

Charakterisierung und Optimierung oberflächen-gebundener Lipid-Membransysteme

Diplomarbeit

zum Erlangen des akademischen Grades

Diplom Chemiker

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

vorgelegt von

Alexander Körner

geboren in Speyer

angefertigt am

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
im Arbeitskreis Materialwissenschaften

Mainz, im August 2009

Erklärung

Die Diplomarbeit wurde am Max-Planck-Institut für Polymerforschung im Arbeitskreis Materialwissenschaften in der Zeit von Oktober 2008 bis August 2009 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Frau Prof. Eva-Kathrin Sinner angefertigt.

Beginn der Diplomarbeit: 20. Oktober 2008

eingereicht beim Prüfungsausschuss: 17. August 2009

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 17. August 2009

Alexander Körner

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Wolfgang Knoll und meiner Projektleiterin Frau Prof. Eva-Kathrin Sinner für die Betreuung, Unterstützung und die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz anzufertigen.

Dr. Sandra Ritz und Dipl. Chem. Jan Dorn gebührt für ihre hervorragende Betreuung mein besonderer Dank. Durch ihre Tipps und Ideen boten sie mir jederzeit eine große Unterstützung.

Meinen Kollegen/innen Indriati, Annette, Nathalie, Angelika, Veronique, Christoph, Ann, Sylvia, Markus möchte ich dafür danken, dass sie mir bei verschiedenen Messungen und deren Auswertungen beratend zur Seite standen.

Der Bio-Gruppe möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen danken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Ingo Köper und seinem Arbeitskreis für die Anregungen und die informativen Gruppenseminare.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir während meines Studiums und meiner Diplomarbeit in jeder Hinsicht immer mit ihrer vollen Unterstützung zur Seite standen.

.....meiner Familie.....

I. Inhaltsverzeichnis

1. Motivation	1
2. Einleitung	2
2.1 Biologische Membranen	2
2.2 Modellmembranen	3
2.2.1 Vesikel.....	4
2.2.2 Schwarzfilmmembranen.....	5
2.2.3 festkörper-unterstützte Membranen	5
2.2.4 Gemischte Doppelschichten aus Alkanthiolen und Lipiden	7
2.2.5 festkörper-unterstützte Lipidmembranen mit „Abstandhalter“	8
2.3 Zielsetzung	9
3. Methoden	10
3.1 Kontaktwinkelmessung	10
3.2 Quarzmikrowaage mit Dissipationsmessung	12
3.3 Oberflächenplasmonenspektroskopie	16
3.3.1 Theoretischer Hintergrund	16
3.3.2 Messprinzip	20
3.4 Rasterkraftmikroskopie	24
3.5 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie	29
4. Experimententeil	35
4.1 Chemikalienverzeichnis	35
4.2 Substratpräparation	36
4.2.1 Präparation der Goldsubstrate:	36
4.2.2 Oberflächenpräparation:	37
4.2.3 Rapid Solvent Exchange:	39
4.3 Experimententeil Messmethoden	40
4.3.1 Kontaktwinkelmessung	40
4.3.2 Quarzmikrowaage mit Dissipationsmessung	41
4.3.3 Oberflächenplasmonenspektroskopie	44
4.3.4 Rasterkraftmikroskopie	44
4.3.5 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie	46
5. Ergebnisse und Diskussion	48
5.1 Belegung der Goldoberfläche.....	49
5.2 Optimierung der Kupplungsreaktion	54
5.2.1 Kupplungen der Lipide an MUS.....	55
5.2.2 Kupplungen an P19.....	60
5.3. Verhalten von Vesikeln auf Oberflächen.....	62
5.3.1 Verhalten der Vesikel auf verschieden funktionalisierten Oberflächen in hochreinem Wasser.....	63

5.3.2 Verhalten der Vesikel auf verschiedenen funktionalisierten Oberflächen in PBS	69
5.4 „Rapid Solvent Exchange“ (RSE)	83
6. Zusammenfassung	92
7. Ausblick	95
8. Literatur	97

II. Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
DMPE	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOctPE	1,2-Dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EIS	Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie
MHS	16-Mercaptohexadekansäure
MUS	11-Mercaptoundekansäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
P19	Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Ala-Asp-Arg
P19 modifiziert	Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Gln-Asp-Asp
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Saline
QCM-D	<i>Quarz Crystal Microbalance with Dissipation</i> , Quarzmikrowaage mit Dissipation
RSE	„ <i>Rapid Solvent Exchange</i> “
S-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
SPR	<i>Surface Plasmon Spectroscopy</i> , Oberflächenplasmonenspektroskopie
TFP-S	Tetrafluorphenol-sulfonat

1. Motivation

Transmembranproteine wie Ionen-Kanäle und Rezeptoren, sind essentiell für viele zelluläre Prozesse, zum Beispiel die Weitergabe von Signalen, den aktiven Transport von Molekülen bzw. Ionen und Zell-Zell-Interaktionen. Membran-Proteine machen etwa ein Drittel des menschlichen Proteoms aus und dienen als Angriffspunkt vieler pharmazeutischer Wirkstoffe. Die spezielle Betrachtung der Rezeptorproteine ist interessant, da sie sich bei höheren Organismen in den Zellmembranen der Sinneszellen befinden und deshalb für das Riechen, Schmecken und Sehen verantwortlich sind. Um Rezeptorproteine untersuchen zu können, müssen sie in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen. Die membrandurchspannenden Rezeptorproteine können ihre native und aktive Struktur nur in einer Membran annehmen. Die Untersuchung einer Protein-Einlagerung in eine biologische Membran mit biophysikalischen Methoden ist aber aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung einer solchen Membran nur schwer möglich. Es erscheint deshalb sinnvoll, eine künstliche Membran zu erschaffen, die zum einen die biologische Membran imitiert und zum anderen die Anwendung biophysikalischer Untersuchungsmethoden erlaubt. Robelek et al. untersuchten die Inkorporation des Rezeptormoleküls OR 5 (engl. *odorant receptor*) in ein künstliches Lipid-Membransystem, welches auf eine Monoschicht des Peptides P19 gebunden wurde.¹

Das Ziel dieser Arbeit war es, das von Robelek et al. verwendete Lipid-Membransystem zu optimieren oder ein ähnliches Membransystem herzustellen, welches als Biosensor-Matrix genutzt werden kann.

2. Einleitung

2.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen trennen als Zellwände zum einen das Innere lebender Zellen vom umgebenden Medium und zum anderen die Organellen des Zellinneren von dem sie umgebenden Cytoplasma. Membranen gewährleisten chemische Isolierung, mechanische Stabilität und halten die Gradienten zwischen den chemischen Potentialen inner- und außerhalb des jeweiligen Kompartiments aufrecht. Diese Gradienten bilden die biochemische Grundlage für Energiegewinnung, Stoffwechselforgänge sowie Aufnahme und Weiterleitung von Signalen und sind somit eine grundlegende Bedingung für jedes Leben.

Die Zellmembranen besitzen einen sehr komplexen und dynamischen Aufbau, wie er im stark vereinfachten und in Abbildung 2.1 gezeigten „*Fluid Mosaic Model*“ von Singer und Nicholson beschrieben wird. ²

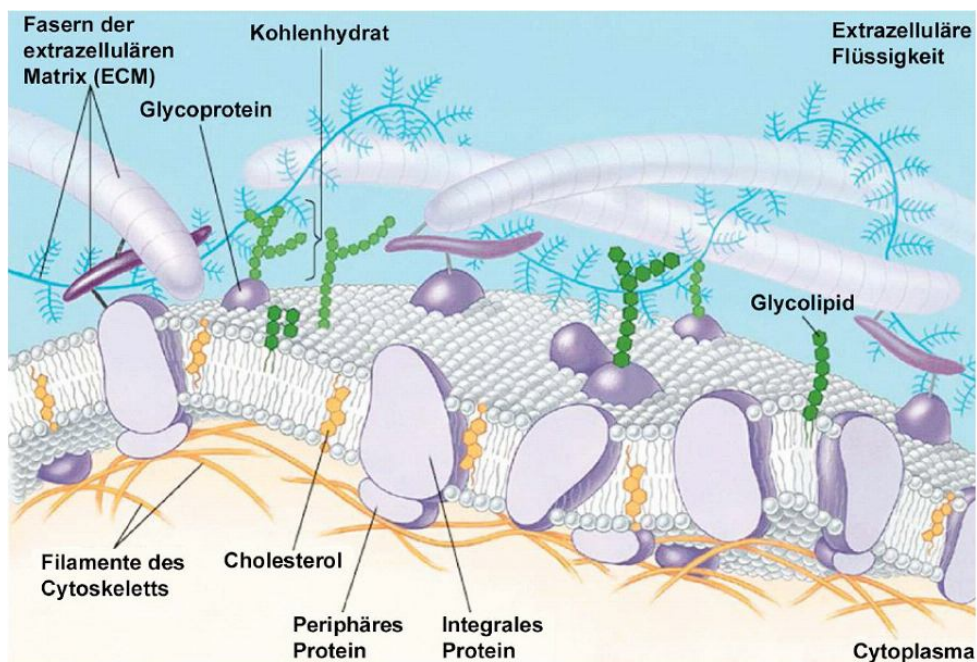


Abbildung 2.1: „Fluid Mosaic Model“ einer Zellmembran nach Singer und Nicholson, entnommen aus ³. Dargestellt ist eine aus Lipiden und Cholesterin bestehende Zellmembran mit inkorporierten Proteinen.

Biologische Membranen sind wenige Nanometer dick und bestehen, wie in Abbildung 2.1 zu sehen, aus zwei Hauptkomponenten: Zum einen aus Lipidmolekülen, die sich aufgrund hydrophober Interaktionen von selbst (*engl. Self-assembly*) zu durchgängigen Doppelschichten bilden. Zum anderen bestehen sie aus Proteinen, welche in die Lipid-Doppelschicht eingebaut oder mit ihr assoziiert sind.

Die Besonderheit der Lipiddoppelschicht ist die hohe Beweglichkeit von Lipiden und Proteinen, weshalb sie auch als zweidimensionale Flüssigkeit bezeichnet werden kann.

Die vielen Zellmembranbausteine sind alle mit lebenserhaltenden Funktionen verknüpft. Eine Vielzahl medizinischer Wirkstoffe besitzt daher ihren Angriffspunkt an der Zellmembran bzw. den eingelagerten, inkorporierten Membranproteinen. Eine wesentliche Rolle spielen hier aus pharmakologischer Sicht membrangebundene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR).⁴ Die Bedeutung der GPCRs für pathologische Prozesse wird deutlich, wenn man bedenkt, dass 60-70% der 2005 auf dem Markt befindlichen Pharmaka diese Rezeptoren als Angriffspunkt besaßen.⁵ Die Konsequenz ist das starke Interesse daran, den Aufbau und die Funktion biologischer Membranen zu untersuchen.

2.2 Modellmembranen

Die hohe Komplexität und hohe Anzahl an unbekanntem Parametern einer natürlichen Zellmembran erschwert die systematische Untersuchung von grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften und der Funktion einzelner Bestandteile.

Modellmembrane ermöglichen, durch Senkung der Membran-Komplexität und unter Beibehaltung der grundlegenden Membraneigenschaften, einzelne Elemente systematisch zu untersuchen.

Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über etablierte Modellsysteme, die im Folgenden vorgestellt werden.

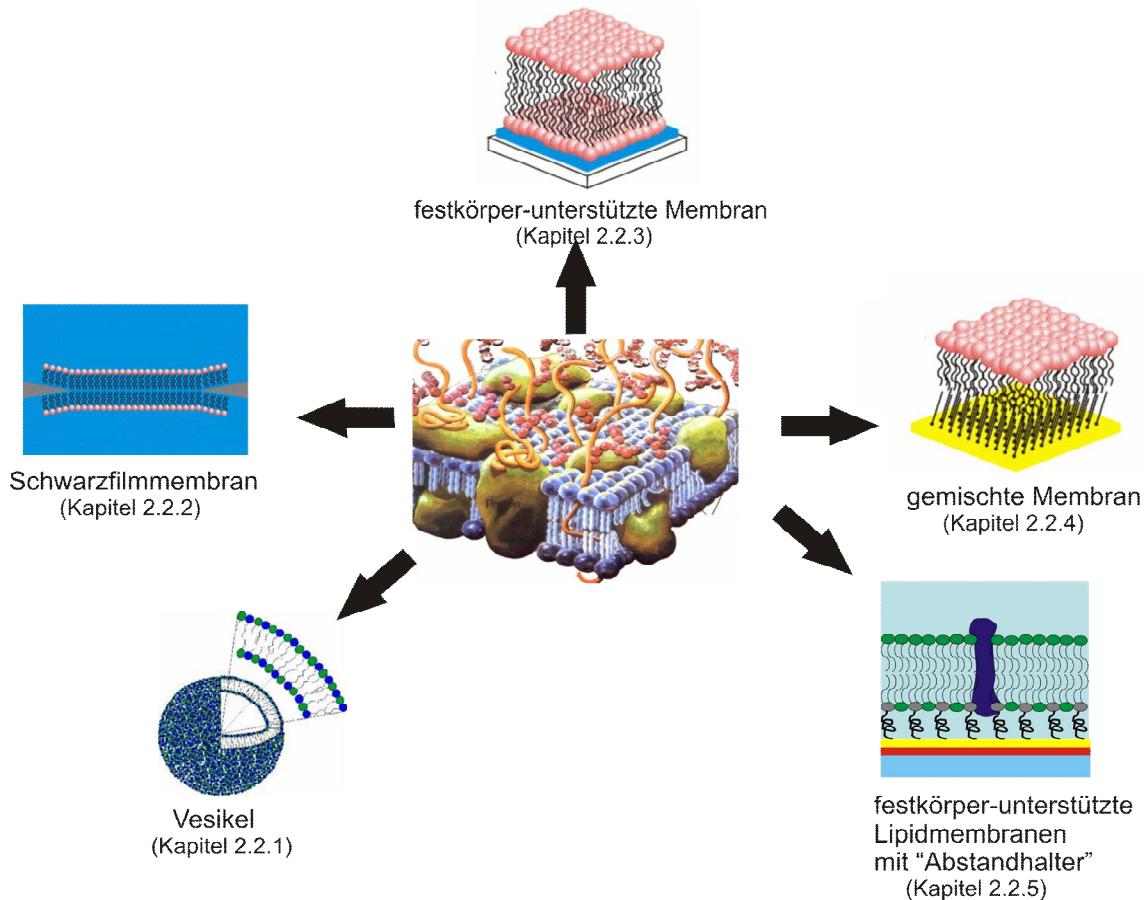


Abbildung 2.2: verschiedene Modellmembransysteme

2.2.1 Vesikel

Als Vesikel bezeichnet man wassereinschließende Hohlkugeln aus Lipiden. Sie bilden sich bei Überschreitung der kritischen Mizellenkonzentration (engl. *Critical Micelle Concentration*, CMC) aus einer wässrigen Lipid-Suspension. Die Lipide bilden zur Reduktion der hydrophil-hydrophoben Wechselwirkungen eine Doppelschicht, in deren Inneren die hydrophoben Alkyl-Ketten der Lipide vor Wasserkontakt geschützt sind.

Um aus multilamellaren Vesikeln unilamellare Vesikel zu machen und sie damit für die Verwendung als Modellmembranen zu nutzen, müssen sie extrudiert werden. Unter Extrudieren versteht man das Pressen der multilamellaren Vesikel

durch kleine Poren. Die resultierenden Vesikel besitzen danach in etwa die Größe der Poren.⁶

Diese Modellmembranen wurden erstmals von Bangham et al. verwendet und dienen vor allem zur Untersuchung von Proteinaktivitäten.^{7, 8}

Nachteil der Vesikel ist eine kurze Lebensdauer (Stunden bis Tage) und ihre geringe Stabilität.⁶

2.2.2 Schwarzfilmmembranen

Schwarzfilmmembranen (engl. *Black Lipid Membranes*, BLM) bestehen aus Phospholipidmolekülen, die in einem mikroskopisch kleinen Loch zwischen zwei Flüssigkeitskammern eine Membran bilden. Sie verdanken ihren Namen der schwarzen Farbe, welche sie in weißem Licht annehmen. Dieses Phänomen ist eine Folge der destruktiven Interferenz des Lichtes, die aufgrund der geringen Dicke der Lipidschichten auftritt.

Schwarzfilmmembranen schwimmen in Flüssigkeit, weshalb es keine störenden Wechselwirkungen mit einer darunterliegenden Auflage geben kann. Transmembran-Proteine liegen in dieser Lipid-Doppelschicht also vollständig mobil und aktiv vor. Der Nachweis von Transportprozessen durch Membranproteine ist folglich mit Hilfe der Schwarzfilmmembranen möglich.^{9, 10}

Eine kommerzielle Nutzung scheiterte bisher an der kurzen Lebensdauer der Doppelschicht.

2.2.3 festkörper-unterstützte Membranen

In dem erstmals von Sackmann et al. beschriebenen System verbessert die Bindung der Membran an eine Festkörperoberfläche ihre Stabilität.¹¹ Diese festkörper-unterstützten Membranen (engl. *Solid Supported Bilayer Membranes*, sBLM) sind robuster und stabiler als die Schwarzfilmmembranen.^{12, 13}

Zudem wird das Membran-System zugänglich für eine Vielzahl oberflächensensitiver Charakterisierungsmethoden wie z.B. Rasterkraftmikroskopie, Oberflächenplasmonenspektroskopie, die Charakterisierung mittels Quarz-Mikrowaage und Ellipsometrie.

Die Membranbeweglichkeit wird bei festkörper-unterstützten Systemen durch eine 10-20 Å breite Wasserschicht aufrechterhalten, die sich zwischen Substrat und der Doppelschicht befindet.

Die Auswahl von geeigneten Substraten ist limitiert. Um eine Membran von hoher Qualität, also mit wenigen Defekten und einer hohen Lipid-Mobilität, zu tragen, sollte die Oberfläche hydrophil und glatt sein. Als Substrat geeignet sind z.B. Titanoxid^{14, 15}, Indium-Zinn-Oxid^{16, 17}, Gold^{18, 19}, Silber²⁰ und Platin²¹.

Die Fixierung einer Membran auf einer Oberfläche stellt einen großen Fortschritt im Hinblick auf die Konstruktion von Biosensoren dar.

Der direkte Kontakt der Lipide mit der Oberfläche hat aber auch Nachteile. So ist zum einen die Fluidität der Membran durch die Immobilisierung der ersten Lipidschicht auf der Oberfläche stark eingeschränkt. Zum anderen können Transmembran-Proteine mit dem Substrat interagieren und dadurch denaturiert werden (siehe Abbildung 2.3).

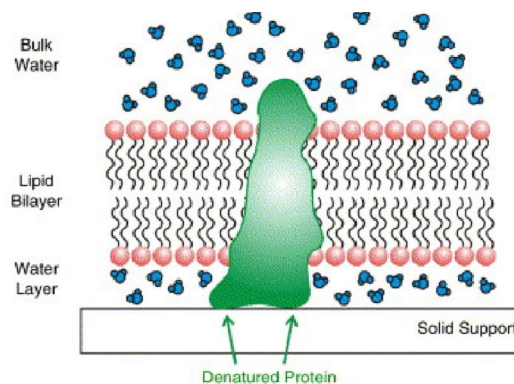


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einer „sBLM“ mit einem durch Oberflächenkontakt denaturiertem Protein²²

2.2.4 Gemischte Doppelschichten aus Alkanthiolen und Lipiden

Alkanthiole bilden durch „Selbstorganisation“ Monoschichten (engl. *Self-Assembled Monolayers*, SAM) an Gold, Silber oder Quecksilber. Methylterminierte Alkanthiol-Oberflächen bilden auf Gold eine hydrophobe Oberfläche und ermöglichen die Anlagerung einer Lipidschicht auf die Alkanthiolschicht und somit die Formierung einer gemischten Doppelschicht-Membran.²³⁻²⁵ In ihrer einfachsten Form besteht die gemischte Membran aus einer selbstorganisierten, festkörper-gestützten Alkanthiol-Monoschicht (SAM) und einer Monoschicht aus Phospholipid.²⁶ Die schematische Darstellung einer gemischten Membran wird in Abbildung 2.4 dargestellt.

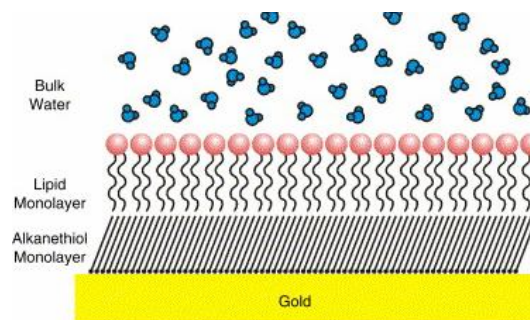


Abbildung 2.4 entnommen aus ²²: Schematische Darstellung einer gemischten Membran bestehend aus einer auf Gold gebundenen Alkanthiolschicht und einer Lipidschicht mit ihren hydrophilen Enden zum Puffer oder Wasser.

Gemischte Doppelschicht-Membranen sind aufgrund der starken Interaktionen zwischen Alkanthiol-Monoschicht und dem darunterliegenden Substrat oft stabiler als die festkörper-gestützten Membranen und somit von Vorteil für die Biosensorik.

Ein Nachteil dieses Systems ist die Verschlechterung der Membran-Fluidität. Aufgrund der stark kristallinen Struktur der Alkanthiol-Schicht²⁷ wird die Proteineinlagerung stärker als mit festkörper-gestützten Membranen beeinträchtigt.

2.2.5 festkörper-unterstützte Lipidmembranen mit „Abstandhalter“

Die festkörper-unterstützten Lipidmembranen mit Abstandhalter (*tethered Bilayer Lipid Membranes*, tBLM) verbinden die Vorteile von freien und festkörper-unterstützten Membranen. Sie besitzen, aufgrund der Anbindung an die Oberfläche, eine hohe Stabilität und sind daher für die Anwendung oberflächensensitiver Methoden geeignet. Die Mobilität der Lipide, wie sie bei freien Membranen vorliegt, kann durch das Benutzen eines „Abstandhalters“ erreicht werden, welcher die Membran von der Oberfläche abkoppelt.²⁸

Der gewonnene Raum beinhaltet Wasser und ermöglicht den funktionellen Einbau von Transmembranproteinen ohne dass diese durch Oberflächenkontakt denaturieren.^{1,29} Eine schematische Darstellung der festkörper-unterstützten Lipidmembran mit Abstandhalter wird in Abbildung 2.5 gezeigt.

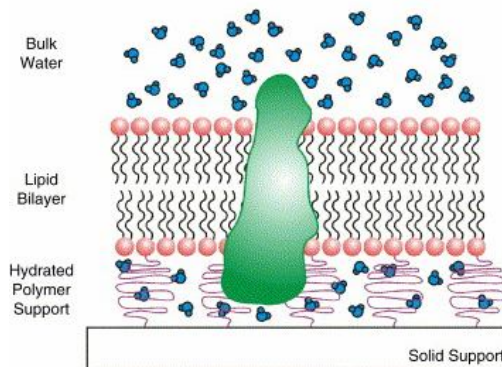


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer tBLM, in welcher die Lipidmoleküle der Doppelschicht an einen „Abstandhalter“ gebunden sind. Proteine (grün) können aufgrund des zusätzlichen Abstandes zu der Oberfläche ohne Denaturierung in die Doppelschicht inkorporieren.²²

Der Abstandhalter bindet beispielsweise über eine Thiol- oder Disulfidgruppe an Gold²⁹⁻³¹ oder durch Silan-Funktionalitäten an Silizium- oder Siliziumdioxidoberflächen.^{31,32} An der gebildeten Monoschicht wird über

Vesikelfusion oder durch das schnelle Austauschen von Lösungsmitteln, dem so genannten „*Rapid Solvent Exchange*“, die Lipid-Doppelschicht aufgebaut.

Der Nachteil dieser Membran besteht in der hohen Anfälligkeit für Defekte in seiner Oberfläche. Trotzdem werden festkörper-unterstützte Lipidmembranen mit Abstandhalter den Anforderungen für Biosensoren im Vergleich zu den anderen Modellmembranen am besten gerecht.³³⁻³⁶

2.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung und Optimierung eines Lipid-Membran-Systems, das als Biosensor-Matrix verwendet werden kann. Im vorherigen Kapitel (2.2.5) wird die festkörper-unterstützte Lipidmembran mit „Abstandhalter“ als ein für die Anwendung in der Biosensorik geeignetes System vorgestellt. Folglich sollte in dieser Arbeit eine Lipidmembran auf das Peptid P19 oder das Alkanthiol 11-Mercaptoundekansäure (MUS), die als Abstandhalter eingesetzt wurden, gebunden werden. Es wurden zwei Systeme untersucht: Zum einen an den „Abstandhalter“ gebundene Vesikel (siehe Abbildung 2.6 a) und zum anderen eine durch „*Rapid Solvent Exchange*“ hergestellte planare Lipid-Doppelschicht (siehe Abbildung 2.6 b).

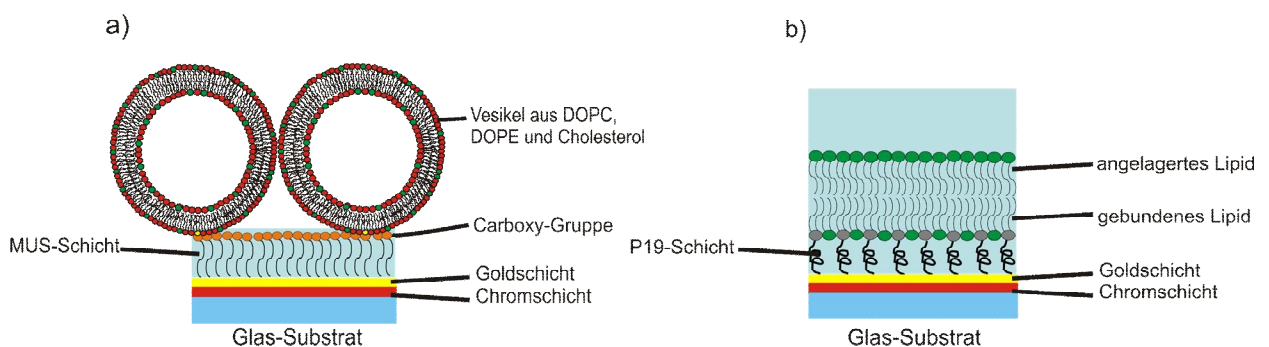


Abbildung 2.6: (a) An MUS gebundene Vesikel; (b) An P19 gebundene Lipid-Doppelschicht.

3. Methoden

In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über die oberflächensensitiven Methoden gegeben, die während dieser Arbeit verwendet wurden.

3.1 Kontaktwinkelmessung

Die Methode der Kontaktwinkelmessung liefert Informationen über die energetischen Wechselwirkungen zwischen einem Festkörper und einer angrenzenden Flüssigkeit. Der Kontaktwinkel wird umso größer, je geringer diese Wechselwirkungen sind. So lassen sich mit Hilfe dieser Methode Rückschlüsse auf die Benetzbarkeit der Substratoberfläche ziehen und somit die Oberflächenpolarität und –morphologie beurteilen.

Bei der Messung bestimmt man im 3-Phasen-Kontaktpunkt den Winkel zwischen einem aufgetragenen Flüssigkeitstropfen (hier entgastet hochreines Wasser) und der Oberfläche (siehe Abbildung 3.1).

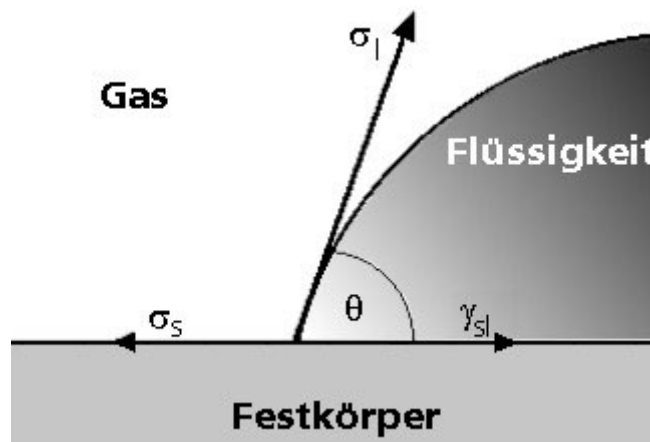


Abbildung 3.1 entnommen aus ³⁷: Kontaktwinkelbildung auf einer Festkörperoberfläche nach Young. Mit σ_s – Oberflächenspannung (fest); σ_l – Oberflächenspannung (flüssig); γ_{sl} – Grenzflächenspannung (fest/flüssig); $\bar{\theta}$ Gleichgewichtskontaktwinkel.

Falls sich diese drei Phasen im thermodynamischen Gleichgewicht befinden, gilt nach Abbildung 3.1:

$$\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l \cos \theta \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Löst man Gleichung 3.1 nach dem Kosinus des Kontaktwinkels auf, so folgt daraus die von Young formulierte Gleichung³⁷:

$$\cos \theta = \frac{\sigma_s - \gamma_{sl}}{\sigma_l} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Der Kosinus des Kontaktwinkels entspricht demnach dem Quotienten der Differenz der Oberflächenspannung des Festkörpers σ_s und der Fest-Flüssig-Grenzflächenspannung γ_{sl} und der Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_l .

