

**HYDROGELVERSTÄRKTE, FESTKÖRPERGESTÜTZTE  
LIPIDMEMBRANEN**

**Diplomarbeit**

Zur Erlangung des Grades

**„Diplom-Chemiker“**

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

vorgelegt von

**Christian Ohm**

Geboren am 03.11.1981 in Mainz



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar bis September 2007 unter der Anleitung von Professor Knoll (Max-Planck-Institut für Polymerforschung) und Professor Zentel (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) angefertigt.

Meinen Eltern



# Inhalt

<b>1. Einleitung und Motivation.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Verschiedene Modellsysteme für Lipidmembranen.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Einleitung.....	4
2.1.2 Liposomen.....	5
2.1.3 Black Lipid Membranes (BLMs).....	6
2.1.4 Festkörpergestützte Lipidmembranen (s-BLMs und sb-BLMs).....	8
2.1.5 Angebundene Lipidmembranen (t-BLMs).....	10
<b>2.2 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Einleitung.....	13
2.2.2 Physikalischer Hintergrund.....	13
2.2.3 Messprinzip.....	15
2.2.4 Äquivalenzschaltkreise.....	16
2.2.5 Bestimmung von Parametern realer Systeme.....	20
<b>2.3 Die Elektrochemische Doppelschicht.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Oberflächenplasmonen Spektroskopie.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Oberflächenplasmonen.....	22
2.4.2 Prinzip der Oberflächenplasmonen Spektroskopie.....	23
2.4.3 Verschiedene Messmodi in der Oberflächenplasmonen Spektroskopie.....	24
<b>2.5 Hydrogele.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Einleitung.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Template Stripped Gold.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 DPTL Monolayer.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Herstellung des Bilayers.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Polymerisation des Hydrogels.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Einbau des Ionencarriers Valinomycin.....</b>	<b>33</b>

---

<b>4. Experimenteller Teil.....</b>	<b>35</b>
4.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte.....	35
4.2 Synthese des Acryl-DPhyPE.....	36
4.3 Synthese des Acryl-DMPE.....	37
4.4 Herstellung von Template Stripped Gold.....	38
4.5 Herstellung von DPTL-Monolayern.....	39
4.6 Herstellung von Vesikeln.....	40
4.7 Aufbau des Systems bei gleichzeitiger Impedanzmessung.....	40
4.7.1 Aufbau der Teflon Messzelle.....	40
4.7.2 Aufbau der Glas Messzelle.....	41
4.7.3 Verwendetes Elektrodenmaterial.....	41
4.7.4 Vesikelfusion.....	43
4.7.5 Solvent Exchange.....	43
4.7.6 Hydrogelwachstum.....	43
4.7.7 Zugabe von Valinomycin.....	44
4.8 Reinigung von Teflonzellen und Elektroden.....	44
4.9 Silanisierung der Glas Messzelle.....	47
4.10 Simultane SPR- und Impedanzmessung.....	48
<b>5. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>50</b>
5.1 Einleitung.....	50
5.2 Charakterisierung der Hydrogelanker-Lipide.....	51
5.2.1 $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -Cosy NMR Spektroskopie.....	51
5.2.2 Nachweis der Vollständigkeit der Funktionalisierung mit Ninhydrin .....	51
5.2.3 Herstellung einer Membran aus reinem Acryl-DMPE.....	52
5.3 Template Stripped Gold.....	53
5.4 Impedanzmessung einer Hydrogelschicht auf TSG.....	55
5.5 DPTL Monolayer.....	57
5.5.1 Einleitung.....	57
5.5.2 Statistische Betrachtung und Kategorisierung von Monolayern.....	58
5.5.3 Monolayer die vom üblichen Modell abweichen: die dritte Kategorie.....	61
5.5.4 Kriterien für die Herstellung guter Monolayer.....	62

---

<b>5.6 Vesikelfusion.....</b>	<b>63</b>
5.6.1 Einleitung.....	63
5.6.2 Vergleich der kinetischen Daten einiger Vesikelfusionen.....	64
5.6.3 Vergleich der Eigenschaften von Monolayer und resultierender Membran..	65
5.6.4 Auswirkung des Spülens auf die Membran.....	67
5.6.5 Probleme bei der Vesikelfusion.....	67
5.6.6 Einfluss des Elektrolyten auf die Vesikelfusion.....	73
<b>5.7 Applikation der Hydrogels.....</b>	<b>74</b>
5.7.1 Einleitung.....	74
5.7.2 Beschreibung des Systems mit einem R(RC)C-Modell.....	75
5.7.3 Beschreibung des Systems mit einem R(RC)(RC)-Modell.....	78
5.7.4 Hydrogelwachstum auf einer Membran, die Hydrogelanker enthält.....	79
<b>5.8 Einbau des Ionencarriers Valinomycin.....</b>	<b>82</b>
5.8.1 Einleitung.....	82
5.8.2 Elektrische Eigenschaften nach dem Einbau von Valinomycin.....	82
5.8.3 Vergleich der Kinetiken des Einbaus bei verschiedenen Experimenten.....	84
<b>5.9 Auswirkung der Hydrogelschicht auf die Stabilität der Membran.....</b>	<b>86</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>93</b>
<b>Anhang A: Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>Anhang B: NMR Spektren.....</b>	<b>97</b>
<b>Anhang C: Danksagung.....</b>	<b>103</b>



