.
- [144] Hillebrandt, H., Tanaka, M., Sackmann, E., *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 477.
- [145] Sinner, A., Offenhäusser, A., *Thin Solid Films* **1998**, 327 - 329, 758.
- [146] Baumgart, T., Offenhäusser, A., *Biophys. J.* **2002**, 83, 1489.
- [147] Baumgart, T., Offenhäusser, A., *Langmuir* **2003**, 19, 1730.
- [148] Bergelson, L. O., Gawrisch, K., Ferretti, J. A., Blumenthal, V., *Mol. Membr. Biol.* **1995**, 12, 1.
- [149] Seelig, J., Limacher, H., Bader, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6364–6371.
- [150] Hrafnisdottir, S., Menon, A. K., *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 4198.
- [151] Satiat-Jeunemaitre, B., Gaire, F., Brown, S., *Biol. Cell* **1998**, 90, 265.
- [152] Andrew, M., Tim, H., *The Cell Cycle*, Oxford University Press, **1993**.
- [153] Hazel, J. R., Williams, E. E., Livermore, R., Mozingo, N., *Lipids* **1991**, 26, 277.
- [154] Wright, L. C., NouriSorkhabi, M. H., May, G. L., Danckwerts, L. S., Kuchel, P. W., Sorrell, T. C., *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 328.
- [155] Marra, C. A., Rimoldi, O., de Alaniz, M. J. T., *Lipids* **2002**, 37, 701.

- [156] Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., Farooqui, T., *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 1.
- [157] Russel, N. J., Hamamoto, T., *Psychrophiles*, Wiley-Liss, New York, **1998**.
- [158] Sprott, G. D., Meloche, M., Richards, J. C., *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3907.
- [159] Hulbert, A. J., Else, P. L., *J. Theor. Biol.* **1999**, *199*, 257.
- [160] Kates, M., Kushner, D. J., Matheson, A. T., in *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 26, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [161] Spinedi, A., Luly, P., Farias, R. N., *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1521.
- [162] D'Onofrio, T. G., Hatzor, A., Counterman, A. E., Heetderks, J. J., Sandel, M. J., Weiss, P. S., *Langmuir* **2003**, *19*, 1618.
- [163] Liu, M. S., Ghosh, S., Yang, Y. S., *Life Sci.* **1983**, *33*, 1995.
- [164] faculty.uca.edu/~march/biol/scimethod/lab_3_ExptDes_f02.htm
- [165] Edidin, M., *Nature* **2003**, *4*, 414.
- [166] Overton, E., *Vjsch. Naturf. Ges. Zürich* **1895**, *40*, 159.
- [167] Gorter, E., Grendel, F., *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439.
- [168] Carpenter, C. L., *Semin. Cell Dev. Biol.* **1996**, *7*, 691.
- [169] Holthuis, J. C. M., van Meer, G., Huitema, K., *Mol. Membr. Biol.* **2003**, *20*, 231.
- [170] Hooper, N. M., *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R114.
- [171] Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P. L., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., *PNAS* **2003**, *100*, 8053.
- [172] Israelachvili, J. N., *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *469*, 221.
- [173] Wisniewska, A., Draus, J., Subczynski, W. K., *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, *8*, 147.
- [174] Glaser, M., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 475.
- [175] Simons, K., Ikonen, E., *Nature* **1997**, *387*, 569.
- [176] Itoh, Y. H., Sugai, A., Uda, I., Itoh, T., *Adv. Space Res.* **2001**, *28*, 719.
- [177] Diomede, L., Albani, D., Bianchi, M., Salmona, M., *Eur. Cytokine Netw.* **2001**, *12*, 625.
- [178] Houseknecht, K. L., Spurlock, M. E., *Nutrition Research Reviews* **2003**, *16*, 83.
- [179] Ohanian, J., Ohanian, V., *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 2053.
- [180] Marsh, D., *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1575.
- [181] Lee, A. G., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2003**, *1612*, 1.
- [182] Tillman, T. S., Cascio, M., *Cell Biochem. Biophys.* **2003**, *38*, 161.
- [183] Devaux, P. F., Fellman, P., Herve, P., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 115.
- [184] Murakami-Murofushi, K., Uchiyama, A., Fujiwara, Y., Kobayashi, T., Kobayashi, S., Mukai, M., Murofushi, H., Tigyi, G., *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids* **2002**, *1582*, 1.
- [185] Unger, R. H., Orci, L., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 202.
- [186] Schaad, N. C., Magistretti, P. J., Schorderet, M., *Neurochem. Int.* **1991**, *18*, 303.
- [187] Verbert, A., Cacan, R., Cecchelli, R., *Biochimie* **1987**, *69*, 91.
- [188] Ravi, K., Rip, J. W., Carroll, K. K., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1986**, *884*, 497.
- [189] Burda, P., Aebi, M., *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 239.
- [190] Helenius, J., Aebi, M., *Semin. Cell Dev. Biol.* **2002**, *13*, 171.
- [191] Parodi, A. J., *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 69.
- [192] Fang, X. J., Schummer, M., Mao, M. L., Yu, S. X., Tabassam, F. H., Swaby, R., Hasegawa, Y., Tanyi, J. L., LaPushin, R., Eder, A., Jaffe, R., Erickson, J., Mills, G. B., *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids* **2002**, *1582*, 257.
- [193] Subbanagounder, G., Deng, Y. J., Borromeo, C., Dooley, A. N., Beliner, J. A., Salomon, R. G., *Vascular Pharmacology* **2002**, *38*, 201.
- [194] Bochkov, V. N., Kadl, A., Huber, J., Gruber, F., Binder, B. R., Leitinger, N., *Nature* **2002**, *419*, 77.
- [195] Bowes, T., Wagner, E. R., Boffey, J., Nicholl, D., Cochrane, L., Benboubetra, M., Conner, J., Furukawa, K., Willison, H. J., *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5008.
- [196] Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M., *J. Immunol.* **1991**, *147*, 2809.
- [197] Anel, A., Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M., *Biochemistry* **1993**, *32*, 530.

- [198] Koynova, R., Tenchov, B., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, 6, 277.
- [199] Rigaudy, J., Klesney, S. P., Pergamon Press, **1979**.
- [200] Breitmaier, E., Jung, G., *Organische Chemie II*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, **1983**.
- [201] *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [202] <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/lipid/>
- [203] Williamson, P., Schlegel, R. A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, 1585, 53.
- [204] Cevc, G., Paltauf, F., American Oil Chemist's Society, **1995**.
- [205] Dirks, J., van Aswegen, C. H., du Plessis, D. J., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **1998**, 59, 273.
- [206] Vancassel, S., Durand, G., Barthelemy, C., Lejeune, B., Martineau, J., Guilloteau, D., Andres, C., Chalon, S., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2001**, 65, 1.
- [207] Cui, Z., Houweling, M., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, 1585, 87.
- [208] Exton, J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1212, 26.
- [209] Billah, M. M., *Biochem. J.* **1990**, 269, 281.
- [210] Wieder, T., Orfanos, C. E., Geilen, C. C., *J. Biol. Chem.* **1998**, 271, 11025.
- [211] Akhrem, A. A., Bovdey, N. A., Kisel, M. A., Kiselev, P. A., *Biol. Membr.* **1995**, 12, 539.
- [212] Kolber, M. A., Haynes, D. H., *J. Membr. Biol.* **1979**, 48, 95.
- [213] Millman, J. S., Qi, H.-Y., Vulcu, F., Bernstein, H. D., Andrews, D. W., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 25982.
- [214] Saatov, T. S., *Ukr. Biokhim. Zh.* **1981**, 53, 44.
- [215] Willems, G. M., Janssen, M. P., Comfurius, P., Galli, M., Zwaal, R. F. A., Bevers, E. D. M., *Biochemistry* **2002**, 41, 14357.
- [216] Shi, J. L., Gilbert, G. E., *Blood* **2003**, 101, 2628.
- [217] Rote, N. S., Stetzer, B. P., *Clin. Lab. Med.* **2003**, 23, 265.
- [218] Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J., Weber, K., *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 839.
- [219] Mollenhauer, J., *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, 53, 506.
- [220] Kourie, J. I., Wood, H. B., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, 73, 91.
- [221] Liemann, S., Huber, R., *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, 53, 516.
- [222] Gerke, V., Moss, S. E., *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 331.
- [223] Gelbmann, C. M., Muller, W. E., *Neurobiol. Aging* **1992**, 13, 45.
- [224] Duan, C. L., Yan, F. S., Lu, G. W., Liu, H. M., Yin, N., *Biol. Signals Recept.* **1999**, 8, 261.
- [225] Akbar, M., Baick, J., Calderon, F., Wen, Z. M., Kim, H. Y., *J. Neurosci. Res.* **2006**, 83, 432.
- [226] <http://www.preventnetwork.com/orthomolekular/naehrst-mono-undecylen.html>
- [227] Martelli, A. M., Bortul, R., Tabellini, G., Aluigi, M., Peruzzi, D., Bareggi, R., Narducci, P., Cocco, L., *FEBS Lett.* **2001**, 505, 1.
- [228] Yin, H. L., Janmey, P. A., *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, 65, 761.
- [229] Flori, F., Della Giovampaola, C., Focarelli, R., Secciani, F., La Sala, G. B., Nicoli, A., Hale, G., Rosati, F., *Tissue Antigens* **2005**, 66, 209.
- [230] McConville, M. J., Menon, A. K., *Mol. Membr. Biol.* **2000**, 17, 1.
- [231] Muller, G., Kessler, A., Wied, S., Uphues, I., Jung, C., Eckel, J., *FASEB J.* **1997**, 11, A1173.
- [232] Hilley, J. D., Zawadzki, J. L., McConville, M. J., Coombs, G. H., Mottram, J. C., *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 1183.
- [233] Baldwin, M. A., in *Mass Spectrometry: Modified Proteins and Glycoconjugates*, Vol. 405, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, **2005**, pp. 172.
- [234] Okamoto, M., Yoko-o, T., Umemura, M., Nakayama, K., Jigami, Y., *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 4013.

- [235] Doncel, G. F., *Hum. Reprod. Update* **2006**, *12*, 103.
- [236] Karnell, F. G., Monroe, J. G., *Transfus. Med. Hemother.* **2006**, *33*, 8.
- [237] Lisanti, M. P., Caras, I. W., Rodriguezboulant, E., *J. Cell Sci.* **1991**, *99*, 637.
- [238] Mayor, S., Menon, A. K., Cross, G. A. M., *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 61.
- [239] Moran, P., Raab, H., Kohr, W. J., Caras, I. W., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1250.
- [240] Trovero, F., Glowinski, J., Levy, M., *Brain Res.* **1990**, *537*, 381.
- [241] Gilch, S., Kehler, C., Schatzl, H. M., *Mol. Cell Neurosci.* **2006**, *31*, 346.
- [242] Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., Sternweis, P. C., *Science* **1991**, *251*, 804.
- [243] Majerus, P. W., Neufeld, E. J., Wilson, D. B., *Cell* **1984**, *37*, 701.
- [244] Malan, T. P., Porreca, F., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2005**, *77*, 123.
- [245] Narwa, R., Harris, D. A., *Biochemistry* **1999**, *38*, 8770.
- [246] D'Santos, C. S., Clarke, J. H., Divecha, N., *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids* **1998**, *1436*, 201.
- [247] Thurk, M., Porschke, D., *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1067*, 153.
- [248] Miura, K., Han, G. P., Kondo, S., Ohhashi, H., Tsutsui, Y., *Pathol. Int.* **2004**, *54*, 881.
- [249] Hite, R. D., Seeds, M. C., Jacinto, R. B., Grier, B. L., Waite, B. M., Bass, D. A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1720*, 14.
- [250] Hancock, J. T., *Cell Signalling*, Addison Wesley Longman, Harlow, **1997**.
- [251] Durieux, M. E., Lynch, K. R., *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 249.
- [252] Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M. A., Chun, J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 108.
- [253] Stoll, L. L., Oskarsson, H. J., Spector, A. A., *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, H1853.
- [254] Maloney, K. M., Grainger, D. W., *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *65*, 31.
- [255] Needham, D., *MRS Bull.* **1999**, *24*, 32.
- [256] Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., Burger, K. N. J., *Traffic* **2003**, *4*, 162.
- [257] Sun, C. Q., Hanasaka, A., Kashiwagi, H., Ueno, M., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2000**, *1467*, 18.
- [258] Martin, I., Ruyschaert, J. M., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1995**, *1240*, 95.
- [259] van Zutphen, H., van Deenan, L. L. M., *Chem. Phys. Lipids* **1967**, *1*, 389.
- [260] Terashita, Z., Imura, Y., Nishikawa, K., Sumida, S., *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *109*, 257.
- [261] Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, M., *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 81.
- [262] Dudda, A., Spiteller, G., *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1249.
- [263] Pike, L. J., *Biochemistry* **2002**, *4*, 2075.
- [264] Moschidis, M. C., *Prog. Lipid Res.* **1984**, *23*, 223.
- [265] Mukhamedova, K. S., Glushenkova, A. I., *Chemistry Of Natural Compounds* **2000**, *36*, 329.
- [266] Moschidis, M. C., *J. Chromatogr.* **1983**, *268*, 485.
- [267] Moschidis, M. C., *J. Chromatogr.* **1984**, *298*, 366.
- [268] Moschidis, M. C., *Z.Naturforsch.(C)* **1986**, *41*, 369.
- [269] Moschidis, M. C., Demopoulos, C. A., Kritikou, L. G., *J. Chromatogr.* **1984**, *292*, 473.
- [270] Moschidis, M. C., *Z.Naturforsch.(C)* **1986**, *41*, 1124.
- [271] Mukhamedova, K. S., Tolibaev, I., Glushenkova, A. I., *Khim. Prir. Soedin.* **1985**, 708.
- [272] Hing, F. S., Shipley, G. G., *Biochemistry* **1995**, *34*, 11904.
- [273] Harder, T., Simons, K., *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1997**, *9*, 534.
- [274] Boggs, J. M., Wang, H., *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 242.
- [275] Fellmann, P., Herve, P., Pomorski, T., Müller, P., Geldwerth, D., Herrmann, A., Devaux, P. F., *Biochemistry* **2000**, *39*, 4004.
- [276] Pettus, B. J., Chalfant, C. E., Hannun, Y. A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 114.
- [277] Barenholz, Y., Cevc, G., in *Physical Chemistry of Biological Surfaces* (Eds.: Baszkin, A., Norde, W.), Marcel Dekker, New York, **1999**.
- [278] Slotte, J. P., *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *102*, 13.

- [279] Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. J., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Spiegel, J., *Nature* **1996**, *381*, 800.
- [280] Cuvillier, O., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 153.
- [281] Tilly, J. L., Kolesnick, R. N., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 135.
- [282] Andrieu-Abadie, N., Levade, T., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 126.
- [283] Hannun, Y. A., Luberto, C., Argraves, K. M., *Biochemistry* **2001**, *40*, 4893.
- [284] Kolter, T., Sandhoff, K., *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1532.
- [285] Skita, V., Chester, D. W., Oliver, C. J., Turcotte, J. G., Notter, R. H., *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 1116.
- [286] Lalchev, Z. I., Todorov, R. K., Christova, Y. T., Wilde, P. J., Mackie, A. R., Clark, D. C., *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2591.
- [287] vonNahmen, A., Post, A., Galla, H. J., Sieber, M., *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1997**, *26*, 359.
- [288] Barenholz, Y., Thompson, T. E., *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *102*, 29.
- [289] Yang, L. J., Zeller, C. B., Shaper, N. L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R. E., Schnaar, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 814.
- [290] Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Shamshiev, A. T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R. A., Kirpichnikov, M. P., *FEBS Lett.* **1997**, *402*, 91.
- [291] Fang, Y., Frutos, A. G., Lahiri, J., *Langmuir* **2003**, *19*, 1500.
- [292] Terretaz, S., Stora, T., Duschl, C., Vogel, H., *Langmuir* **1993**, *9*, 1361.
- [293] Malisan, F., Testi, R., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 179.
- [294] Huang, C., Wheeldon, C., Thompson, T. E., *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 148.
- [295] Shah, D. O., Schulman, J. H., *J. Lipid Res.* **1965**, *6*, 341.
- [296] McMillin, J. B., Dowhan, W., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 97.
- [297] Kim, A., Jeong, I. C., Shim, Y. B., Kang, S. W., Park, J. S., *J. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *34*, 446.
- [298] Parker, M. A., King, V., Howard, K. P., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2001**, *1514*, 206.
- [299] Manson, J. J., Isenberg, D. A., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 1015.
- [300] Tanaseanu, C., Moldoveanu, E., St, T., Popescu, L. M., *Haematologia (Budap).* **2002**, *31*, 287.
- [301] Leung, S., Ziboh, V. A., MillerBlair, D. J., Robbins, D. L., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **1996**, *55*, 385.
- [302] Alexander, C., Rietschel, E. T., *J. Endoxin Res.* **2001**, *7*, 167.
- [303] Silipo, A., Lanzetta, R., Amoresano, A., Parrilli, M., Molinaro, A., *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 2188.
- [304] Wiese, A., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Seydel, U., Muller-Loennies, S., *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 767.
- [305] Ernst, R. K., Guina, T., Miller, S. I., *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 1327.
- [306] Gunn, J. S., *J. Endoxin Res.* **2001**, *7*, 57.
- [307] Muehlradt, P. F., Menzel, J., Golecki, J. R., Speth, V., *Eur. J. Biochem.* **1974**, *43*, 533.
- [308] Schindler, M., Osborn, M. J., Koppel, D. E., *Nature* **1980**, *283*, 346.
- [309] Chaby, *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 209.
- [310] Lee, J. D., Kravchenko, V., Kirkland, T. N., Han, J., Mackman, N., Moriarty, A., Leturcq, D. T., P. S., Ulevitch, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9930.
- [311] Chia, J. K. S., Pollack, M., Guelde, G., Koles, N. L., Miller, M., Evans, M. E., *J. Infect. Dis.* **1989**, *159*, 872.
- [312] Chiba, H., Sano, H., Iwaki, D., Murakami, S., Mitsuzawa, H., Takahashi, T., Konishi, M., Takahashi, H., Kuroki, Y., *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1587.