Zur Oberflächencharakterisierung mittels Kontaktwinkelmessung gibt es mehrere dynamische und statistische Methoden³⁸. In dieser Arbeit wurde zur Kontaktwinkelmessung die statische Methode des „liegenden Tropfens“ (engl. sessile drop) verwendet, bei welcher der Flüssigkeitstropfen auf die Festkörperoberfläche aufgetragen wird und sein Volumen während der Messung konstant bleiben soll³⁸. Aufgrund der Verdunstung der Flüssigkeit kann sich die Tropfenform verändern. Darum sollte man den Kontaktwinkel unmittelbar nach dem Auftragen des Tropfens bestimmen.

3.2 Quarzmikrowaage mit Dissipationsmessung

Die Quarzmikrowaage (*engl. quartz crystal microbalance – QCM*) ist ein Gerät, mit dem die Masse abgedünnter dünner Filme bestimmt werden kann.

Die zusätzliche Betrachtung der Dissipation zur Resonanzfrequenz eines Quarz-Kristalls ermöglicht die mechanische, viskoelastische Charakterisierung dünner Filme (im nm-Bereich) wie Proteine, Polymere und Zellen auf Oberflächen.³⁹

Das Herzstück einer Quarzmikrowaage ist ein Schwingquarz, der sich zwischen zwei Elektroden (in dieser Arbeit aus Gold) befindet. Der verwendete α -Quarz ist aufgrund eines fehlenden Inversionszentrums (d.h. keine Punktspiegelung am Zentrum möglich) piezoelektrisch. Diese Piezoelektrizität des Kristalls führt dazu, dass der Kristall durch Anlegen eines Wechselstroms in seiner fundamentalen Resonanzfrequenz oszilliert.³⁹

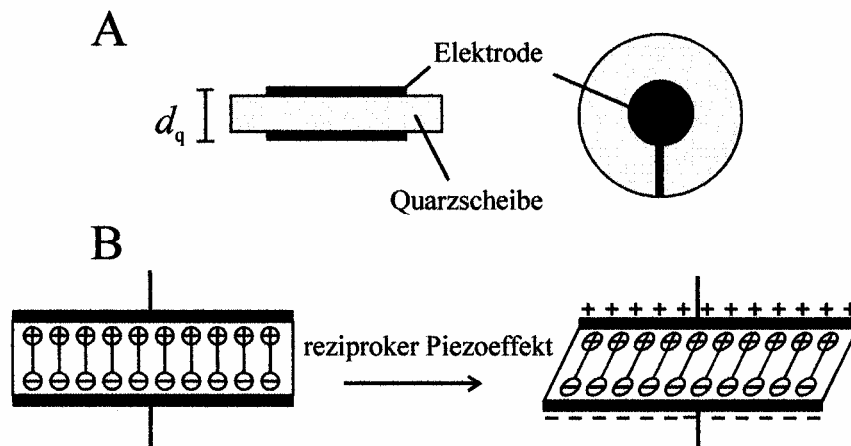


Abbildung 3.2 A : Typischer scheibenförmiger Quarzkristall mit aufgedampften Metallelektroden in Seiten-Ansicht (links) und Aufsicht (rechts); Abbildung 3.2 B: Schematische Darstellung der Scherdeformation eines Quarz-Kristalls.

Abbildung 3.2B zeigt die Scher-Deformation einer Quarzscheibe mit zwei aufgedampften Elektroden bei Applikation eines elektrischen Feldes.

Verschiedene Parameter beeinflussen die Resonanzfrequenz. So hängt die Resonanzfrequenz (f) des Kristalls von der totalen oszillierenden Masse ab. Die Frequenz nimmt ab, wenn Moleküle an den Sensorkristall binden oder adsorbieren⁴⁰ (siehe Abbildung 3.3).

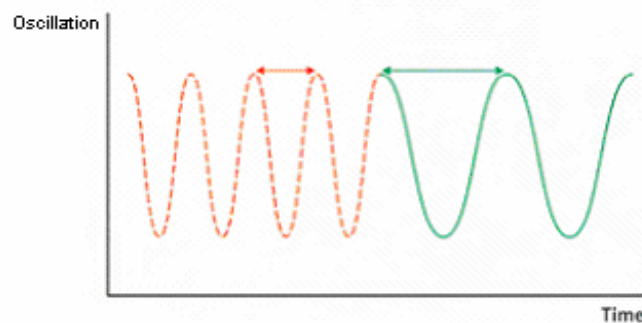


Abbildung 3.3 entnommen aus ⁴⁰: Änderung der Frequenz des oszillierenden Sensorkristalls bei Massenzunahme.

Ist der Film dünn und starr, so ist die Frequenzabnahme proportional zur Filmmasse. Die Masse des gebundenen Films kann dann mittels der Sauerbrey-Gleichung⁴¹ berechnet werden. Die Resonanzfrequenz des Quarzkristall, die Dichte und das Schermodul des Quarzes sowie die Elektrodenfläche sind in der Massenempfindlichkeitskonstanten C enthalten:

$$\Delta m = \frac{C \times \Delta f}{n} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Für einen 5 MHz Quarzkristall der Firma QSense gilt $C = 17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. n entspricht dem verwendeten Oberton und kann 1,3,5 oder 7 sein. Die QCM agiert also als eine sehr sensitive Waage.

Ein weiterer Parameter der die Resonanzfrequenz beeinflusst, ist die Temperatur. Durch eine Temperaturveränderung im System kann es zu einer Frequenzänderung kommen. Um Messfehler zu vermeiden sollte man demzufolge die Temperatur konstant halten.

Es kann geprüft werden, ob die Sauerbrey-Gleichung anwendbar ist oder nicht. Das Messen der Dissipation bei verschiedenen Frequenzen ermöglicht eine Unterscheidung zwischen einem unelastischen und elastischen adsorbierten Film. Ein weicher Film dämpft die Kristalloszillation. Die Dämpfung oder Dissipation (D) der Kristalloszillation sagt etwas über die Weichheit bzw. die Viskoelastizität des Films aus.

D ist definiert als:

$$D = \frac{E_{\text{verloren}}}{2\pi \times E_{\text{gespeichert}}} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Mit E_{verloren} – verlorene Energie nach einem Oszillationszyklus; $E_{\text{gespeichert}}$ – gesamte im Oszillator gespeicherte Energie.

Die Messung des Dissipationsfaktors erfolgt jedes Mal wenn der Generatorantrieb gestoppt wird und die Sensoroszillation anfängt exponentiell abzunehmen (siehe Abbildung 3.4).

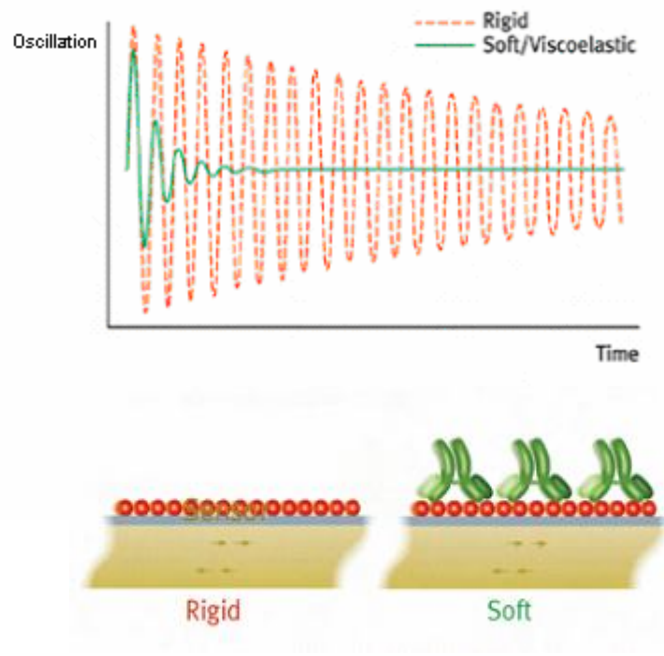


Abbildung 3.4 entnommen aus ⁴⁰: Dissipationsunterschiede zwischen einem weichen (grün) und einem unelastischen (rot) Film.

Ein Film gilt als „zu weich“ für die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung, wenn die Dissipation bei einer Frequenzänderung von 10 Hz um mehr als 1×10^{-6} ansteigt.⁴²

Durch die Messung der Dissipation ist die QCM-D bei Messungen in Flüssigkeit nützlich.

Je nach Typ des Moleküls und der Art, wie es an der Oberfläche adsorbiert, kann der Anteil an Wasser im adsorbierten Film bzw. Molekülen beim Messen in Flüssigkeit zwischen 10 und 95% liegen^{39, 40, 42}.

Das an die Oberfläche gebundene Wasser wird bei allen QCM-Messungen als Massenaufnahme aufgenommen und kann mitschwingen.

Entscheidend für die Menge an gebundenem Wasser ist die Konformation der Moleküle. Gestreckte Moleküle binden dadurch, dass sie flach auf der Oberfläche adsorbieren, wenig Wasser und führen zu einer geringen Dissipation. Aufgerichtete Moleküle hingegen binden viel Wasser und führen zu einer großen Dissipation. Aus diesem Grund würde die Sauerbrey-Gleichung die Masse an der Oberfläche unterbewerten. Durch die Methode der QCM-D ist es also möglich, eine Aussage über die Masse und zugleich die Form der Moleküle oder

des Films zu treffen. Besonders geeignet ist die QCM-D für die Charakterisierung von adsorbierten Vesikeln und Membranen, weil hier eine hohe Dissipationszunahme bei erfolgreicher Adsorption gemessen werden kann⁴³.

3.3 Oberflächenplasmonenspektroskopie

3.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Oberflächenplasmonenspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy* - *SPR*) ist eine optische Methode, um Grenzflächen und dünne Filme zerstörungsfrei zu charakterisieren. Es wird die optische Massenänderung auf einer Oberfläche detektiert, die durch Schichtdicke d und Brechungsindex n beschrieben wird. Mit dieser Methode sind Aufnahmen von Grenzflächen-Bindungs-Prozesse ohne Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff der benutzten Reagenzien möglich.

Die Oberflächenplasmonenspektroskopie basiert auf dem Phänomen der abgeschwächten Totalreflektion (ATR), welches in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt wird.

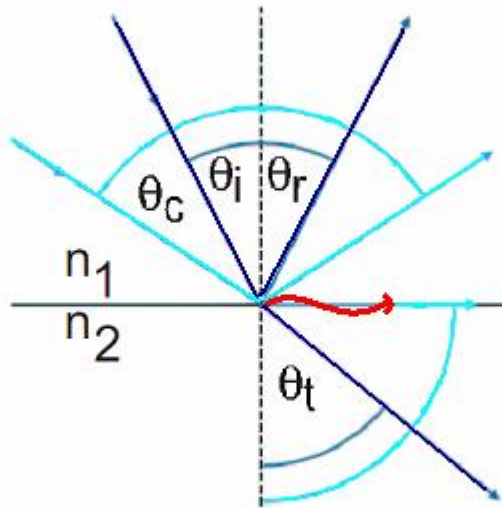


Abbildung 3.5: Reflexion und Brechung an einer Grenzfläche (schwarze Linie) bei Auftreffen eines Lichtstrahls (dunkel-blaue Pfeile) nach Snellius, sowie Totalreflexion und resultierendes Oberflächenplasmon (roter Pfeil) nach Auftreffen eines Lichtstrahls oberhalb des Grenzwinkels für die Totalreflexion (hell-blaue Pfeile). Mit θ_i – Einfallswinkel des einfallenden Lichts; θ_r – Ausfallswinkel des reflektierten Lichts; n_1 – Brechungsindex des optisch dichteren Mediums; n_2 – Brechungsindex des „dünnere“ Mediums; θ_t – Ausfallswinkel des transmittierten Strahls; θ_c – Grenzwinkel der Totalreflexion.

Wenn auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte (z.B. Glas-Luft) Licht (in Abbildung 3.5: dunkel-blaue Pfeile) auftrifft, wird ein Teil dieses Lichtes laut des Reflektionsgesetzes mit $\theta_r = \theta_i$ reflektiert. Der restliche Teil des Lichtes wird nach dem von Snellius aufgestellten Brechungsgesetzes an der Grenzfläche gebrochen.

Die von Snellius aufgestellte Gleichung zum Brechungsgesetz lautet wie folgt:

$$\sin \theta_t = \frac{n_1}{n_2} \times \sin \theta_i \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Nach Gleichung 3.5 ist der Sinus des Ausfallwinkels des transmittierten Strahls θ_t gleich dem Produkt aus dem Quotient der beiden Brechungsindices (n_1 und n_2) und dem Sinus des Einfallwinkels des einfallenden Lichts θ_i .

Oberhalb von θ_c kommt es beim Übergang von einem optisch dichteren zu einem optisch dünneren Medium zu einer vollständigen Reflektion des Lichtstrahls (in Abbildung 3.5: hell-blaue Pfeile). Der Grenzwinkel der Totalreflektion θ_c ergibt sich folglich mit $\theta_t = 90^\circ$.

Ein gewisser Anteil der totalreflektierten Lichtwelle dringt in das optisch dünnere Medium ein und erzeugt dort ein Oberflächenplasmon entlang der Grenzfläche (in Abbildung 3.5: roter Pfeil).⁴⁴

Die Intensität des elektromagnetischen Feldes dieses Oberflächenplasmons, nimmt sowohl in Ausbreitungsrichtung (x-Richtung) als auch senkrecht dazu (z-Richtung) exponentiell ab.

Deswegen bleibt dieses elektromagnetische Feld nur an der Oberfläche lokalisiert und strahlt nicht in das Fernfeld ab.

Diese Oberflächenplasmonen entstehen in Metallen wie Gold durch Anregung des Elektronengases mit parallel zur Einfallrichtung polarisiertem Licht (p-polarisiert). Es gelten Energie- und Impulserhaltung, weshalb für eine Resonanz die eingestrahnten Photonen dieselbe Energie und denselben Impuls wie die Oberflächenplasmonen besitzen müssen.⁴⁴

Ob dieses Kriterium erfüllt ist kann durch Vergleichen der Dispersionsrelationen (Abbildung 3.6) überprüft werden.

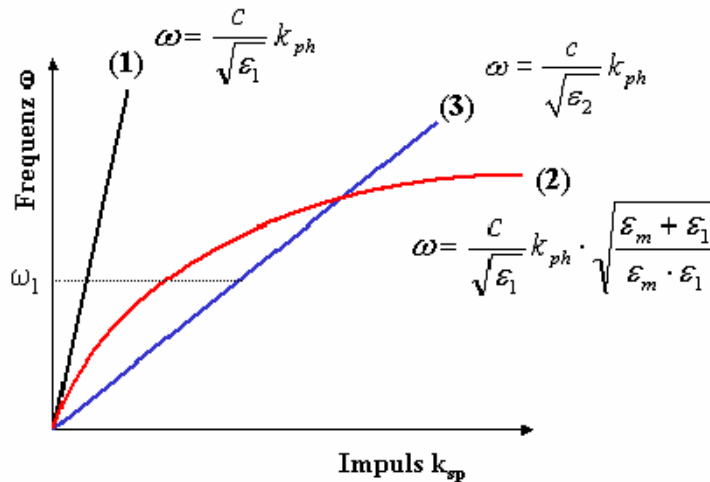


Abbildung 3.6 entnommen aus ⁴⁴: Dispersionsrelation eines sich in Luft (1) fortbewegendes Photons, eines sich in einem Prisma (3) fortbewegenden Photons sowie eines sich entlang der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche fortbewegenden Oberflächenplasmons (2) mit den zugehörigen Ausbreitungsgeschwindigkeiten im jeweiligen Medium. Mit ω_1 – Energie bzw. Frequenz des Anregungslichts; c – Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, ϵ_1 – Dielektrizitätskonstante in Luft; ϵ_2 – Dielektrizitätskonstante im Prisma; ϵ_m – Dielektrizitätskonstante des Metalls; $\overline{K_{ph}}$ - Impulsrelation eines auf eine Metall/Dielektrikumsgrenzfläche unter dem Winkel θ eintreffenden Photons.

Um eine resonante Anregung eines Oberflächenplasmons zu ermöglichen, muss es zu einer Überschneidung zweier Dispersionsrelationen kommen. In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass das Einfügen eines höherbrechenden Mediums (z.B. eines Prismas) eine Überlappung der jeweiligen Dispersionsrelationen zur Folge hat. Die Funktion des höherbrechenden Mediums ist, den Impuls des eintreffenden Photons an den Impuls des Oberflächenplasmons anzugleichen (siehe Abbildung 3.7b), um die Überschneidung der Dispersionsrelationen (Abbildung 3.6) zu realisieren. Dies ist notwendig, da der Impuls eines freien Photons in Luft betragsmäßig nicht für die Anregung eines entsprechenden Plasmons ausreicht (siehe Abbildung 3.7a).⁴⁴

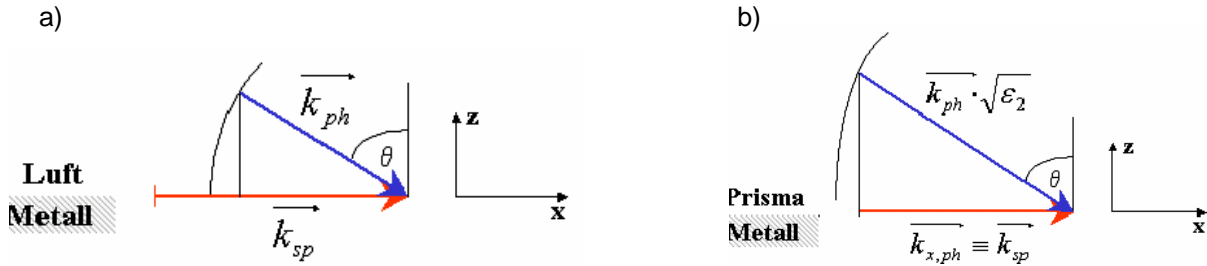


Abbildung 3.7 entnommen aus ⁴⁴:

(a) Impulsrelation eines auf eine Metall/Dielektrikumsgrenzfläche unter dem Winkel θ eintreffenden Photons \vec{k}_{ph} und eines sich in x-Richtung ausbreitenden Oberflächenplasmons \vec{k}_{sp} . (b) Impulsrelation nach Verwendung eines Prismas am Resonanzwinkel θ_0 ; mit ϵ_2 – Dielektrizitätskonstante im Prisma.

3.3.2 Messprinzip

In dieser Arbeit wurde zum Impulsangleich und der daraus folgenden Plasmonenanregung die Kretschmann-Konfiguration⁴⁵ verwendet, wie sie in Abbildung 3.8 dargestellt ist.

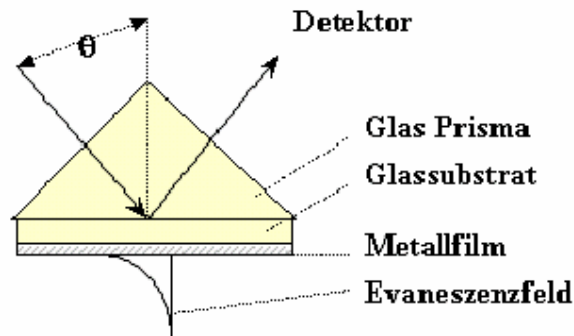


Abbildung 3.8: Schematischen Aufbau der Kretschmann-Konfiguration: Ein Lichtstrahl, der oberhalb des Grenzwinkels für Totalreflektion auftritt, dringt durch das Prisma, trifft auf das Glassubstrat, wird dort reflektiert und regt gleichzeitig ein Oberflächenplasma an. Die Intensität des Oberflächenplasmons nimmt in x- und z-Richtung exponentiell ab. ⁴⁵

Bei dieser Konfiguration trifft der Lichtstrahl des Anregungslaser (He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm) auf ein Glasprisma (LaSFN9), an dessen Unterseite sich ein Glassubstrat aus BK7 befindet. In der Arbeit wurden BK7-Glassubstrate verwendet, da diese kostengünstiger sind und die Unterschiede der Brechungsindices bei Relativmessungen keine Rolle spielen. Auf der Unterseite des Glassubstrats befindet sich ein dünner Metallfilm von ca. 50 nm, an dem ein Oberflächenplasmon erzeugt werden kann.

Der Aufbau der verwendeten Messapparatur ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

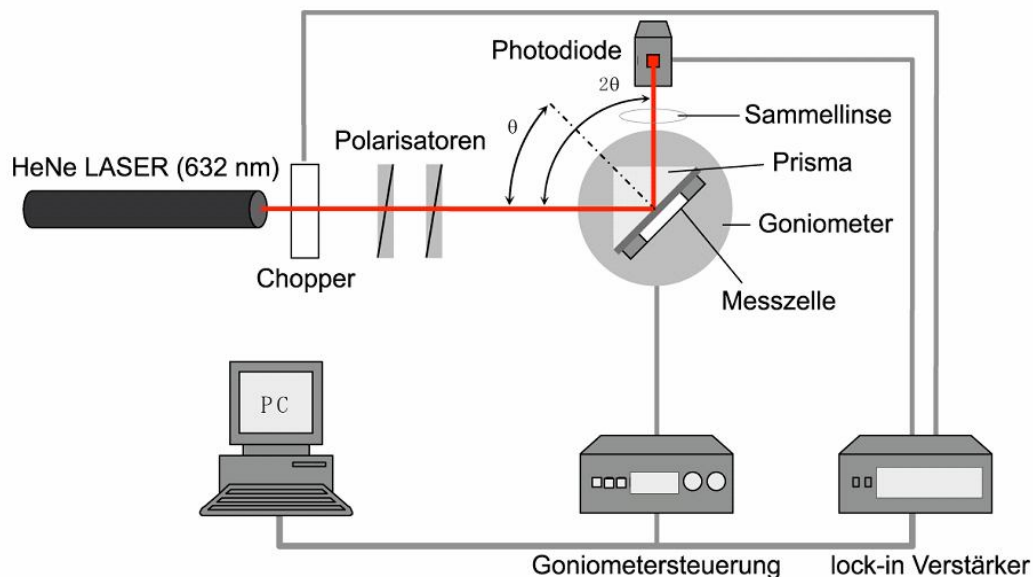


Abbildung 3.9 zeigt den Aufbau eines SPR-Spektrometers bestehend aus einem HeNe-Laser, einem Chopper, zwei Polarisatoren, einer Messzelle, einem Goniometer mit Steuerung, einem Prisma, einer Photodiode mit Lock-in Verstärker sowie einem Computer. Dabei beträgt $\theta = 45^\circ$.

Ein Helium-Neon-Laser ($\lambda = 632 \text{ nm}$) wurde durch einen Chopper, zwei Polarisatoren und eine Blende (in Abbildung 3.9 nicht dargestellt) auf die Probe fokussiert. Der Chopper teilt den Anregungsstrahl in zeitgleiche Licht- und Dunkelphasen, um so eine kohärente Auslesung des Detektorsignals durch den Lock-in-Verstärker zu ermöglichen. Die beiden Polarisatoren stellen p-polarisiertes Licht, sowie dessen Intensität, ein. Das präparierte Substrat

(siehe Kapitel 4.2.2) wurde mit dem Prisma in einer Halterung auf einem Goniometer befestigt.

Der schematische Aufbau des Probenhalters mit eingebauter Flüssigkeitszelle wird in Abbildung 3.10 gezeigt. Um den „brechungsfreien“ Durchgang des Strahls zur Probe sicher zu stellen wurde ein Immersionsöl verwendet, welches den gleichen Brechungsindex wie das Glassubstrat besaß ($n = 1,5$). Es wurde eine geringe Menge Öl auf die nicht bedampfte Substratseite getropft, das Prisma auf den „Ölfilm“ gesetzt, ohne dass sich Blasen bildeten, und die gesamte Konstruktion mit einer Drehschraube festgestellt.

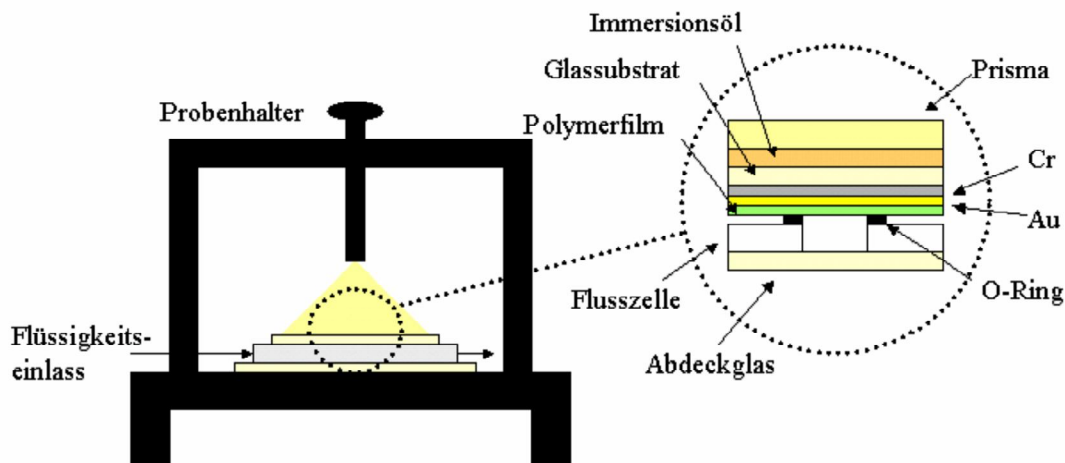


Abbildung 3.10 entnommen aus ⁵⁴: schematischer Aufbau der Probenhalterung für ein SPR-Experiment

Der, an der Glas/Gold-Grenzfläche reflektierte Strahl, wird mittels eines Photomultipliers detektiert. In dieser Arbeit wurden winkelabhängige Messungen (Abbildung 3.11) und zeitabhängige Messungen bei einem festen Winkel Θ_K im linearen Bereich des Oberflächenplasmons (Abbildung 3.12, fester Winkel = Θ_K in Abbildung 3.11) aufgenommen. Dabei ist zu beachten, dass der Winkel so gewählt wird, dass der gesamte zeitliche Messverlauf im linearen Bereich des Oberflächenplasmons liegt.

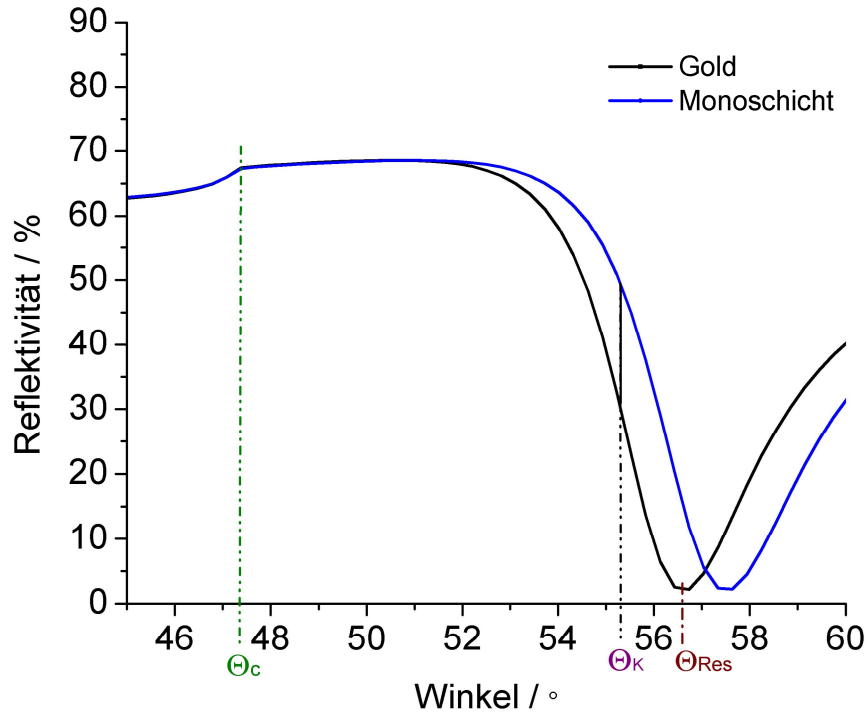


Abbildung 3.11: Auf Basis der Fresnel-Gleichungen simulierte Reflektivitätskurven für die Anlagerung einer Monoschicht an Gold.