# 1. Einleitung und Motivation

Lipid-Doppelschichten sind supramolekulare Strukturen, die durch Selbstorganisation einzelner Lipidmoleküle entstehen. Dabei ordnen sich die amphiphilen Moleküle in zwei übereinander liegenden Schichten an, so dass die hydrophoben Schwanzgruppen nach innen, und die polaren Kopfgruppen nach außen zeigen (Abb. 1.1). Die beiden Schichten halten aufgrund von hydrophoben, sowie van der Waals Wechselwirkungen zusammen.

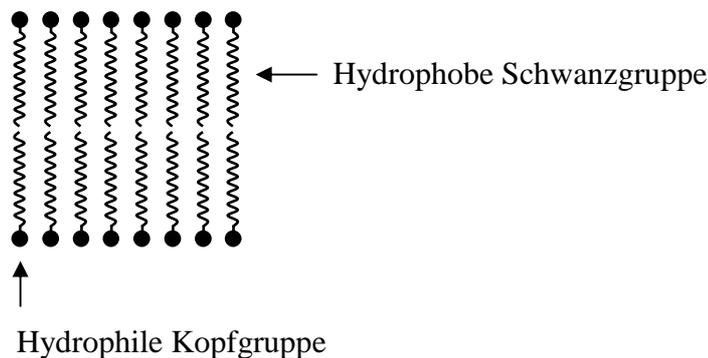


Abb. 1.1 Schematische Darstellung einer Lipidmembran

Diese Membranen sind elementarer Bestandteil aller Zellwände, sowohl tierischen als auch pflanzlichen Ursprungs. Hauptaufgabe der nur wenige Nanometer dicken Membran ist die Abgrenzung des zellinneren Bereiches (Cytoplasma) vom extrazellulären Raum. Sie verhindert eine unkontrollierte Diffusion von Ionen und Molekülen in das Zellinnere oder daraus hinaus und erlaubt somit die Erzeugung von Konzentrationsgradienten. Der Hauptbestandteil von natürlichen Lipidmembranen sind Phospholipide, in unterschiedlichen Anteilen auch Glycolipide und Cholesterol.

Die gesamte Zellwand besteht neben der Lipidmembran noch aus zwei weiteren Schichten: der Glycocalix und dem Cytoskelett.

Die Glycocalix befindet sich an der Außenseite der Lipidmembran und ist eine Ansammlung von Kohlenhydraten. Diese äußerste Schicht ist für die Identifikation der Zelle durch Kohlenhydrat-sensitive Proteine (Lektine) erforderlich. Bei Pflanzenzellen hat die Glycocalix die Form einer massiven Wand, die der Zelle zusätzlichen physischen Schutz bietet.

Das Cytoskelett befindet sich an der Innenseite der Lipidmembran und besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Proteinen. Es sorgt für die mechanische Stabilität der Zelle.

1972 publizierten Singer und Nicolson ihr „fluid mosaic model“ der Struktur der Lipidmembran [1]. Diesem seither experimentell vielfach bestätigtem Model zufolge verhält sich die Lipidmembran wie eine zweidimensionale Flüssigkeit. In ihrem hydrophoben, quasi flüssigen Inneren können sich ebenfalls hydrophobe Membranproteine frei bewegen und von dort aus ihre Arbeit verrichten. Diese Membranproteine sind für das Funktionieren der Zelle von größter Wichtigkeit. Es gibt Proteine für viele verschiedene Aufgaben: den Stofftransport, die Informationsübertragung zu anderen Zellen oder die Verankerung der Lipidmembran mit dem Cytoskelett. Der Proteinanteil in der Membran liegt zwischen 20% bei Nervenzellen und bis zu 80% bei Bakterien.

Die Effizienz und Komplexität dieser von der Evolution hervorgebrachten Strukturen stellt für den Naturwissenschaftler gleichzeitig eine Inspiration sowie eine Herausforderung dar.