- [313] Harris, C. L., Vigar, M. A., Nores, J. E. R., Horejsi, V., Labeta, M. O., Morgan, B. P., *Immunology* **2001**, *104*, 317.
- [314] Flo, T. H., Ryan, L., Kilaas, L., Skjak-Braek, G., Ingalls, R. R., Sundan, A., Golenbock, D. T., Espevik, T., *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6770.
- [315] Augusto, L. A., Synguelakis, M., Johansson, J., Pedron, T., Girard, R., Chaby, R., *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 61.
- [316] Baveye, S., Ellass, E., Fernig, D. G., Blanquart, C., Mazurier, J., Legrand, D., *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6519.
- [317] Viriyakosol, S., Kirkland, T. N., Soldau, K., Tobias, P. S., *J. Endotoxin Res.* **2000**, *6*, 489.
- [318] Wong, P. M. C., Chung, S. W., Sultzer, B. M., *Scand. J. Immunol.* **2000**, *51*, 123.
- [319] Ganaloff, S. C., Zahringer, U., Blondin, C., Goyert, S. M., *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *104*.
- [320] Peiser, L., de Winther, M. P. J., Makepeace, K., Hollinshead, M., Coull, P., Plested, J., Kodama, T., Moxon, E. R., Gordon, S., *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5346.
- [321] Yang, Z., Carter, C. D., Miller, M. S., Bochsler, P. N., *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 51.
- [322] Zieglerheitbrock, H. W. L., *J. Inflamm.* **1995**, *45*, 13.
- [323] Reisser, D., Pance, A., Jeannin, J. F., *BioEssays* **2002**, *24*, 284.
- [324] Lynn, W. A., Golenbock, D. T., *Immunol. Today* **1992**, *13*, 271.
- [325] Raetz, C. R. H., Whitfield, C., *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635.
- [326] Jian, Z.-j., Yang, Z., Miller, M. S., Carter, C. D., Slauson, D. O., Bochsler, P. N., *Veterinary Immunology and Immunopathology* **1995**, *49*, 51.
- [327] Wang, Z. M., Liu, C., Dziarski, R., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20260.
- [328] Alexander, C., Zahringer, U., *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14*, 69.
- [329] Tanamoto, K., Iida, T., Haishima, Y., Azumi, S., *Microbiology-(UK)* **2001**, *147*, 1087.
- [330] Backhed, F., Soderhall, M., Ekman, P., Normark, S., Richter-Dahlfors, A., *Cell Microbiol.* **2001**, *3*, 153.
- [331] Beutler, B., *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 20.
- [332] Cognet, I., de Coignac, A. B., Magistrelli, G., Jeannin, P., Aubry, J. P., Maisnier-Patin, K., Caron, G., Chevalier, S., Humbert, F., Nguyen, T., Beck, A., Velin, D., Delneste, Y., Malissard, M., Gauchat, J. F., *J. Immunol. Methods* **2003**, *272*, 199.
- [333] Netea, M. G., van Deuren, M., Kullberg, B. J., Cavaillon, J. M., Van der Meer, J. W. M., *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 135.
- [334] Ogawa, T., Asai, Y., Hashimoto, M., Takeuchi, O., Kurita, T., Yoshikai, Y., Miyake, K., Akira, S., *Int. Immunol.* **2002**, *14*, 1325.
- [335] Romanowska, E., Pelczarska, A., Wnuk, W., Mulczyk, M., Godzinska, H., Slopek, S., *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, 435.
- [336] Tanamoto, K., Kato, H., Haishima, Y., Azumi, S., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 522.
- [337] Dijkstra, J., Larrick, J. W., Ryan, J. L., Szoka, F. C., *J. Leukocyte Biol.* **1988**, *43*, 436.
- [338] Rietschler, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., *FASEB J.* **1994**, *8*, 217.
- [339] Rietschler, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H. S., U., Flad, H. D., Hausschildt, S., Schade, U. F., Di Padova, F., Kusumoto, S., Schumann, R. R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1996**, *216*, 39.
- [340] Heine, H., Muller-Loennies, S., Brade, L., Lindner, B., Brade, H., *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 440.
- [341] Kosma, P., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 387.
- [342] Southam, G., Donald, R., *Earth-Science Reviews* **1999**, *48*, 251–264.
- [343] Blakemore, R. P., *Science* **1975**, *190*, 377.
- [344] Frankel, R. B., Blakemore, R. P., Wolfe, R. S., *Science* **1979**, *203*, 1355.
- [345] Bäuerlein, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 614.

- [346] Stolz, J. F., Chang, S.-B. R., Kirschvink, J. L., *Nature* **1986**, 321, 849.
- [347] Petersen, N., von Dobeneck, T., Vali, H., *Nature* **1986**, 320, 611.
- [348] Chang, S.-B. R., Kirschvink, J. L., *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* **1989**, 17, 169.
- [349] Ourisson, G., *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62, 1402.
- [350] Ingber, D. E., *BioEssays* **2000**, 22, 1160.
- [351] Koch, A. L., *J. Theor. Biol.* **1994**, 168, 269.
- [352] Walter, M. R., *Earths Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution*, Princeton University Press, Princeton, **1983**.
- [353] Morrell, V., *Science* **1997**, 276, 700.
- [354] Gupta, R. S., *Crit. Rev. Microbiol.* **2000**, 26, 111.
- [355] Woese, C. R., *Microbiol. Rev.* **1987**, 51, 221.
- [356] Olsen, G. J., Woese, C. R., *Cell* **1997**, 89, 991.
- [357] Xu, Y., Glandsdorff, N., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2002**, 133, 677.
- [358] Stetter, K. O., *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**, 18, 149.
- [359] Woese, C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 8392.
- [360] Woese, C. R., in *The Prokaryotes* (Eds.: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H.), Springer-Verlag, New York, **1992**.
- [361] van de Vossenberg, J., Driessen, A. J. M., Konings, W. N., *Extremophiles* **1998**, 2, 163.
- [362] Hauben, K. J. A., Barlett, D. H., Soontjens, C. C. F., Cornelis, K., Wuytack, E. Y., Michiels, C. W., *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 945.
- [363] <http://www.genomebiology.com>
- [364] Stetter, K. O., *FEBS Lett.* **1999**, 452, 22.
- [365] Cavicchioli, R., Thomas, T., Curmi, P. M. G., *Extremophiles* **2000**, 4, 321.
- [366] Blocher, D., Gutermann, R., Henkel, B., Ring, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 778, 74.
- [367] Kates, M., in *The Biochemistry of Archaea, Vol. 26* (Eds.: Kates, M., Kushner, D. J., Matheson, A. T.), Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [368] Kates, M., in *Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycolipids* (Ed.: Kates, M.), Plenum Press, New York, **1990**, pp. 1.
- [369] Ariga, K., Yuki, H., Kikuchi, J.-i., Dannemuller, O., Albrecht-Gary, A.-M., Nakatani, Y., Ourisson, G., *Langmuir* **2005**, 21, 4578.
- [370] Ourisson, G., Nakatani, Y., *Chem. Biol.* **1994**, 1, 11.
- [371] Kates, M., *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **1967**, 15, 301.
- [372] DeRosa, M., Gambacorta, A., Gliozzi, A., *Microbiol. Rev.* **1986**, 50, 70.
- [373] Koga, Y., Nishihara, M., Morii, H., Akagawamatsushita, M., *Microbiol. Rev.* **1993**, 57, 164.
- [374] Xu, Y. H., Ruppel, D., Ziegler, H., Hartmann, W., Galla, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 689, 437.
- [375] Mukherji, M., Schofield, C. J., Wierzbicki, A. S., Jansen, G. A., Wanders, R. J. A., Lloyd, M. D., *Prog. Lipid Res.* **2003**, 42, 359.
- [376] Gutknecht, J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1987**, 898, 97.
- [377] Yamauchi, K., Kuniyuki, D., Yoshida, Y., Kinoshita, M., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1146, 178.
- [378] Hsieh, C. H., Sue, S. C., Lyu, P. C., Wu, W. G., *Biophys. J.* **1997**, 73, 870.
- [379] Baba, T., Minamikawa, H., Hato, M., Handa, T., *Biophys. J.* **2001**, 81, 3377.
- [380] Nishihara, M., Morii, H., Koga, Y., *J. Biochem. (Tokyo)*. **1987**, 101, 1007.
- [381] Schleifer, K. H., Stackebrandt, E., *Ann. Rev. Microbiol* **1983**, 37, 143.
- [382] Hafenbradl, D., Keller, M., Stetter, K. O., *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, 136, 199.
- [383] Langworthy, T. A., *Syst. Appl. Microbiol.* **1986**, 7, 235.
- [384] Gliozzi, A., Paoli, G., Rolandi, R., De Rosa, M., Gambacorta, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 735, 234.

- [385] Damste, J. S. S., Schouten, S., Hopmans, E. C., van Duin, A. C. T., Genevasen, J. A. J., *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 1641.
- [386] Gliozzi, A., Relini, A., Chong, P. L. G., *J. Membr. Sci.* **2002**, *206*, 131.
- [387] Albers, S. V., van de Vossenberg, J., Driessen, A. J. M., Konings, W. N., *Front. Biosci.* **2000**, *5*, D813.
- [388] Konings, W. N., Albers, S. V., Koning, S., Driessen, A. J. M., *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **2002**, *81*, 61.
- [389] Driessen, A. J. M., van de Vossenberg, J. L. C. M., Konings, W. N., *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**, *18*, 139.
- [390] Hochstein, L. I., in *The Biochemistry of Archaea, Vol. 26* (Eds.: Kates, M., Kushner, D. J., Matheson, A. T.), Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [391] Hill, W. G., Zeidel, M. L., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30176.
- [392] Haines, T. H., *FEBS Lett.* **1994**, *346*, 115.
- [393] Hill, W. G., Rivers, R. L., Zeidel, M. L., *J. Gen. Physiol.* **1999**, *114*, 405.
- [394] Carruthers, A., Melchior, D. L., *Biochemistry* **1983**, *22*, 5797–5807.
- [395] Jansen, M., Blume, A., *Biophys. J.* **1995**, *68*, 997–1008.
- [396] Xiang, T. X., Anderson, B. D., *Biophys. J.* **1997**, *72*, 223.
- [397] Lande, M. B., Donovan, J. M., Zeidel, M. L., *J. Gen. Physiol.* **1995**, *106*, 67.
- [398] Paula, S., Volkov, A. G., Van Hoek, A. N., Haines, T. H., Deamer, D. W., *Biophys. J.* **1996**, *70*, 339.
- [399] Deamer, D. W., *J. Bioenerg. Biomembr.* **1987**, *19*, 457.
- [400] Gennis, R. B., *Science* **1998**, *280*, 1712.
- [401] Behrens, N. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *143*, 375.
- [402] Hemming, F. W., *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* **1992**, *70*, 377.
- [403] Chojnacki, T., Dallner, G., *Biochem. J.* **1988**, *251*, 1.
- [404] Quigley, F., Rickauer, M., Tanner, W., *Plant Science Letters* **1984**, *35*, 43.
- [405] Vargas-Rodriguez, L., Villagomez-Castro, J. C., Flores-Carreón, A., Lopez-Romero, E., *Int. J. Parasitol.* **1998**, *28*, 1333.
- [406] Parodi, A. J., *Biochem. J.* **2000**, *348*, 1.
- [407] Elbein, A. D., *FASEB J.* **1991**, *5*, 3055.
- [408] Hsu, A. F., Baynes, J. W., Heath, E. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 2391.
- [409] Mookerjee, S., Coolbear, T., Sarkar, M. L., *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1983**, *61*, 1032.
- [410] Verbert, A., Cacan, R., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1473*, 137.
- [411] Rush, J. S., van Leyen, K., Ouerfelli, O., Wolucka, B., Waechter, C. J., *Glycobiology* **1998**, *8*, 1195.
- [412] Kurup, R. K. A., Devi, D., Augustine, J., Kurup, P. A., *Neurosci. Res. Commun.* **2001**, *28*, 95.
- [413] Kuznetsov, S., Daugavietis, M., *J. Neurochem.* **1995**, *65*, S191.
- [414] Larsson, O., *Anticancer Res.* **1994**, *14*, 123.
- [415] Kurup, R. K., Kurup, P. A., *Int. J. Neurosci.* **2003**, *113*, 1427.
- [416] Kurup, R. K., Kurup, P. A., *Acta Neuropsychiatrica* **2003**, *15*, 266.
- [417] Mills, K., Mills, P. B., Clayton, P. T., Mian, N., Johnson, A. W., Winchester, B. G., *Glycobiology* **2003**, *13*, 73.
- [418] Haines, T. H., *Prog. Lipid Res.* **2001**, *40*, 299.
- [419] Jankowski, W. J., Swieczewska, E., Sasak, W., Chojnacki, T., *J. Plant Physiol.* **1994**, *143*, 448.
- [420] Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., Robbins, P. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1548.
- [421] Ganani, S., Cazzulo, J. J., Parodi, A. J., *Biochemistry* **1991**, *30*, 3098.
- [422] Waffenschmidt, S., Jaenicke, L., *Chem. Unserer Zeit* **1991**, *25*, 29.

- [423] Costa, J., Ashford, D. A., Nimtz, M., Bento, I., Frazao, C., Esteves, C. L., Faro, C. J., Kervinen, J., Pires, E., Verissimo, P., Wlodawer, A., Carrondo, M. A., *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 695.
- [424] Rayon, C., Lerouge, P., Faye, L., *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 1463.
- [425] Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V., Faye, L., *Plant Mol. Biol.* **1998**, *38*, 31.
- [426] Maia, I. G., Leite, A., *Genet. Mol. Biol.* **2001**, *24*, 231.
- [427] Sparvoli, R., Faoro, F., Daminati, M. G., Ceriotti, A., Bollini, R., *Plant J.* **2000**, *24*, 825.
- [428] Ceriotti, A., Duranti, M., Bollini, R., *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 1091.
- [429] Naumowicz, M., Petelska, A. D., Figaszewski, Z. A., *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, *8*, 5.
- [430] Bloch, K., *Steroids* **1992**, *57*, 378.
- [431] Maniloff, J., Morowitz, H. J., *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 263.
- [432] Odriozola, J. M., Waitzkin, E., Smith, T. L., Bloch, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 4107.
- [433] Baseman, J. B., Tully, J. G., *Emerg. Infect. Dis.* **1997**, *3*, 21.
- [434] Yeagle, P. L., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1985**, *822*, 267–287.
- [435] McMullen, T. P. W., McElhaney, R. N., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 83–90.
- [436] Gally, H. U., Seelig, A., Seelig, J., *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, *357*, 1447–1450.
- [437] Chapman, D., Owens, N. F., Phillips, M. C., Walker, D. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *183*, 458–465.
- [438] Smutzer, G., Yeagle, P. L., *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *814*, 274–280.
- [439] Straume, M., Litman, B. J., *Biochemistry* **1987**, *26*, 5121–5126.
- [440] Umebayashi, K., Nakano, A., *The journal of Cell Biology* **2003**, *161*, 1117.
- [441] Bloch, K., *Chimia* **1979**, *33*, 337.
- [442] Bloch, K., *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1983**, *4*, 47.
- [443] Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J. H., Bloom, M., Zuckermann, M. J., Mouritsen, O. G., *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1429.
- [444] McConnell, H. M., Radhakrishnan, A., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2003**, *1610*, 159.
- [445] Raffy, S., Teissie, J., *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2072.
- [446] Leonard, A., Escribe, C., Laguerre, M., Pebay-Peyroula, E., Neri, W., Pott, T., Katsaras, J., Dufourc, E. J., *Langmuir* **2001**, *17*, 2019.
- [447] Harroun, T. A., Katsaras, J., Wassall, S. R., *Biochemistry* **2006**, *45*, 1227.
- [448] Marsan, M. P., Muller, I., Ramos, C., Rodriguez, F., Dufourc, E. J., Czaplicki, J., Milon, A., *Biophys. J.* **1999**, *76*, 351.
- [449] Smaby, J. M., Momsen, M. M., Brockman, H. L., Brown, R. E., *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1492.
- [450] Subczynski, W. K., Wisniewska, A., Yin, J. J., Hyde, J. S., Kusumi, A., *Biochemistry* **1994**, *33*, 7670.
- [451] Gopalakrishna, P., Chaubey, S. K., Manogaran, P. S., Pande, G., *J. Cell. Biochem.* **2000**, *77*, 517.
- [452] Huang, J. Y., Buboltz, J. T., Feigenson, G. W., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1999**, *1417*, 89.
- [453] Van Dijk, P. W. M., de Kruyff, B., van Deenen, L. L. M., de Gier, J., Demel, R. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 576.
- [454] Borst, P., Zelcer, N., van Helvoort, A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2000**, *1486*, 128.
- [455] Hofmann, A. F., Small, D. M., *Annu. Rev. Med.* **1967**, *18*, 333.
- [456] Kritchevsky, D., Nair, P. P., *Chemistry of the bile acids, Vol. Bd. 1: Chemistry*, Plenum Press, New York, **1971**.

- [457] Björkhem, I., *Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver, Vol. 12*, Elsevier, Amsterdam, **1985**.
- [458] Hartley, G. S., *Aqueous solutions of paraffin-chain salts. A study in micelle formation.*, Hermann & Cie, Paris, **1936**.
- [459] Lichtenberg, D., Robson, R. J., Dennis, E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 737, 285.
- [460] Small, D. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, 45, 108.
- [461] Small, D. M., *Fed. Proc.* **1970**, 29, 1320.
- [462] Carey, M. C., Small, D. M., *Am. J. Med.* **1970**, 49, 590.
- [463] Hildebrand, A., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle-Wittenberg), **2002**.
- [464] Privalov, P. L., Gill, S. J., *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 1097.
- [465] Blokzijl, W., Engberts, J., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1993**, 32, 1545.
- [466] Gill, S. J., Wadso, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, 73, 2955.
- [467] Tanford, C., *Science* **1978**, 200, 1012.
- [468] Tanford, C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley, New York, **1980**.
- [469] Tanford, C., *Monolayers, micelles, lipid vesicles and biomembranes, Vol. 90*, **1985**.
- [470] Israelachvili, J. N., *Thermodynamic and geometric aspects of amphiphile aggregation into micelles, vesicles, and bilayers, and the interaction between them, Vol. 90*, **1985**.
- [471] Leadbetter, A. J., in *Thermotropic Liquid Crystals, Vol. Chapter 1* (Ed.: Gray, G. W.), Wiley, Chichester, **1987**.
- [472] Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., Ninham, B. W., *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1976**, 72, 1525.
- [473] Lichtenberg, D., *Micelles and liposomes, Vol. 1*, VCH - Weinheim, Weinheim, **1993**.
- [474] Gennis, R. G., *Biomembranes Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York, **1989**.
- [475] Huang, C., Mason, J. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 308.
- [476] Silvius, J. R., Lyons, M., Yeagle, P. L., O'Leary, T. J., *Biochemistry* **1985**, 24, 5388.
- [477] Pomorski, T., Holthuis, J. C. M., Herrmann, A., van Meer, G., *J. Cell Sci.* **2004**, 117, 805.
- [478] Kumar, V. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 444.
- [479] Kumar, V. V., Baumann, W. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 139, 25.
- [480] Kumar, V. V., Anderson, W. H., Thompson, N. E., Malewicz, B., Baumann, W. J., *Biochemistry* **1988**, 27, 393.
- [481] van Echteld, C. J. A., De Kruijff, B., Mandersloot, J. G., De Gier, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 649, 211.
- [482] Madden, D. T., Cullis, P. R., *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 684, 149.
- [483] Tausk, R. J. M., Karmiggelt, J., Oudshoorn, C., Overbeek, J. T. G., *Biophys. Chem.* **1994**, 1, 175.
- [484] Burns, R. A., Roberts, M. F., *Biochemistry* **1980**, 19, 3100.
- [485] Racey, T. J., Singer, M. A., Finegold, L., Rochon, P., *Chem. Phys. Lipids* **1989**, 49, 271.
- [486] Menger, F. M., Angelova, M. I., *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 789.
- [487] Stuiblé, H. P., Meurer, G., Schweizer, E., *Eur. J. Biochem.* **1997**, 247, 268.
- [488] Joshi, A. K., Witkowski, A., Berman, H. A., Zhang, L., Smith, S., *Biochemistry* **2005**, 44, 4100.
- [489] Chakravarty, B., Gu, Z. W., Chirala, S. S., Wakil, S. J., Quioco, F. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 15567.
- [490] Johnson, R. A., Hamilton, J. A., Worgall, T. S., Deckelbaum, R. J., *Biochemistry* **2003**, 42, 1637.
- [491] Deamer, D. W., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, 61, 239.
- [492] Monnard, P. A., Deamer, D. W., in *Liposomes, Pt B, Vol. 372*, Academic Press Inc, San Diego, **2003**, pp. 133.
- [493] Rosano, H. L., Christodolou, A. P., Feinstein, M. E., *J. Colloid Interface Sci.* **1969**, 29, 335.