Die Kurven besitzen alle den typischen Verlauf: Bei Annäherung an den Grenzwinkel der Totalreflektion Θ_c steigt die Reflektivität an, erreicht ihr Maximum bei Θ_c und sinkt dann bei Anregung eines Oberflächenplasmons am Resonanzwinkel auf ein Minimum bei ca. $56,7^\circ$ (Gold) bzw. $57,5^\circ$ (Monoschicht). Wie in der Abbildung 3.11 zu erkennen ist, verschiebt sich der Resonanzwinkel Θ_{Res} durch die Massenzunahme zu höheren Werten, wenn ein zusätzlicher Film auf die Oberfläche abgeschieden wird. Diese Winkelverschiebung erfolgt aufgrund der Änderung der Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons an der Grenzschicht und ist sowohl von der Filmdicke als auch vom optischen Kontrast des Umgebungsmediums abhängig.⁴⁵

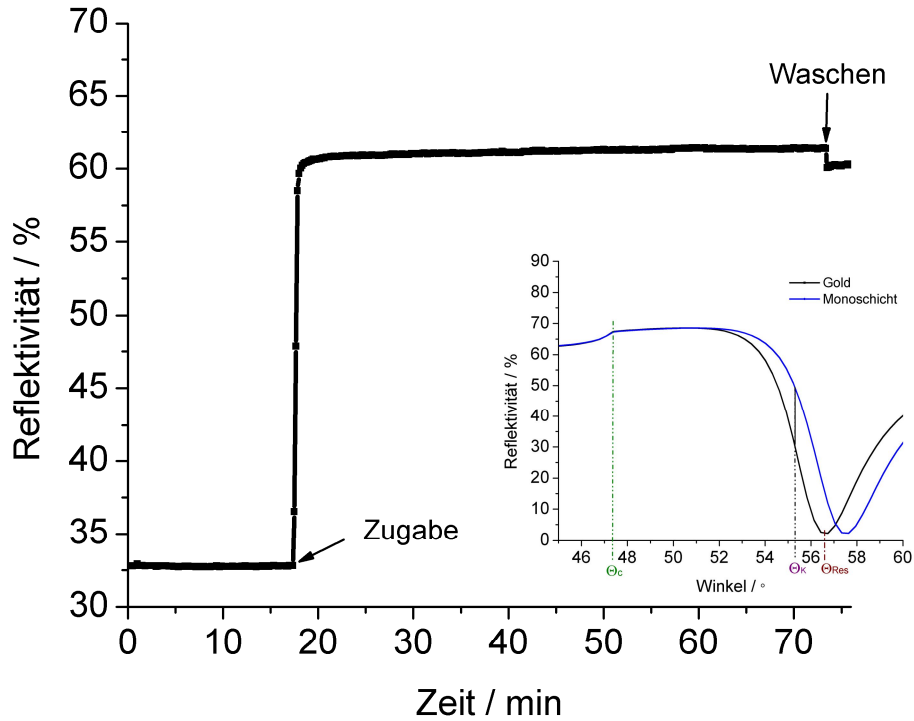


Abbildung 3.12: Zeitabhängige Reflektivitätskurve bei konstantem Winkel von $55,2^\circ$ für eine Vesikelfusion und die resultierende Kinetik-Messung.

3.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*engl. Atomic Force Microscopy - AFM*) wurde 1986 von Gerd Binnig, Calvin Quate sowie Christoph Gerber entwickelt und ermöglicht eine mechanische Abtastung von Oberflächen im Bereich von Nanometern.^{46, 47}

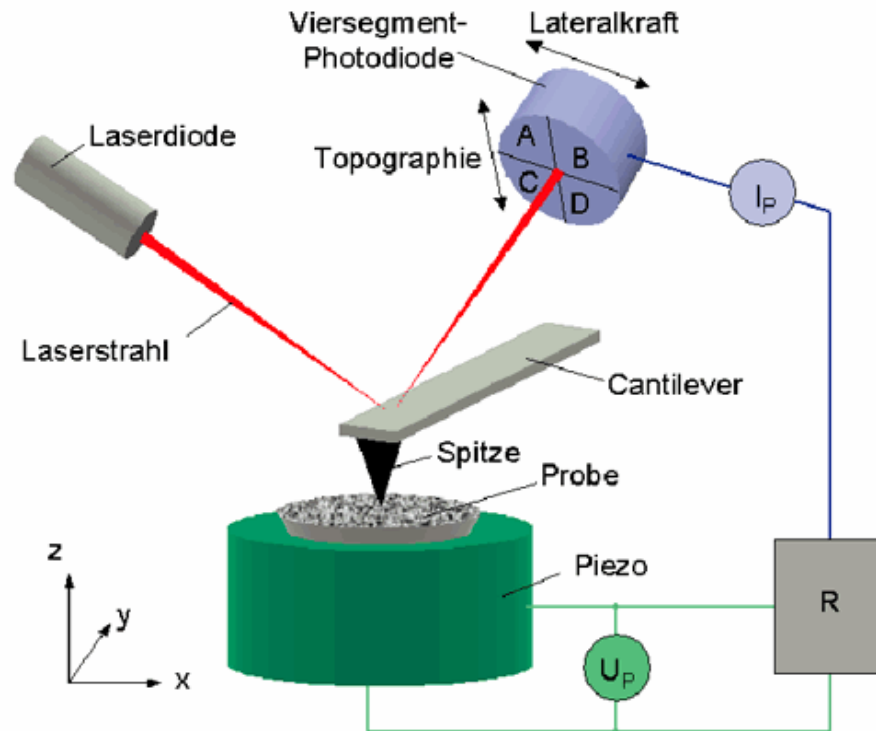


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskop-Aufbaus.

Dabei wird eine Messspitze, die sich auf einem elastisch biegsamen Federbalken (engl. *Cantilever*) befindet, als Messsonde über die Probenoberfläche geführt. Dieser Federbalken besteht aus Silizium oder Siliziumnitrid, besitzt typischerweise eine Federkonstante zwischen 0,001 N/m und 50 N/m und sein Spitzenradius variiert zwischen 2 nm und 100 nm. Das Substrat ist auf einem piezoelektrischen Stellglied montiert (x-y-z- Piezo), mit dessen Hilfe sich die Tastnadel über die Probe heben und senken, aber auch lateral über die Oberfläche rastern lassen kann. Die Deformation des Cantilevers wird durch Wechselwirkungen zwischen der Probe und der Spitze hervorgerufen und gemessen, indem ein Laserstrahl auf die Spitze gerichtet wird. Die Verschiebung des reflektierten Strahls wird schließlich mittels eines Photodetektors detektiert. Die Auslenkungen des Cantilevers geben Aufschluss über die Wechselwirkungen mit der Substratoberfläche.

Bei der Rasterkraftmikroskopie gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Betriebsmodi, die je nach vorliegender Probe angewendet werden können.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich im Tapping-Modus gemessen.

Tapping-Modus

Beim Tapping-Modus wird der Cantilever zu einer hochfrequenten Schwingung (Nahe der Resonanzfrequenz des Cantilevers) angeregt und „tippt“ lateral über die Probe. Wechselwirkungskräfte zwischen der Spitze des Cantilevers und der Probenoberfläche führen zu einer Veränderung der Resonanzfrequenz des Systems⁴⁹ (siehe Abbildung 3.14). Es ändert sich die Schwingungsamplitude und die Phase zwischen Anregung und Schwingung.

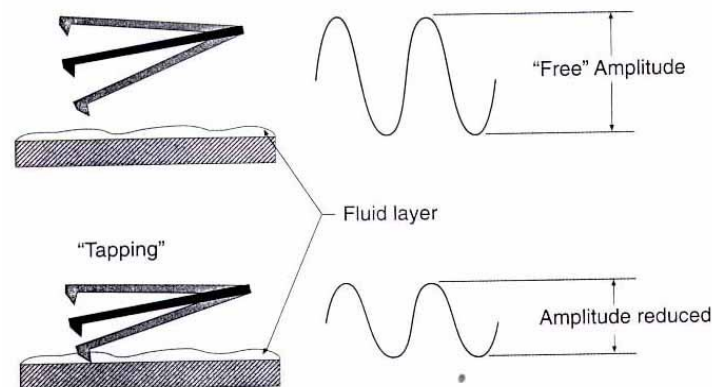


Abbildung 3.14 entnommen aus⁴⁹: Schwingungsamplitudenänderung beim Tapping-Modus

Dieser Modus vermindert wegen des minimalen Kontaktes zwischen Spitze und Probe die Gefahr einer Manipulation der Probe. Der Tapping-Modus ist also speziell für Proben mit weichen Oberflächen gut geeignet. Der Nachteil gegenüber dem Kontakt-Modus ist aber die schlechtere Auflösung (schnelles Rastern) bzw. der erhöhte Zeitaufwand (langsames Rastern).

Kraft-Abstands-Kurven

Neben der topographischen Analyse von Oberflächen mittels Tapping mode wurden auch Kraft-Abstands-Kurven gemessen.

Dabei wird der Cantilever mit einer definierten Geschwindigkeit an die Probe angenähert und wieder zurückgezogen, wobei er das gesamte Wechselwirkungspotenzial durchläuft (siehe Abbildung 3.15).

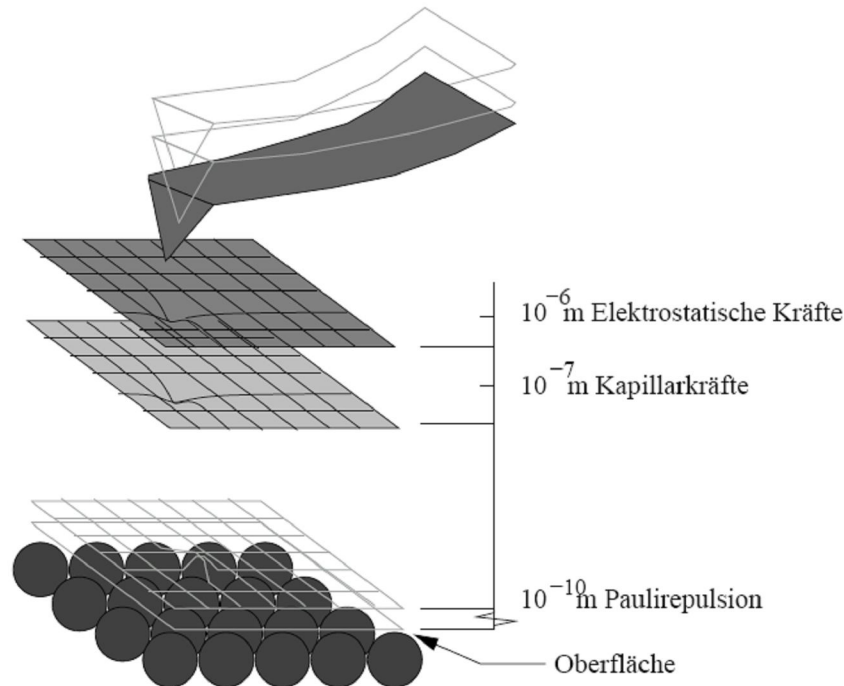


Abbildung 3.15 entnommen aus ⁵⁰: Verschiedene Wechselwirkungen, die beim Annähern der Spitze an die Probe auftreten.

Es besteht eine Abhängigkeit der auftretenden Wechselwirkungen zu der verwendeten Spitze, der Probe sowie dem Messmedium. So dominieren Kapillarkräfte, welche durch Kondensation hervorgerufen werden, gegenüber den Van der Waals-Kräften, wenn sich die Probe an der Luft befindet. Während Kraftkurven von Van-der-Waals Wechselwirkungen dominiert werden, falls sich die Probe in Flüssigkeit befindet⁴⁶. Eine Änderung der Wechselwirkung führt auch zu einer Änderung der Auslenkung des Cantilevers, da Wechselwirkungskraft und Rückstellkraft im statischen Gleichgewicht gleich sind.

Die Kraftinformation steckt in der gemessenen Auslenkung z_F des Cantilevers, da durch das Hook'sche Gesetz

$$F = -k \cdot x_{ZF}$$

Gleichung 3.6

diese über die Federkonstante des Cantilevers k direkt mit der einwirkenden Kraft F verknüpft ist.

Sind die Steigung der Kraftkurve und die Proportionalitätskonstante der Photodiode bekannt, kann mit Hilfe des Hookschen Gesetzes und der Federkonstante des Cantilevers aus dessen Verbiegung eine Kraft errechnet werden und diese als Funktion des Abstandes zwischen Spitze und Probe in einer Kraft-Abstands-Kurve dargestellt werden⁵¹.

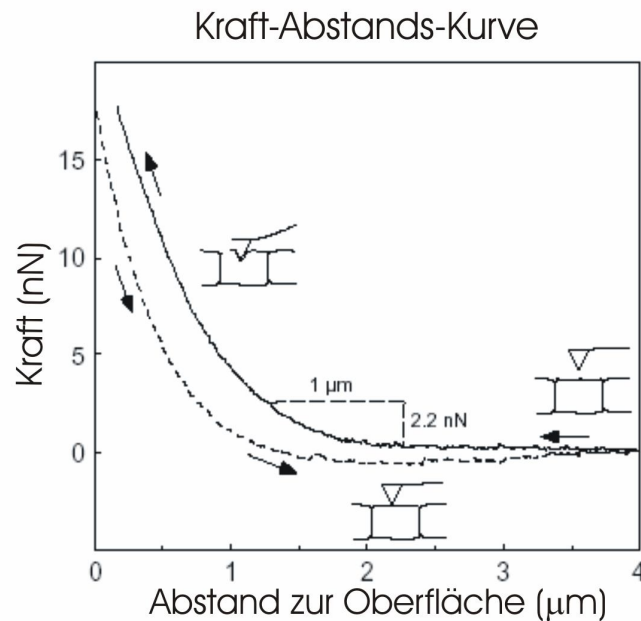


Abbildung 3.16: Beispiel einer Kraft-Abstands-Kurve

Während der Messung kann es durch akustischen Schall, Gebäudeschwingungen, stark reflektierende Proben und thermische Ausdehnung der Probe zu Messfehler kommen.⁵²

Außerdem ist ein grundlegendes Problem bei allen Abbildungen mit einer endlich großen Mess-Spitze, dass die Messdaten eine Faltung der Geometrie der Spitze mit der Struktur der Oberfläche darstellen und nicht die tatsächliche Probenoberfläche.

3.5 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie

Die elektrochemische Impedanz-Spektroskopie (engl. *Electrochemical Impedance Spectroscopy* – EIS) dient als eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung elektrischer Eigenschaften biologischer Systeme in ihrer quasi-natürlichen Umgebung (z.B. Pufferlösungen).

Unter der Impedanz wird der komplexe Widerstand eines Stromkreises verstanden, welcher sich aus Widerständen, Kondensatoren und Induktoren zusammensetzt. Dieser Widerstand wird durch Anlegen einer Wechselspannung mit geringer Amplitude und der Messung der darauf folgenden Strom-Antwort ermittelt. Für den Fall einer kleinen Amplitude gilt:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = |Z(\omega)| e^{i\varphi(\omega)} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Gleichung 3.7 enthält mit $Z(\omega)$ die komplexe elektrische Impedanz, $U(\omega)$ die angelegte Spannung als Funktion der Frequenz, $I(\omega)$ den gemessenen Strom als Funktion der Frequenz, ω die Kreisfrequenz, U_0 die Spannungsamplitude, I_0 die Stromamplitude, i die komplexe Einheit, $\varphi(\omega)$ die Phasenverschiebung als Funktion der Frequenz und $|Z(\omega)|$ den Betrag der Impedanz.

Die elektrische Impedanz entspricht dem Quotient aus angelegter Spannung und gemessener Stromstärke.

Wie jede komplexe Zahl lässt sich die Impedanz auch in der kartesischen Form ausdrücken:

$$Z(\omega) = Z' + iZ'' \quad \text{Gleichung 3.8}$$

mit

$$Z' = |Z(\omega)| \cos \varphi(\omega) \quad Z'' = |Z(\omega)| \sin \varphi(\omega)$$

$$|Z(\omega)| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad \varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right)$$

In einem Wechselstromkreis sind die Angaben der Beträge von Strom und Spannung nicht ausreichend, da es sich um zeitlich veränderte Größen handelt. Es ist daher wichtig ihre Phasenverschiebung zueinander anzugeben.

Für Ohmsche Widerstände ist die Phasenverschiebung zur angelegten Spannung null, für Kondensatoren beträgt sie 90° .

In Abbildung 3.17 ist das Verhalten von Widerständen und Kondensatoren im Wechselstromkreis graphisch dargestellt.

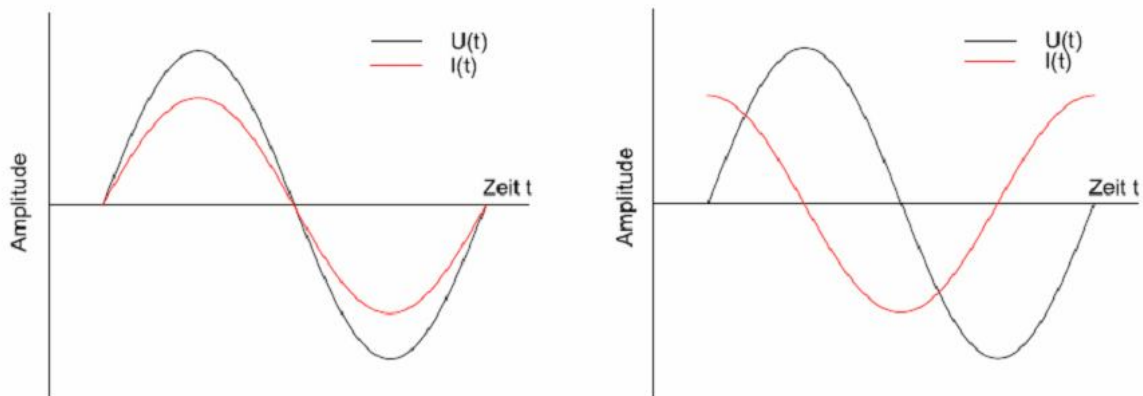


Abbildung 3.17: Strom-Spannungsverhalten für einen idealen Widerstand (links) und einen idealen Kondensator (rechts) mit der erkennbaren Phasenverschiebung von Strom zu Spannung beim idealen Kondensator (rechts).

Um die Impedanz-Daten interpretieren zu können wird das zu vermessende System mit einem theoretisch modellierten, physikalisch sinnvollen Äquivalenz-Schaltkreis verglichen. Dieser besteht aus einer Kombination von Widerständen und Kondensatoren und sollte das System so einfach wie möglich repräsentieren.

Das entwickelte Model für eine Lipid-Doppelschicht Membran auf einer Goldelektrode in Elektrolytlösung besteht aus einem Widerstand, der für die Elektrolytlösung steht $R_{\text{Elektrolyt}}$, seriell dazu einem RC-Element (R und C parallel), dass die Mono- bzw. Doppelschicht repräsentiert und einem in Reihe

geschaltetem Kondensator, der die Effekte der Substratoberfläche C_{OE} (OE steht in diesem Fall für Oberfläche) imitiert.

Ein Äquivalenzschaltkreis zur Simulation einer Modellmembran wird in Abbildung 3.18 dargestellt.

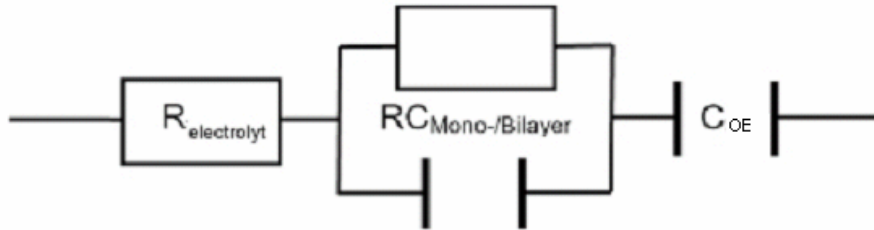


Abbildung 3.18: Beispiel eines Äquivalenzschaltkreises zur Simulation einer Modellmembran mit Widerstand $R_{\text{Elektrolyt}}$, dem RC-Element und dem Kondensator C_{OE} .

Bei Unregelmäßigkeiten in der Doppelschicht ist der Austausch des idealen Kondensators im RC-Element durch ein so genanntes „*constant phase element*“ (CPE) möglich. Die Phasenverschiebung des CPE beträgt nicht genau -90° sondern $-(90n)^\circ$ ($n =$ positive Zahl zwischen 0 und 1), daher wird er auch nicht-idealer Kondensator genannt.

Die erhaltenen Daten können beispielsweise im Bode-Plot oder im Admittanz-Plot dargestellt werden. Im Bode-Plot trägt wird der Logarithmus von $|Z|$ sowie die Phasenverschiebung φ gegen den Logarithmus der Messfrequenz aufgetragen. Wenn die Steigung des Betrages der Impedanz gleich null beträgt, kann an der y-Achse der Widerstand abgelesen werden.

In Abbildung 3.19 wird ein Beispiel für einen Bode-Plot einer Lipid-Doppelschicht gezeigt:

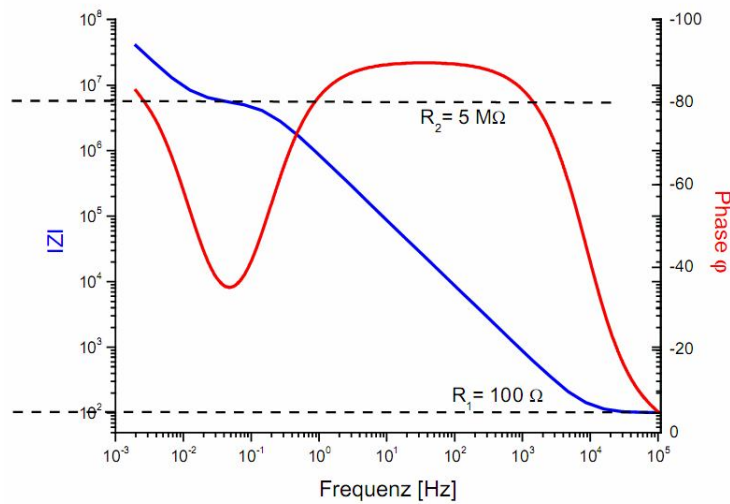


Abbildung 3.19: Simuliertes Impedanzspektrum im Bode-Plot

Es ist zu erkennen, dass in diesem Model der erste Widerstand, welcher für den Widerstand der Elektrolytlösung steht, im Frequenzbereich von 10^4 bis 10^5 Hz liegt und einen Wert von 100Ω hat. Der zweite Widerstand, welcher den Widerstand des RC-Elements symbolisiert erscheint bei $0,05$ Hz und hat einen Wert von $5 \text{ M}\Omega$.

Die quantitative Bestimmung der Kapazitäten kann im Admittanz-Plot erfolgen. Die Admittanz entspricht, wie in Gleichung 3.9 beschrieben, der inversen Impedanz.

$$Y(\omega) = \frac{1}{Z(\omega)} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

In Abbildung 3.20 wird ein Beispiel für ein Admittanz-Plot einer Lipid-Doppelschicht gezeigt

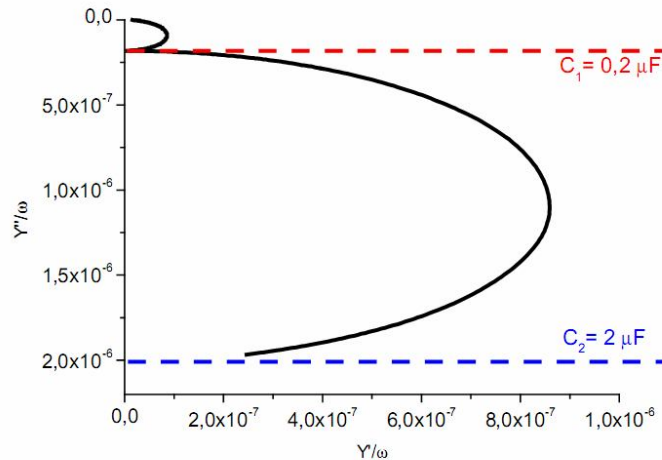


Abbildung 3.20: Simuliertes Impedanzspektrum im Admittanz-Plot

An der extrapolierten Schnittstelle des ersten Halbkreises des Graphen mit der y-Achse lässt sich der Wert für den ersten Kondensator ablesen, welcher in diesem Fall $0,2 \mu\text{F}$ beträgt und das RC-Element repräsentiert.

Den Wert für den zweiten Kondensator erhält man durch Extrapolation des zweiten Halbkreises. Er beträgt in diesem Fall $2 \mu\text{F}$ und stellt den Kondensator für die Oberflächeneffekte dar.

Wenn aus einer Monolage ein Bilayer aufgebaut wird verändern sich die Werte des RC-Elements, während sie für den Kondensator für Oberflächeneffekte und den Widerstand der Elektrolytlösung konstant bleiben.

Zur Veranschaulichung der Veränderungen wird in Abbildung 3.19 der Bode- und Admittanz-Plot eines Mono- und eines Bilayers dargestellt:

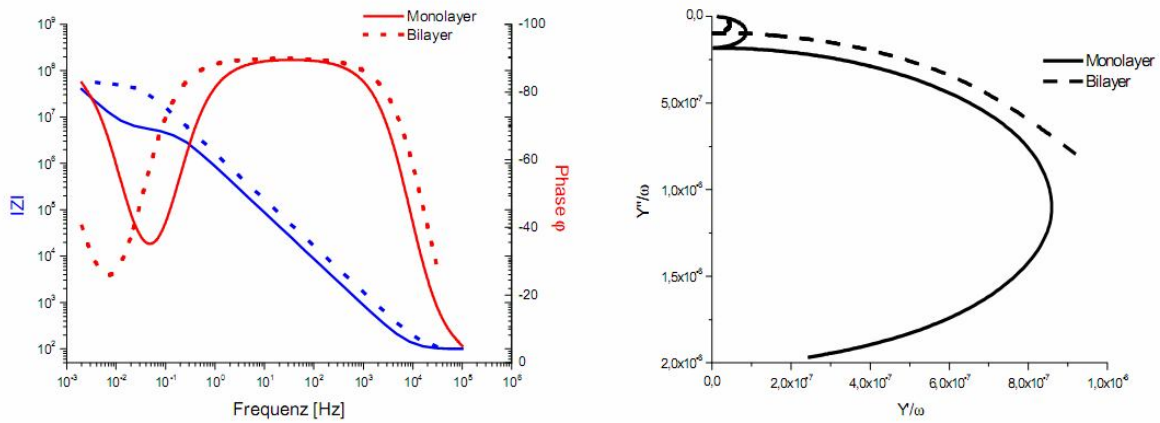


Abbildung 3.21: Änderung der Impedanzspektren in Bode- und Admittanz-Plot bei Aufbringen einer weiteren Lipid-Schicht auf eine Monoschicht.

Der Widerstand des RC-Elements vergrößert sich aufgrund der geringeren Durchlässigkeit der Doppelschicht gegenüber Ionen im Vergleich zur Monoschicht.

Gleichzeitig sinkt die Kapazität, da sie ein Maß für den inversen Abstand des Elektrolyten von der Elektrodenoberfläche ist.

4. Experimentaltteil

4.1 Chemikalienverzeichnis

In dieser Arbeit wurden folgende Chemikalien benutzt:

- Hochreines Wasser (R=18.2 MΩ; MilliQ)
- PBS (Dulbecco's phosphat buffered saline; Sigma Aldrich Kat. # D8537)
- Ethanol absolut (Sigma Aldrich Kat. # 34852)
- Chloroform (Acros organics, Fisher scientific GmbH, Kat. # 167735000)
- Hellmanex II (Hellma GmbH & Co. KG, Kat. # 320.001)
- MUS (11-Mercaptoundekansäure; Sigma Aldrich Kat. # 450561)
- MHS (16-Mercaptohexadekansäure; Sigma Aldrich Kat # 448303-1G)
- P19 (Laminin-Peptide P19, Cys-Laminin A Kette 2091-2108; Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Ala-Asp-Arg; Sigma Aldrich Kat. # C6171-.5mg)
- P19 modifiziert (Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Gln-Asp-Asp, hergestellt von coring systems)
- EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid; Fluka Kat. # 03451)
- NHS (N-Hydroxysuccinimid; Pierce; Kat. # 24500)
- S-NHS (Sulfo-N-Hydroxysuccinimid; Pierce; Kat. # 24510)
- TFP-S (Tetrafluorphenol-sulfonat; von Robert Rosskamp nach ⁵³)
- PFP (Pentafluorphenol 100%; Alfa Aesar Kat. # A15574)
- DMPE (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin; Alexis biochemicals Kat. # ALX-300-037-M050)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich Kat. # T-9284)

- DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin; Sigma Aldrich Kat. # P-0510)
- DOctPE (1,2-Dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin; Avanti Polar Lipids Kat. # 850699P)
- DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin; Avanti Polar Lipids Kat. # 850375P)
- Cholesterin (Sigma Aldrich Kat. # C-0510)

4.2 Substratpräparation

4.2.1 Präparation der Goldsubstrate:

Als Goldsubstrate wurden BK7-Gläser mit einem aufgedampften dünnen Gold-Film verwendet. Vor dem Bedampfen der Gläser wurden diese wie folgt gereinigt:

1. Die Glas-Substrate wurden vollständig mit einer 2%igen Hellmanex II – Lösung (MilliQ) bedeckt und für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt.
2. Danach wurden die Substrate ausgiebig mit hochreinem Wasser gewaschen und für weitere 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt.
3. Nachdem erneuten ausgiebigen Waschen mit hochreinem Wasser und reinem Ethanol wurden die Glassubstrate unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Anschließend wurde zunächst eine 2nm dicke Chromschicht zur besseren Haftung der Goldschicht und danach eine 50nm-dicke Goldschicht aufgedampft (Edwards FL 400). Die Aufdampftrate betrug 0,6-1,0 Å/s.