Die inspirierende Wirkung der Natur führte zur Entwicklung des Forschungszweiges der Biomimetik, der sich mit der Nachahmung und Modifikation von natürlichen Strukturen beschäftigt. Seit vielen Jahren arbeiten Forschungsgruppen daran, mithilfe von Lipidmembranen so genannte Biosensoren herzustellen. Ein Biosensor ist definiert als eine Sensorklasse, die in der Natur vorkommende Moleküle (Rezeptor-Proteine, Antikörper, Hormone, DNA etc.) als Basis des Nachweises verwendet. So wurden bereits Biosensoren zur Bestimmung von Ammonium Ionen [2], Amilorid (ein Pyrazin Derivat) [3] und zur pH-Wert Bestimmung [4] vorgestellt. Das Messprinzip all dieser Sensoren beruht auf der Wechselwirkung des Analyten mit einem Membranprotein, woraufhin sich die Eigenschaften der Membran in messbarer Weise verändern.

Die gezielte Einflussnahme auf Vorgänge in den Lipidmembranen lebender Zellen ist eine große Herausforderung an die Wissenschaft. Eine Vielzahl bis heute unheilbarer Krankheiten (z.B. Alzheimer, Chorea Huntington, Mukoviszidose) [5] geht auf Fehlfunktionen innerhalb der Lipidmembran zurück. Mithilfe vereinfachter Modellmembranen versuchen viele Forschungsgruppen die Vorgänge innerhalb der lebenden Membran besser zu verstehen und mit diesen Informationen neue Therapiemöglichkeiten zu erschließen.

Wir können also zwei Hauptgebiete in der Membranforschung unterscheiden: das eine beschäftigt sich mit der Entwicklung von Biosensoren auf Membranbasis, das andere verwendet Modellmembranen um Informationen über Zellvorgänge zu gewinnen.

Betrachtet man die verschiedenen Membransysteme, die seit den ersten Versuchen mit Lipidmembranen 1962 hergestellt wurden, so erkennt man den Trend zu immer stabileren Konstruktionen. Die ersten künstlich erzeugten Lipidmembranen waren freistehend und

hatten eine Lebensdauer von wenigen Stunden (BLMs). Es folgten Membranen, die von festen Substraten gestützt wurden und für mehrere Tage verwendet werden können (sBLMs). Die Lebensdauer von am Substrat gebundenen Membranen (tBLMs) liegt bei vielen Monaten. Im Rahmen dieser Arbeit wird versucht, die Stabilität von Lipidmembranen durch die Einkapselung in Hydrogele noch weiter zu erhöhen. Von besonderem Interesse ist es hierbei, Systeme herzustellen die in einer nichtflüssigen Umgebung stabil sind. Dies ist für die praktische Anwendbarkeit von Biosensoren von großer Wichtigkeit. Durch die Ergänzung der Lipidmembran mit einer Hydrogelschicht erzeugt man einen mechanischen Schutz der Membran sowie eine Schnittstelle der Detektionsfläche mit dem umgebenden Gasraum. In der Gasphase enthaltene Analytmoleküle können so in das Hydrogel hineindiffundieren und an der Membran nachgewiesen werden.

Dieses Prinzip gibt es auch in der Natur: die Riechschleimhaut (regio olfactoria) aller Tiere besteht aus einem dünnen Schleimfilm (Mucus). An dessen Unterseite befinden sich die Riechzellen, deren Härchen, an denen die Chemorezeptoren sitzen, in den Schleimfilm hineinragen.

Die Anwendungsgebiete einer „elektronischen Nase“ wären immens. Anwendungen im Sicherheitsbereich zur Detektion von Sprengstoffen und Drogen sind genauso denkbar wie die Detektion giftiger Gase in der Atemluft und der Erkennung von Krankheiten wie Krebs anhand des Geruches des Patienten.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Verschiedene Modellsysteme für Lipidmembranen

#### 2.1.1 Einleitung

In diesem Kapitel werden verschiedene Membranmodelle vorgestellt, die im Laufe der Jahre entwickelt wurden. Die Anforderungen an ein geeignetes Modell sind hoch. Zum einen soll das Modellsystem der realen Membran in möglichst vielen Eigenschaften sehr ähnlich sein, damit man aus dem Modell tatsächlich Rückschlüsse auf Vorgänge in den Zellmembranen lebender Zellen schließen kann. Zum anderen sollte das Modell weniger komplex sein als das Vorbild in der Natur, also über weniger einstellbare Parameter verfügen. Dies ist nötig, damit Experimente am Modell durchführbar und reproduzierbar bleiben.