- [494] Haines, T. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 160.
- [495] Cistola, D. P., Hamilton, J. A., Jackson, D., Small, D. M., *Biochemistry* **1988**, *27*, 1881.
- [496] Hargreaves, W. R., Deamer, D. W., *Biochemistry* **1978**, *17*, 3759.
- [497] Apel, C. L., Deamer, D. W., Mautner, M. N., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2002**, *1559*, 1.
- [498] Mabrey, S., Sturtevant, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 3862.
- [499] Wilkinson, D. A., Nagle, J. F., *Biochemistry* **1981**, *20*, 187.
- [500] Blume, A., *Biochemistry* **1983**, *22*, 5436.
- [501] Parente, R. A., Lentz, B. R., *Biochemistry* **1984**, *23*, 2353.
- [502] Seelig, J., in *Les Houches* (Eds.: Balian, R., Charbre, M., Devaux, P. F.), North Holland, Amsterdam, **1981**, p. 36.
- [503] Wong, M., Anthony, F. W., Tillack, T. W., Thompson, T. E., *Biochemistry* **1982**, *21*, 4128.
- [504] Vaughan, D. J., Keough, K. M., *FEBS Lett.* **1974**, *47*, 158.
- [505] Van Echteld, C. J. A., De Kruijff, B., De Gier, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *595*, 71.
- [506] Klopfenstein, W. E., De Kruijff, B., Verkleij, A. J., Demel, R. A., Van Demen, L. L. M., *Chem. Phys. Lipids* **1974**, *13*, 215.
- [507] Salvati, S., Serlupi-Crescenzi, G., de Gier, J., *J. Chem. Phys. Lipids* **1979**, *24*, 85.
- [508] McKeone, B. J., Pownall, H. J., Massey, J. B., *Biochemistry* **1986**, *25*, 7711.
- [509] Hinz, H. J., Sturtevant, J. M., *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6071.
- [510] Seddon, J. M., Cevc, G., Marsh, D., *Biochemistry* **1983**, *22*, 1280.
- [511] Harlos, K., Eibl, H., *Biochemistry* **1981**, *20*, 2888.
- [512] Wu, W. G., Huang, C. H., Conley, T. G., Martin, R. B., Levin, I. W., *Biochemistry* **1982**, *21*, 5957.
- [513] Mattai, J., Shipley, G. G., *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *859*, 257.
- [514] Ladbroke, B. D., Chapman, D., *Chem. Phys. Lipids* **1969**, *3*, 304.
- [515] Lipka, G., Chowdhry, B. Z., Sturtevant, J. M., *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5401.
- [516] http://uni-schule.san-ev.de/space/AG_Bickel/se2/grundl2/schmelz.htm
- [517] Nagle, J. F., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1980**, *31*, 157.
- [518] Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., Mohler, W., Han, D. K., *Dev. Cell* **2003**, *4*, 587.
- [519] Henson, P. M., Bratton, D. L., Fadok, V. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 627.
- [520] Garidel, P., Blume, A., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1998**, *1371*, 83.
- [521] Nibu, Y., Inoue, T., Motoda, I., *Biophys. Chem.* **1995**, *56*, 273.
- [522] Carnie, S., Israelachvili, J. N., Pailthorpe, B. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *554*, 340.
- [523] Rand, R. P., Parsegian, V. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *988*, 351
- [524] Momchilovapankova, A. B., Markovska, T. T., Yanev, E. I., Koumanov, K. S., *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1994**, *9*, 235.
- [525] Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W. C., Harmsma, M., Zwaal, R. F. A., *Lupus* **1998**, *7*, S126.
- [526] Corcelli, A., Turner, R. J., *J. Membr. Biol.* **1991**, *120*, 125.
- [527] Momchilovapankova, A. B., Markovska, T. T., Koumanov, K. S., *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1995**, *11*, 13.
- [528] Lehmann, O., *Physik. Z.* **1907**, *8*, 42.
- [529] Lehmann, O., *Die neue Welt der flüssigen Kristalle und deren Bedeutung für Physik, Chemie, Technik und Biologie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1911**.
- [530] Cevc, G., *Phospholipid Handbook*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [531] Acher, R., Chauvet, J. U.-h. w. s. c. s. a. B. W.-N.-D. e. a. e. f. f. f. c., *Front. Neuroendocrinol.* **1995**, *16*, 237.

- [532] Cevc, G., Marsh, D., *Phospholipid Bilayers - Physical Principles and Models, Vol. Bd. 5*, Wiley, New York, **1987**.
- [533] Laggner, P., Kriechbaum, M., *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 121–145.
- [534] Garidel, P., Blume, A., *Lipid model membranes and biomembranes, Vol. Bd. 4. - Kapitel 4*, Elsevier, Amsterdam, **1998**.
- [535] Mishima, K., *J. Phys. Soc. Japan* **1976**, *41*, 139–2140.
- [536] Small, D. M., *J. Lipid Res.* **1967**, *8*, 551.
- [537] Gruner, S. M., Cullis, P. R., Hope, M. J., Tilcock, C. P. S., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **1985**, *14*, 211.
- [538] Kirk, G. L., Princeton Univ. (Princeton), **1984**.
- [539] Kim, J. T., Mattai, J., Shipley, G. G., *Biochemistry* **1987**, *26*, 6599.
- [540] Ruocco, M. J., Siminovitich, D. S., Griffin, R. G., *Biochemistry* **1985**, *24*, 2406.
- [541] Haas, N. S., Sripada, P. K., Shipley, G. G., *Biophys. J.* **1987**, *57*, 117.
- [542] Hing, F. S., Shipley, G. G., *Biochemistry* **1995**, *34*, 11904.
- [543] Cheng, K. H., Ruonala, M., Virtanen, J., Somerharju, P., *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1967–1976.
- [544] Cheng, K. H., Virtanen, J., Somerharju, P., *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3108–3119.
- [545] Somerharju, P. J., Virtanen, J. A., Cheng, K. H., *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1440*, 32.
- [546] Koynova, R., Caffrey, M., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *115*, 107.
- [547] McClain, R. L., Breen, J. J., *Langmuir* **2001**, *17*, 5121.
- [548] Aguilar, L., Ortega-Pierres, G., Campos, B., Fonseca, R., Ibanez, M., Wong, C., Farfan, N., Naciff, J. M., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., Baeza, I., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25193.
- [549] Ringsdorf, H., Schlarb, B., Venzmer, J., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1988**, *27*, 113.
- [550] Small, D. M., *The Physical Chemistry of Lipids, Vol. Bd. 4.*, Plenum Press, New York, **1986**.
- [551] Lasic, D. D., *Liposomes: from Physics to Application*, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [552] Jones, M. N., Chapman, D., *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*, Wiley, New York, **1995**.
- [553] Lipowsky, R., *Europhys. Lett.* **1999**, *3*, 76–77.
- [554] Hanczyc, M. M., Szostak, J. W., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 660.
- [555] Limozin, L., Sackmann, E., *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, art. no.
- [556] Behrisch, A., Kloboucek, A., Simson, R., Gerisch, G., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1998**, *74*, A375.
- [557] Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Schwille, P., *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 77.
- [558] Kahya, N., Schwille, P., *Biophys. J.* **2005**, *88*, 75A.
- [559] London, E., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2005**, *1746*, 203.
- [560] Silvius, J. R., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2005**, *1746*, 193.
- [561] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P. H., Brochard-Wyart, F., *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1734.
- [562] Menger, F. M., Balachander, N., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5862.
- [563] Dobreiner, H. G., Kas, J., Noppl, D., Sprenger, I., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1396.
- [564] Sackmann, E., Feder, T., *Mol. Membr. Biol.* **1995**, *12*, 21.
- [565] Devaux, P. F., Morris, R., *Traffic* **2004**, *5*, 241.
- [566] Menger, F. M., Seredyuk, V. A., Kitaeva, M. V., Yaroslavov, A. A., Melik-Nubarov, N. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2846.
- [567] Harbich, W., Helfrich, W., *Z. Naturforsch. Sect. A-J. Phys. Sci.* **1979**, *34*, 1063.
- [568] Kummrow, M., Helfrich, W., *Phys. Rev. A* **1991**, *44*, 8356.
- [569] Simon, J., Kuhner, M., Ringsdorf, H., Sackmann, E., *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76*, 241.
- [570] Jesorka, A., Markstrom, M., Karlsson, M., Orwar, O., *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14759.

- [571] Menger, F. M., Keiper, J. S., Lee, S. J., *Langmuir* **1997**, *13*, 4614.
- [572] Baumgart, T., Hess, S. T., Webb, W. W., *Nature* **2003**, *425*, 821.
- [573] Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., Schwille, P., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28109.
- [574] Angelova, M. I., Dimitrov, D. S., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1987**, *152*, 89.
- [575] Dimitrov, D. S., Angelova, M. I., *Stud. Biophys.* **1987**, *119*, 61.
- [576] Angelova, M. I., Dimitrov, D. S., *Faraday Discuss.* **1986**, 303.
- [577] Dimitrov, D. S., Angelova, M. I., *Stud. Biophys.* **1986**, *113*, 15.
- [578] Kros, A., Linhardt, J. G., Tirrell, D. A., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *221*, 285.
- [579] Karlsson, M., Davidson, M., Karlsson, R., Karlsson, A., Bergenholtz, J., Konkoli, Z., Jesorka, A., Lobovkina, T., Hurtig, J., Voinova, M., Orwar, O., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 613.
- [580] Fromherz, P., Kiessling, V., Kottig, K., Zeck, G., *Appl. Phys. A-Mater. Sci. Process.* **1999**, *69*, 571.
- [581] http://scienceinyoureyes.memphys.sdu.dk/index_en.php
- [582] Carey, M. C., Small, D. M., *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506–527.
- [583] Hofmann, A. F., Small, D. M., *Annu. Rev. Med.* **1967**, *18*, 333–376.
- [584] Gelbart, W. M., Ben-Shaul, A., Roux, D., **1994**.
- [585] Mukerjee, P., *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 972–981.
- [586] Helenius, A., Simons, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *415*, 29–79.
- [587] Marques, E. F., Edlund, H., la Mesa, C., Khan, A., *Langmuir* **2000**, *16*, 5178–5186.
- [588] Small, D. M., *Gastroenterology* **1967**, *52*, 607–610.
- [589] Dervichian, D. G., *Adv. Chem. Ser. B* **1968**, *84*, 78–87.
- [590] Hjelm, R. P., Alkan, H., Thiyagaragan, P., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1990**, *180*, 155–164.
- [591] Mazer, N. A., Kwasnick, R. F., Carey, M. C., Benedek, G. B., *Quasielastic light scattering spectroscopic studies of aqueous bile salt, bile salt-lecithin and bile salt-lecithin-cholesterol solutions, Vol. 1*, Plenum Press, New York, **1977**.
- [592] Bayburt, T. H., Carlson, J. W., Sligar, S. G., *J. Struct. Biol.* **1998**, *123*, 37.
- [593] Vold, R. R., Prosser, R. S., Deese, A. J., *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 329.
- [594] Katsaras, J., Harroun, T. A., Pencer, J., Nieh, M. P., *Naturwissenschaften* **2005**, *92*, 355.
- [595] Andersson, A., Mäler, L., *Langmuir* **2006**, *22*, 2447.
- [596] Andersson, A., Mäler, L., *Langmuir* **2005**, *21*, 7702.
- [597] Lichtenberg, D., *Micelles and liposomes, Vol. 1*, VCH - Weinheim, Weinheim, **1993**.
- [598] Helenius, A., Simons, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *415*, 29.
- [599] Lasch, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1241*, 269–292.
- [600] Lichtenberg, D., Robson, R. J., Dennis, E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *737*, 285–304.
- [601] Andelman, D., Kozlov, M. M., Helfrich, W., *Europhys. Lett.* **1994**, *25*, 231–236.
- [602] Kozlov, M. M., Lichtenberg, D., Andelman, D., *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 6600.
- [603] Ulmius, J., Lindblom, G., Wennerström, H., *Biochemistry* **1982**, *21* 553.
- [604] Evans, E., Rawicz, W., Hofmann, A. F., *Lipid bilayer expansion and mechanical disruption in solutions of water-soluble bile acids, Vol. 5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1995**.
- [605] Wetzel, P. B., Cammenga, H. K., *J. Colloid Interf. Sci.* **1998**, *207*, 70–77.
- [606] Lasch, J., Hoffmann, J., Omelyanenko, W. G., Klivanov, A. A., Torchilin, V. P., Binder, H., Gawrisch, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1022* 71–180.
- [607] Inoue, T., Yamahata, T., Shimozawa, R., *J. Colloid Interf. Sci.* **1992**, *149*, 345–358.
- [608] Tanford, C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Krieger, Malabar, **1991**.
- [609] Edidin, M., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 257.
- [610] Brown, D. A., London, E., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221.
- [611] Van Meer, G., *Science* **2002**, *296*, 855.
- [612] Jain, M. K., White, H. B. r., *Ad. Lipid Res.* **1977**, *15*, 1.

- [613] Brown, D. A., Rose, J. K., *Cell* **1992**, *68*, 533.
- [614] Degroote, S., Wolthorn, J., Gerrit, v. M., *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 375.
- [615] Brown, D. A., London, E., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111.
- [616] Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., Pierce, S. K., *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 457.
- [617] Kuzmin, P. I., Akimov, S. A., Chizmadzhev, Y. A., Zimmerberg, J., Cohen, F. S., *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1120.
- [618] Subczynski, W. K., Antholine, W. E., Hyde, J. S., Kusumi, A., *Biochemistry* **1990**, *29*, 7936.
- [619] Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A., Keen, J. H., *Nat. Cell. Biol.* **1998**, *1*, 1.
- [620] Adams, C., Nelson, W. J., *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, *7*, 457.
- [621] Kawasaki, K., Yin, J.-J., Subczynski, W. K., Hyde, J. S., Kusumi, A., *Biophys. J.* **2001**, *80*, 738.
- [622] Almeida, R. F. M., Loura, L. M. S., Fedorov, A., Prieto, M., *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 1109.
- [623] Binder, W. H., Barragan, V., Menger, F. M., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2003**, *42*, 5802.
- [624] Pike, L. J., *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 655.
- [625] Kasahara, K., Sanai, Y., *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 153.
- [626] Yuyama, K., Sekino-Suzuki, N., Sanai, Y., Kasahara, K., *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 139.
- [627] Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., Pierce, S. K., *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1549.
- [628] Vidalain, P. O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., Manie, S., *EMBO J.* **2000**, *19*, 3304.
- [629] Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F., Levrero, M., *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 915.
- [630] Liu, P., Ying, Y., Ko, Y. G., Anderson, R. G., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10299.
- [631] Junge, S., Brenner, B., Lepple-Wienhues, A., Nilius, B., Lang, F., Linderkamp, O., Gulbins, E., *Cell. Signal.* **1999**, *11*, 301.
- [632] Rosenmann, S. J., Ganji, A. A., Tedder, T. F., Gallatin, W. M., *J. Leukoc. Biol.* **1993**, *53*, 1.
- [633] Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2333.
- [634] Koleske, A. J., Baltimore, D., Lisanti, M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 1381.
- [635] Raulin, J., *Prog. Lipid Res.* **2002**, *41*, 27.
- [636] Aloia, R. C., Tian, H., Jensen, F. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5181.
- [637] Dahmen-Levison, U., Brezesinski, G., Mohwald, H., *Thin Solid Films* **1998**, *329*, 616.
- [638] Muppidi, J. R., Tschopp, J., Siegel, R. M., *Immunity* **2004**, *21*, 461.
- [639] Mattjus, P., Slotte, J. P., *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *81*, 69.
- [640] Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., Tsien, R. Y., *Science* **2002**, *296*, 913.
- [641] Bretscher, M. S., Munro, S., *Science (Washington, D. C., 1883-)* **1993**, *261*, 1280.
- [642] Kundu, A. K., Avalos, R. T., Sanderson, C. M., Nayak, D. P., *J. Virol.* **1996**, *70*, 6508.
- [643] Lee, A., *Curr. Biol.* **2003**, *11*, R811.
- [644] Nybond, S., Björkqvist, Y. J. E., Ramstedt, B., Slotte, J. P., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1718*, 61.
- [645] Levin, I. W., Thompson, T. E., Barenholz, Y., Huang, C., *Biochemistry* **1985**, *24*, 6282.
- [646] Bittmann, R., Kasireddy, C. R., Mattjus, P., Slotte, J. P., *Biochemistry* **1994**, *33*, 11776.
- [647] Liu, F., Sugar, I. P., Chong, P. L.-G., *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2243–2254.
- [648] Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., Anderson, R. G., *Cell* **1992**, *68*, 673.
- [649] Marx, J., **2001**, *294*, 1862.
- [650] Takei, K., Haucke, V., *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 385.