4.2.2 Oberflächenpräparation:

Die Anbindung einer Peptidmonolage (bzw. von 11-Mercaptoundekansäure=MUS) wurde durch Selbstanordnung von Thiolen aus wässriger (bzw. ethanolischer) Lösung erreicht. Auf die frisch bedampfte Goldsubstrate wurden 500 µl der frisch angesetzten P19- bzw. mod. P19-Lösung (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml oder 0,5 mg/ml gelöst in hochreinem Wasser) aufgetragen und sie in einer mit Wasser befeuchteten, verschlossenen Petrischale für ca. 16 Stunden aufbewahrt.

Bei der Funktionalisierung mit MUS wurden Goldsubstrate für ca. 16 Stunden in der MUS-Lösung (2 mg/ml gelöst in abs. Ethanol) eingelegt.

Zur Aktivierung der Carboxy-Funktionen des P19 wurden diese in einen Aktivester umgewandelt. Hierzu wurden folgende Methoden verwendet.

Reaktion im wässrigen Lösungsmittel:

- a) 2,3 mg (0,02 mmol) NHS wurden in 200 µl hochreinem Wasser gelöst (0,1 mol/L), zu einer EDC-Lösung (12,4 mg (0,08 mmol) in 200 µl hochreinem Wasser; 0,4 Mol/L) gegeben und im Vortexrührer durchmischt.
- b) 4,3 mg (0,02 mmol) S-NHS wurden in 200 µl hochreinem Wasser gelöst (0,1 mol/L) und wie in a) mit 400 µL der EDC-Lösung (0,4 mol/L) vermischt
- c) 4,25 mg (0,02 mmol) TFP-S wurden in 200 µl hochreinem Wasser gelöst (0,1 mol/L) und wie in a) mit der EDC-Lösung (0,4 mol/L) vermischt und kräftig geschüttelt.
- d) 2,5 µl PFP (0,02 mmol) wurden zu 400 µl einer EDC-Lösung (0,2 mol/L) gegeben (d.h. das Verhältnis von PFP (0,06 mol/L) zu EDC (0,2 mol/L) ist 1: 3,33) und kräftig geschüttelt. Da PFP bei Raumtemperatur als Feststoff vorliegt wurde es im Wasserbad auf 100°C erwärmt, um es zu verflüssigen und so besser abmessen zu können.

Das fertige Reaktionsgemisch wurde direkt für 15 Minuten auf das Substrat gegeben und dieses danach mit reichlich hochreinem Wasser gewaschen.

Reaktion im organischen Lösungsmittel:

- a) 10 mg NHS (0,09 mmol) wurden in 200 μ l Chloroform gelöst (0,43 mol/L), zu 200 μ l EDC-Lösung (0,48 mol/L in Chloroform) gegeben.
- b) 15 mg S-NHS (0,07 mmol) wurden in 200 μ l Chloroform gelöst (0,35 mol/L) und wie in a) mit 200 μ l der EDC-Lösung (0,48 mol/L in Chloroform) vermischt.
- c) 10 μ l PFP (0,1 mmol) wurden zu 400 μ l einer EDC-Lösung (0,2 mol/L) gegeben (d.h. das Verhältnis von PFP (0,24 mol/L) zu EDC (0,2 mol/L) ist 1,2: 1) und gut durchmischt. Das PFP musste wie bei der Reaktion im wässrigen Milieu vor der Zugabe zur Verflüssigung erwärmt werden.

Das fertige Reaktionsgemisch wurde auf das Substrat gegeben und dieses nach 45 Minuten Reaktionszeit mit reichlich reinem Ethanol gewaschen. Die Substrate wurden während der Reaktion in einer gut verschlossenen Petrischale aufbewahrt, um das Verdampfen von Chloroform zu minimieren.

Nach der Aktivierung der Carboxy-Gruppe des P19 wurden Lipide bzw. Vesikel über ihre Amino-Gruppen an die COOH-Gruppe des P19 gebunden. Diese Kupplungen wurden wie folgt durchgeführt:

Reaktion im wässrigen Lösungsmittel:

- a) Auf das Substrat wurden 500 μ l einer wässrigen DMPE-Suspension (0,2 mg/ml, DMPE, 0,1 % Triton X-100) gegeben und dieses nach 1,5 Stunden Reaktionszeit kräftig mit hochreinem Wasser gewaschen.

- b) Auf das Substrat wurden 500 μl einer DOctPE-Suspension (1 mg/ml, in hochreinem Wasser) gegeben und dieses nach 1,5 Stunden Reaktionszeit kräftig mit hochreinem Wasser gespült.
- c) Zur Kupplung von Vesikeln wurde die hergestellte Vesikel-Suspension (Vesikel aus DOPC, DOPE und Cholesterin im Mischungsverhältnis von 45:25:30 und aufgenommen mit PBS oder hochreinem Wasser) verwendet. Die Vesikel-Suspension wurde vor jeder Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt (Lagerung bei -20°C) und ca. 30mal durch eine 50 nm Polycarbonat-Membran extrudiert. Die Vesikel-Suspension wurde hergestellt von Frau Dr. Sandra Ritz.

Reaktion im organischen Lösungsmittel:

- a) Auf das Substrat wurden 500 μl einer DMPE-Suspension (1 mg/ml, in Chloroform) gegeben und dieses nach ca. 70 Minuten Reaktionszeit kräftig mit abs. Ethanol gewaschen.
- b) Auf das Substrat wurden 500 μl einer DOctPE-Lösung (1 mg/ml, in Chloroform) gegeben und dieses nach ca. 70 Minuten Reaktionszeit kräftig mit abs. Ethanol gewaschen.

Bei den Kupplungen im organischen Medium musste, wie bei der Aktivierung der Oberfläche, das Substrat in einer gut verschlossenen Petrischale aufbewahrt werden, um das Verdampfen von Chloroform zu verringern.

4.2.3 Rapid Solvent Exchange:

Auf das Goldsubstrat wurde 500 μl der frisch angesetzten modifizierten P19-Lösung (0,2 mg/ml in hochreinem Wasser) aufgetragen und sie in einer befeuchteten, verschlossenen Petrischale für ca. 16 Stunden aufbewahrt. Danach wurde das Substrat kräftig mit hochreinem Wasser abgespült.

Um die Carboxy-Gruppe für eine nukleophile Substitution zugänglich zu machen wurden sie zu Aktivestern umgewandelt. Hierzu wurden 10 μl PFP (0,096 mmol) zu 400 μl einer EDC-Lösung (0,2 mol/L) gegeben (d.h. das Verhältnis von PFP (0,24 mol/L) zu EDC (0,2 mol/L) ist 1,2: 1) und gut durchmischt. Diese Reaktionslösung wurde für 45 min auf das Substrat gegeben. Nach ausgiebigen Waschen des Substrates mit reinem Ethanol wurde es im Stickstoffstrom getrocknet.

Anschließend wurden 500 μl einer DOctPE-Lösung (1 mg/ml, gelöst in Chloroform) auf das Substrat gegeben und dieses nach ca. 70 Minuten Reaktionszeit kräftig mit reinem Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Dieses frisch präparierte Substrat wurde in eine abgeschlossene Flüssigkeitszelle eingespannt und eine DOPC- Lösung (5 mg/ml, gelöst in Chloroform) zugegeben. Nach 45 Minuten wurde mit ca. 20 ml hochreinem Wasser gespült.

Bei weiterer Verwendung des Substrates wurde darauf geachtet, dass keine Luft an die Oberfläche gelangt, da dies zur Zerstörung der Lipid-Doppelschicht führen würde.

4.3 Experimentaleil Messmethoden

4.3.1 Kontaktwinkelmessung

Die verwendeten Tropfen aus hochreinem Wasser (Milli-Q) hatten ein Volumen von 2,5 μl und wurden mit einer Geschwindigkeit von 5 $\mu\text{l/s}$ auf die zu bestimmende Oberfläche aufgetragen. Nachdem die Grenzfläche zwischen Substrat und Tropfen manuell bestimmt wurde, wurde die Oberfläche des Tropfens simuliert und der Kontaktwinkel bestimmt (siehe Kapitel 3.1).

Diese Messungen des Kontaktwinkels wurden an mindestens 5 Stellen eines Substrates durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Alle Messungen wurden mit

dem Kontaktwinkelmessgerät „DSA10“ der Firma Krüss (siehe Abbildung 4.1) ausgeführt.

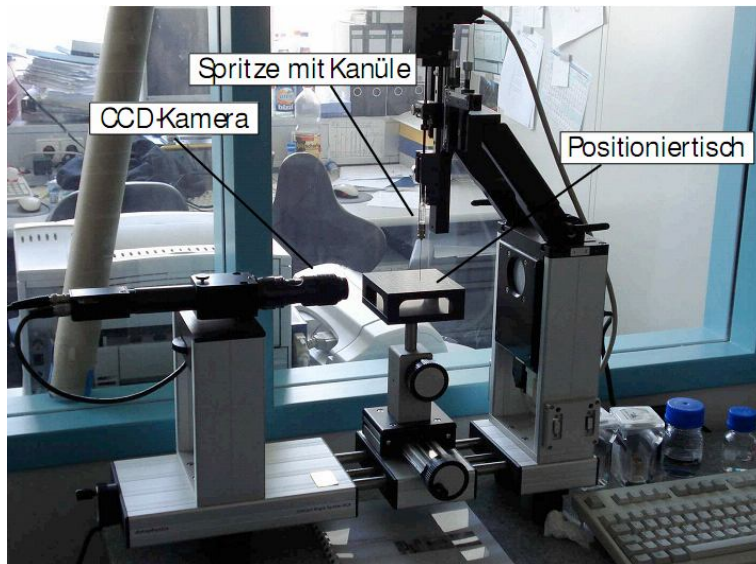


Abbildung 4.1: Kontaktwinkelmessgerät „DSA 10“ der Firma Krüss

4.3.2 Quarzmikrowaage mit Dissipationsmessung

Präparation der Oberfläche des Kristalls



Abbildung 4.2: Quarzkristalle der Firma QSense

Der mit Gold beschichtete Quarzkristall (siehe Abbildung 4.2; Firma QSense) wurde zur Reinigung 10 min in eine, auf 80°C erwärmte, 5:1:1 Lösung aus $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2(30\%):\text{NH}_3(25\%)$ getaucht, mit hochreinem Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde der Kristall 10 min einer UV-Ozon-Behandlung ausgesetzt (Ozonanlage), mit hochreinem Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Unmittelbar nach der Reinigung wurde der Kristall, je nach Versuchsanordnung, entweder direkt in die Messzelle eingebaut oder die Goldoberfläche erst, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, aktiviert.

Aufbau der Messapparatur

In Abbildung 4.3 ist der Aufbau einer QCM-D Apparatur zu sehen.

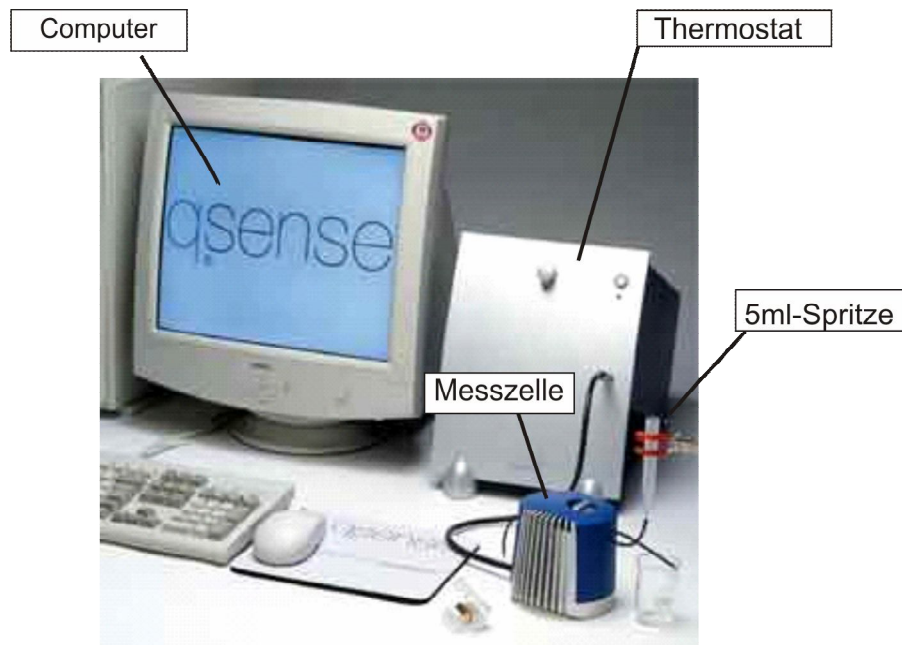


Abbildung 4.3: Aufbau der QCM-D Messapparatur mit Computer, Thermostat, 5mL-Spritze und Messzelle.

Der Aufbau besteht aus:

- Der Messzelle, in welcher der QCM-D-Kristall eingebaut wurde. An dieser Messzelle befand sich ein 3-Wegehahn, mit welchem der Fluss entweder

auf die Temperaturschleife oder auf den QCM-Sensor geleitet werden kann.

- Einer 5ml-Spritze, über die die Flüssigkeit mittels ihrer Schwerkraft in die Messzelle eingelassen wird.
- Dem Thermostat, welcher die Flüssigkeit vor dem Einlassen in die Messzelle auf eine Temperatur von $20,5^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ regulierte und konstant hielt.
- Dem Computer zum Aufnehmen und Auswerten der Messungen. Zum Auswerten der Messungen wurde die Software von QSense benutzt (QTools)

Durchführung der Messungen

Vor jeder Messung wurde die Messzelle gereinigt. Hierzu wurde eine 2%ige Hellmanex II Lösung in die Zelle gegeben, diese dort für 30 min belassen und danach mit reichlich hochreinem Wasser gespült.

Nach der Präparation des QCM-D-Kristalls wurde dieser in die Messzelle eingebaut und Puffer (PBS oder hochreines Wasser) auf die Temperaturschleife und dann auf den Sensor gegeben. Es wurde gewartet bis sich das System auf eine konstante Temperatur eingestellt hat. Danach wurde 2-3mal mit dem Puffer durchgespült und gewartet bis die Messung eine stabile Basislinie anzeigte. Bei der Zugabe wurde zunächst 1,5 ml der Flüssigkeit auf die Temperaturschleife und erst nach wenigen Minuten 0,5 ml Flüssigkeit auf den QCM-D-Sensor gegeben. Dies hatte zum Ziel, die Flüssigkeit vor Zugabe zu temperieren.

Wenn die Messung für mindestens 10 Minuten eine stabile Basislinie zeigte, wurde die jeweilige Lösung, wie oben beschrieben (1,5ml Temperaturschleife dann 0,5ml Sensor) zugegeben. Es wurden die für den 3. Oberton gemessenen Daten verwendet. Der schematische Aufbau einer Messzelle ist in Abbildung 4.4 gezeigt.

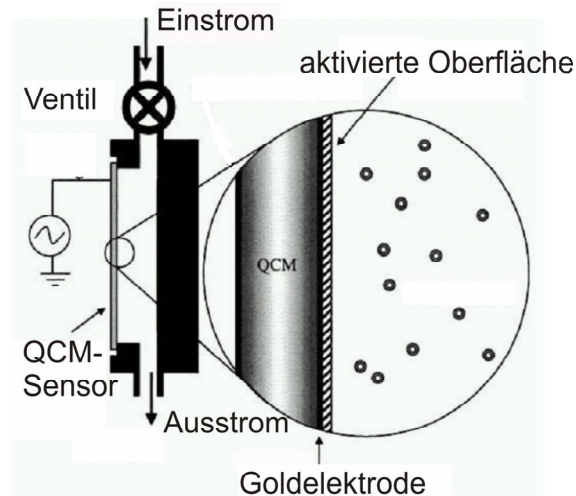


Abbildung 4.4 entnommen aus ⁴³ und verändert: Schematischer Aufbau der Messzelle

4.3.3 Oberflächenplasmonenspektroskopie

Nach der Justage ($\theta = 45^\circ$) (siehe Abbildung 3.9) wurde zunächst eine winkelabhängige Messung an Luft aufgenommen. Dann wurde mittels einer angeschlossenen Peristaltikpumpe ein kontinuierlicher Fluss von 0,1 mL/min (PBS oder hochreines Wasser) erzeugt und weitere winkelabhängige Messung durchgeführt.

Im Anschluss an die winkelabhängige Messung in Flüssigkeit wurde bei einem festen Winkel in der Flanke des Oberflächenplasmons der zeitliche Verlauf der Massenzunahme bei weiteren Reaktionsschritten detektiert. Die Zugabe- und Waschschrte variierten für die verschiedenen Messungen. Es wurde nach jedem Waschschrte eine winkelabhängige Messung durchgeführt.

4.3.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurde auf einem Nanowizard (JPK Instruments, Germany, siehe Abbildung 4.5) ausgeführt, welches auf einem

invertiertem Mikroskop (Zeiss, Axiovert) installiert ist. Es wurde bei Raumtemperatur, im Tapping-Modus (oder auch *intermittent contact mode*) und in Flüssigkeit gemessen. Für die Aufnahme von Bildern und Messungen von Kraft-Abstands-Kurven wurden Siliziumnitrid-*Cantilever* (Veeco, NP-S) mit einer nominalen Federkonstanten von 0,32 N/m benutzt. Die typische *Scan-Rate* lag zwischen 0,8 - 1,2 Hz. Die *Cantilever* wurden für die Kraft-Abstands-Messungen nicht kalibriert, sondern die nominale Federkonstante verwendet. Bei Kraft-Messungen wurde der *Cantilever* mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ periodisch angehoben und abgesenkt.



Abbildung 4.5: verwendetes Rasterkraftmikroskop „Nanowizard“ der Firma JPK Instruments

4.3.5 Elektrochemische Impedanz-Spektroskopie

Um ein Impedanzspektrum aufnehmen zu können, muss an die Arbeitselektrode beispielsweise eine Spannung mit konstanter Amplitude angelegt und die Stromantwort in Abhängigkeit der Frequenz gemessen werden.

Zur Aufnahme der Impedanzspektren wird daher ein Potentiostat mit Frequenzgenerator benötigt, welcher zur Kontrolle und Auswertung der Daten an einen Rechner angeschlossen ist.

Die in dieser Arbeit gemessenen Werte für die Frequenzen lagen im Bereich von 10^5 bis 10^{-3} Hz.

Um das Substrat und die Elektroden aufzunehmen wird eine Messzelle, wie sie in Abbildung 4.6 gezeigt wird, verwendet.

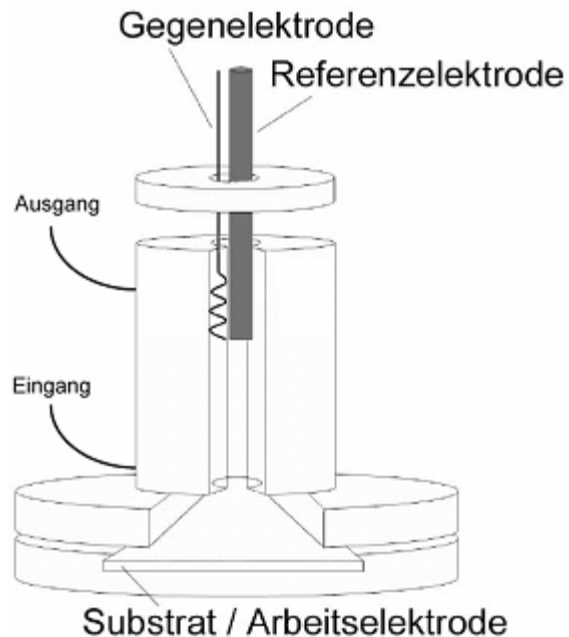


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Messzelle zur elektrochemischen Impedanz-Spektroskopie

Die Teflon-Messzelle besteht aus einer Bodenplatte sowie einem hohlen Aufbau, zwischen die das Substrat eingebaut wird. Das Substrat wurde, wie in

Kapitel 4.2.3 beschrieben, präpariert und stellt in dem Drei-Elektroden-System die Arbeitselektrode dar. Als Gegenelektrode dient eine Platinspirale und als Referenzelektrode wurde eine Silber-Silberchlorid-Elektrode verwendet.

Die Zelle wird durch einen O-Ring zum Substrat abgedichtet und gleichzeitig die aktive Elektrodenoberfläche auf $0,28 \text{ cm}^2$ begrenzt. Alle angegebenen Werte sind jedoch auf 1 cm^2 normiert. Das Spülen des hohlen Aufbaus wird über zwei Zugänge an der Seite ermöglicht. Zur Minimierung des Hintergrundrauschens wird die Messung in einem Farradaykäfig durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Zur Charakterisierung und Optimierung eines als Biosensor-Matrix geeigneten Lipid-Membran-Systems wurden Untersuchungen der einzelnen Bestandteile, wie das abstandsgebende Anker-Molekül, die kovalente Bindung der Lipid-Membran an das Anker-Molekül, sowie die Struktur der Lipidmembran – planare Lipid-Doppelschicht oder Lipid-Vesikel – durchgeführt.

Zunächst wurde die konzentrationsabhängige Belegung eines Goldsubstrates mit dem abstandshaltenden Peptid P19 mittels QCM-D analysiert. Zur Optimierung der kovalenten Bindung der Lipid-Membran an das Anker-Molekül wurde die Effizienz verschiedener Kupplungsreagenzien über die Hydrophobizität einer angebundenen Lipidmonoschicht mittels Kontaktwinkelmessungen verglichen. Dazu wurde ein Testsystem, bestehend aus dem Anker-Molekül 11-Mercaptoundekansäure (MUS) und DOctPE aufgebaut und die Kupplung im organischen und wässrigen Milieu untersucht. Die Ergebnisse wurden auf das Peptid P19 als Anker übertragen.

Anschließend wurde die Anbindung von Lipid-Vesikeln, in hochreinem Wasser oder PBS, an das Peptid P19 und an ein Alkanthiol mittels SPR, QCM-D und AFM analysiert. Alternativ dazu wurde der Aufbau einer Lipid-Doppelschicht durch das schnelle Austauschen von Lösungsmitteln „*Rapid Solvent Exchange*“ mittels AFM und EIS untersucht.

5.1 Belegung der Goldoberfläche

Die Belegungsichte des Abstandhalters ist bei dem Aufbau eines künstlichen Membran-Systems von Bedeutung. Ob eine hohe oder eine niedrige Belegung sinnvoll ist, hängt von der geplanten Anwendung des Systems ab.

Beispielsweise könnte eine hohe Ankerdichte die Einlagerung von Proteinen in die spätere Membran stören. Aus diesem Grund würde zur Anbindung einer planaren Lipid-Doppelschicht eine relativ geringe Belegungsichte des Abstandhalters gewählt werden.

Ein Abstandhalter mit relativ geringer Belegungsichte ist zum Beispiel das Peptid P19, welches ein Bestandteil des extrazellulären Glycoproteins Laminin ist. Deshalb ist P19 für die Nachahmung einer biologischen Membran geeignet. In der Promotionsarbeit von Frau Dr. Heike Lauer wurden die Strukturen von Peptiden nach der Anbindung an eine Oberfläche untersucht.⁵⁵ Die Erkenntnis dieser Untersuchung war, dass Peptide, die eine ähnliche Anzahl an Aminosäuren hatten wie P19, eine α -Helix-Struktur auf der Oberfläche besitzen.⁵⁵ Aufgrund der vermuteten Helix-Struktur von P19 hat ein einzelnes Molekül einen hohen Raumbedarf anders als z.B. oft verwendete, lineare Alkanthiole.⁵⁶ Die P19-Moleküle sind, wie in Abbildung 5.1 veranschaulicht, nicht dichtest gepackt. Daraus resultiert, dass eine auf diesen Abstandhalter gekoppelte Membran flexibel ist und eine Protein-Inkorporation erlaubt.

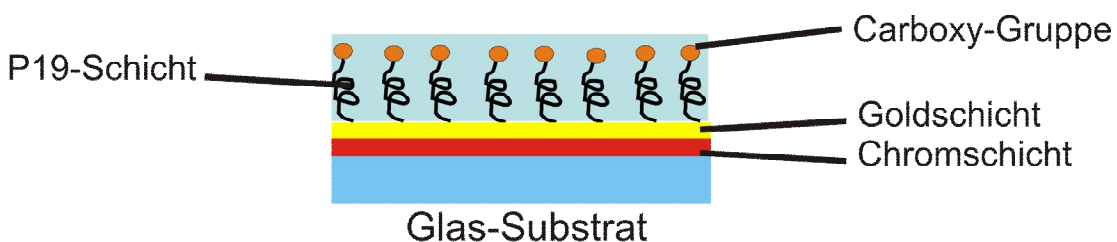


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Anlagerung des Peptides P19 an das Gold-Substrat über die Thiol-Gruppen des Cysteins. Wie zu erkennen, ist die Belegungsichte aufgrund der α -helikalen Struktur des P19 relativ gering.

Der Nachteil einer geringen Ankerdichte ist jedoch die Anfälligkeit der Membran auf Defekte in der Lipid-Doppelschicht. Eine Erhöhung der Ankerdichte führt, aufgrund des resultierenden Anstiegs der reaktiven Endgruppendichte, zu einer verbesserten Membranherstellung und einer optimierten Stabilität der Membran.

Sollen stattdessen Lipid-Vesikel an eine Oberfläche angebunden werden, kann eine hohe Ankerdichte von Vorteil sein.

Die Vesikel besitzen eine Lipid-Doppelschicht und einen Hohlraum, in den Wasser eingelagert ist. In die Lipid-Doppelschicht der Vesikel können Transmembran-Proteine ohne Kontakt zum Abstandhalter inkorporieren. Die hohe Ankerdichte auf der Oberfläche bietet mehr Angriffspunkte für funktionelle Gruppen der Lipide bei der Kupplungsreaktion. Ein Abstandhalter mit hoher Belegungsichte ist beispielsweise die in dieser Arbeit verwendete 11-Mercaptoundekansäure (MUS). MUS ist ein Alkanthiol und bildet durch seine Alkylgruppen starke Wechselwirkungen unter den einzelnen Molekülen aus. Daraus folgen der geringe Platzbedarf der einzelnen Moleküle und die daraus resultierende hohe Belegungsichte einer optimalen Packung der Oberfläche von $4,5 \times 10^{14}$ Moleküle/cm².⁵⁶

Die Wechselwirkungen führen zur Selbstanordnung einer Monoschicht (engl. *Self-assembled monolayer* - SAM), die im Idealfall kristallin ist. Die schematische Darstellung der MUS zu einer Monoschicht ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

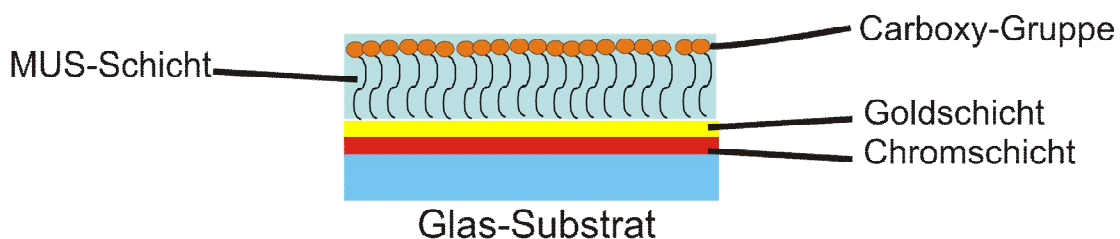


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer MUS-Schicht auf Gold.

Die konzentrationsabhängige Belegungsichte von P19 auf Gold wurde mit Hilfe der Quarzmikrowaage (QCM-D) für die Konzentrationen 0,01 mg/mL,

0,02 mg/mL und 0,05 mg/mL bestimmt. Die Frequenzänderungen bei verschiedenen Konzentrationen sind in Abbildung 5.3 dargestellt:

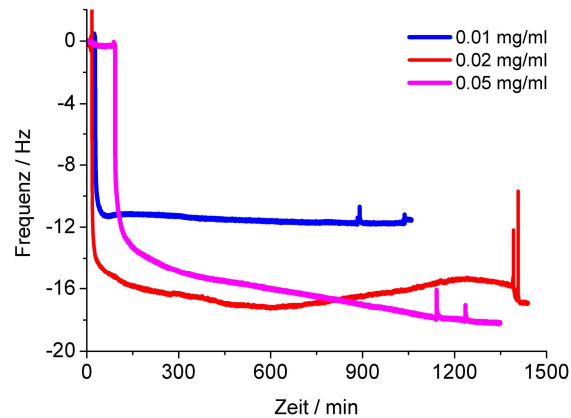


Abbildung 5.3: Änderung der Frequenz bei verschiedenen Konzentrationen von P19. Es ist zu erkennen, dass bei der 0,01 mg/mL-Lösung (blaue Kurve) eine geringere Frequenzabnahme gemessen wurde, als bei der 0,02 mg/mL-Lösung (rote Kurve) und der 0,05 mg/mL-Lösung (violette Kurve), die beide im gleichen Bereich lagen. Folglich ist die maximale Belegung der Oberfläche bei der Konzentration von 0,02 mg/mL erreicht.

Nach Zugabe der P19-Lösungen nahmen die Frequenzen für die 0,01 mg/mL-Lösung (blaue Kurve) um 11,8 Hz, für die 0,02 mg/mL-Lösung (rote Kurve) um 16,9 Hz und für die 0,05 mg/mL-Lösung (violette Kurve) um 18,1 Hz ab. Die Messung der P19-Lösung mit der Konzentration von 0,02 mg/mL (rote Kurve) zeigte starke Schwankungen der Frequenz von der 600. min bis zum Waschvorgang (1400.min). Der Grund war ein Defekt der Temperatur-Kontrolle des QCM-D-Gerätes. Der Wert der Frequenz blieb nach dem Waschen konstant. Der Graph zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit der Frequenzänderung. Die 0,05 mg/mL-Lösung führte im Vergleich zur 0,02 mg/mL-Lösung zu keiner beträchtlich höheren Frequenzabnahme. Da die Frequenzabnahme laut der Sauerbrey (Gleichung 3.3, Kapitel 3.2) proportional zu einer Massenzunahme ist, kann man von einer Sättigung der Oberfläche mit P19 ausgehen.

Vor der Betrachtung der resultierenden Oberflächenbelegung wird zunächst, die in Abbildung 5.4 dargestellte Dissipationsänderung bei Zugabe der P19-Lösungen diskutiert.

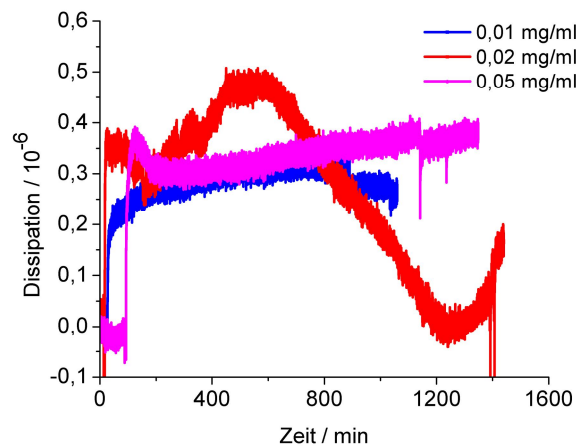


Abbildung 5.4: Änderung der Dissipation bei verschiedenen Konzentrationen von P19. Es ist zu erkennen, dass die Dissipationszunahme der 0,01 mg/mL-Lösung (blaue Kurve), der 0,02 mg/mL-Lösung (rote Kurve) und der 0,05 mg/mL-Lösung (violette Kurve) im gleichen Bereich lagen.

Nach Zugabe der P19- Lösungen nahmen die Dissipationen nur minimal ($0,27 - 0,38 \times 10^{-6}$) zu und lagen für alle drei Konzentrationen im gleichen Bereich. Die Schwankungen der Dissipation der P19-Lösung mit einer Konzentration von 0,02 mg/mL (rote Kurve in Abbildung 5.4) sind, wie auch schon die Schwankungen der Frequenz in Abbildung 5.3, mit dem Defekt der Temperatur-Kontrolle zu begründen.

Die geringe Dissipationszunahme deutet, wie in Kapitel 3.2 erklärt, auf eine rigide und flache Schicht hin, die wenig Flüssigkeit bindet.

Aus den Ergebnissen der Frequenzänderungen Δf , die aus Abbildung 5.3 erhalten wurden, konnte mit Gleichung 5.1 die Belegungsdichte errechnet werden.

$$\frac{\Delta f \times C}{M_w} \times N_A = X \quad \text{Gleichung 5.1}$$

In Gleichung 5.1 entspricht Δf der Frequenzänderung, C der Massenempfindlichkeits-Konstante für einen 5 MHz-Kristall der Firma QSense = $17,7 \frac{ng}{Hz \times cm^2}$, M_w der molaren Masse (P19 = 2017,32 g/mol), N_A der Avogadro-Konstanten = $6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ und X der Belegungsdichte.

Wie in Gleichung 5.1 zu erkennen, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Belegungsdichte und der Frequenzänderung.

Einsetzen der Frequenzänderungen Δf in Gleichung 5.1 ergibt für die verschiedenen P19-Konzentrationen folgende Belegungsdichten:

Tabelle 5.1: Belegungsdichten für verschiedene P19-Konzentrationen:

P19-Konzentration/ $\frac{mg}{mL}$	Belegungsdichte/ $\frac{Moleküle}{cm^2}$
0,01	$6,235 \times 10^{13}$
0,02	$8,931 \times 10^{13}$
0,05	$9,235 \times 10^{13}$

Der Vergleich zeigte, dass die Erhöhung der P19-Konzentration von 0,01 mg/mL um den Faktor 2 bzw. den Faktor 5 keine Verdopplung oder Verfünffachung der Belegung zur Folge hatte. Eine Sättigung der Oberfläche ist zu vermuten. Folglich ist die Verwendung einer höheren Konzentration an P19 nicht sinnvoll, da sie nicht zu einer Zunahme der Belegungsdichte führt. Die Verwendung der 0,02 mg/mL-P19-Lösung ist somit am effizientesten, da mit dieser Konzentration, wie in Tabelle 5.1 gezeigt, die für P19 maximale Belegungsdichte erreicht wurde.

Wenn man den Kehrwert der Ergebnisse bildet, lässt sich aus den Belegungsdichten die für ein Molekül verfügbare Fläche ermitteln (siehe Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Verfügbare Fläche für verschiedene P19-Konzentrationen:

P19-Konzentration/ $\frac{mg}{mL}$	Verfügbare Fläche/ $\frac{\text{Å}^2}{\text{Molekül}}$
0,01	160,4
0,02	112,9
0,05	108,3

Aus der pro Molekül verfügbaren Fläche kann auf die Dichte an funktionellen Gruppen geschlossen werden. Diese wurden, unter Berücksichtigung, dass P19 zwei funktionelle COOH-Gruppen pro Molekül besitzt, das Alkanthiol MUS dagegen nur eine funktionelle Carboxy-Gruppe pro Molekül, miteinander verglichen. Folglich muss die für ein P19-Molekül verfügbare Fläche halbiert werden. MUS hat eine hohe Belegungsdichte von $4,5 \times 10^{14}$ Moleküle/cm², daraus resultierend pro Molekül und funktioneller Carboxy-Gruppe eine verfügbare Fläche von 22,2 Å². Unter Berücksichtigung des oben genannten Verhältnisses funktioneller COOH-Gruppen von MUS und Peptid, ergibt der Vergleich der funktionellen Gruppendichte zwischen MUS und P19 Molekülen, dass diese bei MUS größer ist.

5.2 Optimierung der Kupplungsreaktion

Zur kovalenten Anbindung einer Lipidmembran oder Lipid-Vesikeln an einen geeigneten Abstandhalter wurden verschiedene Kupplungsreagenzien untereinander verglichen.

Das Ziel ist die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen der Amino-gruppe des Lipids, in dieser Arbeit DOctPE oder DMPE, und der Carboxy-Gruppe des Abstandhalters (Abbildung 5.5).

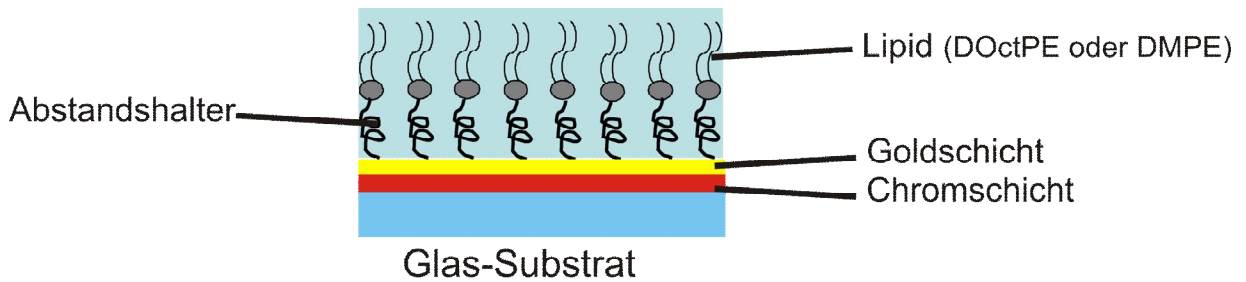


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung des Aufbaus einer DOctPE- oder DMPE-Monoschicht gekuppelt an den Abstandhalter P19.

5.2.1 Kupplungen der Lipide an MUS

Für die Untersuchung der Kupplung wurde zunächst 11-Mercaptoundekansäure (MUS) als Testsystem verwendet. Die Verwendung von MUS als Abstandhalter hat mehrere Vorteile: Zum einen bildet MUS auf Gold eine homogene und dichte Monoschicht und bietet so eine hohe Dichte an Carboxy-Gruppen (siehe Abbildung 5.6). Zum anderen besitzt MUS keine Seitengruppen, die Angriffspunkte für Nebenreaktionen bieten können.

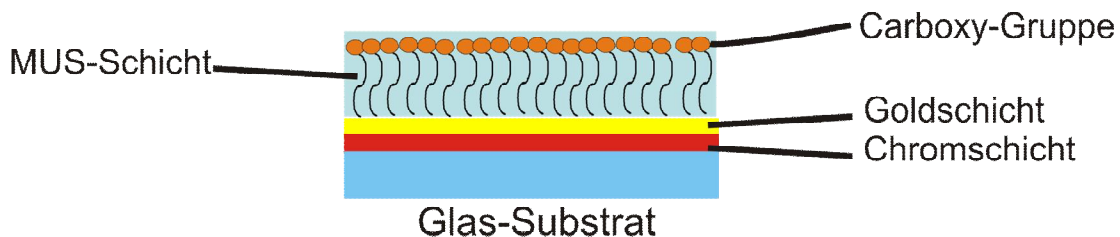


Abbildung 5.6: Aufbau einer MUS-Schicht auf Gold

Der schematische Kupplungsmechanismus am Beispiel von EDC und PFP als Kupplungsreagenzien ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

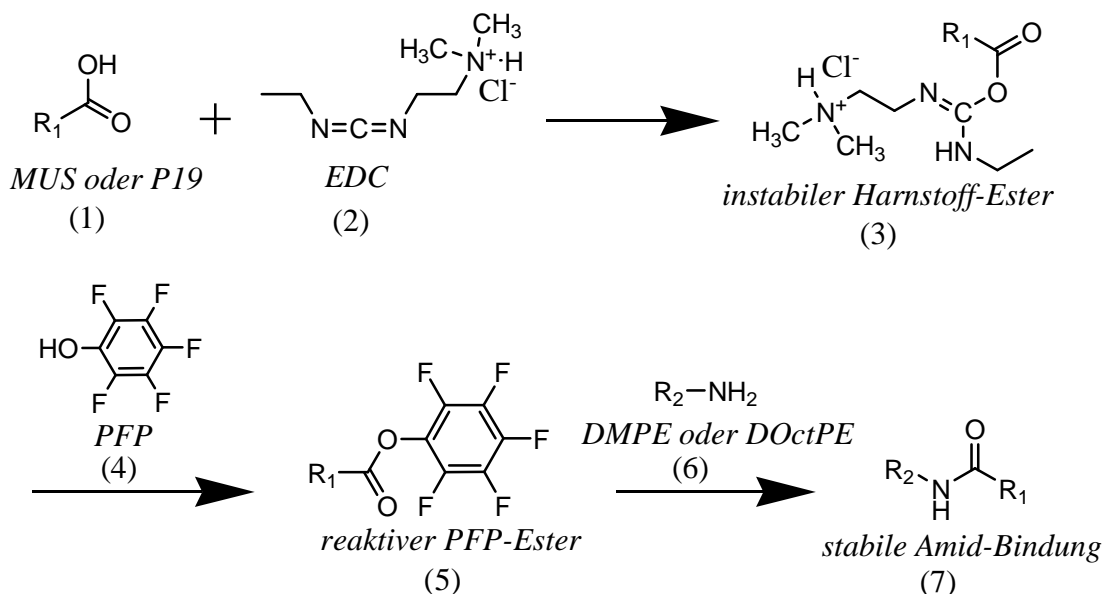


Abbildung 5.7: Mechanismus der Kupplungsreaktion mit EDC und PFP. Zunächst reagiert MUS bzw. P19 (1) mit EDC (2) zu einer instabilen Zwischenstufe (3). Diese instabile Zwischenstufe (3) reagiert umgehend mit PFP (4) zum Aktivester (5), aus dem nach Zugabe des Lipids DMPE oder DOctPE (6) eine stabile Amid-Bindung (7) entsteht.

Es wurden die verschiedenen Kupplungsreagenzien (NHS, S-NHS, TFP-S oder PFP immer mit EDC eingesetzt) sowohl im wässrigen Milieu als auch im organischen Milieu an die MUS-Monoschicht ((1) in Abbildung 5.7, wenn $R_1 = \text{MUS}$) gebunden. Dabei bildet sich im ersten Schritt durch Reaktion des EDCs ((2) in Abbildung 5.7) mit der Carboxy-Gruppe ein instabiler, reaktiver Harnstoffester ((3) in Abbildung 5.7). Dieser Harnstoffester reagiert dann im zweiten Schritt mit PFP, TFP-S, S-NHS oder NHS zu einem schnell zerfallenden Ester ((5) in Abbildung 5.7), der eine hohe Reaktivität gegenüber Aminen besitzt und stabiler als der Harnstoffester gegenüber Hydrolyse ist. An die aktivester-aktivierte COOH-Gruppe wurden dann DMPE oder DoctPE gebunden.

DMPE wurde in hochreinem Wasser suspendiert und danach zugegeben (Tabelle 5.3). In dieser DMPE-Suspension befand sich das Detergenz Triton X-100 um die Löslichkeit von DMPE zu erhöhen. Es ist aber nicht bekannt, welche Auswirkungen Triton X-100 auf die Kupplung hat und wie hoch die

Löslichkeit von DMPE wirklich ist. Die Ergebnisse der Kupplungsreaktion mit DMPE in Wasser werden unter Abschnitt a) diskutiert.

Das Lösen von DMPE in Chloroform als organisches Lösungsmittel war nicht erfolgreich. Deshalb wurde DOctPE verwendet, weil es sich aufgrund seiner geringeren Anzahl an hydrophoben Alkylketten und laut Hersteller (Avanti Lipids) besser als DMPE in Wasser lösen sollte. In der verwendeten Konzentration von 1mg/mL entstand jedoch, wie schon mit DMPE, eine Suspension. In Abschnitt b) werden die Ergebnisse der Kupplungsreaktion mit der DOctPE-Suspension in Wasser diskutiert.

Um DOctPE vollständig zu lösen wurde Chloroform verwendet. Diese DOctPE-Lösung kann für die Kupplung benutzt werden. Ob die Zugabe der DOctPE-Lösung einen Effekt auf die Kupplungsreaktion hatte, wird in Abschnitt c) diskutiert.

Die Untersuchung der Kupplungseffizienz wurde mittels Kontaktwinkelmessung durchgeführt, welche Aussagen über die Hydrophilie bzw. Hydrophobizität der Oberfläche zulässt. Bei erfolgreicher Kupplung eines Lipids an die Carboxy-Gruppe des Abstandhalters sollte, aufgrund der hydrophoben Alkylgruppen des Lipids, ein starker Anstieg des Kontaktwinkels gemessen werden.

Die jeweiligen Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 5.3, 5.4 und 5.5 erfasst.

a) Kupplung von DMPE an MUS in Wasser

Die Kupplung wurde im wässrigen Milieu und mit DMPE durchgeführt, welches in einer wässrigen inhomogenen Suspension vorlag.

Tabelle 5.3: Kontaktwinkel nach der Kupplung von DMPE an MUS in Wasser und mit verschiedenen Kupplungsreagenzien:

	Kontaktwinkel / °
MUS	25,2±5,5
MUS-EDC/SNHS _(H2O) -DMPE _(H2O)	47,0±1,8
MUS-EDC/TFPS _(H2O) -DMPE _(H2O)	50,0±1,8
MUS-EDC/NHS _(H2O) -DMPE _(H2O)	42,5±1,8

Die Kontaktwinkel nach der Reaktion der drei verschiedenen Kupplungsreagenzien (EDC/SNHS, EDC/TFPS und EDC/NHS) mit MUS und DMPE lagen mit 47,0°; 50,0° und 42,5° sehr nah beieinander. Die Kontaktwinkel waren niedriger als für eine Kupplung des hydrophoben DMPEs bei dichter Packung zu erwarten wäre.⁵⁷ Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es zu keiner messbaren Kupplung kam. Der Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich die schlechte Löslichkeit des DMPE in Wasser sowie zusätzlich die hohe Hydrolyseempfindlichkeit der Kupplungsreagenzien.

b) Kupplung von DOctPE an MUS in H₂O

Die Kupplung wurde, wie unter a), im wässrigen Milieu durchgeführt mit dem Unterschied, dass man DOctPE als Lipid verwendete.

Tabelle 5.4: Kontaktwinkel nach der Kupplung von DOctPE an MUS in Wasser und mit verschiedenen Kupplungsreagenzien.

	Kontaktwinkel / °
MUS	25,2±5,5
MUS-EDC/SNHS _(H2O) -DOctPE _(H2O)	44,4±1,2
MUS-EDC/TFPS _(H2O) -DOctPE _(H2O)	47,5±0,8
MUS-EDC/NHS _(H2O) -DOctPE _(H2O)	50,4±4,8
MUS-EDC/PFP _(H2O) -DOctPE _(H2O)	69,9±0,7

Die Kontaktwinkel nach der Reaktion der vier verschiedenen Kupplungsreagenzien (EDC/SNHS, EDC/TFPS, EDC/NHS und EDC/PFP) mit MUS und DOctPE lagen für SNHS,TFPS und NHS wie schon unter a) (siehe Tabelle 5.3) nah beieinander und waren zu niedrig um von einer effizienten Kupplung sprechen zu können. Der Kontaktwinkel nach der Reaktion von EDC/PFP mit MUS und DOctPE lag mit 69,9° höher als bei den anderen Kupplungsreagenzien.

c) Kupplung von DOctPE an MUS in Chloroform

Die Kupplung wurde im organischen Milieu (Chloroform) und mit DOctPE, welches im Gegensatz zu DMPE in Chloroform vollständig gelöst werden konnte, durchgeführt. Das Verwenden von Chloroform als Lösungsmittel hat den Vorteil, dass dadurch die Gefahr der Hydrolyse einer reaktiven Zwischenstufe in der Kupplungsreaktion minimiert wird. Der Mechanismus der Hydrolyse des instabilen Harnstoff-Esters ((3) in Abbildung 5.7 und 5.8) wird in Abbildung 5.8 dargestellt.

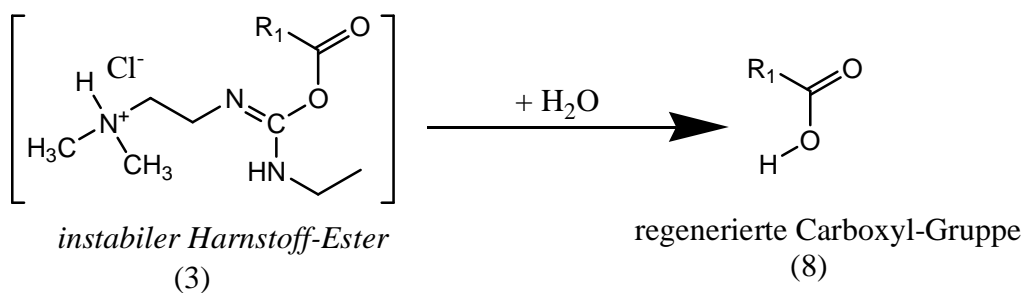


Abbildung 5.8: Mögliche Hydrolyse der Harnstoffester-Zwischenstufe während der Kupplungsreaktion im wässrigen Milieu.

Durch den Wechsel zu Chloroform als Lösungsmittel konnte die Reaktionszeit der Kupplungsreagenzien mit dem Abstandhalter von 15 min auf 45 min erhöht werden, was zu einem besseren Umsatz führt.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit in CHCl₃ wurden die Kupplungsreagenzien EDC/SNHS und EDC/TFPS nicht untersucht.

Tabelle 5.5: Kontaktwinkel nach der Reaktion von DOctPE an MUS in Chloroform mit verschiedenen Kupplungsreagenzien bzw. ohne Kupplungsreagenzien.

	Kontaktwinkel / °
MUS	25,2±5,5
c) Kupplung in CHCl ₃ + DOctPE	
MUS-EDC/NHS _(CHCl₃) -DOctPE _(CHCl₃)	74,9±0,8
MUS-EDC/PFP _(CHCl₃) -DOctPE _(CHCl₃)	80,0±2,2
MUS-DOctPE _(CHCl₃) (ohne Kupplung)	47,3±1,6

Die Kontaktwinkel nach der Reaktion von EDC/NHS und EDC/PFP mit MUS und DOctPE in CHCl₃ lagen bei 74,9° und 80,0°. Die Oberfläche war nach der Kupplungsreaktion hydrophober als die Kontrolle mit MUS und DOctPE in Chloroform ohne Kupplungsreagenzien, welche zu einem Kontaktwinkel von 47,3° führt. Der Kontaktwinkel ohne Kupplungsreagenz liegt viel niedriger als mit den Kupplungsreagenzien EDC/NHS und EDC/PFP und weist auf eine unspezifische Adsorption hin.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Kupplung des hydrophoben DOctPE in Chloroform an die hydrophile MUS (25,2°) am effizientesten war.

5.2.2 Kupplungen an P19

Die Untersuchung der Kupplungsreaktionen an MUS unter verschiedenen Reaktionsbedingungen ergab, dass die Kupplung von DOctPE in Chloroform am effektivsten war. Eine Verwendung von MUS als Abstandhalter war für die Betrachtung der Kupplungsreaktion zwar von Vorteil, aber die hohe

Belegungsdichte von MUS⁵⁶ kann in der späteren Anwendung Nachteile mit sich bringen, wie zum Beispiel die Behinderung von Transmembranproteinen bei der Protein-Inkorporation. Deshalb wurde für die Herstellung planarer Lipid-Doppelschichten P19 verwendet, bei dem die Belegung der Goldoberfläche geringer als bei MUS ist (siehe Kapitel 5.1).

Tabelle 5.6: Kontaktwinkel nach Reaktion von P19 mit verschiedenen Kupplungsreagenzien bzw. nach Reaktion der Kupplungsreagenzien mit P19 und DOctPE in CHCl₃.

	Kontaktwinkel / °
P19	43,0±4,1
a) Kupplungsreagenzien	
P19-EDC/SNHS _(CHCl₃)	49,0±3,9
P19-EDC/NHS _(CHCl₃)	53,1±1,9
P19-EDC/PFP _(CHCl₃)	54,1±1,6
b) Kupplung in CHCl ₃ +DOctPE	
P19-EDC/SNHS _(CHCl₃) -DOctPE _(CHCl₃)	51,1±3,6
P19-EDC/NHS _(CHCl₃) -DOctPE _(CHCl₃)	51,0±2,8
P19-EDC/PFP _(CHCl₃) -DOctPE _(CHCl₃)	61,9±4,2

Zunächst wurden, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, die verschiedenen Kupplungsreagenzien in Chloroform an P19 angebunden.

Anschließend wurde die Kupplung von DOctPE an verschiedenen aktivierten Oberflächen in Chloroform durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2.2). Das Ziel war es, ein Kupplungsreagenz mit hoher Effektivität und guter Löslichkeit im organischen Milieu zu finden.

Die Bildung der Aktivester sowie die Kupplungsreaktionen wurden mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen untersucht. Die jeweiligen Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

In Tabelle 5.6 a) wurden die in Chloroform gelösten Kupplungsreagenzien EDC/SNHS, EDC/NHS und EDC/PFP jeweils auf die P19-bedeckten Goldoberflächen aufgetragen. Die Kontaktwinkel lagen nach dem Spülen bei den Kupplungsreagenzien mit 49,0°, 53,1° und 54,1° nah beieinander und wichen nicht weit vom Kontaktwinkel der nicht-funktionalisierten Oberfläche 43,0° ab. Der Kontrollwert resultiert aus der Messung der mit P19 bedeckten Goldoberfläche vor der Reaktion mit dem Kupplungsreagenz.

In Tabelle 5.6 b) wurden die mit P19 bedeckte Goldoberfläche mit den in Chloroform gelösten Kupplungsreagenzien EDC/SNHS, EDC/NHS und EDC/PFP aktiviert. Anschließend wurde ebenfalls in Chloroform gelöstes DOctPE, zugegeben. Die Kontaktwinkel wichen für EDC/SNHS und EDC/NHS wie unter a) mit 51,1° und 51,0° nicht signifikant von dem Kontaktwinkel der nicht-funktionalisierten Oberfläche 43,0° ab. Der Kontaktwinkel für EDC/PFP als Kupplungsreagenz lag mit 61,9° deutlich höher als vor Zugabe des Lipids (siehe Tabelle 5.6a)) und über dem Kontrollwert 43,0°.

Aus den Kontaktwinkelmessung der Oberflächen geht hervor, dass die Kupplung von P19 an DOctPE mit EDC/PFP in Chloroform effektiver war als mit den anderen beiden Kupplungsreagenzien. Daher wurden die Substrate der Messungen im Kapitel 5.3 und 5.4 mit den Kupplungsreagenzien EDC und PFP in Chloroform aktiviert.

5.3. Verhalten von Vesikeln auf Oberflächen

Nach der Optimierung der Kupplungsreaktion stellte sich die Frage, ob es möglich ist, eine dichte und homogene Vesikel-Belegung an der Oberfläche zu erreichen. Dies ist von Interesse, weil es bei einer lückenhaften Vesikel-Belegung bei Anwendungen, wie zum Beispiel bei der Protein-Inkorporation, zu

Interaktionen des Proteins mit der Oberfläche oder dem Abstandhalter kommen kann.

Die verwendeten Vesikel bestanden, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, aus 45% DOPC, 25% DOPE und 30% Cholesterin. Diese Zusammensetzung der Vesikel ähnelt stark der Zusammensetzung der Zellmembran des endoplasmatischen Retikulums.⁵⁸ Die verwendeten Vesikel enthielten DOPE und sind daher wie DoctPE in der Lage über ihre Amino-Gruppe an P19 bzw. MUS binden.

Es wurde untersucht wie sich Vesikel in hochreinem Wasser oder PBS bei Zugabe zu einem Abstandhalter, dessen Carboxy-Gruppe durch EDC und PFP aktiviert wurde, verhalten.

5.3.1 Verhalten der Vesikel auf verschiedenen funktionalisierten Oberflächen in hochreinem Wasser

Das Verhalten der Vesikel in hochreinem Wasser auf verschiedenen Oberflächen wurde mit Hilfe von Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) und Quarzmikrowaagemessungen (QCM-D) untersucht.

a) Verhalten von Vesikeln auf MUS ohne Kupplungsreagenz

In dieser Messung wurde das Verhalten der Vesikel an MUS in hochreinem Wasser untersucht. Hierzu wurden die Vesikel auf die MUS-Schicht gegeben, ohne diese vorher mit einem Kupplungsreagenz zu aktivieren.

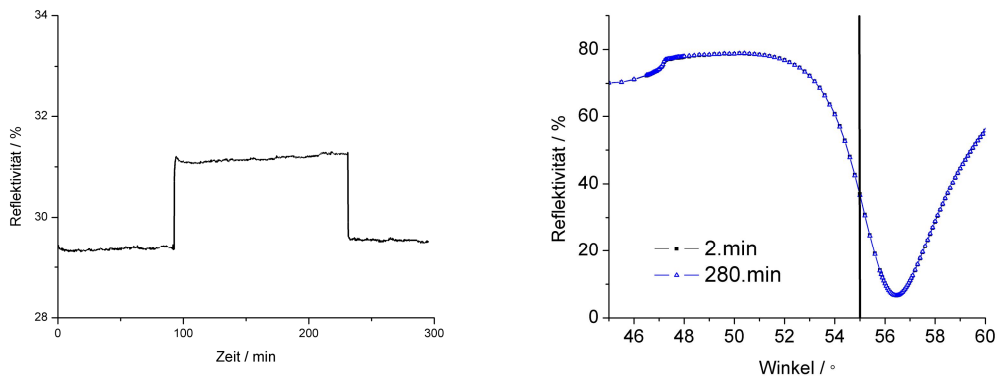


Abbildung 5.9: Die Kinetikmessung bei einem Winkel von $55,23^\circ$ (links) und die nach 2 min (■) und nach 280 min (Δ) aufgenommenen winkelabhängigen Messungen (rechts) der Reaktion von Vesikeln in hochreinem Wasser an nicht-aktivierte MUS.

Die Kinetikmessung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (93. min) eine geringe Zunahme der Reflektivität auf 31,24 %, welche nach dem Waschen (230. min) auf den vorherigen Wert von 29,58 % sank.

Die winkelabhängigen Messungen, die vor der Zugabe der Vesikel-Lösung (Abbildung 5.9 rechts ■) und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem Waschen mit Wasser (Abbildung 5.9 rechts Δ) gemacht wurden, zeigten nur eine minimale Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel.

Aus der vernachlässigbar kleinen Reflektivitätszunahme in der Kinetik-Messung und der sehr geringe Minimumverschiebung beim Vergleich der beiden winkelabhängigen Messungen lässt sich schlussfolgern, dass keine signifikante Massenzunahme und somit auch keine unspezifische Adsorption der Vesikel an MUS ohne Esteraktivierung statt fand.

b) Verhalten von Vesikeln auf aktivierter Mercaptohexadecanocarbonsäure (MHS)

Für diese Messung wurde zum Vergleich MHS als Abstandhalter verwendet. Durch die Verwendung von MHS soll, aufgrund der stärkeren Wechselwirkungen

der 16 Alkylgruppen miteinander, eine höhere Belegung der Oberfläche erreicht werden.