- [651] Mausavi, S. A., Malerod, L., Berg, T., Kjekken, R., *Biochem J.* **2004**, 377, 1.
- [652] Schmidt, A. L., *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 511.
- [653] Zimmerberg, J., Vogel, S. S., Chernomordik, L. V., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 433.
- [654] Zimmerberg, J., Chernomordik, L. V., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 38, 197.
- [655] Luisi, P. L., in *Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe* (Eds.: Cosmovici, C. B., Bowyer, S., Werthimer, D.), Editrice Compositori, Bologna, **1997**, pp. 461.
- [656] Deamer, D. W., Oro, J., *Biosystems* **1980**, 12, 167.
- [657] Deamer, D. W., *Origins Life* **1986**, 17, 3.
- [658] Luisi, P. L., Walde, P., Oberholzer, T., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, 4, 33.
- [659] Menger, F. M., Gabrielson, K. D., *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2260.
- [660] Luisi, P. L., Varela, F. J., *Orig. Life Evol. Biosph.* **1989**, 19, 633.
- [661] Blumenthal, R., Claque, M. J., Durell, S. R., Epand, R. M., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 53.
- [662] Cevc, G., Richardsen, H., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 38, 207
- [663] Jahn, R., Hanson, P. I., *Nature*, 393, 14.
- [664] Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M., *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 175.
- [665] Hamill, O. P., Martinac, B., *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 685.
- [666] Sackmann, E., Eggl, P., Fahn, C., Bader, H., Ringsdorf, H., Schollmeier, M., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1985**, 89, 1198.
- [667] Duzgunes, N., Wilschut, J., Fraley, R., Papahadjopoulos, D., *Biochim. Biophys. Acta.* **1981**, 642, 182.
- [668] Aldwinckle, T. J., Ahkong, Q. F., Bangham, A. D., Fisher, D., Lucy, J. A., *Biochim. Biophys. Acta.* **1982**, 689, 548
- [669] Wilschut, J., Hoekstra, D., *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 40, 145.
- [670] Ohki, S., *Surface tension, hydration energy and membrane fusion*, Plenum Press, New York, **1988**.
- [671] Lentz, B. R., *Chem. Phys. Lipids* **1994**, 73, 91.
- [672] Peisajovich, S. G., Epand, R. F., Pritsker, M., Shai, Y., Epand, R. M., *Biochemistry* **2000**, 39, 1826.
- [673] Chanturiya, A., Leikina, E., Zimmerberg, J., Chernomordik, L. V., *Biophys. J.* **1999**, 77, 2035.
- [674] Hui, S. W., Kuhl, T. L., Guo, Y. Q., Israelachvili, J., *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1999**, 14, 213.
- [675] Aroeti, B., Okhrimenko, H., Reich, V., Orzech, E., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1998**, 1376, 57.
- [676] Yang, L., Ding, L., Huang, H. W., *Biochemistry* **2003**, 42, 6631.
- [677] Lentz, B. R., Malinin, V., Haque, M. E., Evans, K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 607.
- [678] Hui, W. W., Stewart, T. P., Boni, L. T., Yeagle, P. L., *Science* **1981**, 212, 912.
- [679] Yang, L., Ding, L., Huang, H. W., *Biochemistry* **2003**, 42, 6631.
- [680] Markin, V. S., Kozlov, M. M., Borovjagin, V. L., *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, 3, 361.
- [681] Yang, L., Huang, H. W., *Science* **2002**, 297, 1877.
- [682] Brandenburg, K., Richter, W., Koch, M. H. J., Meyer, H. W., Seydel, U., *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 91, 53.
- [683] Ortiz, A., Killian, J. A., Verkleij, A. J., Wilschut, J., *Biophys. J.* **1999**, 77, 2003.
- [684] Ekeroth, J., Konradsson, P., Hook, F., *Langmuir* **2002**, 18, 7923.
- [685] Elferink, M. G. L., vanBremen, J., Konings, W. N., Driessen, A. J. M., Wilschut, J., *Chem. Phys. Lipids* **1997**, 88, 37.
- [686] Jass, J., Tjårhage, T., Puu, G., *Biophys. J.* **2000**, 79, 3153–3163.
- [687] Gruner, S. M., *Science* **2002**, 297, 1817.
- [688] Gruner, S. M., *Science* **2002**, 297, 1817.
- [689] Keller, C. A., Kasemo, B., *Biophys. J.* **1998**, 75, 1397.

- [690] Subczynski, W. K., Hyde, J. S., Kusumi, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4474.
- [691] Lippe, G., Perardi, A., Sorgato, M. C., Dabbeni-Sala, F., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1987**, *17*, 147.
- [692] Mueller, P., Chien, T. F., Rudy, B., *Biophys. J.* **1983**, *44*, 375.
- [693] Montal, M., Mueller, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 3561.
- [694] Pomorski, T., Hrafnisdottir, S., Devaux, P. F., van Meer, G., *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 139.
- [695] Devaux, P. F., *Biochemistry* **1991**, *30*, 1163.
- [696] Devaux, P. F., *Period. Biol.* **1998**, *100*, 21.
- [697] Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 1943.
- [698] Buton, X., Herve, P., Kubelt, J., Tannert, A., Burger, K. N. J., Fellmann, P., Muller, P., Herrmann, A., Seigneuret, M., Devaux, P. F., *Biochemistry* **2002**, *41*, 13106.
- [699] Kornberg, R. D., McConnel.Hm, *Biochemistry* **1971**, *10*, 1111.
- [700] Op den Kamp, J. A. F., *Ann. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47.
- [701] Middelkoop, E., Lubin, B. H., Op den Kamp, J. A. F., Roelfsen, B., *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *855*, 421–424.
- [702] Bishop, W. R., Bell, R. M., *Cell* **1985**, *42*, 51.
- [703] Hamilton, J. A., *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 263.
- [704] De Kruijff, B., van Zoelen, E. J., *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *511*, 105.
- [705] Kol, M. A., van Laak, A. N. C., Rijkers, D. T. S., Killian, J. A., de Kroon, A., de Kruijff, B., *Biochemistry* **2003**, *42*, 231.
- [706] Fattal, E., Nir, S., Parente, R. A., Szoka Jr., F. C., *Biochemistry* **1994**, *33*, 6721.
- [707] Janssen, M. J. F. W., Koorengel, M. C., de Kruij, B., de Kroon, A. I. P. M., *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 64.
- [708] Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W. C., Zwaal, R. F. A., *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids* **1999**, *1439*, 317.
- [709] Daleke, D. L., *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 233.
- [710] Bevers, E. M., Comfurius, P., Zwaal, R. F. A., *Lupus* **1996**, *5*, 480.
- [711] Devaux, P. F., *News Physiol. Sci.* **1990**, *5*, 53.
- [712] Graham, T. R., *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 670.
- [713] Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M. F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J. M., Devaux, P. F., McNeish, J., Marguet, D., Chimini, G., *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 399.
- [714] Liu, J., Conboy, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8376.
- [715] Gaip, U. S., Beyer, T. D., Baumann, I., Voll, R. E., Stach, C. M., Heyder, P., Kalden, J. R., Manfredi, A., Herrmann, M., *Immunobiology* **2003**, *207*, 73.
- [716] Castegna, A., Lauderback, C. M., Mohmmad-Abdul, H., Butterfield, D. A., *Brain Res.* **2004**, *1004*, 193.
- [717] Gadella, B. M., Harrison, R. A., *Biol. Reprod.* **2002**, *67*, 340.
- [718] Gadella, B. M., Harrison, R. A. P., *Development* **2000**, *127*, 2407.
- [719] Moore, P., B., Lopez, C. F., Klein, M. L., *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2484.
- [720] Benninger, R. K. P., Onfelt, B., Neil, M. A. A., Davis, D. M., French, P. M. W., *Biophys. J.* **2005**, *88*, 609.
- [721] Fuller, G. M., Shields, D., *Molecular Basis of Medical Cell Biology*, Appleton & Lange, **1998**.
- [722] Jamora, C., Fuchs, E., *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E101.
- [723] Discher, D. E., Carl, P., *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6*, 593.
- [724] Helmke, B. P., Davies, P. F., *Ann. Biomed. Eng.* **2002**, *30*, 284.
- [725] Wilke, A., Schonian, U., Herzum, M., Hengstenberg, C., Hufnagel, G., Brilla, C. G., Maisch, B., *Herz* **1995**, *20*, 95.
- [726] Carpenter, C. L., *Crit. Care Med.* **2000**, *28*, N94.
- [727] Schoenwaelder, S. M., Burrige, K., *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 274.

- [728] Smith, G. A., Enquist, L. W., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 135.
- [729] Ploubidou, A., Way, M., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 97.
- [730] Barbieri, J. T., Riese, M. J., Aktories, K., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 315.
- [731] Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 793.
- [732] Juliano, R. L., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 283.
- [733] Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., Ingber, D. E., *Science* **1997**, *276*, 1425.
- [734] Acuto, O., Cantrell, D., *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 165.
- [735] Das, V., Nal, B., Roumier, A., Meas-Yedid, V., Zimmer, C., Olivo-Marin, J. C., Roux, P., Ferrier, P., Dautry-Varsat, A., Alcover, A., *Immunol. Rev.* **2002**, *189*, 123.
- [736] Abe, S., Davies, E., in *Methods in Cell Biology, Vol 50, Vol. 50*, **1995**, pp. 223.
- [737] Fais, S., Luciani, F., Logozzi, M., Parlato, S., Lozupone, F., *Histol. Histopathol.* **2000**, *15*, 539.
- [738] Wang, N., Butler, J. P., Ingber, D. E., *Science* **1993**, *260*, 1124.
- [739] Ingber, D. E., *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, *59*, 575.
- [740] Ingber, D., *J. Cell. Sci.* **1993**, *104*, 613.
- [741] Petrov, A. G., Usherwood, P. N. R., *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1994**, *23*, 1.
- [742] Svetina, S., Bozic, B., Derganc, J., Zeks, B., *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6*, 677.
- [743] Capetanaki, Y., *Trends Cardiovasc. Med.* **2002**, *12*, 339.
- [744] Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y., Schaper, J., *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45*, 273.
- [745] Appaix, F., Kuznetsov, A. V., Usson, Y., Kay, L., Andrienko, T., Olivares, J., Kaambre, T., Sikk, P., Margreiter, R., Saks, V., *Exp. Physiol.* **2003**, *88*, 175.
- [746] Apodaca, G., *Traffic* **2001**, *2*, 149.
- [747] Schmidt, A., Hall, M. N., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 305.
- [748] Wasteneys, G. O., Galway, M. E., *Annual Review of Plant Biology* **2003**, *54*, 691.
- [749] Stromer, M. H., *Microsc. Res. Tech.* **1995**, *31*, 95.
- [750] Wallar, B. J., Alberts, A. S., *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 435.
- [751] Le Rudulier, R., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., Valentine, R. C., *Science* **1984**, *224*, 1064.
- [752] Leterrier, J. F., *Cell. Mol. Biol.* **2001**, *47*, 901.
- [753] Morley, S. C. P., Bierer, B. E., in *Adv. Immunol., Vol. 77*, **2001**, pp. 1.
- [754] Hu, S., Reichardt, L. F., *Neuron* **1999**, *22*, 419.
- [755] Geiger, B., *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *737*, 305.
- [756] Qualmann, B., Kessels, M. M., in *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol. 220*, **2002**, pp. 93.
- [757] Yao, X. B., Forte, J. G., in *Membrane Protein-Cytoskeleton Interactions, Vol. 43*, **1996**, pp. 73.
- [758] Diakowski, W., Sikorski, A. F., *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1564*, 403–411.
- [759] Szaszi, K., Grinstein, S., Orlowski, J., Kapus, A., *Cell. Physiol. Biochem.* **2000**, *10*, 265.
- [760] Caroni, P., *EMBO J.* **2001**, *20*, 4332.
- [761] O'Toole, P. J., Wolfe, C., Ladha, S., Cherry, R. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1419*, 64.
- [762] Denker, S. P., Barber, D. L., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 214.
- [763] Winder, S. J., *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1997**, *18*, 617.
- [764] Lanzetti, L., Di Fiore, P. P., Scita, G., *Exp. Cell Res.* **2001**, *271*, 45.
- [765] Stamnes, M., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 428.
- [766] Walker, J. H., Agoston, D. V., *Biochem. J.* **1987**, *247*, 249.
- [767] Okamoto, C. T., Forte, J. G., *J. Physiol.-London* **2001**, *532*, 287.
- [768] Kamal, A., Goldstein, L. S. B., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 503.
- [769] Buvet, R., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1987**, *17*, 121.

- [770] Chiu, D. T., Wilson, C. F., Ryttsen, F., Strömberg, A., Farre, C., Karlsson, A., Nordholm, S., Gaggar, A., Modi, B. P., Moscho, A., Garza-Lopez, R. A., Orwar, O., Zare, R. N., *Science* **1999**, *283*, 1892.
- [771] Chrai, S. S., Murari, R., Ahmad, I., *Biopharm-the Applied Technologies of Biopharmaceutical Development* **2002**, *15*, 40.
- [772] Nikolelis, D. P., Hianik, T., Krull, U. J., *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1.
- [773] Tomii, Y., *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 467.
- [774] Meier, W., Nardine, C., Winterhalter, M., *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4747.
- [775] Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007.
- [776] Deboer, A. G., Devries, H. E., Delange, E. C. M., Danhof, M., Kuiper, J., Breimer, D. D., *J. Controlled Release* **1994**, *28*, 259.
- [777] Abbott, N. J., Romero, I. A., *Mol. Med. Today* **1996**, *2*, 106.
- [778] Pidgeon, *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 36.
- [779] Fournier, L., Joos, B., *Physical Reviews E* **2003**, *67*, art. no.
- [780] Farago, O., *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 596.
- [781] Kalko, S. G., Hernandez, J. A., Grigera, J. R., Fischbarg, J., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1995**, *1240*, 159.
- [782] Duncan, R., Rejmanova, P., Kopecek, J., Lloyd, J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *678*, 143.
- [783] Pratten, M. K., Lloyd, J. B., Horpel, G., Ringsdorf, H., *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1985**, *186*, 725.
- [784] Higashi, N., Sunamoto, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1243*, 386.
- [785] Bradbury, N. A., Bridges, R. J., *Am. J. Physiol.* **1994**, *267*, C1.
- [786] Aldridge, B. E., Bruner, L. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, *817*, 343.
- [787] Horne, D. W., Reed, K. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298*, 121.
- [788] Kudzina, L. Y., Lukyanenko, A. I., Rotaru, V. K., Evtodienko, Y. V., *Biofizika* **1977**, *22*, 363.
- [789] Gilmanshin, R., Creutz, C. E., Tamm, L. K., *Biochemistry* **1994**, *33*, 8225.
- [790] Kastl, K., Ross, M., Gerke, V., Steinem, C., *Biochemistry* **2002**, *41*, 10087.
- [791] Janshoff, A., Ross, M., Gerke, V., Steinem, C., *Chembiochem* **2001**, *2*, 587.
- [792] Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H. J., Hinz, H. J., Gerke, V., *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 279.
- [793] Plant, A. L., Brighamburke, M., Petrella, E. C., Oshannessy, D. J., *Anal. Biochem.* **1995**, *226*, 342.
- [794] Ross, E. E., Spratt, T., Liu, S. C., Rozanski, L. J., O'Brien, D. F., Saavedra, S. S., *Langmuir* **2003**, *19*, 1766.
- [795] Crile, G., Telkes, M., Rowland, A., *Protoplasma* **1932**, *15*, 337.
- [796] Franklin, B., *Philos. Trans. R. Soc. London* **1774**, *64*, 445.
- [797] Pockels, A., *Nature* **1891**, *43*, 437.
- [798] Pockels, A., *Nature* **1892**, *46*, 418.
- [799] Pockels, A., *Nature* **1893**, *48*, 152.
- [800] Pockels, A., *Nature* **1894**, *50*, 223.
- [801] Bangham, A. D., *Membrane models with phospholipids*, Pergamon Press-Oxford, Oxford, **1968**.
- [802] Xu, Y., Seto, T., Tang, P., Firestone, L., *Biophys. J.* **2000**, *78*, 746.
- [803] Lee, S., Desaubry, L., Nakatani, Y., Ourisson, G., *C. R. Chim.* **2002**, *5*, 331.
- [804] Terzi, E., Holzemann, G., Seelig, J., *Biochemistry* **1997**, *36*, 14845.
- [805] Linseisen, F. M., Bayerl, S., Bayerl, T. M., *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *83*, 9.
- [806] Luisetti, J., Mohwald, H., Galla, H. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *78*, 754.
- [807] Borochoveori, H., Fortes, P. A. G., Montal, M., *Biophys. J.* **1982**, *37*, A87.
- [808] Sunamoto, J., Sato, T., Hirota, M., Fukushima, K., Hiratani, K., Hara, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *898*, 323.