Hieraus folgt eine Erhöhung der Dichte an funktionalisierten Endgruppen. Die Präparation des Substrates und die Kupplung wurden entsprechend des Protokolles der MUS Kupplung ausgeführt.

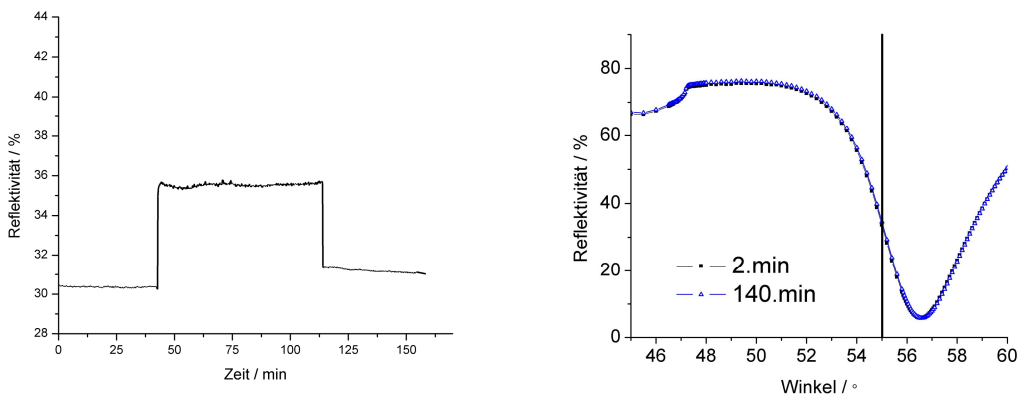


Abbildung 5.10: Die Kinetikmessung bei einem Winkel von $55,13^\circ$ und die nach 2 min (■) und nach 140 min (Δ) aufgenommenen winkelabhängigen Messungen (rechts) der Reaktion der Vesikel mit aktivierter MHS.

Die Kinetikmessung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (42. min) eine geringe Zunahme der Reflektivität von 30,72 % auf 35,6 %, welche nach dem Waschen mit Wasser (114. min) auf den Wert von 31,14 % sank. Die Reflektivität vor der Zugabe der Vesikel-Lösung und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem Waschen war ähnlich.

Die winkelabhängigen Messungen, welche vor der Zugabe der Vesikel-Lösung (Abbildung 5.10 rechts ■) und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem Waschen mit Wasser (Abbildung 5.10 rechts Δ) gemacht wurden, zeigten kaum Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel.

Aus der Betrachtung der Kinetik-Messung und der Betrachtung der Minimumsverschiebung in den winkelabhängigen Messungen folgt, dass keine signifikante Änderung des Brechungsindex oder der Schichtdicke messbar ist.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass keine Kupplung bzw. Adsorption der Vesikel an die aktivierte MHS statt fand.

c) Verhalten von Vesikel auf aktiviertem P19

Im Anschluss an die Untersuchung des Verhaltens der Vesikel auf der aktivierten MHS und dem Ergebnis, dass keine unspezifische Kupplung oder Adsorption der Vesikel in hochreinem Wasser messbar war, wurde das Verhalten der Vesikel auf aktiviertem P19 mit Hilfe der Oberflächenplasmonenspektroskopie geprüft.

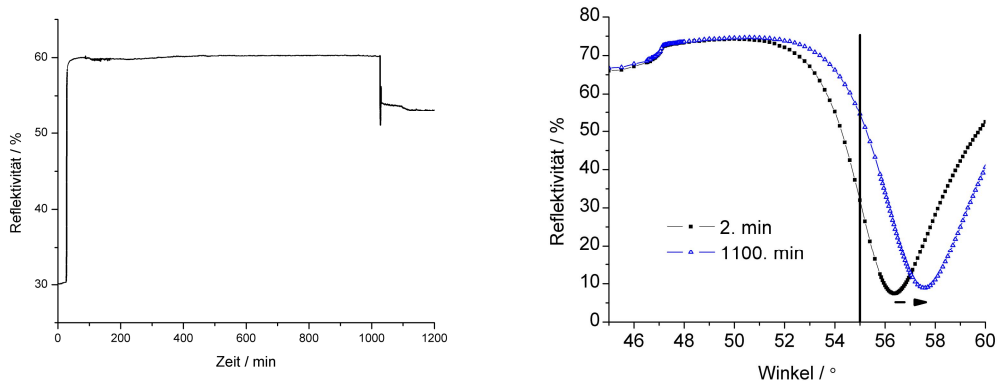


Abbildung 5.11: Die Kinetikmessung bei einem Winkel von 54,8° (links) und die nach 2 min (■) und nach 1100 min (Δ) aufgenommenen winkelabhängigen Messungen (rechts) der Reaktion der Vesikel an aktiviertes P19.

Die Kinetikmessung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (26. min) eine Zunahme der Reflektivität auf 60 %, welche nach dem Waschen mit Wasser (1029. min) auf einen Wert von 53 % sank. Die Reflektivitätszunahme um 23 % zeigt eine hohe Massenzunahme, die ihre Begründung in der kovalenten Kupplung oder der Adsorption der Vesikel haben kann.

Die winkelabhängigen Messungen, welche vor der Zugabe der Vesikel-Lösung (Abbildung 5.11 links; ■) und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem Waschen mit Wasser (Abbildung 5.11 links Δ) gemacht wurde, zeigten eine Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel um 1,25°.

Der Grund dieser Verschiebung kann, wie in Kapitel 3.3.2 erklärt, die Kupplung oder Adsorption einer Vesikel-Schicht an aktiviertes P19 gewesen sein.

Zur Bestimmung genauer Schichtdicken ist eine Simulation der winkelabhängigen Messungen auf Basis der Fresnel-Gleichungen nötig. Dazu muss ein Brechungsindex der Schicht bekannt sein, um eine Schichtdicke und Belegungsdichte durch Simulation der Plasmonenposition zu bestimmen. Da der Brechungsindex nicht bekannt ist und nur angenommen werden kann, können hier keine verlässlichen Ergebnisse präsentiert werden.

Es kann folglich nur, ohne genaue Kenntnis der Oberflächenstruktur, festgestellt werden, dass Vesikel anbinden oder adsorbieren.

Die Ergebnisse der SPR-Messungen waren nicht eindeutig. MHS bildet genauso wie MUS eine Monoschicht mit hoher Belegung (Kapitel 5.1) und einer hohen Dichte an Carboxy-Gruppen. P19 hat im Gegensatz dazu eine niedrigere Belegung (Kapitel 5.1) und daher eine niedrigere Dichte an Carboxy-Gruppen.

Die Wahrscheinlichkeit einer Vesikel-Kupplung wäre also an aktivierte MHS oder MUS höher als an aktiviertes P19.

Die Anbindung der Vesikel in hochreinem Wasser an das aktivierte P19 (Abbildung 5.11) anstatt an die mit EDC/PFP aktivierte MHS (Abbildung 5.10) lässt sich aus den SPR-Messungen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erklären. Wie in Kapitel 3.2 erklärt, können mit der Quarzmikrowaage (QCM-D), genauso wie mit der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR), kleinste Massenänderungen detektiert werden.

Deshalb kann das nicht eindeutige Ergebnis der SPR-Messungen mittels der Quarzmikrowaage (QCM-D) wiederholt und überprüft werden. Es wurden drei QCM-D-Messungen durchgeführt, bei denen die Vesikel in hochreinem Wasser auf aktiviertes P19 gegeben wurden.

Die Ergebnisse der QCM-D-Messungen sind in den Abbildungen 5.12 a, b und c dargestellt.

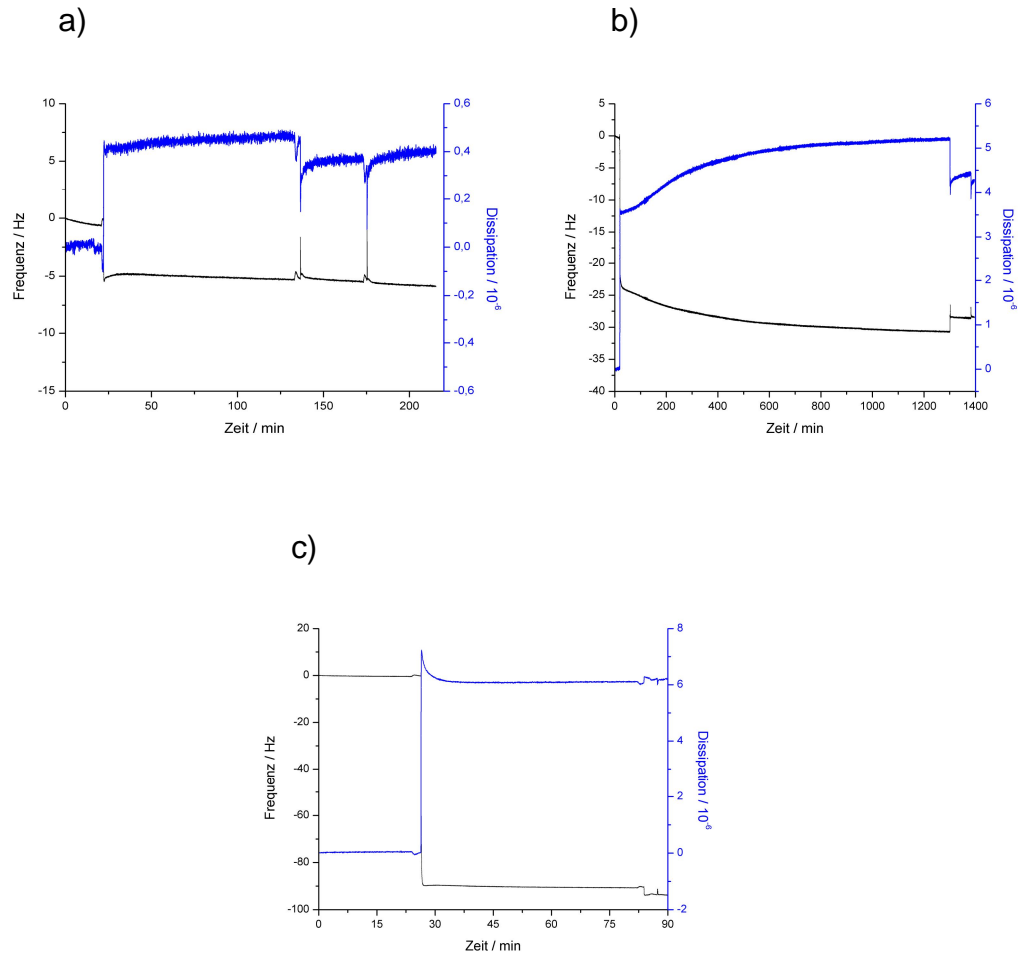


Abbildung 5.12: QCM-D-Daten von Vesikeln auf aktiviertem P19 in hochreinem Wasser.

a) Messung 1; b) Messung 2; c) Messung 3

Die Werte für die Frequenzabnahme wurden aus den Abbildungen 5.12 a, b und c, welche laut der Sauerbrey Gleichung (Kapitel 3.2, Gleichung 3.3) mit einer Massenzunahme gleichzusetzen ist, und der Dissipationszunahme entnommen.

Die resultierenden Werte sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

Tabelle 5.7: Aus den Messungen 1-3 resultierende Frequenz- und Dissipationsänderungen.

	Frequenzabnahme / Hz	Dissipationszunahme / 10^{-6}
Messung 1 (a)	5,1	0,45
Messung 2 (b)	30,8	5,2
Messung 3 (c)	90,8	6,1

Aus Tabelle 5.7 ist ersichtlich, dass die drei Messungen sowohl für die Frequenzabnahmen, als auch für die Dissipationszunahmen unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Es war nicht möglich das Verhalten der Vesikel in hochreinem Wasser auf aktiviertem P19 reproduzierbar zu messen.

Die resultierenden Frequenzabnahmen wurden mit den Literaturwerten der Bildung einer Lipid-Doppelschicht ($\Delta f = 13 \text{ Hz}$)⁴³ und der Vesikeladsorption ($\Delta f = 360 \text{ Hz}$; POPC/POPE (98/2)-Vesikel)⁵⁹ verglichen.

Daraus lässt sich schließen, dass man in keiner der drei Messungen von einer Bildung einer Doppelschicht oder der erfolgreichen Adsorption einer homogenen Vesikelschicht ausgehen kann. Es kann eine Oberfläche mit wenigen Vesikeln und vereinzelt Lipid-Domänen vermutet werden.

5.3.2 Verhalten der Vesikel auf verschiedenen funktionalisierten Oberflächen in PBS

Ein Grund für die geringe Kupplungseffizienz der Vesikel in hochreinem Wasser könnte die mangelnde Reaktivität der Amino-Gruppe des DOPEs gewesen sein. Der pH-Wert des verwendeten hochreinem Wassers lag im leicht Sauren (pH=5,5). Durch die Verwendung von Phosphat gepufferter Saline (PBS) lässt sich aufgrund des neutral-basischen pH-Wertes von PBS (pH=7,4) die Nucleophilie der Amino-Gruppe erhöhen. Folglich kann wahrscheinlich durch den Wechsel zu PBS eine Reaktivitätssteigerung des Amins und somit eine erhöhte Effizienz der Kupplung erzielt werden.

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) und der Quarzmikrowaage (QCM-D) wurde untersucht, wie sich die Vesikel in PBS verhalten.

a) Verhalten von Vesikeln auf aktivierter MUS

Nach der Untersuchung des Verhaltens der Vesikel in hochreinem Wasser war die Erkenntnis, dass keine Kupplung oder Adsorption der Vesikel an aktivierte MUS oder nicht-funktionalisierte Oberflächen messbar war.

Es wurde zunächst mit Hilfe der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) untersucht, welches Verhalten die Vesikel in PBS und an aktivierter MUS hatten. Das Ergebnis der SPR-Messung von Vesikeln in PBS an aktivierte MUS ist in Abbildung 5.13 dargestellt.

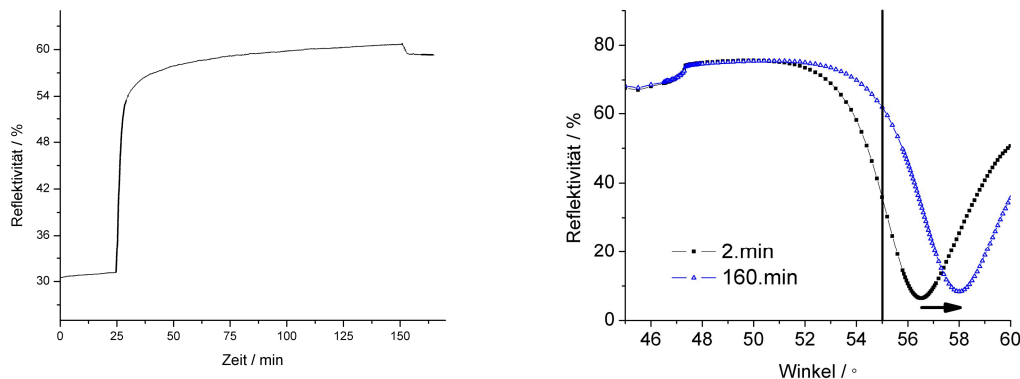


Abbildung 5.13: Die Kinetikmessung bei einem Winkel von 55,21° (links) und die nach 2 min (■) und nach 160 min (Δ) aufgenommenen winkelabhängigen Messungen (rechts) der Reaktion der Vesikel in PBS mit aktivierter MUS.

Die Kinetikmessung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (25. min) eine Zunahme der Reflektivität auf 60.3 %, welche sich nach dem Waschen mit PBS (190. min) kaum veränderte.

Die winkelabhängigen Messungen, welche vor der Zugabe der Vesikel-Lösung (Abbildung 5.13 rechts ■) und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem

Waschen mit PBS (Abbildung 5.13 rechts Δ) gemacht wurden, zeigten eine Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel um $1,45^\circ$.

Sowohl die Reflektivitätszunahme um 30 %, die einer hohen Massenzunahme entspricht, als auch die Winkelverschiebung zu höheren Winkeln, lassen sich auf die Kupplung bzw. starke Adsorption der Vesikel an MUS und dem Kupplungsreagenz zurückführen.

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde die Reaktion der Vesikel an aktivierte MUS in PBS mittels der Quarzmikrowaage (QCM-D) wiederholt,

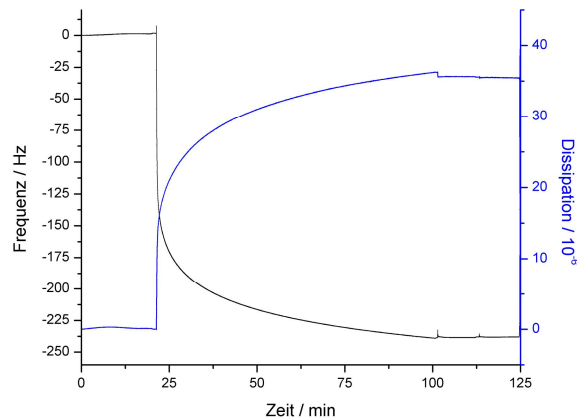


Abbildung 5.14: Frequenz- und Dissipationsänderung bei Zugabe von Vesikeln auf aktivierter MUS in PBS.

Die Messung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (21.min) eine Frequenzabnahme um 238,8 Hz, was mit einer Massenzunahme gleichzusetzen ist. Gleichzeitig nahm die Dissipation, welche Informationen über die Elastizität einer Oberfläche liefert, auf einen Wert von $35,6 \times 10^{-6}$ zu. Nach dem Waschen (101.min und 114.min) blieben die Werte für die Frequenz und Dissipation nahezu unverändert. Daraus kann gefolgert werden, dass die Moleküle auf der Oberfläche bleiben und nicht durch Waschen mit Puffer entfernt werden konnten. Die Frequenzabnahme wurde mit dem Literaturwert für die Kupplung von 50 nm-großen POPC/POPE(98/2)-Vesikel an aktivierte MUS verglichen.⁵⁹ Dieser Literaturwert wird mit $\Delta f=361$ Hz angegeben und lag näher an dem Ergebnis

dieser Messung ($\Delta f=238,8$ Hz) als an einer der drei vorherigen Messungen in hochreinem Wasser auf aktiviertem P19 ($\Delta f= 5,1$ Hz; $30,8$ Hz und $90,8$ Hz).

Die Dissipationszunahme war mit $35,6 \times 10^{-6}$ fast um das siebenfache höher als bei den Messungen in Kapitel 5.3.1 und lag damit viel höher als der in der Literatur angegebene Wert für Doppelschichten von $1,2 - 2 \times 10^{-6}$.⁴³

Wie in Kapitel 3.2 erklärt, hängt die Frequenzabnahme von der Zunahme der Masse ab und die Dissipationszunahme gibt Informationen über eine Zunahme der Elastizität der gebundenen Schicht. Deshalb kann vermutet werden, dass die Vesikel in PBS zum größten Teil intakt blieben und an aktiviertes P19 kuppeln oder adsorbieren.

b) Verhalten von Vesikel auf aktiviertem P19

Aus dem Vergleich der SPR-Messung und der QCM-D-Messung vom Verhalten der Vesikel in PBS auf aktivierter MUS lässt sich folgern, dass es zu einer Kupplung oder Adsorption der Vesikel kommt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich dieses Resultat nur auf aktivierte MUS beschränkt oder ob die Vesikel auch auf aktiviertes P19 gekuppelt oder adsorbiert werden können.

Der Anlagerungsprozess von Vesikel in PBS auf aktivierten P19 wurde mittels der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.15 dargestellt.

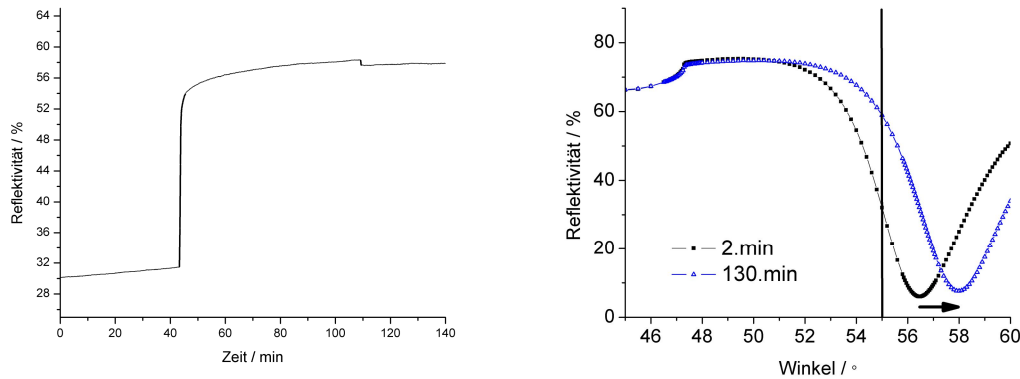


Abbildung 5.15: Die Kinetikmessung bei einem Winkel von $55,07^\circ$ (links) und die vor Vesikelanlagerung (■) und die nach Vesikelanlagerung (nach 130 min, ▲) aufgenommenen winkelabhängigen Messungen (rechts) der Reaktion von Vesikeln in PBS mit aktiviertem P19.

Die Kinetikmessung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (43. min) eine Reflektivitätszunahme um 30 %.

Die winkelabhängigen Messungen, welche vor der Zugabe der Vesikel-Lösung (Abbildung 5.15 rechts ■) und nach der Zugabe der Vesikel-Lösung und dem Waschen mit PBS (Abbildung 5.15 rechts ▲) gemacht wurden, zeigten eine Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel um $1,5^\circ$. Die Reflektivitätszunahme in der Kinetik-Messung und die Verschiebung des Minimums der winkelabhängigen Messungen können, wie in Kapitel 3.3.2 erklärt, auf die Kupplung oder Adsorption einer Vesikel-Schicht an aktiviertes P19 zurückgeführt werden.

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde die Reaktion der Vesikel in PBS an aktivierte P19 mittels der Quarzmikrowaage (QCM-D) wiederholt.

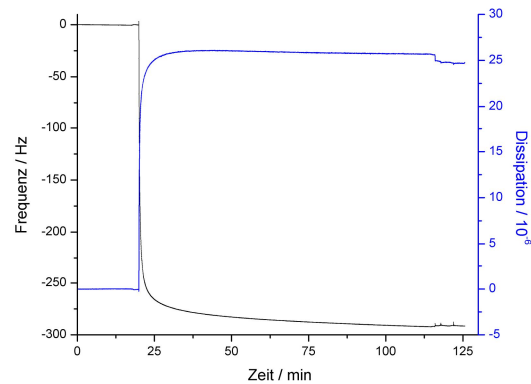


Abbildung 5.16: Frequenz- (schwarze Kurve) und Dissipationsänderung (blaue Kurve) bei Zugabe von Vesikeln in PBS auf aktiviertes P19.

Die Messung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (20.min) eine Abnahme der Frequenz um 291.8 Hz und eine gleichzeitige Zunahme der Dissipation auf $25,7 \times 10^{-6}$. Nach dem Waschen mit PBS (116.min und 122.min) blieben die Werte für die Frequenz und Dissipation nahezu unverändert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Vesikel fest an die Oberfläche binden.

Die Frequenzabnahme wurde mit dem Literaturwert für die Kupplung von 50 nm-großen POPC/POPE(98/2)-Vesikel an aktivierte MUS verglichen. Der Literaturwert von $\Delta f = 361$ Hz lag näher an dem Ergebnis dieser Messung ($\Delta f = 291,8$ Hz) als an der Messung vom Verhalten der Vesikel in PBS auf aktivierter MUS ($\Delta f = 238,8$ Hz).⁵⁹ Beide Messungen zeigten aber eine Frequenzabnahme, die viel höher war als sie für eine Lipid-Doppelschicht (Literaturwert: $\Delta f = 26$ Hz) erwartet gewesen wäre.⁴³

Die Dissipationszunahme war mit $25,7 \times 10^{-6}$ niedriger als bei der Messung der Vesikel in PBS auf aktivierter MUS ($35,6 \times 10^{-6}$) und viel höher als der Literaturwert für Doppelschichten ($1,2 - 2 \times 10^{-6}$).⁴³

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann vermutet werden, dass die Vesikel in PBS an aktiviertes P19 kuppeln oder adsorbieren.

Zur Überprüfung ob es sich um eine Vesikel-Kupplung oder eine Vesikel-Adsorption an P19 handelt, wurde eine QCM-D-Messung durchgeführt, bei welcher die Vesikel in PBS auf das nicht-aktivierte P19 aufgetragen wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

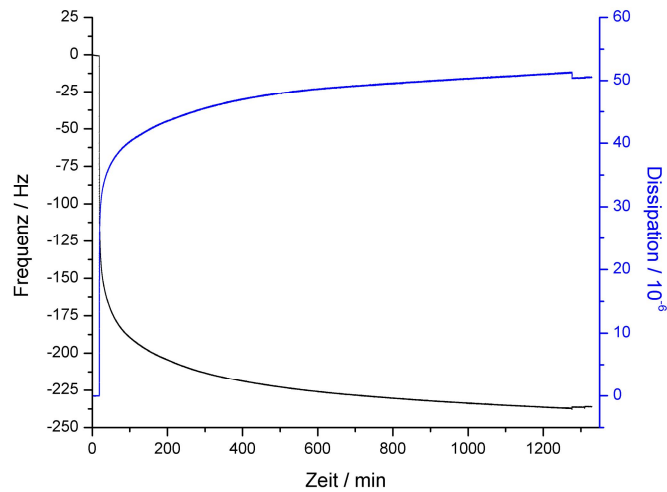


Abbildung 5.17: Frequenz- (schwarze Kurve) und Dissipationsänderung (blaue Kurve) bei Zugabe von Vesikeln in PBS auf nicht-aktiviertes P19.

Die Messung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (16.min) eine Abnahme der Frequenz um 237,2 Hz und eine gleichzeitige Zunahme der Dissipation auf $51,1 \times 10^{-6}$. Nach dem Waschen mit PBS (1274.min) blieben die Werte für die Frequenz und Dissipation nahezu unverändert. Es kann folglich von einer starken Adsorption der Vesikel ausgegangen werden.

Die Frequenzabnahme dieser Messung ($\Delta f=237,2\text{Hz}$) war niedriger als bei der Messung des Verhaltens der Vesikel auf aktiviertem P19 ($\Delta f=291,8\text{ Hz}$) und minimal niedriger als bei der Messung vom Verhalten der Vesikel in PBS auf aktivierter MUS ($\Delta f=238,8\text{Hz}$).

Die Dissipationszunahme war mit $51,1 \times 10^{-6}$ höher als bei der Messung der Vesikel in PBS auf aktiviertem P19 oder aktivierter MUS ($35,6 \times 10^{-6}$; $25,7 \times 10^{-6}$).

Da die Frequenzabnahme im gleichen Bereich wie bei den Messungen des Verhaltens der Vesikel auf aktiviertem P19 und aktivierter MUS lagen und auch eine hohe Dissipationszunahme messbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die Vesikel ebenfalls an die nicht-aktivierte Oberfläche adsorbierten.

Folglich ist für die Anbindung der Vesikel in PBS an die Abstandhalter keine Aktivierung von P19 oder MUS mit EDC und PFP nötig. Aufgrund der hohen Adsorption der Vesikel an nicht-aktiviertes P19 (Abbildung 5.17) und dem dazu ähnlichem Ergebnis der Messung mit aktiviertem P19 (Abbildung 5.16), kann bei den Untersuchungen der Vesikel an aktiviertes P19 nicht zwischen adsorbierten und kovalent gebundenen Vesikel unterschieden werden.

Um zu überprüfen, ob der Abstandhalter für die Adsorption der Vesikel in PBS benötigt wird, wurde eine QCM-D-Messung durchgeführt. Das Ergebnis der Messung, bei welcher die Vesikel in PBS direkt auf die Goldoberfläche des Quarzmikrokristalls aufgetragen wurde, ist in Abbildung 5.18 dargestellt.

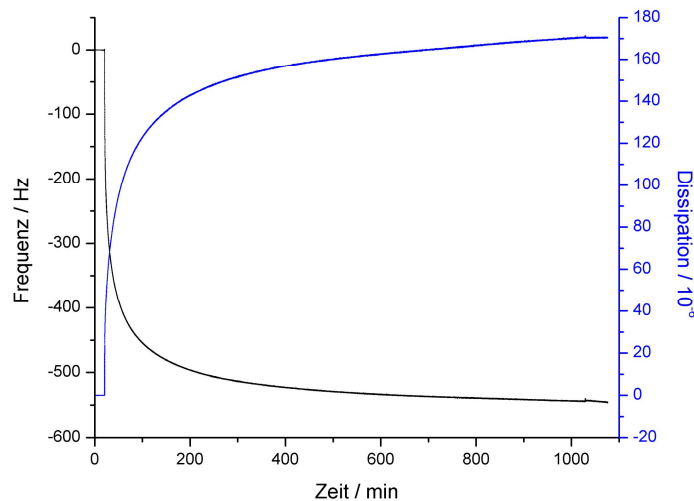


Abbildung 5.18: Frequenz- (schwarze Kurve) und Dissipationsänderung (blaue Kurve) bei Zugabe von Vesikeln in PBS auf Gold.