- [809] Gard, D. L., in *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, Second Edition, Vol. 70*, **2002**, pp. 379.
- [810] Thomas, J. L., Tirrell, D. A., *J. Controlled Release* **2000**, *67*, 203.
- [811] Voinova, M. V., Jonson, M., Kasemo, B., *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 835.
- [812] Reimhult, E., Hook, F., Kasemo, B., *Langmuir* **2003**, *19*, 1681.
- [813] Schmidli, P. K., Schurtenberger, P., Luisi, P. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8127.
- [814] Sackmann, E., *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1978**, *82*, 891.
- [815] Torchilin, V. P., Klibanov, A. L., Ivanov, N. N., Ringsdorf, H., Schlarb, B., *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* **1987**, *8*, 457.
- [816] Gaines Jr., G. L., *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley-Interscience, New York, **1966**.
- [817] Honig, D., Möbius, D., *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590.
- [818] Ronzon, F., Desbat, B., Chauvet, J. P., Roux, B., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2002**, *1560*, 1.
- [819] Dieudonne, D., Mendelsohn, R., Farid, R. S., Flach, C. R., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2001**, *1511*, 99.
- [820] Thompson, N. L., McConnell, H. M., *Biophys. J.* **1984**, *46*, 739
- [821] Alsniesen, J., Jacquemain, D., Kjaer, K., Leveiller, F., Lahav, M., Leiserowitz, L., *Phys. Rep.-Rev. Sec. Phys. Lett.* **1994**, *246*, 252.
- [822] Majewski, J., Smith, G. S., Kuhl, T. L., Israelachvili, J. N., *Biophys. J.* **2001**, *80*, 95.
- [823] Majewski, J., Kuhl, T. L., Gerstenberg, M. C., Israelachvili, J. N., Smith, G. S., *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3122.
- [824] Ebara, Y., Okahata, Y., *Langmuir* **1993**, *9*, 574.
- [825] Dubreuil, F., Daillant, J., Guenoun, P., *Langmuir* **2003**, *19*, 8409.
- [826] Eng, L. M., Seuret, C., Looser, H., Gunter, P., *J. Vac. Sci. Technol. B* **1996**, *14*, 1386.
- [827] Taneva, S. G., Keough, K. M. W., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1995**, *1236*, 185.
- [828] Tronin, A., Dubrovsky, T., Dubrovskaya, S., Radicchi, G., Nicolini, C., *Langmuir* **1996**, *12*, 3272.
- [829] Signor, G., Mammi, S., Peggion, E., Ringsdorf, H., Wagenknecht, A., *Biochemistry* **1994**, *33*, 6659.
- [830] Cornell, D. G., *ACS Symp. Ser.* **1991**, *454*, 122.
- [831] Ottova, A., Tien, H. T., *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 171.
- [832] Bayley, H., Braha, O., Gu, L. Q., *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 139.
- [833] Howorka, S., Movileanu, L., Lu, X., Magnon, M., Cheley, S., Braha, O., Bayley, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2411.
- [834] Bayley, H., Cremer, P. S., *Nature* **2001**, *413*, 226.
- [835] Abidor, I. G., Chernomordik, L. V., Sukharev, S. I., Chizmadzhev, Y. A., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1982**, *9*, 141.
- [836] Coronade, R., *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1986**.
- [837] Gambacorta, A., Gliozzi, A., Derosa, M., *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *11*, 115.
- [838] Lalchev, Z. I., Mackie, A. R., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *15*, 147.
- [839] Andreoli, T. E., in *Methods Enzymol., Vol. 12, Biomembranes* (Eds.: Fleischer, S., Packer, L.), Academic Press, New York, **1974**.
- [840] Chen, T., Acker, J. P., Eroglu, A., Cheley, S., Bayley, H., Fowler, A., Toner, M. L., *Cryobiology* **2001**, *43*, 168.
- [841] Marsh, D., Bartucci, R., Sportelli, L., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2003**, *1615*, 33.
- [842] Tamm, L. K., McConnell, H. M., *Biophys. J.* **1985**, *47*, 105.
- [843] Sigal, G. B., Mrksich, M., Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3464.
- [844] Qian, X. P., Metallo, S. J., Choi, I. S., Wu, H. K., Liang, M. N., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1805.
- [845] Lingler, S., Rubinstein, I., Knoll, W., Offenhausser, A., *Langmuir* **1997**, *13*, 7085.

- [846] Kugler, R., Knoll, W., *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 175.
- [847] Ma, C., Srinivasan, M. P., Waring, A. J., Lehrer, R. I., Longo, M. L., Stroeve, P., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *28*, 319.
- [848] Zhang, L. Q., Booth, C. A., Stroeve, P., *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *228*, 82.
- [849] Ringsdorf, H., Sackmann, E., Simon, J., Winnik, F. M., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1153*, 335.
- [850] Miller, W. J., Abbott, N. L., *Langmuir* **1997**, *13*, 7106.
- [851] Beyer, D., Elender, G., Knoll, W., Kühner, M., Maus, S., Ringsdorf, H., Sackmann, E., *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1791.
- [852] Bain, C. D., Whitesides, G. M., *Adv. Mater.* **1989**, *4*, 110.
- [853] Miller, L. S., Rhoden, A. L., Byrne, N., Heptinstall, J., Walton, D. J., *Materials Science and Engineering: C* **1995**, *3*, 187.
- [854] Lehmann, T., Ruhe, J., *Macromol. Symp.* **1999**, *142*, 1.
- [855] Shen, W. W., Boxer, S. G., Knoll, W., Frank, C. W., *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 70.
- [856] Seitz, M., Ter-Ovanesyan, E., Hausch, M., Park, C. K., Zasadzinski, J. A., Zentel, R., Israelachvili, J. N., *Langmuir* **2000**, *16*, 6067.
- [857] Theato, P., Zentel, R., *Langmuir* **2000**, *16*, 1801.
- [858] Spinke, J., Yang, J., Wolf, H., Liley, M., Ringsdorf, H., Knoll, W., *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1667.
- [859] Förtig, A., Doktorarbeit, Technischen Universität München (München), **2004**.
- [860] Seitz, M., **2001**
- [861] Sackmann, E., Tanaka, M., *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 58.
- [862] Purrucker, O., Hillebrand, H., Adlkofer, K., Tanaka, M., *Electrochim. Acta* **2001**, *47*, 791.
- [863] Bunjes, N., Schmidt, E. K., Jonczyk, A., Rippmann, F., Beyer, D., Ringsdorf, H., Graber, P., Knoll, W., Naumann, R., *Langmuir* **1997**, *13*, 6188.
- [864] Naumann, R., Jonczyk, A., Hampel, C., Ringsdorf, H., Knoll, W., Bunjes, N., Graber, P., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 241.
- [865] Krysinski, P., Zebrowska, A., Michota, A., Bukowska, J., Becucci, L., Moncelli, M. R., *Langmuir* **2001**, *17*, 3852.
- [866] Wieder, H., Doktorarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [867] Steinem, C., Janshoff, A., von dem Bruch, K., Reihls, K., Goossens, J., Galla, H.-J., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *45*, 17.
- [868] Heyse, S., Stora, T., Schmid, E., Lakey, J. H., Vogel, H., *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *85507*, 319.
- [869] Raguse, B., Braach-Maksvytis, V., Cornell, B. A., King, L. G., Osman, P. D. D., Pace, R. J., Wiczorek, L., *Langmuir* **1998**, *14*, 648.
- [870] Krishna, G., Schulte, J., Cornell, B. A., Pace, R., Wiczorek, L., Osman, P. D., *Langmuir* **2001**, *17*, 4858.
- [871] Mack, J., Dissertation, Universität Tübingen **1999**.
- [872] Stelze, M., Miehl, R., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1346.
- [873] Rentschler, M., Fromherz, P., *Langmuir* **1998**, *14*, 547.
- [874] Johnson, S. J., Bayerl, T. M., McDermott, D. C., Adam, G. W., Rennie, A. R., Thomas, R. K., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289.
- [875] Hianik, T., Pässechnik, V. I., Snejdarkova, M., Sivak, B., Fajkus, M., Ivanov, S. A., Franek, M., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *47*, 47.
- [876] Cheng, Y., Ogier, S. D., Bushby, R. J., Evan, S. S. D., *Journal of Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 159
- [877] Hillebrandt, H., Wiegand, G., Tanaka, M., Sackmann, E., *Langmuir* **1999**, *15*, 8451.
- [878] Ziegler, W., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Sivak, B., Rehacek, V., Tvarozek, V., Hianik, T., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *140*, 357.
- [879] Seitz, M., Park, C. K., Wong, J. Y., Israelachvili, J. N., *Langmuir* **2001**, *17*, 4616.
- [880] Wong, J. Y., Majewski, J., Seitz, M., Park, C. K., Israelachvili, J. N., Smith, G. S., *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1445

- [881] Pink, D., Kuhner, M., Quinn, B., Sackmann, E., Pham, H., *Langmuir* **1995**, *11*, 2696.
- [882] Luo, G., Liu, T., Zhao, X. S., *Langmuir* **2001**, *17*, 4074.
- [883] Florin, E. L., Gaub, H. E., *Biophys. J.* **1993**, *64*, 375.
- [884] Costello, R. F., Peterson, I. R., Heptinstall, J., Walton, D. J., *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 265.
- [885] Li, H., Li, F., Qian, Z. M., Sun, H., *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1938.
- [886] Gandhi, S., Rubinstein, I., Tsueshita, T., Onyuksel, H., *Peptides* **2002**, *23*, 201.
- [887] Menger, F. M., Eliseev, A. V., *Langmuir* **1995**, *11*, 1855.
- [888] Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Khmelnskiy, Y. L., Berezin, I. V., *Eur. J. Biochem.* **1986**, *155*, 453.
- [889] Fersht, A. R., *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York, **1985**.
- [890] Walde, P., Giuliani, A. M., Boicelli, C. A., Luisi, P. L., *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 265.
- [891] Martinek, K., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., Khmelnskiy, Y. L., Levashov, A. V., *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *981*, 161.
- [892] Lequin, O., Bruston, F., Covert, O., Chassaing, G., Nicolas, P., *Biochemistry* **2003**, *42*, 10311.
- [893] Nicot, C., Vacher, M., Denoroy, L., Kahn, P. C., Waks, M., *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 1283.
- [894] Glover, K. J., Whiles, J. A., Wu, G. H., Yu, N. J., Deems, R., Struppe, J. O., Stark, R. E., Komives, E. A., Vold, R. R., *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2163.
- [895] Luchette, P. A., Vetman, T. N., Prosser, R. S., Hancock, R. E. W., Nieh, M. P., Glinka, C. J., Krueger, S., Katsaras, J., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2001**, *1513*, 83.
- [896] Struppe, J., Whiles, J. A., Vold, R. R., *Biophys. J.* **2000**, *78*, 281.
- [897] Ram, P., Prestegard, J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *940*, 289.
- [898] Sanders, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P., Prestegard, J. H., *Prog. NMR Spectrosc.* **1994**, *26*, 421.
- [899] Glover, K. J., Wood, M. J., Vold, R. R., Komives, E. A., *Biophys. J.* **2000**, *78*, 158A.
- [900] Whiles, J. A., Glover, K. J., Vold, R. R., Komives, E. A., *J. Magn. Reson.* **2002**, *158*, 149.
- [901] Glover, K. J., Whiles, J. A., Vold, R. R., Melacini, G., *J. Biomol. NMR* **2002**, *22*, 57.
- [902] Ellena, J. F., Moulthrop, J., Wu, J., Rauch, M., Jaysinghne, S., Castle, J. D., Cafiso, D. S., *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3221.
- [903] Ellena, J. F., Burnitz, M. C., Cafiso, D. S., *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2442.
- [904] Andersson, A., Maler, L., *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*, 103.
- [905] Biverstahl, H., Andersson, A., Graslund, A., Maler, L., *Biochemistry* **2004**, *43*, 14940.
- [906] Barany-Wallje, E., Andersson, A., Graslund, A., Maler, L., *FEBS Lett.* **2004**, *567*, 265.
- [907] Andersson, A., Maler, L., *FEBS Lett.* **2003**, *545*, 139.
- [908] Chou, J. J., Kaufman, J. D., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Bax, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2450.
- [909] Struppe, J., Prosser, R. S., Vold, R. R., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1997**, *214*, 138.
- [910] Triba, M. N., Warschawski, D. E., Devaux, P. F., *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1887.
- [911] van Dam, L., Karlsson, G., Edwards, K., *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664*, 241.
- [912] Whiles, J. A., Deems, R., Vold, R. R., Dennis, E. A., *Bioorg. Chem.* **2002**, *30*, 431.
- [913] Vold, R. R., Prosser, R. S., *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *113*, 267.
- [914] Meyer, H. W., Richter, W., Rettig, W., Stumpf, M., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *183*, 495.
- [915] Cavagnero, S., Dyson, H. J., Wright, P. E., *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 387.
- [916] Crowell, K. J., Macdonald, P. M., *Biophys. J.* **2001**, *81*, 255.
- [917] Carlotti, C., Aussenac, F., Dufourc, E. J., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2002**, *1564*, 156.
- [918] Marcotte, I., Separovic, F., Auger, M., Gagne, S. M., *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1587.
- [919] Czernik, L., Sanders, C. R., *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 327.
- [920] Akinyii, S., Spink, C. H., *Biophys. J.* **2003**, *84*, 508A.

- [921] Andersson, A., Almqvist, J., Hagn, F., Maler, L., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2004**, *1661*, 18.
- [922] Sanders, C. R., Landis, G. C., *Biochemistry* **1995**, *34*, 4030.
- [923] Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., Sligar, S. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3477.
- [924] Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., Sligar, S. G., *Nano Lett.* **2002**, *2*, 853.
- [925] Shaw, A. W., McLean, M. A., Sligar, S. G., *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 260.
- [926] Bayburt, T. H., Grinkova, L. V., Denisov, I. G., Sligar, S. G., *Biophys. J.* **2004**, *86*, 252A.
- [927] Bayburt, T. H., Sligar, S. G., *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2476.
- [928] Bayburt, T. H., Sligar, S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 6725.
- [929] Sanders, C. R., Prosser, R. S., *Structure* **1998**, *6*, 1227.
- [930] Assender, H., Bliznyuk, V., Porfyakis, K., *Science* **2002**, *297*, 973.
- [931] Hrbek, J., Schmid, A. K., Bartelt, M. C., Hwang, R. Q., *Surf. Sci.* **1997**, *385*, L1002.
- [932] Parsons, R., *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *142*, 299.
- [933] Hamelin, A., *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *138*, 395.
- [934] Kolb, D. M., *Prog. Surf. Sci.* **1996**, *51*, 109.
- [935] Lipkowski, J., **2001**
- [936] Magnussen, O. M., Hotlos, J., Beitel, G., Kolb, D. M., Behm, R. J., *J. Vac. Sci. Technol.* **1991**, *B9*, 969.
- [937] Adjan, M., Breitenbach, V., Christoph, S., *Spezielle Pharmakologie*, Mediscript-Verlag, München, **1991**.
- [938] Nuzzo, Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481.
- [939] Boal, A. K., Rotello, V. M., *Langmuir* **2000**, *16*, 9527.
- [940] Jordan, R., *Langmuir* **1999**, *15*, 2095.
- [941] Zamborini, F. P., Crooks, R. M., *Langmuir* **1998**, *14*, 3279.
- [942] Xiao, X.-D., Liu, G.-Y., Charych, D. H., Salmeron, M., *Langmuir* **1996**, *12*, 235.
- [943] Ostuni, E., Chapman, R. G., Liang, M. N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D. E., Whitesides, G. M., *Langmuir* **2001**, *17*, 6336.
- [944] Svedhem, S., Hollander, C. A., Shi, J., Konradsson, P., Liedberg, B., Svensson, S. C. T., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4494.
- [945] Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M., Laibinis, P. E., *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426.
- [946] Seigel, R. R., Harder, P., Dahint, R., Grunze, M., Josse, F., Mrksich, M., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3321.
- [947] Houseman, B. T., Gawalt, E. S., Mrksich, M., *Langmuir* **2003**, *19*, 1522.
- [948] Naumann, R., Schiller, S. M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K. B., Kärcher, I., Köper, I., Lübben, J., Vasilev, K., Knoll, W., *Langmuir* **2003**, *19*, 5435.
- [949] Yousaf, M. N., Houseman, B. T., Mrksich, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5992.
- [950] Ulman, A., *An Introduction to Ultrathin Organic Films From Langmuir Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, INC., Boston, **1991**.
- [951] Kitaigorodskii, A. I., *Organic Chemistry Crystallography*, Consultants Bureau, New York, **1961**.
- [952] Laibinis, P. E., Whitesides, G. M., Allara, D. L., Tao, Y.-T., Parikh, A. N., Nuzzo, R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152.
- [953] Arnold, R., Terfort, A., Wöll, C., *Langmuir* **2001**, *17*, 4980.
- [954] Schreiber, F., *Prog. Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151.
- [955] Grönbeck, H., Curioni, A., Andreoni, W., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3839.
- [956] Jagessar, R. C., Tour, J. M., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 111.
- [957] Tour, J. M., Jones II, L., Pearson, D. L., Lamba, J. J. S., Burgin, T. P., Whitesides, G. M., Allara, D. L., Parikh, A. N., Atre, S. V., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9529.
- [958] Lee, M.-T., Hsueh, C.-C., Freund, M. S., Ferguson, G. S., *Langmuir* **2003**, *19*, 5246.
- [959] Liebau, M., Huskens, J., Reinhoudt, D. N., *Adv. Funct. Mater.* **2001**, *11*, 147.

- [960] Thoden van Velzen, E. U., Engbersen, J. F. J., de Lange, P. J., Mahy, J. W. G., Reinhoudt, D. N., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6853.
- [961] Delamarche, E., Michel, B., Kang, H., Gerber, C., *Langmuir* **1994**, *10*, 4103.
- [962] Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y.-T., Evall, J., Whitesides, G. M., Nuzzo, R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321.
- [963] Janshoff, A., Dancil, K. P. S., Steinem, C., Greiner, D. P., Lin, V. S. Y., Gurtner, C., Motesharei, K., Sailor, M. J., Ghadiri, M. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12108.
- [964] Zhao, Y., Perez-Segarra, W., Shi, Q., Wei, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7328.
- [965] Nakamura, T., Miyamae, T., Yoshimura, D., Kobayashi, N., Nozoye, H., Matsumoto, M., *Langmuir* **2005**, *21*, 5026.
- [966] Robertson, M. J., Angelici, R. J., *Langmuir* **1994**, *10*, 1488.
- [967] Brunetti, V., Blum, B., Salvarezza, R. C., Arvia, A. J., *Langmuir* **2003**, *19*, 5336.
- [968] Xia, Y., Whitesides, G. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 551.
- [969] Owens, T. M., Nicholson, K. T., Banaszak Holl, M. M., Sützer, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6800.
- [970] Parikh, A. N., Allara, D. L., Ben Azouz, I., Rondelez, F., *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7577.
- [971] Balachander, N., Sukenik, C. N., *Langmuir* **1990**, *6*, 1621.
- [972] Allara, D. L., Nuzzo, R. G., *Langmuir* **1995**, *1*, 45.
- [973] Allara, D. L., Nuzzo, R. G., *Langmuir* **1995**, *1*, 52.
- [974] Ulman, A., *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- [975] Linford, M. R., Chindsey, C. E. D., Fenter, P., Eisenberger, P. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3145.
- [976] Laibinis, P. E., Hickman, J. J., Whitesides, G. M., *Science* **1989**, *245*, 845.
- [977] Schlotter, N. E., Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132*, 93.
- [978] Dubois, H., L., Zegarski, B. R., Nuzzo, R. G., *Langmuir* **1986**, *2*, 412.
- [979] Mao, G. Z., Tsao, Y. H., Tirrell, M., Davis, H. T., Hessel, V., Ringsdorf, H., *Langmuir* **1995**, *11*, 942.
- [980] Zhang, H.-L., Chen, M., Li, H.-L., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 28.
- [981] Garg, N., Carrasquillo-Molina, E., Lee, T. R., *Langmuir* **2002**, *18*, 2717.
- [982] Folker, J. P., Laibinis, P. E., Whitesides, G. M., *Langmuir* **1992**, *8*, 1330.
- [983] Nelles, G., Schonherr, H., Jaschke, M., Wolf, H., Schaub, M., Kuther, J., Tremel, W., Bamberg, E., Ringsdorf, H., Butt, H. J., *Langmuir* **1998**, *14*, 808.
- [984] Uragami, M., Miyake, Y., Tokutake, N., Zhang, L. H., Regen, S. L., *Langmuir* **2000**, *16*, 8010.
- [985] Chen, S. F., Li, L. Y., Boozer, C. L., Jiang, S. Y., *Langmuir* **2000**, *16*, 9287.
- [986] Chen, S., Li, L., Boozer, C. L., Jiang, S., *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2975.
- [987] Li, L., Chen, S., Jiang, S., *Langmuir* **2003**, *19*, 3266.
- [988] Cooper, E., Leggett, G. J., *Langmuir* **1999**, *15*, 1024.
- [989] Delamarche, E., Michel, B., Biebuyck, H., Gerber, C., *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 719.
- [990] Allara, D. L., Dunbar, T. D., Weiss, P. S., Bumm, L. A., Cygan, M. T., Tour, J. M., Reinert, W. A., Yao, Y.-T., Kozaki, M., Jones, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *852*, 349.
- [991] Himmelhaus, M., Eisert, F., Buck, M., Grunze, M., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 576.
- [992] Jung, C., Dannenberger, O., Xu, Y., Buck, M., Grunze, M., *Langmuir* **1998**, *14*, 1103.
- [993] Greenwood, N. N., Earnshaw, A., *Chemie der Elemente*, VCH, Weinheim, **1988**.
- [994] Cao, Y., Ge, Q., Dyer, D. J., Wang, L., *J. Phys. Chem. B* **2003**, *in press*.
- [995] Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H., Gaub, H. E., *Science* **1999**, *283*, 1727.
- [996] Dubois, L. H., Nuzzo, R. G., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 437.
- [997] Piscevic, D., Knoll, W., Tarlov, M. J., *Supramol. Sci.* **1995**, *2*, 99.
- [998] Eisenberg, D., Kauzmann, W., *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, New York, **1969**.

- [999] Soper, A. K., Rossky, P. J., *Chem. Phys.* **2000**, 258, 107.
- [1000] Robinson, G. W., Zhu, S.-B., Singh, S., Evans, M. W., *Water in Biology, Chemistry, and Physics*, World Scientific, Singapore, **1996**.
- [1001] Müller, H. J., *Langmuir* **1998**, 14, 6789.
- [1002] Mao, Y., Ratner, M. A., Jarrold, M. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2950.
- [1003] Kier, L. B., Cheng, C.-K., Testa, B., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 255.
- [1004] Cremer, P. S., Boxer, S. G., *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 2554.
- [1005] Sofou, S., Thomas, J. L., *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 445.
- [1006] Ekeröth, J., Borgh, A., Konradsson, P., Liedberg, B., *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 254, 322.
- [1007] Yaminsky, V., Ohnishi, S., *Langmuir* **2003**, 19, 1970–1976.
- [1008] Ludwig, R., *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1856.
- [1009] Li, G., Fudickar, W., Skupin, M., Klyszcz, A., Draeger, C., Lauer, M., Fuhrhop, J.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1828.
- [1010] Mashl, R. J., Joseph, S., Aluru, N. R., Jakobsson, E., *Nano Lett.* **2003**, 3, 589.
- [1011] Lum, L., Blobel, C. P., *Dev. Biol.* **1997**, 191, 131.
- [1012] Steitz, R., Gutberlet, T., Hauss, T., Klösgen, B., Krastev, R., Schemmel, S., Simonsen, A. C., Findenegg, G. H., *Langmuir* **2003**, 19, 2409.
- [1013] Jensen, T. R., Jensen, M. Ø., Reitzel, N., Balashev, K., Peters, G. H., Kjaer, K., Bjørnholm, T., *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 086101.
- [1014] Schwendel, D., Hayashi, T., Dahint, R., Pertsin, A., Grunze, M., Steitz, R., Schreiber, F., *Langmuir* **2003**, 19, 2284.
- [1015] Lilach, Y., Romm, L., Livnch, T., Asscher, M., *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 2736.
- [1016] Churaev, N. V., *Adv. Colloid Interf. Sci.* **1995**, 58, 87.
- [1017] Vogler, E. A., *Adv. Colloid Interf. Sci.* **1998**, 74, 69.
- [1018] Helm, C. A., Israelachvili, J. N., McGuiggan, P. M., *Biochemistry* **1992**, 31, 1794.
- [1019] Binder, H., Zschörnig, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 115, 39–61.
- [1020] Dudev, T., Lim, C., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 773.
- [1021] Demuth, R., Kober, F., *Komplexchemie-experimentell*, Diesterweg/Salle, Frankfurt am Main, Berlin, München, **1980**.
- [1022] Steffan, G., Wulff, S., Galla, H. J., *Chem. Phys. Lipids* **1994**, 74, 141.
- [1023] Ross, M., Steinem, C., Galla, H. J., Janshoff, A., *Langmuir* **2001**, 17, 2437.
- [1024] Abidor, I. G., Barbul, A. I., Zhelev, D. V., Doinov, P., Bandrina, I. N., Osipova, E. M., Sukharev, S. I., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1152, 207.
- [1025] Pisarchick, M. L., Gesty, D., Thompson, N. L. *B. J.*, 63, 215-, 223., *Biophys. J.* **1992**, 63, 215.
- [1026] Fang, Y., Frutos, A. G., Lahiri, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 124, 2394.
- [1027] Wetzler, B., Pum, D., Sleytr, U. B., *J. Struct. Biol.* **1997**, 119, 123.
- [1028] Holden, M. A., Jung, S.-Y., Yang, T., Castellana, E. T., Cremer, P. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6512.
- [1029] Buschl, R., Hupfer, B., Ringsdorf, H., *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* **1982**, 3, 589.
- [1030] Benz, R., Prass, W., Ringsdorf, H., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1982**, 21, 368.
- [1031] Elbert, R., Laschewsky, A., Ringsdorf, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4134.
- [1032] Ross, E. E., Rozanski, L. J., Spratt, T., Liu, S. C., O'Brien, D. F., Saavedra, S. S., *Langmuir* **2003**, 19, 1752.
- [1033] Richter, R. P., Maury, N., Brisson, A. R., *Langmuir* **2005**, 21, 299.
- [1034] Tanaka, K., Takeda, T., Miyajima, K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1991**, 39, 1917.
- [1035] Hianik, T., Dlugopolsky, J., Gyepessova, M., Sivak, B., Tien, H. T., OttovaLeitmannova, A., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, 39, 299.
- [1036] Moellerfeld, J., Prass, W., Ringsdorf, H., Hamazaki, H., Sunamoto, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 857, 265.
- [1037] Kuhl, T., Guo, Y. Q., Alderfer, J. L., Berman, A. D., Leckband, D., Israelachvili, J., Hui, S. W., *Langmuir* **1996**, 12, 3003.

- [1038] Berquand, A., Mazeran, P. E., Pantigny, J., Proux-Delrouyre, V., Laval, J. M., Bourdillon, C., *Langmuir* **2003**, *19*, 1700.
- [1039] Franzin, C. M., Macdonald, P. M., Polozova, A., Winnik, F. M., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1998**, *1415*, 219.
- [1040] Morra, M., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2001**.
- [1041] Diederich A., Bähr G., Winterhalter M., *Langmuir* **1998**, *14*, 4597
- [1042] Simonov, A. N., Vyshenskaya, T. V., Livshits, V. A., Kuznetsov, A. N., *Biofizika* **1984**, *29*, 610.
- [1043] Ozeki, S., Kursahima, H., Miyanaga, M., Nozawa, C., *Langmuir* **2000**, *16*, 1478.
- [1044] Opella, S. J., *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 845.
- [1045] Petrov, A. G., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2002**, *1561*, 1.
- [1046] Akinlaja, J., Sachs, F., *Biophys. J.* **1998**, *75*, 247.
- [1047] Zhelev, D. V., Needham, D., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1147*, 89.
- [1048] Ho, S. Y., Mittal, G. S., *Crit. Rev. Biotechnol.* **1996**, *16*, 349.
- [1049] Neumann, E., Kakorin, S., *Biophys. Chem.* **2000**, *85*, 249.
- [1050] Chernomordik, L. V., Sukharev, S. I., Abidor, I. G., Chizmadzhev, Y. A., *Stud. Biophys.* **1982**, *90*, 221.
- [1051] Sukharev, S. I., Chernodordik, L. V., Abidor, I. G., *Stud. Biophys.* **1983**, *94*, 73.
- [1052] Pastushenko, V. F., Chizmadzhev, Y. A., *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 43.
- [1053] Zhang, L., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1994**, *34*, 109.
- [1054] Blangero, C., Rols, M. P., Teissie, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *981*, 295.
- [1055] Garner, A. L., Chen, N. Y., Yang, J., Kolb, J., Swanson, R. J., Loftin, K. C., Beebe, S. J., Joshi, R. P., Schoenbach, K. H., *Ieee Transactions On Plasma Science* **2004**, *32*, 2073.
- [1056] Vernier, P. T., Sun, Y. H., Marcu, L., Salemi, S., Craft, C. M., Gundersen, M. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 286.
- [1057] Chang, D. C., Gao, P. Q., Maxwell, B. L., *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1092*, 153.
- [1058] Bier, M., Hammer, S. M., Canaday, D. J., Lee, R. C., *Bioelectromagnetics* **1999**, *20*, 194.
- [1059] Cemazar, M., Jarm, T., Miklavcic, D., Lebar, A. M., Ihan, A., Kopitar, N. A., Sersa, G., *Electro- And Magnetobiology* **1998**, *17*, 263.
- [1060] Davalos, R. V., Rubinsky, B., Lir, L. M., *Bioelectrochemistry* **2003**, *61*, 99.
- [1061] Ramos, C., Teissie, J., *Biochimie* **2000**, *82*, 511.
- [1062] Antov, Y., Barbul, A., Korenstein, R., *Exp. Cell Res.* **2004**, *297*, 348.
- [1063] Hofmann, F., Ohnimus, H., Scheller, C., Strupp, W., Zimmermann, U., Jassoy, C., *J. Membr. Biol.* **1999**, *169*, 103.
- [1064] Elouagari, K., Benoist, H., Sixou, S., Teissie, J., *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 1031.
- [1065] Elouagari, K., Gabriel, B., Benoist, H., Teissie, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1151*, 105.
- [1066] Binder, H., Lindblom, G., *Biophys. J.* **2003**, *85*, 982.
- [1067] Shirakashi, R., Kostner, C. M., Muller, K. J., Kurschner, M., Zimmermann, U., Sukhorukov, V. L., *J. Membr. Biol.* **2002**, *189*, 45.
- [1068] Koppelhus, U., Nielsen, P. E., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 267.
- [1069] Eynard, N., Rols, M. P., Ganeva, V., Galutzov, B., Sabri, N., Teissie, J., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *44*, 103.
- [1070] Eynard, N., Sixou, S., Duran, N., Teissie, J., *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 431.
- [1071] Faurie, C., Golzio, M., Moller, P., Teissie, J., Rols, M. P., *DNA Cell Biol.* **2003**, *22*, 777.
- [1072] Jaroszeski, M. J., Gilbert, R., Nicolau, C., Heller, R., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *35*, 131.
- [1073] Kubota, Y., Nakada, T., Yanai, H., Kakizaki, H., Sasagawa, I., Watanabe, M., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *39*, 67.
- [1074] Puc, M., Kotnik, T., Mir, L. M., Miklavcic, D., *Bioelectrochemistry* **2003**, *60*, 1.

- [1075] Rabussay, D., Dev, N. B., Fewell, J., Smith, L. C., Widera, G., Zhang, L., *J. Phys. D- Appl. Phys.* **2003**, *36*, 348.
- [1076] Tounekti, O., Belehradek, J., Mir, L. M., *Bull. Cancer (Paris)*. **1994**, *81*, 1043.
- [1077] Gehl, J., *Acta Physiol. Scand.* **2003**, *177*, 437.
- [1078] Horikoshi, T., Naganuma, H., Ohashi, Y., Ueno, T., Nukui, H., *Brain Res. Bull.* **2000**, *51*, 371.
- [1079] Barrau, C., Teissie, J., Gabriel, B., *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 327.
- [1080] Braach-Maksvytis, V., Raguse, B., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9544.
- [1081] Buschl, R., Ringsdorf, H., Zimmermann, U., *FEBS Lett.* **1982**, *150*, 38.
- [1082] Chernomordik, L. V., Papahadjopoulos, D., Tsong, T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 193.
- [1083] Biswas, S., Guha, S. K., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1999**, *48*, 435.
- [1084] Davalos, R. V., Otten, D. M., Mir, L. M., Rubinsky, B., *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2004**, *51*, 761.
- [1085] Artyukhin, A. B., Stroeve, P., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 2156.
- [1086] Hapala, I., *Crit. Rev. Biotechnol.* **1997**, *17*, 105.
- [1087] Nissen, J., Gritsch, S., Wiegand, G., Radler, J. O., *Eur. Phys. J. B* **1999**, *10*, 335.
- [1088] Nissen, J., Jacobs, K., Radler, J. O., *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 1904.
- [1089] Elender G., Sackmann E., *Journale de Physique II France* **1994**, *4*, 455
- [1090] Munro, J. C., Frank, C. W., *Langmuir* **2004**, *20*, 3339.
- [1091] Vanderah, D. J., Pham, C. P., Springer, S. K., Silin, V., Meuse, C. W., *Langmuir* **2000**, *16*, 6527.
- [1092] Dowhan, W., *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199.
- [1093] Palsdottir, H., Hunte, C., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2004**, *1666*, 2.
- [1094] Pliquett, U., **2004**
- [1095] Karlson, *Pathobiochemie*, Thieme, Stuttgart, **1978**.
- [1096] Pomerleau, V., Harvey-Girard, E., Boucher, F., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1234*, 221.
- [1097] Gutsmann, T., Fix, M., Larrick, J. W., Wiese, A., *J. Membrane Biol.* **2000**, *176*, 223.
- [1098] Peterson, I. R., Brzezinski, V., Kenn, R. M., Steitz, R., *Langmuir* **1992**, *8*, 2995.
- [1099] Peterson, I. R., Kenn, R. M., *Langmuir* **1994**, *10*, 4645.
- [1100] Petty, M. C., *Langmuir-Blodgett Films*, Cambridge University Press, Cambridge, **1996**.
- [1101] Fainerman, V. B., Vollhardt, D., *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3098.
- [1102] Nagle, J. F., Tristram-Nagle, S., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **2000**, *1469*, 159.
- [1103] Fainerman, V. B., Vollhardt, D., *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 145.
- [1104] Dynarowicz-Latka, P., Dhanabalan, A., Oliveira Jr., O. N., *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91*, 221.
- [1105] Vollhardt, D., Emrich, G., Gutberlet, T., Fuhrhop, J.-H., *Langmuir* **1996**, *12*, 5659.
- [1106] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2000**, *219*, 82.
- [1107] Boxer, S. G., Kung, L., Hovis, J., Ajo, C., Johnson, J., Olson, D., Fuller, G. G., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2000**, *220*, 205.
- [1108] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2150.
- [1109] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Langmuir* **2001**, *17*, 3400.
- [1110] Kung, L. A., Kam, L., Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Langmuir* **2000**, *16*, 6773.
- [1111] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Langmuir* **2000**, *16*, 894.
- [1112] Groves, J. T., Boxer, S. G., *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1972.
- [1113] Stelzle, M., Miehlich, R., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1346.
- [1114] Chong, P. L.-G., Suga, I. n. P., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 153.
- [1115] Lagnier, P., **2004**
- [1116] Epand, R. M., *Biopoly.* **1997**, *43*, 15.
- [1117] Naumann, C. A., Brooks, C. F., Fuller, G. G., Lehmann, T., Ruhe, J., Knoll, W., Kuhn, P., Nuyken, O., Frank, C. W., *Langmuir* **2001**, *17*, 2801.

- [1118] Naumann, C. A., Prucker, O., Lehmann, T., Ruhe, J., Knoll, W., Frank, C. W., *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 27.
- [1119] Chen, Y., Segarini, P., Raoufi, F., Bradham, D., Leask, A., *Exp. Cell Res.* **2001**, *271*, 109.
- [1120] Brezesinski, G., Mogel, H.-J., *Grenzflachen und Kolloide*, Spektrum Akademischer Verlag, **1993**.
- [1121] Adamson, A. W., *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, **1990**.
- [1122] Hunter, R. J., *Foundations of Colloid Science I+II*, Clarendon Press, Oxford, **1995**.
- [1123] Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol. I: Fundamentals*, Academic Press, London, **1991**.
- [1124] Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol. II: Solid-Liquid Interfaces*, Academic Press, London, **1995**.
- [1125] Myrer, D., *Surfaces, Interfaces and Colloids*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [1126] Whitesides, G. M., Laibinis, P. E., *Langmuir* **1990**, *6*, 87.
- [1127] Furstner, R., Neinhuis, C., Barthlott, W., *Nachrichten aus der Chemie* **2000**, *48*, 24.
- [1128] Barthlott, W., Neinhuis, C., *Planta* **1997**, *202*, 1.
- [1129] Neinhuis, C., Barthlott, W., *Ann. Bot.* **1997**, *79*, 667.
- [1130] Neinhuis, C., Barthlott, W., *New Phytol.* **1998**, *138*, 91.
- [1131] Dambacher, G. T., *Kunststoffe-Plast Europe* **2002**, *92*, A18.
- [1132] Binning, G., Quate, C. F., Gerber, C., *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
- [1133] Rugar, D., Hansma, P., *Phys. Today* **1990**, *43*, 23.
- [1134] Frommer, J., *Angew. Chem.* **1992**, *101*, 1325.
- [1135] Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdorfer, Y., Fuchs, H., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000**, *39*, 3213.
- [1136] Florin, E. L., Moy, V. T., Gaub, H. E., *Science* **1994**, *264*, 415.
- [1137] Lee, G. U., Kidwell, D. A., Colton, R. J., *Langmuir* **1994**, *10*, 354.
- [1138] Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B., Gaub, H. E., *Science* **1997**, *275*, 1295.
- [1139] Li, H. B., Rief, M., Oesterhelt, F., Gaub, H. E., *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 316.
- [1140] Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F., Pang, Y.-P., Fernandez, J. M., *Nature* **1998**, *396*, 661.
- [1141] Sheiko, S. S., *Imaging of polymers using scanning force microscopy: From superstructures to individual molecules*, Springer Verlag Berlin, Berlin, **2000**.
- [1142] Janshoff, A., Steinem, C., *Chembiochem* **2001**, *2*, 799.
- [1143] Bamberg, F., Butt, H. J., Eisenrauch, A., Fendler, K., *Q. Rev. Biophys.* **1993**, *26*, 1.
- [1144] Butt, H. J., Seifert, K., Fendler, K., Bamberg, E., *Biophys. J.* **1993**, *64*, A14.
- [1145] Neff, D., Tripathi, S., Middendorf, K., Stahlberg, H., Butt, H. J., Bamberg, E., Dencher, N. A., *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 139.
- [1146] Frisbie, C. D., Rozsnyai, L. F., Noy, A., Wrighton, M. S., Lieber, C. M., *Science* **1994**, *265*, 2071.
- [1147] McGuire, G. E., Fuchs, J., Han, P., Kushmerick, J. G., Weiss, P. S., Simko, S. J., Nemanich, R. J., Chopra, D. R., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 373R.
- [1148] McKendry, R., Theoclitou, M. E., Abell, C., Rayment, T., *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1 - Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.* **1999**, *38*, 3901.
- [1149] Mueller, H., Butt, H. J., Bamberg, E., *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1072.
- [1150] Mueller, H., Butt, H. J., Bamberg, E., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 4552.
- [1151] Loi, S., Sun, G., Franz, V., Butt, H. J., *Phys. Rev. E* **2002**, *66*, art. no.
- [1152] Yang, J., Tamm, L. K., Tillack, T. W., Takeyasu, K., Shao, Z. F., *Biophys. J.* **1993**, *64*, A222.
- [1153] Woolley, A. T., Cheung, C. L., Hafner, J. H., Lieber, C. M., *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R193.
- [1154] Yakubov, G. E., Vinogradova, O. I., Butt, H. J., *J. Adhes. Sci. Technol.* **2000**, *14*, 1783.
- [1155] Heim, L. O., Blum, J., Preuss, M., Butt, H. J., *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 3328.