Die Messung zeigte nach Zugabe der Vesikel-Lösung (20.min) eine Abnahme der Frequenz um 543,5 Hz und eine gleichzeitige Zunahme der Dissipation auf

$170,1 \times 10^{-6}$. Nach dem Waschen mit PBS (1029.min) blieben die Werte für die Frequenz und Dissipation nahezu unverändert, was für eine feste Bindung der Vesikel an Gold sprach.

Die Werte für die Frequenzabnahmen und Dissipationszunahmen bei allen Messungen in PBS werden in Tabelle 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.8: Frequenzabnahmen und Dissipationsabnahmen für die QCM-D-Messung des Verhaltens von Vesikeln in PBS auf verschiedenen Oberflächen.

Vesikel...	Frequenzabnahme / Hz	Dissipationszunahme / 10^{-6}
Auf aktivierte MUS	238,8	35,6
Auf aktiviertes P19	291,8	25,7
Auf nicht-aktiviertes P19	237,2	51,1
Auf Gold	543,5	170,1

Aus Tabelle 5.8 ist erkennbar, dass bei der Messung von Vesikel in PBS auf Gold die Frequenzabnahme ungefähr doppelt so hoch und die Dissipationszunahme mehr als 3-mal so hoch als es bei den anderen Messungen der Fall war.

Die Frequenzabnahme entspricht einer Massenzunahme und die Dissipationszunahme einer Zunahme der Flexibilität der angebundenen Schicht. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass bei der Messung des Verhaltens von Vesikel in PBS auf Gold eine höhere Anzahl an intakten Vesikeln auf der Oberfläche adsorbieren. Eine andere Vermutung wäre, dass anhand des Vergleiches der Dissipationszunahmen und Frequenzabnahmen eine teilweise stattfindende Vesikelfusion auf aktivierten bzw. nicht-aktivierten Abstandhalter bedeckten Oberflächen, zu erkennen ist.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen von Vu et al., bei denen die Frequenzabnahmen bei aktivierter Oberfläche höher war, als es bei der Adsorption an der Goldoberfläche der Fall ist.⁵⁹ Da Vu et al. allerdings keine

Aussagen über den verwendeten Puffer machten, könnte dies ein Grund für die beobachtete Abweichung sein.

Der hohe Einfluss des verwendeten Puffers wurde hier anhand der Unterschiede des Verhaltens von Vesikeln an Oberflächen in hochreinem Wasser und in PBS gezeigt. Die Werte der SPR- und QCM-D-Messungen in PBS ließen eine starke Adsorption und teilweise Fusion einer hohen Anzahl an Vesikeln mit der Oberfläche vermuten.

Vesikeladsorption

Die Ergebnisse der SPR- und QCM-D-Messungen ließen vermuten, dass die Vesikel in PBS sowohl an aktivierte MUS (Abbildungen 5.13 und 5.14) und aktiviertes P19 (Abbildungen 5.15 und 5.16) als auch an Gold (Abbildung 5.18) bzw. P19 ohne Kupplungsreagenz (Abbildung 5.17) adsorbieren.

Da mit SPR und QCM-D nur die auf eine Fläche gemittelte Massenzunahme bestimmt werden kann, haben diese den Nachteil, dass keine Informationen über die Verteilung der Moleküle auf der Oberfläche geliefert werden können. Zudem ist bei der QCM-D-Messung, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, die Verwendung der Sauerbrey-Gleichung für die Berechnung einer exakten Massenzunahme nicht mehr möglich, da für die hier gemessenen Daten zu hohe Dissipationszunahmen vorlagen (Dissipationszunahmen waren pro 10 Hz Frequenzabnahme $> 1 \times 10^{-6}$).⁴²

Die laterale Auflösung oder das genaue Profil der Oberfläche kann, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, mittels der Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht werden.

Folglich wurde das AFM benutzt um die mit SPR und QCM-D gewonnenen Daten interpretieren zu können.

Es wurde mittels AFM untersucht, ob die an Gold oder den nicht-aktivierten Abstandhalter adsorbierten Vesikel die Oberfläche vollständig belegen oder es dazwischen noch unbelegte Bereiche gibt.

a) Adsorption von Vesikeln an Gold

In Abbildung 5.19 ist die Charakterisierung einer unspezifischen Vesikeladsorption auf reinem Gold als Höhenbild (A) und im Höhenprofil (B) zu sehen.

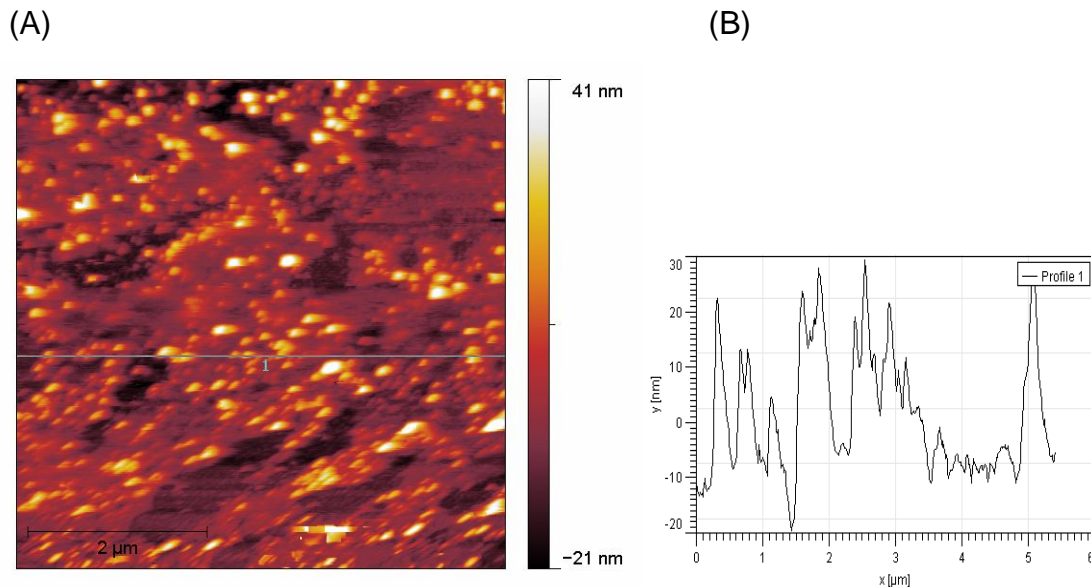


Abbildung 5.19: AFM-Messung von Vesikeln in PBS auf einer Goldoberfläche. (A) Höhenbild; (B) Höhenprofil (B), entlang der grauen Linie in (A).

Das Höhenbild (Abbildung 5.19 A) und das Höhenprofil (Abbildung 5.19 B) zeigen eine unvollständige Belegung der Oberfläche mit Objekten verschiedener Größe, die von der Höhe her Vesikel (vermuteter Durchmesser der Vesikel = 40 nm) sein könnten, und vereinzelt Lipid-Domänen. Die gemessenen Höhenunterschiede der gleich-großen Vesikeln könnten an den Wechselwirkungen zwischen der AFM-Spitze und den Vesikeln gelegen haben.⁴⁶ Die Vesikelfusion auf eine Goldoberfläche wird in der Literatur ausführlich beschrieben.^{29, 60} Das Auftreten von „Lipid-Domänen“ könnte ein Zeichen dafür sein, dass einzelne Vesikel an der Goldoberfläche fusionieren. Die erwünschte homogene und dichte Verteilung der Vesikel auf der Gold-Oberfläche konnte nicht gemessen werden.

b) Adsorption von Vesikeln an P19 (ohne Kupplungsreagenz)

Die Untersuchung des Verhaltens der Vesikel in PBS auf Gold führte zu dem Ergebnis, dass keine vollständige Belegung stattfand. In den folgenden Messungen wurde deshalb untersucht, ob eine vollständige Belegung durch Adsorption von Vesikel in PBS auf nicht-aktivierten Abstandhaltern möglich ist. In Abbildung 5.20 wird das Ergebnis der AFM-Messung vom Verhalten der Vesikel in PBS auf nicht-aktiviertem P19 gezeigt.

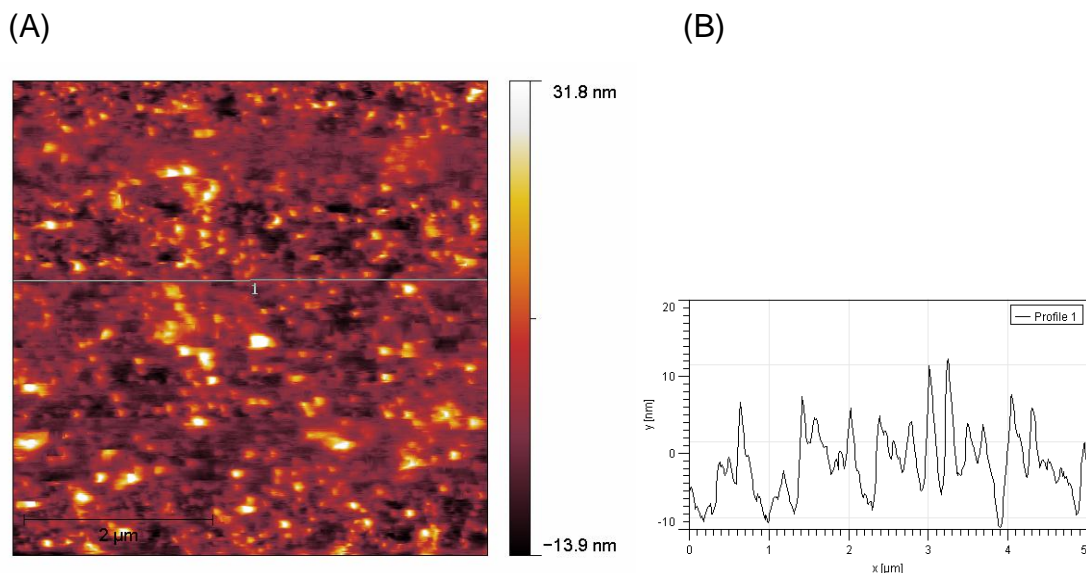


Abbildung 5.20: AFM-Messung von Vesikeln in PBS auf nicht-aktiviertem P19. (A) Höhenbild; (B) Höhenprofil (B), entlang der grauen Linie in (A).

Das Höhenbild (Abbildung 5.20 A) und das Höhenprofil (Abbildung 5.20 B) zeigen, wie unter a) (in Abbildung 5.19), eine statistische Verteilung von Vesikeln verschiedener Größe und vereinzelt Lipid-Domänen. Es kann, wie schon auf der reinen Goldoberfläche beobachtet, auch auf dem nichtaktivierten P19 keine homogene und dichte Belegung der Vesikel auf der Oberfläche beobachtet werden.

c) Adsorption von Vesikeln an MUS (ohne Kupplungsreagenz)

Bei den AFM-Messungen der Vesikel in PBS auf Gold (Abbildung 5.19) und auf nicht-aktiviertem P19 (Abbildung 5.20) waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Bei beiden Untersuchungen fand keine dichte bzw. vollständige Belegung von Vesikeln an der Oberfläche statt.

In der in Abbildung 5.21 dargestellten AFM-Messung wurde untersucht, ob auch die Adsorption von Vesikel in PBS auf MUS zu einer statistischen Verteilung der Vesikel führt oder es zu einer dichten und vollständigen Belegung kommen kann.

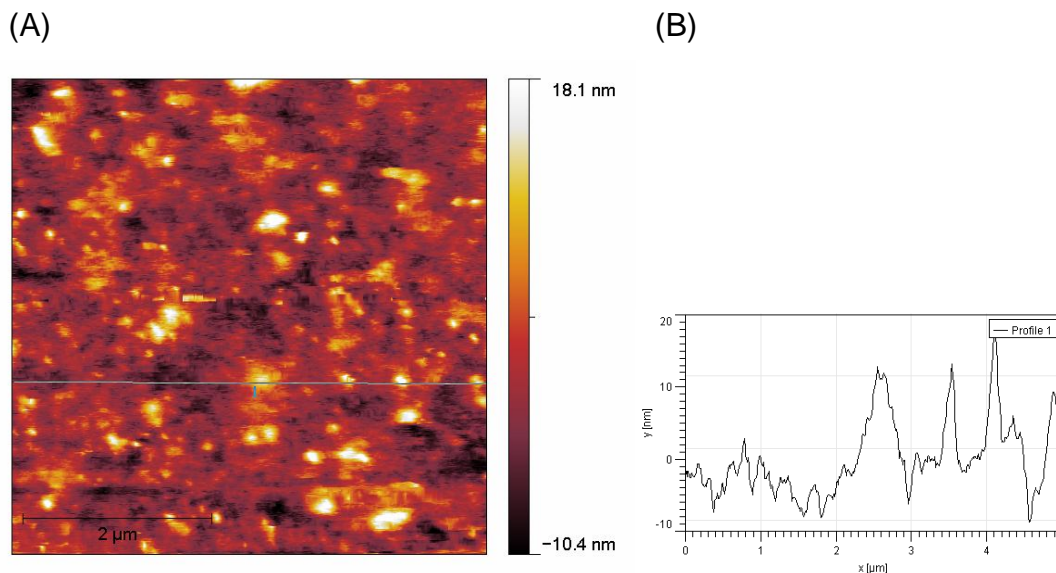


Abbildung 5.21: AFM-Messung von Vesikeln in PBS auf nicht-aktivierter MUS. (A) Höhenbild; (B) Höhenprofil ((B), entlang der grauen Linie in (A)).

Das Höhenbild (Abbildung 5.21 A) und das Höhenprofil (Abbildung 5.21 B) zeigen, wie bei den AFM-Messungen der Vesikeladsorption auf Gold (Abbildung 5.19) und auf nicht-aktiviertem P19 (Abbildung 5.20), eine statistische Verteilung von Vesikeln verschiedener Größe und vereinzelt Lipid-Domänen. Es kann folglich auch bei dieser Messung keine vollständige Belegung der Oberfläche beobachtet werden.

Aus dem Vergleich von Abbildung 5.21 mit Abbildung 5.19 und 5.20 ergibt sich, dass die Vesikel in PBS an Gold und nicht-aktiviertem Abstandhalter adsorbieren. Dieses Ergebnis entspricht der Erkenntnis aus den QCM-D-Messungen (Abbildungen 5.17 und 5.18).

Eine dichte und vollständige Belegung der Vesikel an der Oberfläche konnte weder an Gold, nicht-aktivierter MUS oder nicht-aktiviertem P19 gemessen werden. Es waren jedoch in allen drei Messungen Lipid-Domänen erkennbar, die aus einer Vesikelfusion resultieren könnten.

Aus dem Ergebnis der SPR, QCM-D und AFM-Untersuchungen folgt, dass bei dem „Vesikel-System“, welches durch Vesikeladsorption in PBS an einer Oberfläche entstand, keine einheitliche Vesikelbelegung resultierte. Aufgrund der Möglichkeit, dass teilweise Vesikel mit der Oberfläche fusionierten und so eine Doppelschicht bildeten, ist dieses System für eine weitere Optimierung und Betrachtung interessant.

5.4 „Rapid Solvent Exchange“ (RSE)

Während der Optimierung der Kupplungsreaktion (Kapitel 5.2) wurde beobachtet, dass die Kontaktwinkelmessung nach dem Waschen des Substrates, auf welchem in Chloroform gelöstes DOctPE an das aktivierte P19 oder aktiviertes, modifiziertes P19 gekuppelt wurde, mit hochreinem Wasser einen kaum messbaren Wert zwischen 5-15° ergab. Nachdem das Substrat ausgiebig mit reinem Ethanol gewaschen wurde, ergab die Kontaktwinkelmessung, je nach Abstandhalter und dessen Konzentration, einen Wert zwischen 65-85° (siehe Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9: Kontaktwinkel nach Kupplung der Lipide an mit verschiedenen Abstandhaltern bedeckte Substrate.

	Kontaktwinkel / °
a) 0,01mg/ml	
mod. P19-EDC/PFP-DOctPE _(CHCl3)	82,0±1,2
mod. P19-DOctPE _(CHCl3)	61,7±2,3
b) 0,02mg/ml	
P19(mod)-EDC/PFP-DOctPE _(CHCl3)	83,8±1,7
P19-EDC/PFP-DOctPE _(CHCl3)	63,5±1,5
P19-DOctPE _(CHCl3)	59,9±1,1

Aus Tabelle 5.9 ist zu entnehmen, dass die Oberfläche nach der Kupplung des DOctPE an modifiziertes P19 hydrophober war als es nach der Kupplungsreaktion an normales P19 der Fall war. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass modifiziertes P19 einen Asparaginsäure-Terminus anstelle eines Arginin-Restes besitzt und damit eine Carboxy-Gruppe zusätzlich für die Kupplung des Lipids an den Abstandhalter zur Verfügung steht.

Modifiziertes P19 besitzt folglich eine höhere Kupplungseffizienz als normales P19.

Eine weitere Erkenntnis aus Tabelle 5.9 ist die minimal erhöhte Hydrophobizität bei einer Peptidkonzentration von 0,02 mg/mL im Vergleich zu 0,01 mg/mL. Diese Erhöhung des Kontaktwinkels liefert, wie die Erkenntnisse aus Kapitel 5.1, einen Beleg für die Notwendigkeit die Konzentration des modifizierten P19 zu erhöhen.

Der schnelle Austausch vom organischen zum wässrigen Milieu entspricht einem Wechsel vom besseren in das schlechtere Lösungsmittel und führte dazu, dass sich die Alkylketten der gelösten Lipide zu den Alkylketten der gebundenen Lipide orientieren und ihr hydrophiler Kopf in Richtung des hydrophilen, sie umgebenden Mediums orientiert. Die Folge ist die beobachtete hydrophile Oberfläche.

In Abbildung 5.22 ist eine schematische Darstellung der Lipidanlagerung an die Oberfläche gezeigt:

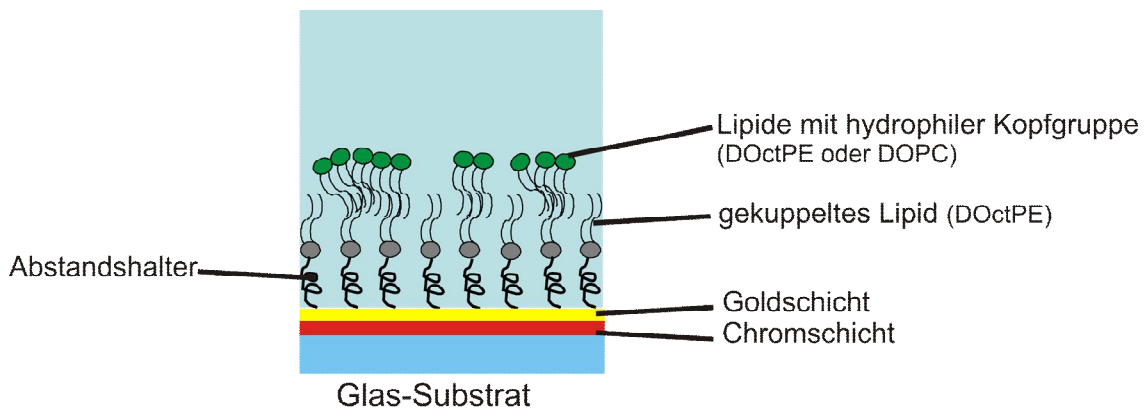


Abbildung 5.22: Schematische Darstellung der Lipidanlagerung an die Alkylketten der Monoschicht.

Die Oberfläche war dann aufgrund des „Abspülens“ der ungebundenen Lipide mit organischem Lösungsmittel hydrophob. Dieses Phänomen ist auch bekannt unter dem Namen „*Rapid Solvent Exchange*“ (RSE)⁶¹ und ist in Abbildung 5.23 erklärt.

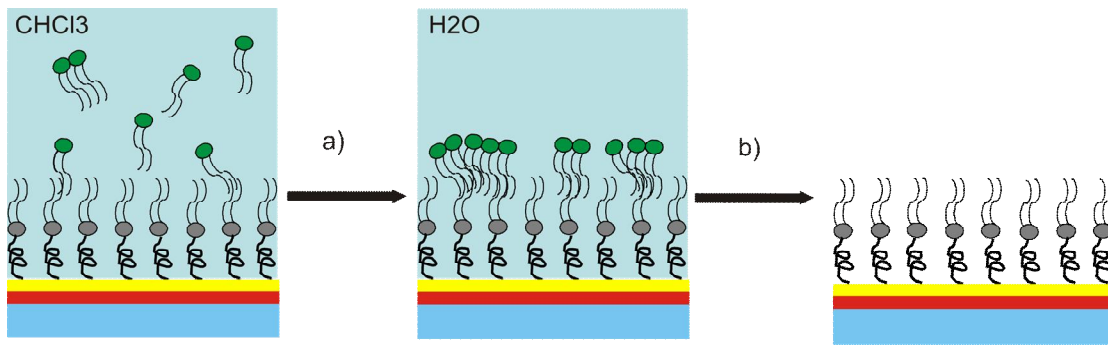


Abbildung 5.23: Schematische Darstellung des Rapid Solvent Exchanges mit auf eine Goldschicht (blau = BK7-Glassubstrat; rot = 2 nm Chromschicht; gelb = 50 nm Goldschicht) gebundener Monoschicht (Abstandhalter P19 (schwarze Helices), Lipid (grau)) sowie Lipiden (grün), die entweder in einem gut solvatisierenden Medium (z.B. Chloroform) ungebunden oder nach Waschen mit Wasser (Schritt a)) an die Alkylketten angelagert vorliegen. Durch Waschen mit organischem Lösungsmittel können diese Alkylketten wieder weggespült (Schritt b)) werden.

Zunächst liegt eine fest an das Substrat gebundene Monoschicht und nicht-umgesetzte gelöste Lipide in einem gut solvatisierenden organischen Medium vor (Abbildung 5.23 links). In Schritt a) wird das Substrat schnell mit hochreinem Wasser gewaschen woraufhin sich die nicht-umgesetzten Lipide an die Alkylketten der bestehenden Monoschicht lagern (Abbildung 5.23 Mitte). Wenn die Konzentration der nicht-umgesetzten „freien“ Lipide in der Lösung vorher hoch genug war, kann sich eine homogene Lipid-Doppelschicht bilden (siehe Abbildung 5.24). Die angelagerten Lipide lassen sich in Schritt b) durch Waschen mit organischem Lösungsmittel wieder entfernen (Abbildung 5.23 rechts).

Zur systematischen Untersuchung des RSE wurden im folgenden System versucht eine homogene Doppelschicht auf modifiziertes P19 zu konstruieren. Eine schematische Darstellung der Lipid-Doppelschicht ist in Abbildung 5.24 gezeigt.

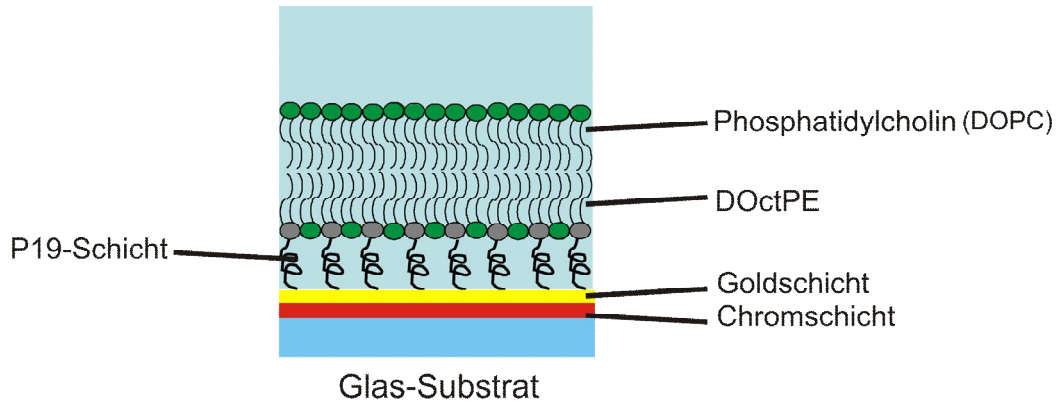


Abbildung 5.24: Schematische Darstellung einer Lipid-Doppelschicht, welche durch *Rapid Solvent Exchange* hergestellt werden kann.

Der Aufbau einer Lipid-Doppelschicht mittels RSE wurde mit der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Impedanzspektroskopie (EIS) untersucht. Der RSE wurde in der EIS-Zelle wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt. Zur Untersuchung der P19-Monolage mit Lipidschicht und der nach Rapid Solvent Exchange (RSE) entstandenen Doppelschicht wurden AFM-Messungen durchgeführt.

a) P19-Monolage mit Lipidschicht

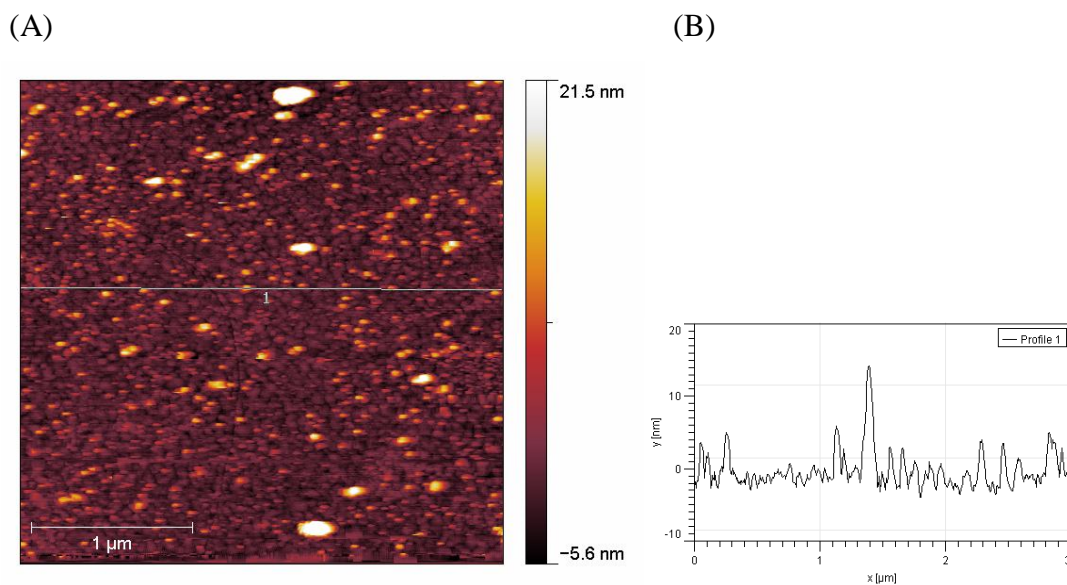


Abbildung 5.25: AFM-Messung einer P19-Monolage mit Lipidschicht. (A) Höhenbild; (B) Höhenprofil (B), entlang der grauen Linie in (A).

Das Höhenbild (Abbildung 5.25 A) und das Höhenprofil (Abbildung 5.25 B) zeigen eine homogene Schicht mit vereinzelt Lipid-Rückständen, welche durch unvollständiges Spülen auf der Oberfläche geblieben sind.

In Abbildung 5.26 ist eine in diesem Bereich aufgenommene Kraft-Abstands-Kurve gezeigt.

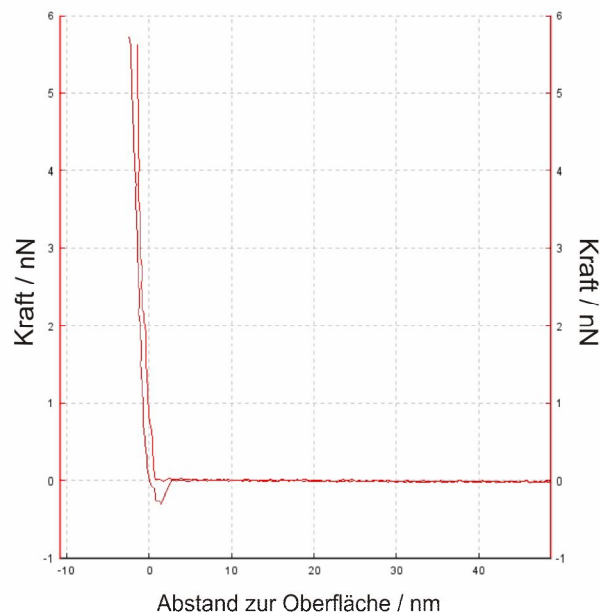


Abbildung 5.26: Kraft-Abstands-Kurve der Monoschicht

Die gemessene Kraft-Abstands-Kurve wurde mit einer typischen Kraft-Abstands-Kurve, wie sie in Kapitel 3.4 Abbildung 3.15 gezeigt wird, verglichen und zeigte keine signifikanten Unterschiede.

b) nach Rapid Solvent Exchange (RSE)

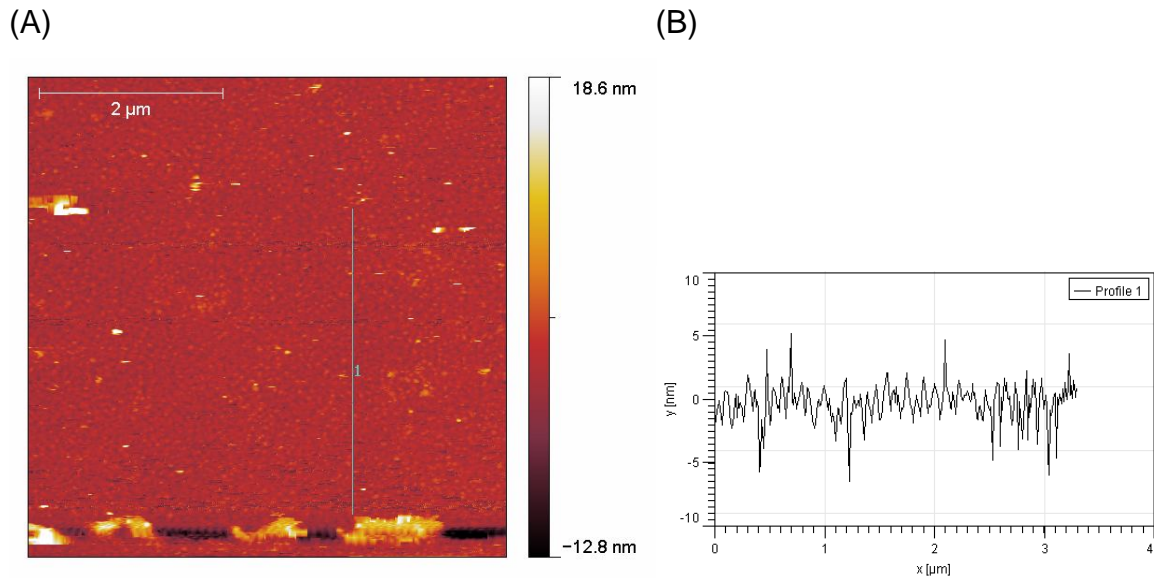


Abbildung 5.27: AFM-Messung von der Lipid-Doppelschicht nach RSE. (A) Höhenbild; (B) Höhenprofil (B), entlang der grauen Linie in (A).

Das Höhenbild (A) und das Höhenprofil (B) zeigen eine homogene Schicht. Im Vergleich zu dem Höhenbild der Monoschicht (Abbildung 5.25) sind kaum Lipid-Rückstände oder Artefakte auf der Oberfläche messbar.

Im Höhenprofil ist ein Höhenunterschied von 6-10 nm zu erkennen. Diese Höhe entspricht der Dicke einer Lipid-Doppelschicht⁶² und ist durch kleine Defekte in dieser Schicht messbar.

In Abbildung 5.28 ist die zugehörige Kraft-Abstands-Kurve gezeigt.

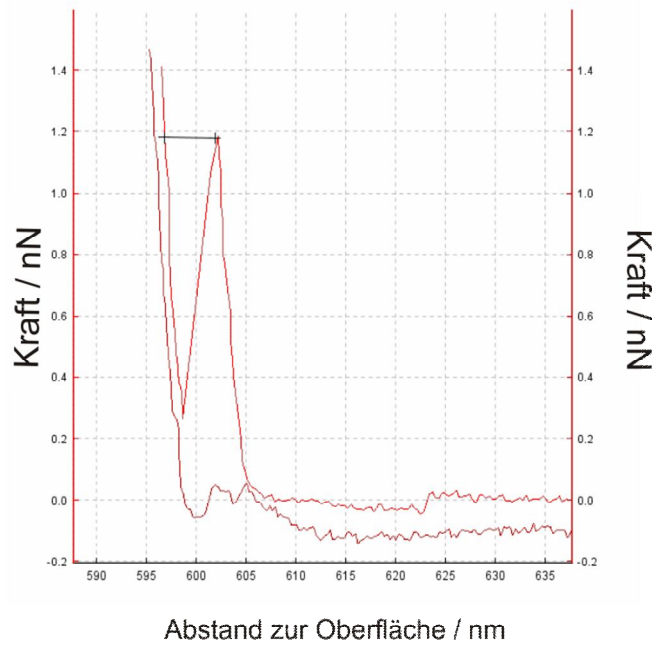


Abbildung 5.28: Kraft-Abstands-Kurve der Doppelschicht mit typischem Sprung.

Beim Vergleichen der gemessenen Kraft-Abstand-Kurve mit der Kraft-Abstands-Kurve der Monoschicht (Abbildung 5.26) ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Kraft-Abstands-Kurve der Lipid-Doppelschicht nach dem *Rapid Solvent Exchange* zeigte einen Sprung, der durch das Eindringen des *Cantilevers* in eine Lipid-Doppelschicht erklärt werden kann. Eine schematische Darstellung dieses Eindringens in die Lipid-Doppelschicht ist in Abbildung 5.29 dargestellt.

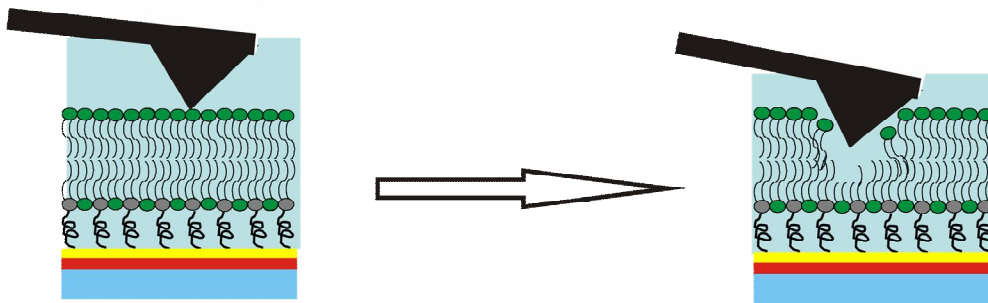


Abbildung 5.29: Darstellung des Eindringens eines Cantilevers in eine Lipid-Doppelschicht.

Zur weiteren Untersuchung der Lipid-Doppelschicht wurde die elektrochemische Impedanz-Spektroskopie (EIS) benutzt. Die EIS ist, wie in Kapitel 3.5 erklärt, geeignet Membranen auf ihre elektrischen Eigenschaften zu untersuchen. Sie ermöglicht es, eine Aussage über die Durchlässigkeit einer Lipid-Doppelschicht für Ionen treffen zu können.

In Kapitel 3.5 wird ein Äquivalenzschaltkreis vorgestellt, welcher zur Simulation einer Membran benötigt wird. Der in dieser Messung verwendete Äquivalenzschaltkreis enthielt 2 Widerstände und ein CPE (Abbildung 5.30).

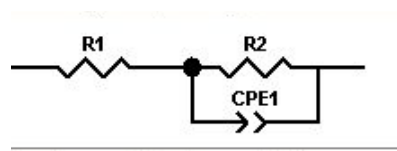


Abbildung 5.30: Äquivalenzschaltkreis für die Simulation des verwendeten Membransystems. Dieser besteht aus den Widerständen R1, R2 sowie einem „constant phase element“ (CPE).

Aus dem in Abbildung 5.31 dargestellten Bode-Plot lässt sich, wie in Kapitel 3.5 erklärt, der Widerstand und die Kapazität des gemessenen Systems ablesen.

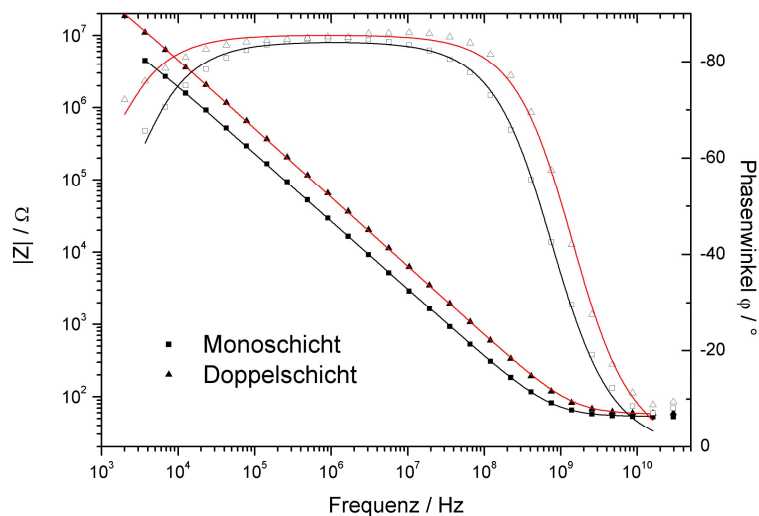


Abbildung 5.31: Bode-Plot des Rapid Solvent Exchanges vor (schwarz) und nach (rot) der Bildung der Membran.

Die Werte für die Frequenzen und die Kapazitäten lassen durch eine Simulation an die Messkurven erhalten und sind in Tabelle 5.10 dargestellt.

Tabelle 5.10: Aus EIS-Messung resultierende Widerstände und Kapazitäten für P19-Monolage und Lipid-Doppelschicht.

	Widerstand / $M\Omega \cdot cm^2$	Kapazität / $\mu F/cm^2$
P19-Monolage mit Lipidschicht	3,5	24,0
Lipid-Doppelschicht	19,4	10,9

Wie in Tabelle 5.10 dargestellt, resultierte aus der EIS-Messung für die Monoschicht (schwarz), welche aus P19 und daran gekoppeltem DOctPE bestand, ein Widerstand von $3,51 M\Omega \cdot cm^2$ und eine Kapazität von $23,96 \mu F/cm^2$. Für die Doppelschicht wurden ein Widerstand von $19,42 M\Omega \cdot cm^2$ und eine Kapazität von $10,86 \mu F/cm^2$ gemessen. Die Doppelschicht bestand aus dem DOctPE, welches an P19 gekuppelt wurde, und DOPC. Sie besitzt einen mehr als 4mal höheren Widerstand als die Monoschicht. Der Widerstand vergrößert sich bei geringerer Durchlässigkeit der Ionen durch die Membran. Deshalb kann angenommen werden, dass die vierfache Erhöhung des Widerstands auf eine erfolgreiche Bildung einer Doppelschicht zurückzuführen ist.

Die Kapazität der Doppelschicht war weniger als halb so groß wie die Kapazität der Monoschicht. Die Kapazität ist umgekehrt proportional zur Schichtdicke. Je niedriger die Kapazität umso dicker die Schicht, die sich auf der Oberfläche befindet. Aus diesem Grund kann die Abnahme der Kapazität bei Bildung der Doppelschicht als eine Schichtdickenzunahme interpretiert werden.

Die gemessenen Kapazitäten für Mono- und Doppelschicht wurden mit den Literaturwerten der Kapazitäten für Gold⁶³ ohne eine Belegung ($C=10-50\mu F/cm^2$) und einer Doppelschicht mit wenigen Defekten⁶⁴ (DPhyTL als stabilisierende Schicht $C=0,77\mu F/cm^2$) verglichen.

Anhand dieser Vergleiche lässt sich erkennen, dass die ersten Ergebnisse zwar viel versprechend waren, aber die über RSE hergestellte Doppelschicht noch nicht defektfrei ist.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Lipid-Membran-System zu optimieren und zu charakterisieren, das sich zukünftig auch für den Einsatz als Biosensor-Matrix eignet. Dazu wurde (i) die kovalente Anbindung von Lipiden bzw. Lipid-Vesikeln an goldgebundene Peptide oder Alkanthiole untersucht und (ii) die Herstellung einer planaren peptid-gestützten Lipid-Doppelschicht mittels „Rapid-Solvent-Exchange“ (RSE) optimiert.

Der erste Schritt zur Herstellung einer molekül-gestützten Lipid-Membran lag in der Optimierung der Anbindung des abstandgebenden Anker-moleküls an eine planare Goldoberfläche. Zur Bestimmung der Ankerdichte des Peptides „P19“ wurden verschieden konzentrierte P19-Lösungen (0,01 mg/mL, 0,02mg/mL und 0,05 mg/mL) auf eine Goldoberfläche gegeben und die Anlagerung der P19 Moleküle mittels Quarzkristallmikrowaage (QCM-D) gemessen. Die effizienteste Belegungsdichte an der Oberfläche ergab sich bei einer Konzentration von 0.02 mg/mL P19.

Um eine Lipid-Membran kovalent an einen Abstandhalter zu binden, ist eine Kupplungsreaktion zwischen den reaktiven Gruppen des Abstandhalters und der Membran-Lipide erforderlich. In dieser Arbeit wurde die Kupplung zwischen der Amino-Gruppe von Lipiden (DMPE oder DOctPE) und der Carboxy-Gruppe eines Abstandhalters (P19 oder MUS) untersucht. Als Abstandshalter wurde das Peptid „P19“ oder das Alkanthiol „MUS“ (Mercaptoundekansäure) eingesetzt. Zur erfolgreichen Kupplung zwischen Anker-molekül und Lipid sollten Kupplungsreagenzien eingesetzt werden, welche die Carboxy-Gruppe des Abstandhalters aktivieren und so den nukleophilen Angriff der Amino-Gruppe erleichtern. Es wurde die Effizienz der Kupplungsreagenzien NHS, S-NHS, PFP und TFP-S, jeweils in Verbindung mit EDC, untersucht. Der Erfolg der Kupplungsreaktion wurde anhand der Hydrophobizität der angebundenen Lipid-Monoschicht mittels Kontaktwinkelmessungen abgeschätzt. Zur Vereinfachung

wurde zunächst ein Testsystem, bestehend aus dem Anker-Molekül MUS und dem Lipid DOctPE aufgebaut und die Kupplung im organischen und wässrigen Milieu untersucht. Die Erkenntnisse aus der Untersuchung des Testsystems wurden auf das Peptid P19 übertragen. Die effektivste Kupplung von DOctPE an den Abstandhalter P19 wurde durch eine Aktivierung mittels EDC und PFP in Chloroform erreicht.

Anschließend wurde die Anbindung von Lipid-Vesikeln, in hochreinem Wasser oder phosphat gepufferter Saline (PBS), an das Peptid P19 und an MUS mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) und QCM-D verglichen.

Das Verhalten der Vesikel in hochreinem Wasser auf verschiedenen Oberflächen zeigte, dass keine dichte und homogene Vesikelschicht adsorbiert oder gekuppelt wurde. Folglich kann eine Oberfläche mit wenigen Vesikeln und vereinzelt Lipid-Domänen vermutet werden.

Die Untersuchungen des Verhaltens der Vesikel in phosphat gepufferter Saline auf verschiedenen Oberflächen ließen vermuten, dass eine höhere Anzahl an Vesikeln auf der Oberfläche adsorbierte oder kuppelte. Um die Vesikel-Adsorption von der Vesikel-Kupplung zu unterscheiden, wurden Kontrollmessungen auf nicht-aktivierten Abstandhaltern (P19 oder MUS) sowie auf unbehandeltem Gold durchgeführt. Das Ergebnis der Messungen zeigte eine hohe Adsorption der Vesikel in PBS an nicht-aktiviertes P19 und nicht-aktiviertes MUS, sowie eine im Vergleich dazu höhere Adsorption der Vesikel an Gold. Die adsorbierten Vesikel waren während der Messungen stabil und nicht wegwaschbar. Um zu analysieren, ob es sich bei den adsorbierten Vesikeln um eine dichte und homogene Schicht handelte, wurde das Oberflächenprofil mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht.

Aus den AFM-Messungen von Vesikeln in phosphat gepufferter Saline auf nicht-aktiviertem P19, nicht-aktivierter MUS und Gold resultierte, dass keine dichte und homogene Vesikelschicht vorlag. Insofern ergaben sowohl die QCM-D Messungen, als auch die Rasterkraftmessungen ein konsistentes Bild von der

Oberfläche: eine unvollständige Bedeckung mit einzelnen Vesikeln, bzw. Lipiddomänen.

Alternativ zu der Vesikel-Anbindung wurde der Aufbau einer Lipid-Doppelschicht durch das schnelle Austauschen von Lösungsmitteln, dem so genannten „*Rapid Solvent Exchange*“ (RSE), mittels AFM und Impedanzspektroskopie (EIS) untersucht. Die AFM-Messungen zeigten bei Betrachtung der Höhenbilder und den Kraft-Abstands-Kurven signifikante Unterschiede zwischen der P19-Monolage mit Lipidschicht und der Lipid-Doppelschicht nach dem Lösungsmittelaustausch (RSE). Die Untersuchung der hergestellten Lipid-Doppelschicht mittels EIS zeigte den für die Bildung einer Doppelschicht aus einer Monoschicht erwarteten Anstieg des Widerstandes und die erwartete Abnahme der Kapazität. Ein Vergleich der Messdaten mit den Literaturwerten für Gold und für eine dichte Lipid-Doppelschicht lassen vermuten, dass in der hergestellten Lipid-Doppelschicht Defekte vorhanden waren.

7. Ausblick

Die hier beschriebenen Untersuchungen, ergeben ein differenziertes Bild der Oberflächenarchitekturen und der dynamischen Prozesse, die mit der Vesikeladhäsion und Lipiddoppelschichtbildung zusammenhängen.

Markante Präparationsschritte, wie die Peptidkonzentration und die Kupplungsreaktionsbedingungen wurden optimiert als Folge der experimentellen Betrachtungen.

Die Untersuchung der Vesikel in PBS führte, wie in Kapitel 5.3.2 gezeigt, zu der Erkenntnis, dass eine hohe Anzahl an intakten Vesikeln an die Oberfläche adsorbierten, unabhängig davon ob aktivierte, nicht-aktivierte Abstandhalter oder reines Gold vorlag. Außer dieser Adsorption ließ sich aber auch anhand der AFM-Höhenbilder zeigen, dass die Vesikel teilweise fusionierten und eine Doppelschicht bildeten. Folglich kann ein zukünftiges Ziel sein, eine höhere Fusionseffizienz der Vesikel auf den Abstandhalter zu erreichen. Hierfür gibt es mehrere denkbare Ansätze:

- Variation der Lipid-Zusammensetzung in den Vesikeln.
- Erhöhung der Belegungsdichte von P19 und Verwendung von modifiziertem P19, da für die Untersuchungen in Kapitel 5.3 aufgrund der Vergleichbarkeit zu vorausgehenden Messungen die Konzentration von 0,01 mg/mL verwendet wurde. Es liegt nahe, die für P19 optimale Belegung von 0,02 mg/mL zu wählen (siehe Kapitel 5.1)
- Vesikelfusion durch Austausch des Lösungsmittels und dem daraus resultierenden osmotischen Druck.

Das zweite Membran-System war die durch RSE hergestellte Lipid-Doppelschicht. Die Untersuchungen in Kapitel 5.4 zeigten, dass die Lipid-Doppelschicht zwar großflächig vorhanden war, aber noch einige Defekte beinhaltete. Die Ausbesserung dieser Membran-Defekte könnte durch die Verwendung eines Lipides mit längeren Alkylketten in der Monoschicht, anstelle des DoctPE mit nur 2x8 Methylengruppen erfolgen. Aus der Alkylkettenerhöhung

würden höhere Van-der-Waals-Wechselwirkungen resultieren, was zu einer höheren Lipid-Membran-Stabilität führen könnte.

Beide Membransysteme sind noch in ihrer Entwicklungsphase und müssen, bevor sie als Biosensor-Matrix verwendet werden können, optimiert werden.

8. Literatur

1. Robelek, R.; Lemker, E. S.; Wiltschi, B.; Kirste, V.; Naumann, R.; Oesterhelt, D.; Sinner, E. K., Incorporation of in vitro synthesized GPCR into a tethered artificial lipid membrane system. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, (4), 605-608.
2. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes. *Science* **1972**, 175, (4023), 720-&.
3. Roskamp, R. Tethered Bilayer Lipid Membranes auf Aluminiumoxid. Diplomarbeit, Mainz, 2006.
4. Lummen, G.; Rubben, H., G-protein-coupled receptors, cell motility and proliferation. *Urologia Internationalis* **2003**, 71, (1), 1-7.
5. Lundstrom, K., Structural genomics of GPCRs. *Trends in Biotechnology* **2005**, 23, (2), 103-108.
6. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R., Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure - Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane-Potential. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1985**, 812, (1), 55-65.
7. Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of Univalent Ions across Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, 13, (1), 238-&.
8. Nardin, C.; Widmer, J.; Winterhalter, M.; Meier, W., Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *European Physical Journal E* **2001**, 4, (4), 403-410.
9. Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C., Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System. *Nature* **1962**, 194, (4832), 979-&.
10. Mueller, P.; Wescott, W. C.; Rudin, D. O.; Tien, H. T., Methods for Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry* **1963**, 67, (2), 534-&.
11. Sackmann, E., Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* **1996**, 271, (5245), 43-48.
12. Tamm, L. K.; McConnell, H. M., Supported Phospholipid-Bilayers. *Biophysical Journal* **1985**, 47, (1), 105-113.
13. Johnson, S. J.; Bayerl, T. M.; McDermott, D. C.; Adam, G. W.; Rennie, A. R.; Thomas, R. K.; Sackmann, E., Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons. *Biophysical Journal* **1991**, 59, (2), 289-294.
14. Csucs, G.; Ramsden, J. J., Interaction of phospholipid vesicles with smooth metal-oxide surfaces. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1998**, 1369, (1), 61-70.
15. Reimhult, E.; Hook, F.; Kasemo, B., Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* **2003**, 19, (5), 1681-1691.
16. Yang, J. L.; Kleijn, J. M., Order in phospholipid Langmuir-Blodgett layers and the effect of the electrical potential of the substrate. *Biophysical Journal* **1999**, 76, (1), 323-332.
17. Gritsch, S.; Nollert, P.; Jahnig, F.; Sackmann, E., Impedance spectroscopy of porin and gramicidin pores reconstituted into supported lipid bilayers on indium-tin-oxide electrodes. *Langmuir* **1998**, 14, (11), 3118-3125.
18. Bunjes, N.; Schmidt, E. K.; Jonczyk, A.; Rippmann, F.; Beyer, D.; Ringsdorf, H.; Graber, P.; Knoll, W.; Naumann, R., Thiopeptide-supported lipid layers on solid substrates. *Langmuir* **1997**, 13, (23), 6188-6194.
19. Lahiri, J.; Kalal, P.; Frutos, A. G.; Jonas, S. T.; Schaeffler, R., Method for fabricating supported bilayer lipid membranes on gold. *Langmuir* **2000**, 16, (20), 7805-7810.
20. Salamon, Z.; Wang, Y.; Tollin, G.; Macleod, H. A., Assembly and Molecular-Organization of Self-Assembled Lipid Bilayers on Solid Substrates Monitored by Surface-Plasmon Resonance Spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1994**, 1195, (2), 267-275.

21. Puu, G.; Gustafson, I., Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1997**, 1327, (2), 149-161.
22. Castellana, E. T.; Cremer, P. S., Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* **2006**, 61, (10), 429-444.
23. Plant, A. L.; Brighamburke, M.; Petrella, E. C.; Oshannessy, D. J., Phospholipid Alkanethiol Bilayers for Cell-Surface Receptor Studies by Surface-Plasmon Resonance. *Analytical Biochemistry* **1995**, 226, (2), 342-348.
24. Plant, A. L., Self-Assembled Phospholipid Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **1993**, 9, (11), 2764-2767.
25. Rao, N. M.; Plant, A. L.; Silin, V.; Wight, S.; Hui, S. W., Characterization of biomimetic surfaces formed from cell membranes. *Biophysical Journal* **1997**, 73, (6), 3066-3077.
26. Meuse, C. W.; Niaura, G.; Lewis, M. L.; Plant, A. L., Assessing the molecular structure of alkanethiol monolayers in hybrid bilayer membranes with vibrational spectroscopies. *Langmuir* **1998**, 14, (7), 1604-1611.
27. Glazier, S. A.; Vanderah, D. J.; Plant, A. L.; Bayley, H.; Valincius, G.; Kasianowicz, J. J., Reconstitution of the pore-forming toxin alpha-hemolysin in phospholipid/18-octadecyl-1-thiahexa(ethylene oxide) and phospholipid/n-octadecanethiol supported bilayer membranes. *Langmuir* **2000**, 16, (26), 10428-10435.
28. Sinner, E. K.; Knoll, W., Functional tethered membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, (6), 705-711.
29. Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B.; Karcher, I.; Koper, I.; Lubben, J.; Vasilev, K.; Knoll, W., Tethered lipid Bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* **2003**, 19, (13), 5435-5443.
30. Schiller, S. M.; Naumann, R.; Lovejoy, K.; Kunz, H.; Knoll, W., Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, (2), 208-+.
31. Atanasov, V.; Atanasova, P. P.; Vockenroth, I. K.; Knorr, N.; Koper, I., A molecular toolkit for highly insulating tethered bilayer lipid membranes on various substrates. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, (3), 631-637.
32. Atanasov, V.; Knorr, N.; Duran, R. S.; Ingebrandt, S.; Offenhausser, A.; Knoll, W.; Koper, I., Membrane on a chip: A functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophysical Journal* **2005**, 89, (3), 1780-1788.
33. Steinem, C.; Janshoff, A.; Ulrich, W. P.; Sieber, M.; Galla, H. J., Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: A scrutiny of different preparation techniques. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1996**, 1279, (2), 169-180.
34. Wiegand, G.; Arribas-Layton, N.; Hillebrandt, H.; Sackmann, E.; Wagner, P., Electrical properties of supported lipid bilayer membranes. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, (16), 4245-4254.
35. Bittermann, A. G.; Jacobi, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Reichelt, R., Contrast studies on organic monolayers of different molecular packing in FESEM and their correlation with SFM data. *Langmuir* **2001**, 17, (6), 1872-1877.
36. Taborelli, M.; Descouts, P., Organic monolayers chemisorbed on gold observed by scanning probe microscopy. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, 354, (7-8), 777-781.
37. www.kruss.de/de/theorie/messungen/kontaktwinkel/einfuehrung.html , 15.07.2009
38. www.kruss.de/de/theorie/messungen/kontaktwinkel/messung-des-kontaktwinkels.html., 15.07.2009
39. http://www.qsense.se/qcm_d_technology--32.asp., 21.7.2009
40. www.qsense.se/dbfiles/QCM-D_technology_note.pdf, In., 25.07.2009
41. Sauerbrey, G., Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung. *Zeitschrift Fur Physik* **1959**, 155, (2), 206-222.
42. www.qsense.se/qcm_d_faq--33.asp., 25.07.2009
43. Keller, C. A.; Kasemo, B., Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* **1998**, 75, (3), 1397-1402.

44. Knoll, W., Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annual Review of Physical Chemistry* **1998**, 49, 569-638.
45. Kretschm.E; Raether, H., Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie* **1968**, A 23, (12), 2135-&.
46. Radmacher, M.; Tillmann, R. W.; Fritz, M.; Gaub, H. E., From Molecules to Cells - Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Science* **1992**, 257, (5078), 1900-1905.
47. Florin, E. L.; Moy, V. T.; Gaub, H. E., Adhesion Forces between Individual Ligand-Receptor Pairs. *Science* **1994**, 264, (5157), 415-417.
48. Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, 56, (9), 930-933.
49. www.shuiyinlo.org/book/page94.htm, 30.07.2009
50. Ellings, V., Digital Instruments Nanoscope *Command Reference Manual* **1995**.
51. Janshoff, A.; Neitzert, M.; Oberdorfer, Y.; Fuchs, H., Force spectroscopy of molecular systems - Single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, (18), 3213-3237.
52. Wiesendanger, R., Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy – Methods and Applications. *Cambridge University Press I*.
53. Gee, K. R.; Archer, E. A.; Kang, H. C., 4-Sulfotetrafluorophenyl (STP) esters: New water-soluble amine-reactive reagents for labeling biomolecules. *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, (8), 1471-1474.
54. Schwartz, V. Antikörperanbindung auf plasmapolymerisierte Maleinsäureanhydrid-Filme. Mainz, Mainz, 2008.
55. Lauer, H. Die molekulare Architektur von Thiopeptid- und Thiolipopeptidmonoschichten auf Goldoberflaechen und ihre Verwendung als Spacersystemefuer festkoerpergestuetzte Lipiddoppelschichten. Mainz, 2001.
56. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **2005**, 105, (4), 1103-1169.
57. Song, H.; Sinner, E. K.; Knoll, W., Peptid-tethered bilayer lipid membranes and their interaction with Amyloid beta-peptide. *Biointerphases* **2007**, 2, (4), 151-158.
58. van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, 9, (2), 112-124.
59. Vu, T. H.; Shimanouchi, T.; Ishii, H.; Umakoshi, H.; Kuboi, R., Immobilization of intact liposomes on solid surfaces: A quartz crystal microbalance study. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 336, (2), 902-907.
60. Reimhult, E.; Zach, M.; Hook, F.; Kasemo, B., A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir* **2006**, 22, (7), 3313-3319.
61. McGillivray, D. J.; Valincius, G.; Vanderah, D. J.; Febo-Ayala, W.; Woodward, J. T.; Heinrich, F.; Kasianowicz, J. J.; Losche, M., Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases* **2007**, 2, (1), 21-33.
62. Adam G., L. P. a. S. G., *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag: 2003.
63. Cortie, M. B.; Maarroof, A. I.; Smith, G. B., Electrochemical capacitance of mesoporous gold. *Gold Bulletin* **2005**, 38, (1), 14-22.
64. Vockenroth, I. K.; Rossi, C.; Shah, M. R.; Koper, I., Formation of tethered bilayer lipid membranes probed by various surface sensitive techniques. *Biointerphases* **2009**, 4, (2), 19-26.