- [1156] Mazzola, L. T., Frank, C. W., Fodor, S. P. A., Mosher, C., Lartius, R., Henderson, E., *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2922.
- [1157] Moy, V. T., Florin, E. L., Gaub, H. E., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *93*, 343.
- [1158] Fiorini, M., McKendry, R., Cooper, M. A., Rayment, T., Abell, C., *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2471.
- [1159] Yakubov, G. E., Butt, H. J., Vinogradova, O. I., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3407.
- [1160] Vinogradova, O. I., Yakubov, G. E., Butt, H. J., *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 8124.
- [1161] Ecke, S., Raiteri, R., Bonaccorso, E., Reiner, C., Deiseroth, H. J., Butt, H. J., *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 4164.
- [1162] Goldstein, J. I., Romig, A. D., Newbury, D. E., Lyman, C. E., Echlin, P., Fiori, C., Joy, D. C., Lifshin, E., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Plenum, New York, **1992**.
- [1163] Bindell, J. B., "SEM", Butterworth-Heinemann, Greenwich, **1992**.
- [1164] L.C. Sawyer, D. T. G., „Polymer Microscopy", Chapman & Hall,, **1996**, L.
- [1165] Butler, J. H., Joy, D. C., Bradley, G. F., Krause, S. J., *Polymer* **1995**, *36*, 1780.
- [1166] Jaksch, H., Martin, J. P., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *353*, 378.
- [1167] Joy, D. C., Joy, C. S., *Micron.* **1996**, *27*, 247.
- [1168] Vezie, D. L., Thomas, E. L., Adams, W. W., *Polymer* **1995**, *36*, 1761.
- [1169] Pacy, D. J., *Vacuum* **1960**, *9*, 261.
- [1170] Curie, J., Curie, P., *Rendu* **1880**, *91*, 294–297.
- [1171] Ebersole, R., Miller, J., Moran, J., Ward, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3239.
- [1172] Sauerbrey, G., *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206.
- [1173] Sauerbrey, G., *Arch. Elektrotech. Übertragung* **1964**, *18*, 617.
- [1174] Johannsmann, D., Mathauer, K., Wegner, G., Knoll, W., *Phys. Rev. B* **1992**, *46*, 7808.
- [1175] Johannsmann, D., *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 501.
- [1176] Hook, F., Rodahl, M., Kasemo, B., Brzezinski, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12271.
- [1177] Fredriksson, C., Kihlman, S., Rodahl, M., Kasemo, B., *Langmuir* **1998**, *14*, 248.
- [1178] Zhdanov, V. P., Kasemo, B., *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 6497.
- [1179] Nimeri, G., Fredriksson, C., Elwing, H., Liu, L., Rodahl, M., Kasemo, B., *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1998**, *11*, 255.
- [1180] Forrest, J. A., Svanberg, C., Revesz, K., Rodahl, M., Torell, L. M., Kasemo, B., *Phys. Rev. E* **1998**, *58*, R1226.
- [1181] Wei, W. Z., Hu, C. W., Zhu, W. H., Yao, S. Z., *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 2371.
- [1182] Wittung-Stafshede, P., Rodahl, M., Kasemo, B., Nielsen, P., Norden, B., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *174*, 269.
- [1183] Kasemo, B., *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **1998**, *3*, 451.
- [1184] Kasemo, B., *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 656.
- [1185] Werner, H. W., Vanderwel, H., *Analytical Methods and Instrumentation* **1995**, *2*, 111.
- [1186] Adamson, K., *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1363.
- [1187] Wohlfart, P., Diplomarbeit, Friedrich Alexander-Universität (Erlangen-Nürnberg), **1993**.
- [1188] Wohlfart, P., Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Mainz), **1997**.
- [1189] Krämer, S., Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Mainz), **2001**.
- [1190] Cornelioclark, P. A., Gardella, J. A., *Langmuir* **1991**, *7*, 2279.
- [1191] Bolbach, G., Viari, A., Galera, R., Brunot, A., Blais, J. C., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, *112*, 93.
- [1192] Haggenghoff, B., Benninghoven, A., Spinke, J., Liley, M., Knoll, W., *Langmuir* **1993**, *9*, 1622.
- [1193] Bolbach, G., Beavis, R., Della Negra, S., Deprun, C., Ens, W., Lebeve, Y., Main, D. E., Schueler, B., Standing, K. G., *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions With Materials and Atoms* **1988**, *30*, 74.

- [1194] Bolbach, G., Plissonnier, M., Galera, R., Blais, J. C., Dufour, G., Roulet, H., *Thin Solid Films* **1992**, 210, 524.
- [1195] Seah, M. P., Dench, W. A., *Surf. Interface Anal.* **1979**, 1, 2.
- [1196] Andres, R. P., Bein, T., Dorogi, M., Feng, S., Henderson, J. I., Kubiak, C. P., Mahoney, W., Osifchen, R. G., Reifenberger, R., *Science* **1995**, 272, 1323.
- [1197] MacDonald, J. R., *Impedance Spectroscopy - Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley, New York, **1987**.
- [1198] Hamann, C. H., Vielstich, W., *Electrochemie I*, VCH-Verlag, **1985**.
- [1199] Henz, G., Neeb, R., *Elektrolytische Analytik*, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, **1986**.
- [1200] Schwuger, M. J., *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1996**.
- [1201] Finkela, H. O., *Electrochemistry of Organized Monolayers of Thiols and related Molecules on Electrodes, Vol. 10*, Marcel Dekker, New York, **1996**.
- [1202] Stelzle, M., Sackmann, E., *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 981, 135.
- [1203] Southampton Electrochemical Group, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Wiley, New York, **1985**.
- [1204] Bard, J. A., Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods-Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [1205] Zang, D. F., P., W. C., Morin, M., *Langmuir* **1996**, 12, 6570.
- [1206] Walczak, M. M., Alves, C. A., Lamp, B. D., Porter, M. D., *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 396, 103.
- [1207] Widrig, C. A., Chung, C., Porter, M. D., *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 310, 335.
- [1208] Zhong, C. J., Porter, M. D., *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 425, 147.
- [1209] Zhong, C. J., Zak, J., Porter, M. D., *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 421, 9.
- [1210] Walczak, M. M., Alves, C. A., Lamp, B. D., Porter, M. D., *Langmuir* **1991**, 7, 2687.
- [1211] Yang, D. F., Morin, M., *Canadian Journal of Chemistry - Revue Canadienne de Chimie* **1997**, 75, 1680.
- [1212] Schneider, T. W., Buttry, D. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12391.
- [1213] Zhong, C. J., Porter, M. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11616.
- [1214] Yang, D. F., Wilde, C. P., Morin, M., *Langmuir* **1997**, 13, 243.
- [1215] Imabayashi, S., Hobara, D., Kakiuchi, T., Knoll, W., *Langmuir* **1997**, 13, 4502.
- [1216] Weissmüller, G., Dissertation, Technische Universität München (München), **1995**.
- [1217] Oldham, K. B., Myland, J. C., *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press, San Diego, **1994**.
- [1218] Gordon, J. G., Swalen, J. D., *Opt. Commun.* **1977**, 22, 374.
- [1219] Schmitt, F. J., Haussling, L., Ringsdorf, H., Knoll, W., *Thin Solid Films* **1992**, 210, 815.
- [1220] Knoll, W., *MRS Bull.* **1991**, 16, 29.
- [1221] Turbadar, T., *Proc. Phys. Soc. (London)* **1959**, 73, 40.
- [1222] Otto, A., *Z. Phys.* **1968**, 216, 398.
- [1223] Otto, A., *Phys. Stat. Solidi.* **1968**, 26, 199.
- [1224] Kretschmann, E., Raether, H., *Z. Naturf.* **1968**, 230, 2135.
- [1225] Agarwal, G. S., *Phys. Rev.* **1973**, B8, 4768.
- [1226] Swalen, J. D., *J. Mol. Electron.* **1986**, 2, 155.
- [1227] Knoll, W., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 569.
- [1228] Welford, K., *Opt. Quant. Elect.* **1991**, 23, 1.
- [1229] Raether, H., *Physics of Thin Films, Vol. 9*, Academic Press, New York, **1977**.
- [1230] Knoll, W., Zizlsperger, M., Liebermann, T., Arnold, S., Badia, A., Liley, M., Piscevic, D., Schmitt, F. J., Spinke, J., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, 161, 115.
- [1231] Raether, H., *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Springer, Berlin, **1988**.
- [1232] Kreiter, M., Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [1233] Kretschmann, E., *Physik* **1971**, 241, 313.

- [1234] Pockrand, I., *Surf. Sci. Rep.* **1978**, 72, 577.
- [1235] Karthe, W., Müller, R., *Integrierte Optik*, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig, **1991**.
- [1236] Yeh, P., *Optical Waves in Layered Media*, John Wiley and Sons, **1998**.
- [1237] Kovacs, G., *Electromagnetic Surface Modes*, John Wiley & Sons, New York, **1982**.
- [1238] Worm, J., 2.10 ed., Mainz, **1999**.
- [1239] Stietz, F., Träger, F., *Phys. Bl.* **1999**, 9, 57.
- [1240] Tassin, J. F., Siemens, R. L., Tang, W. T., Hadziioannou, G., Swalen, J. D., Smith, B. A., *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 2106.
- [1241] Sönksen, C. P., Nordhoff, E., Jansson, Ö., Malqvist, M., Roepstorff, R., *Anal. Chem.* **1988**, 70, 2731.
- [1242] Krone, J. R., Nelson, R. W., Dogruel, D., Williams, P., Granzow, R., *Anal. Biochem.* **1997**, 244, 124.
- [1243] Nelson, R. W., Krone, J. R., Jansson, O., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4363.
- [1244] Nelson, R. W., Krone, J. R., Jansson, O., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4369.
- [1245] Nelson, R. W., Jarvik, J. W., Taillon, B. E., Tubbs, K. A., *Anal. Chem.* **1997**, 71, 2858.
- [1246] Ekgasit, S., Yu, F., Knoll, W., *Sens. Actuator B-Chem.* **2005**, 104, 294.
- [1247] Knoll, W., Park, H., Sinner, E. K., Yao, D. F., Yu, F., *Surf. Sci.* **2004**, 570, 30.
- [1248] Neumann, T., Johansson, M. L., Kambhampati, D., Knoll, W., *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 575.
- [1249] Yu, F., Yao, D. F., Knoll, W., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2610.
- [1250] Knoll, W., Yu, F., Neumann, T., Schiller, S., Naumann, R., *PCCP Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 5169.
- [1251] Naumann, R., Jonczyk, A., Kopp, R., Vanesch, J., Ringsdorf, H., Knoll, W., Graber, P., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1995**, 34, 2056.
- [1252] <http://www.ir-spektroskopie.de>
- [1253] Francis, S. A., Ellison, A. H., *J. Opt. Soc. Am.* **1959**, 49, 131.
- [1254] Greenler, R. G., *J. Chem. Phys.* **1966**, 44, 310.
- [1255] <http://www.ir-spektroskopie.de/techniken/irras/grundlagen.html>
- [1256] <http://www.ir-spektroskopie.de/>
- [1257] Hénon, S., Meunier, J., *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, 62, 936.
- [1258] Möbius, D., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, 1, 250.
- [1259] Hénon, S., Meunier, J., *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, 62, 936.
- [1260] Lheveder, C., Hénon, S., Mercier, R., Tissot, G., Fournet, P., Meunier, J., *Rev. Sci. Instrum.* **1998**, 69, 1446.
- [1261] Harke, M., Teppner, R., Schulz, O., Motschmann, H., Orendi, H., *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, 68, 3130.
- [1262] Brewster, D., *Philos. Trans. R. Soc. London* **1815**, 105, 125.
- [1263] Hönig, D., Möbius, D., *Thin Solid Films* **1991**, 159, 1.
- [1264] Hénon, S., Meunier, J., *Thin Solid Films* **1992**, 210, 121.
- [1265] Overbeck, G. A., Dissertation, (Georg-August-Universität Göttingen), **1993**.
- [1266] Overbeck, G. A., Möbius, D., *J. Chem. Phys.* **1993**, 97, 7999.
- [1267] Vollhardt, D., 64, 143, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1969**, 64, 143.
- [1268] Rivière, S., Hénon, S., Meunier, J., Schwartz, D. K., Tsao, M. W., Knobler, C. M., *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 10045.
- [1269] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, London, **1983**.
- [1270] Maier, O., Oberle, V., Hoekstra, D., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 116, 3.
- [1271] Birks, J. B., *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Interscience, London, **1970**.
- [1272] Lösche, M., Möhwald, H., *Rev. Sci. Instrum.* **1984**, 55, 1968.
- [1273] Lösche, M., Sackmann, E., Möhwald, H., *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1983**, 87, 848.
- [1274] Weis, R. M., McConnell, H. M., *Nature* **1984**, 310, 47.
- [1275] Somerharju, P., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 116, 57.

- [1276] Lala, A. K., *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 177.
- [1277] Meyvis T.K.L., De Smedt S.C., Van Oostveldt P., Demeester J., *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1153
- [1278] Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W. W., *Biophys. J.* **1976**, *16*, 1055
- [1279] Auch, M., Fischer, B., Möhwald, H., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *164*, 39.
- [1280] Soumpasis D.M., *Biophys. J.* **1983**, *41*, 95
- [1281] Sinner, A., Technische Universität München (München), **1999**.
- [1282] Poo, M. M., Robinson, K. R., *Nature* **1977**, *265*, 602.
- [1283] Groves, J. T., Boxer, S. G., McConnell, H. M., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11409.
- [1284] Groves, J. T., Boxer, S. G., McConnell, H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 935.
- [1285] Groves, J. T., Boxer, S. G., McConnell, H. M., *Biophys. J.* **1998**, *74*, A314.
- [1286] Groves, J. T., Boxer, S. G., *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 149.
- [1287] Groves, J. T., Boxer, S. G., *Biophys. J.* **1996**, *70*, SU353.
- [1288] Groves, J. T., Boxer, S. G., McConnell, H. M., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 119.
- [1289] Cremer, P. S., Groves, J. T., Kung, L. A., Boxer, S. G., *Langmuir* **1999**, *15*, 3893.
- [1290] Lenz, P., Ajo-Franklin, C. M., Boxer, S. G., *Langmuir* **2004**, *20*, 11092.
- [1291] van Oudenaarden, A., Groves, J. T., Boxer, S. G., *Biophys. J.* **1999**, *76*, A11.
- [1292] van Oudenaarden, A., Boxer, S. G., *Science* **1999**, *285*, 1046.
- [1293] Groves, J. T., Ulman, N., Boxer, S. G., *Science* **1997**, *275*, 651
- [1294] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Langmuir* **2000**, *16*, 894.
- [1295] Cremer P.S., Boxer S.G., *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554
- [1296] Radler, J., Strey, H., Sackmann, E., *Langmuir* **1995**, *11*, 4539.
- [1297] Groves, J. T., Ulman, N., Cremer, P. S., Boxer, S. G., *Langmuir* **1998**, *14*, 3347
- [1298] Hovis, J. S., Boxer, S. G., *Biophys. J.* **2001**, *80*, 502A.
- [1299] Möhwald, H., *Annual Reviews of Physical Chemistry* **1990**, *41*, 441.
- [1300] McConnell, H., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171.
- [1301] Harkins, W. D., Young, T. F., Boyd, E., *J. Chem. Phys.* **1940**, *8*, 954.
- [1302] Harkins, W. D., Copeland, L. E., *J. Chem. Phys.* **1942**, *10*, 272.
- [1303] Albrecht, O., Gruler, H., Sackmann, E., *Journal De Physique* **1978**, *39*, 301.
- [1304] Ahrens, H., Förster, S., Helm, C. A., *Macromolecules* **1997**, *30*, 8447.
- [1305] Thomas, R. K., *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **1996**, *1*, 636.
- [1306] Majewski J., Kuhl T.L., Wong J.Y., Smith G.S., *Journal of Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 207
- [1307] Majewski, J., Kuhl, T. L., Wong, J. Y., Smith, G. S., *Journal of Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 207.
- [1308] L'vov, Y. M., Sukhorukov, G. B., *Biol. Membr.* **1997**, *14*, 229.
- [1309] www.mrl.ucsb.edu/~pynn
- [1310] Brückel, T., Kentzinger, E., **1999**, *Streuethoden zur Untersuchung von Dünnschichtsystemen*, Vorlesungsskript des 30. IFF-Ferienkurses "Magnetische Schichtsysteme in Forschung und Anwendung, Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Materie und Material/Matter and Materials, Band 2, B3.1 - B3.48
- [1311] Russel, T. P., *Mat. Sci. Rep.* **1990**, *5 (4&5)*, 171.
- [1312] Cowley, J. M., *Diffraction Physics*, North-Holland, Amsterdam, **1990**.
- [1313] Lovell, M. R., Richardson, R. M., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 197.
- [1314] Skript, TU Braunschweig, Institut für Anorganische und Analytische Chemie
- [1315] <http://webster.ncnr.nist.gov/resources/n-lengths/>
- [1316] Messiah, A., *Quantenmechanik, Vol. 2*, Walter de Gruyter, Berlin, **1979**.
- [1317] http://www.chemkrist.de/chemkrist/Kristallographietexte/8_Neutronenbeugung.pdf
- [1318] Thomas, R. K., *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **1996**, *1*, 636.
- [1319] Alsnielsen, J., *Physica A* **1986**, *140*, 376.

- [1320] Smith, G. S., Majkrzak, C. F., in *International Tables for Crystallography, Vol. C: Mathematical, Physical and Chemical Tables* (Eds.: Prince, E., Wilson, A. J. C.), 2nd Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1999**, pp. 126.
- [1321] Pynn, R., Hamilton, W. A., Smith, G. S., *Physica B* **1992**, 180, 465.
- [1322] Webster, J., Langridge, S., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, 4, 186.
- [1323] Pershan, P. S., *Phys. Rev. E* **1994**, 50, 2369.
- [1324] Zhou, X. L., Chen, S. H., *Phys. Rev. E* **1993**, 47, 3174.
- [1325] Wiese, H., in *Wäßrige Polymerdispersionen: Synthese, Eigenschaften, Anwendung* (Ed.: Distler, D.), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, pp. 31.
- [1326] Leharne, S. A., Chowdhry, B. Z., *Thermodynamic background to differential scanning calorimetry, Vol. Kapitel 12*, Wiley, New York, **1998**.
- [1327] Burger, A., *Pharmazie u. Z.* **1982**, 6, 177.
- [1328] Cooper, A., Johnsson, C. M., *Differential scanning calorimetry, Vol. 22*, Marcel Dekker, New York, **1994**.
- [1329] Blume, A., *Applications of calorimetry to lipid model membranes, Vol. Kapitel 3*, Plenum Press, New York, **1988**.
- [1330] Hato, M., Minamikawa, H., Tamada, K., Baba, T., Tanabe, Y., *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, 80, 233.
- [1331] Hato, M., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, 6, 268.
- [1332] Laughlin, R. G., *The Aqueous Phase Behaviour of Surfactants*, Academic Press, London, **1994**.
- [1333] Larsson, K., *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 7304.
- [1334] Feldman, K., Hahner, G., Spencer, N. D., Harder, P., Grunze, M., *J. Amer. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10134.
- [1335] Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [1336] Spinke, J., Dissertation, Johannes Gutenberg Universität (Mainz), **1992**.
- [1337] Ikariyama, Y., Fukuri, M., Aziawa, M., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 496.
- [1338] Mückter, H., Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität München (München), **1988**.
- [1339] Whittaker, V. P., *Biochem. J.* **1947**, 41, 56.
- [1340] Schmidt, A., Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **1998**.
- [1341] Kuhn, R., Sugimoto, H., *Helvetica Chim. Acta* **1929**, 12, 915.
- [1342] Kerr, W. J., Kirk, G. G., Middlemiss, D., *J. Organomet. Chem.* **1996**, 519, 93.
- [1343] Wagner, A. F., Walton, E., Boxer, G. E., Pruss, M. P., Holly, F. W., Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 5079.
- [1344] Blandamer, M. J., Fox, M. F., Powell, E., Stanfford, J. W., *Makromol. Chem.* **1969**, 124, 122.
- [1345] Kjellander, R., Florin, E., *J. Chem. Soc., Faraday Trans* **1981**, 77, 2053.
- [1346] Wang, R. R. C., Kreuzer, H. J., Grunze, M., *J. Phys. Chem.* **1997**, B101, 9767.
- [1347] Lee, J. H., Li, T., Park, K., in *Water in Biomaterials Surface Science* (Ed.: Morra, M.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2001**.
- [1348] Gauger, D. R., Binder, H., Vogel, A., Selle, C., Pohle, W., *J. Mol. Struct.* **2002**, 614, 211.
- [1349] Vanderah, D. J., Meuse, C. W., Silin, V., Plant, A. L., *Langmuir* **1998**, 14, 6916.
- [1350] Keller C.A., Glasmästar K., Zhdanov V.P., Kasemo B., *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 5443
- [1351] Krishna, G., Schulte, J., Cornell, B. A., Pace, R., Wiczorek, L., Osman, P. D., *Langmuir* **2001**, 17, 4858.
- [1352] Busch, W., Saier, J., Milton H., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 37, 287.
- [1353] Locher, K. P., Bass, R. B., Rees, D. C., *Science* **2003**, 301, 603.
- [1354] Berzina, T. S., Troitsky, V. I., Vakula, S., Riccio, A., Morana, A., Derosa, M., Gobbi, L., Rustichelli, F., Erokhin, V. V., Nicolini, C., *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Mater. Sens. Syst.* **1995**, 3, 33.

- [1355] Katchalski-Katzir, E., in *Design and synthesis of organic molecules based on molecular recognition* (Ed.: Van Binst, G.), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1986**, pp. 1.
- [1356] Neurath, Hill, *The Proteins, Vol. 5*, New York: Academic Press, **1982**.
- [1357] Smith, G. D., Duax, V. L., Langs, D. A., De Titta, G. T., Edmonds, J. W., Rohrer, D. C., Weeks, C. M., *J. Amer. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7242.
- [1358] Weber, E., Vögte, F., in *Host-Guest Complex Chemistry I. Topics in Current Chemistry* **98**, Vol. 98 (Ed.: Vögte, F.), Springer-Verlag, Berlin, **1981**.
- [1359] York, R. L., Nguyen, P. T., Slowinski, K., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5948.
- [1360] Elie-Caille, C., Fliniaux, O., Pantigny, J., Maziere, J.-C., Bourdillon, C., *Langmuir* **2005**, *21*, 4661.
- [1361] Haussling, L., Knoll, W., Ringsdorf, H., Schmitt, F. J., Yang, J. L., *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia* **1991**, *46*, 145.
- [1362] Arya, A., Krull, U. J., Thompson, M., Wong, H. E., *Anal. Chim. Acta* **1985**, *173*, 331
- [1363] Hongyo, K., Joseph, J., Huber, R. J., Janata, J., *Langmuir* **1987**, *3*, 827.
- [1364] Chi, L. F., Johnston, R. R., Ringsdorf, H., *Langmuir* **1992**, *8*, 1360
- [1365] Yuan, H. P., LeitmannovaOttova, A., Tien, H. T., *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Mater. Sens. Syst.* **1996**, *4*, 35.
- [1366] Antonietti, M., Thunemann, A., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 667.
- [1367] Majewski, J., Wong, J. Y., Park, C. K., Seitz, M., Israelachvili, J. N., Smith, G. S., *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2363.
- [1368] Ide, T., Yanagida, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *265*, 595
- [1369] Costello, R. F., Peterson, I. R., Heptinstall, J., Walton, D. J., *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 265.
- [1370] Kühner, M., Tampe, R., Sackmann, E., *Biophys. J.* **1994**, *67*, 217.
- [1371] Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H. J., Fuchs, H., Janshoff, A., *Biophys. J.* **2000**, *78*, 487.
- [1372] Dietrich, C., Tampe, R., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1238*, 183.
- [1373] Schuster, B., Weigert, S., Pum, D., Sara, M., Sleytr, U. B., *Langmuir* **2003**, *19*, 2392.
- [1374] Elender, G., Kuhner, M., Sackmann, E., *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 565.
- [1375] Seitz, M., Wong, J. Y., Park, C. K., Alcantar, N. A., Israelachvili, J., *Thin Solid Films* **1998**, *329*, 767.
- [1376] Heibel, C., Maus, S., Knoll, W., Ruhe, J., in *Organic Thin Films, Vol. 695*, Amer Chemical Soc, Washington, **1998**, pp. 104.
- [1377] Wagner, M. L., Tamm, L. K., *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1400.
- [1378] Theato, P., Zentel, R., Schwarz, S., *Macromol. Biosci.* **2002**, *2*, 387.
- [1379] Munro, J. C., Frank, C. W., *Polymer* **2003**, *44*, 6335.
- [1380] Munro, J. C., Frank, C. W., *Langmuir* **2004**, *20*, 10567.
- [1381] Hato, M., Minamikawa, H., *Langmuir* **1996**, *12*, 1658.
- [1382] Retailleau, L., Laplace, A., Fensterbank, H., Larpent, C., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 608.
- [1383] Gotz, H., Harth, E., Schiller, S. M., Frank, C. W., Knoll, W., Hawker, C. J., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2002**, *40*, 3379.
- [1384] Benoit, D., Chaplinski, V., Braslau, R., Hawker, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3904.
- [1385] Ouchi, T., Fujie, H., Jokei, S., Sakamoto, Y., Chikashita, H., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1986**, *23*, 2059.
- [1386] Huber, T., Botelho, A. V., Beyer, K., Brown, M. F., *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2078.
- [1387] Kusumi, A., Ike, H., Nakada, C., Murase, K., Fujiwara, T., *Semin. Immunol.* **2005**, *17*, 3.
- [1388] Cha, X., Ariga, K., Onda, M., Kunitake, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11833.
- [1389] Tamada, K., Minamikawa, H., Hato, M., *Langmuir* **1996**, *12*, 1666.
- [1390] Du, Y.-k., An, J.-y., Tang, J. a., Li, Y., Jiang, L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1996**, *7*, 129.

- [1391] Boyd, B. J., Drummond, C. J., Krodkiewska, I., Grieser, F., *Langmuir* **2000**, *16*, 7359.
- [1392] Marsh, D., *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Biomembr.* **1996**, *1286*, 183.
- [1393] Schief, W. R., Touryan, L., Hall, S. B., Vogel, V., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7388.
- [1394] Chechik, V., Crooks, R. M., Stirling, J. M., *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1161.
- [1395] Wallwork, M. L., Smith, D. A., Zhang, J., Kirkham, J., Robinson, C., *Langmuir* **2001**, *17*, 1126.
- [1396] Sullivan, T. P., Huck, W. T. S., *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 17.
- [1397] Vasilev, K., Knoll, W., Kreiter, M., *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 3439.
- [1398] Lakowicz, J. R., *Anal. Biochem.* **2001**, *298*, 1.
- [1399] Kittredge, K. W., Fox, M. A., Whitesell, J. K., *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10594.
- [1400] Chambon, C., Bennat, D., Delolme, F., Dessalces, G., Blachere, T., de Ravel, M. R., Mappus, E., Grenot, C., Cuilleron, C. Y., *Biochemistry* **2001**, *40*, 15424.
- [1401] Tarlov, M. J., Burgess, D. R. F., Gillen, G., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5305.
- [1402] Dormtin, G., Prestwich, G. D., *Biochemistry* **1994**, *33*.
- [1403] Förster, T., *Disc. Farad. Soc.* **1959**, *27*, 7.
- [1404] Fleet, G. W., Porter, R. R., Knowles, J. R., *Nature* **1969**, *224*, 511.
- [1405] Lwowski, W., *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 922.
- [1406] Lwowski, W., John Wiley&Sons, New York-London-Sydney-Toronto, **1970**.
- [1407] Keana, J. F. W., Cai, S. X., *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640.
- [1408] Gritsan, N. P. e. a., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1951.
- [1409] Borden, W. T. e. a., *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 765.
- [1410] Gritsan, N. P., Platz, M. S., *Adv. Phys. Org. Chem.* **2001**, *36*, 255.
- [1411] Scriven, E. F. V., Academic Press, Inc., Orlando San Diego New York London Toronto Montreal Sydney Tokyo, **1984**.
- [1412] Albini, A., Bettinetti, G., Minoli, G., *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **1999**, 2803.
- [1413] Popova, T. V., Mal'shakova, V. S., Alekseyev, P. V., Kudryashova, N. V., Shakirov, M. M., Savinkova, L. L., Drachkova, I. A., Godovikova, T. S., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 921.
- [1414] Bailey, F. E., Koleske, J. Y., *Poly(ethylene oxide), Vol. 14*, Academic Press, New York, **1976**.
- [1415] Amiji, M., Park, K., *Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1993**, *4*, 217.
- [1416] Lee, J. H., Lee, H. B., Andrade, J., *Prog. Polym. Sci.* **1995**, *20*, 1034.
- [1417] Elbert, L., Hubbell, J. A., *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1996**, *26*, 365.
- [1418] Yasuda, H., *Plasma Polymerization*, Academic Press Inc., Orlando, FL, **1985**.
- [1419] Kickuth, R., *Plasmatechnik; Prozessvielfalt + Nachhaltigkeit*, Roco Druck GmbH, Wolfenbüttel, **2000**.
- [1420] Boenig, H. V., *Fundamentals of Plasma Chemistry and Technology*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, **1988**.
- [1421] Ardenne, M. v., Musiol, G., Reball, S., *Effekte der Physik und ihre Anwendungen*, Harri Deutsch, Frankfurt/Main, **1990**.
- [1422] Lampitt, R. A., Crowther, J. M., Badyal, J. P. S., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10329.
- [1423] Ryan, M. E., Hynes, A. M., Badyal, J. P. S., *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 37.
- [1424] van Os, M. T., Menges, B., Foerch, R., Vancso, G. J., Knoll, W., *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3252.
- [1425] Einspahr, H., Bugg, C. E., *Calcium and its Role in Biology-Metal ions in biological systems Calcium and its Role in Biology, Vol. 17*, Dekker, New York, **1984**.
- [1426] Niki, I., Yokokura, H., Sudo, T., Kato, M., Hidaka, H., *J. Biochem. (Tokyo)*. **1996**, *120*, 685.
- [1427] Meech, R. W., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1978**, *7*, 1.
- [1428] Maurer, Schiedt, *Hoppe-eyler's Z. Physiol. Chem.* **1932**, *206*, 129.
- [1429] Cadwallader, D. E., Larocca, J. P., *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash)*. **1956**, *45*, 480.
- [1430] US 2717908, **1954**,
- [1431] Dogue, I. L. J., Förch, R., Mermilliod, N., *J. Adhesion Sci. Technol.* **1995**, *9*, 1531.

Lebenslauf

Marienthal, den 1. Januar 2008

Stefan Schiller

Wohnort : Blumenstraße 14
65366 Geisenheim

Geburtstag : 21. April 1971

Geburtsort : Wiesbaden

Konfession : katholisch

Familienstand : verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung :

08/1977- 07/1986 Clemens-Brentano-Schule, Grund- und Hauptschule Oestrich-Winkel

09/1986 - 07 1988 Berufsbildende Schule Landwirtschaft Bad Kreuznach,
Berufsfachschule -Schwerpunkt Agrar

08/1988 - 06/1991 Friedrich-List-Schule, Berufliches Gymnasium der Landeshauptstadt
Wiesbaden Abitur - Schwerpunkt Chemie, mit der Note 1,0 &
Ausbildung zum chem. techn. Assistent, Abschluß mit Auszeichnung

Bundeswehr :

06/1991 - 07/1992 Wehrdienst bei der deutschen Luftwaffe; Spezialausbildung Abwehr
von ABC-Kampfstoffen und Selbstschutz (SE), Raketenflugabwehr

Studium :

10/1992 - 09/1994 Studium der Chemie an der **Justus-Liebig-Universität Gießen**,
Vordiplom mit "sehr gut"

ab 10/1994 Studium der Chemie an der **Johannes-Gutenberg-Universität Mainz**
davon

08/1995 - 03/1996 Studium der Polymerchemie (4. Hauptfach im Rahmen der
Diplomprüfung) am Silvio O'Conte National Research Center for
Polymer Chemistry and Engineering, **University of Massachusetts**
at Amherst, Forschungsprojekt im Ak Prof. D. Tirrell, DAAD-
Stipendium

05/1996 - 08/1996 wissenschaftl. Mitarbeiter o.H. am Max-Planck-Institut für
Polymerforschung Mainz, Kern/Mantel Emulsionspolymerisationen im
AK Prof. Spiess / Frau Dr. Katharina Landfester

04/96 - 04/97 Studium der Biochemie: Grundpraktikum und Praktikum für
Fortgeschrittene mit Vorlesung und Seminar (zusätzliches Hauptfach)

11/1997 **mündliche Diplomprüfung** ("sehr gut")

- 12/1997 - 09/1998 **Diplomarbeit** im AK Prof.H.Kunz mit dem Thema "Selektive Synthese eines Sialyl-Tn-Glykokonjugats", Bewertung mit "sehr gut", **Diplom**, Abschluß mit "sehr gut"
- 07/1998 - 09/1998 Praktikum in der Abteilung "Forschung Arzneiwirkstoffe" im **Hauptlabor der BASF AG Ludwigshafen**, synthetische Arbeit mit dem Thema: Endothelin Converting Enzyme (ECE) - Inhibitoren
- 10/98-01/2004 **Promotion** im AK Prof. W. Knoll unter Mitbetreuung von Prof. H. Kunz Thema "Biomimese biologischer Membranen: Konzeptionierung, Synthese und biophysikalische Charakterisierung einer hierarchie festkörpergestützter Mimikry biologischer Membranen",
- davon**
- 09/1999 - 12/1999 Forschungsaufenthalt an der **Stanford University**, Palo Alto am Department of Chemical Engineering bei Prof. C. W. Frank, am Department of Chemistry bei Prof. S. Boxer und am **IBM Almaden Research Center**, San Jose, bei Ph.D. C. J. Hawker -DAAD-Stipendium
- 04/2001 Brester-Winkel Mikroskopie am Biotechnology Engineering Department, **Ben Gurion University of the Negev**, Beer Sheva, Israel, bei Prof. A. Berman
- 06/2001 Neutronenstreuexperimente am **Manuel Lujan Los Alamos Neutron Scattering Center (LANSCE)**, Los Alamos, bei Ph. D. J. Majewski
- 01/2002-01/2004 **wissenschaftlicher Mitarbeiter**
- 03/2004-present **Research Associate** im AK Prof. P.G. Schultz: Entwicklung von Mutanten-Aminoacyl-tRNA Synthetasen zur Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren in *E. coli* und *S. cerevisiae*. Synthese der unnatürlichen Aminosäuren mit neuen chemischen Linkereinheiten für biomimetischen, bioorthogonalen und posttranslationalen Modifikationen, cellbiologische Studien subzellulärer Wechselwirkungen auf supramolekularer Ebene

Danksagung

Ich danke meinen Betreuern und Kollegen für ihre Unterstützung der Arbeit, vor allem aber meiner Familie und Gemeinde; Gottes Hilfe allein machte diese Arbeit möglich. Danke!

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Quellen, außerhalb der angegebenen wurden nicht verwendet. Ich habe die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität vorgelegt oder mich um eine Promotion beworben.

Stefan Schiller, Dipl. Chemiker, Mainz den 3.1.2008