Die Modellmembran sollte dicht genug sein, um die Passage von kleinen Molekülen und Ionen zu verhindern. Diese Eigenschaft bezeichnet man als elektrisch dicht. Trotzdem muss die Membran eine ausreichende Fluidität behalten, um die Inkorporation von Proteinen zu erlauben. Auch sollte die Beschaffenheit des Systems eine Analyse der Membraneigenschaften mit verschiedenen analytischen Methoden erlauben. Für die Anwendbarkeit des Systems als Biosensor spielen weiterhin Stabilität und Herstellbarkeit eine wichtige Rolle. Abb. 2.1 gibt einen Überblick über die vier am häufigsten eingesetzten Modellsysteme.

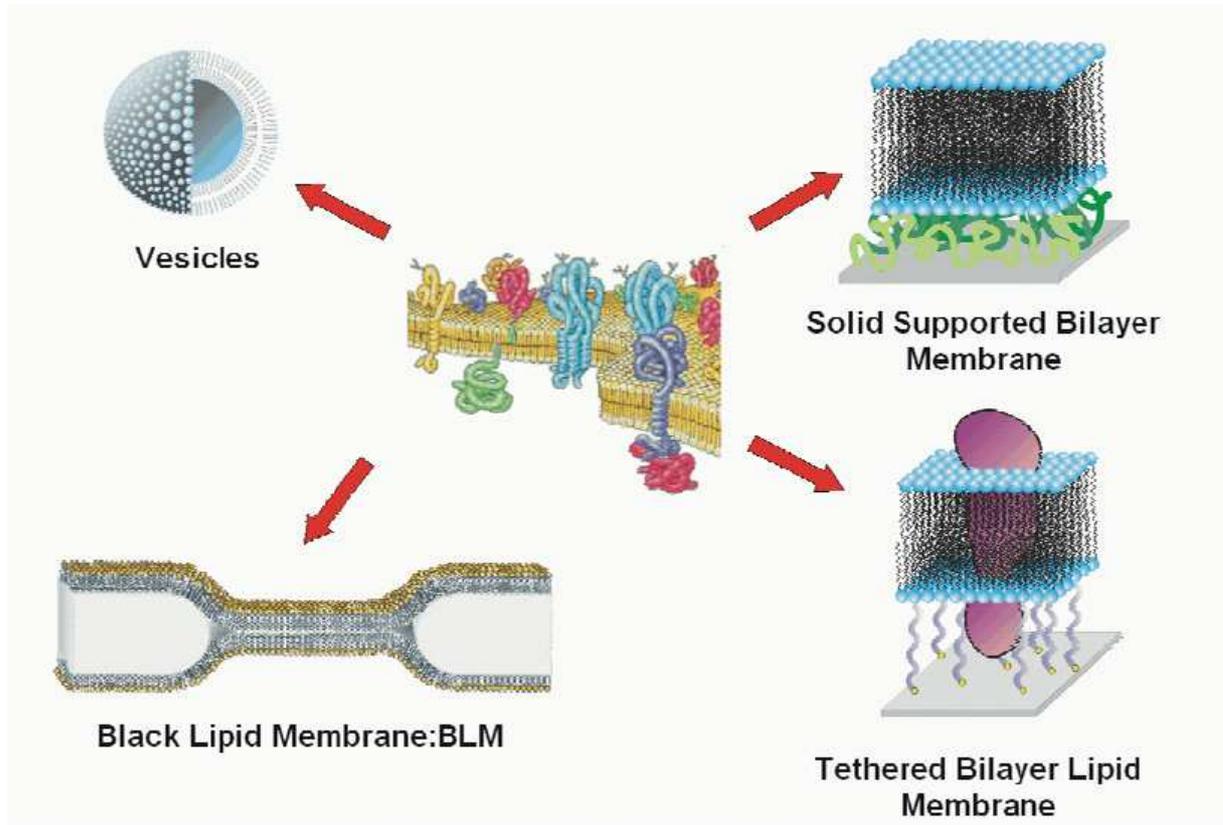


Abb. 2.1 Verschiedene Modellmembranen (Grafik aus[6])

### 2.1.2 Liposomen

Bei Liposomen (ein anderer Ausdruck ist Vesikel) ist die Lipidschicht gekrümmt und schließt sich zu einer kugelförmigen Struktur zusammen. Multilamellare Vesikel, die aus mehreren konzentrisch angeordneten Lipidschalen bestehen, entstehen spontan in einer Mischung aus Lipid und Wasser. Unilamellare Vesikel kann man durch Ultraschallung oder Extrusion der Mischung erzeugen.

Mithilfe der Patch Clamp Technik [7] ist es möglich, die Funktionsweise von Proteinen, die in die Vesikel eingebaut wurden, elektrisch zu messen. Ein großer Nachteil von Liposomen ist deren Neigung, mit der Zeit zu aggregieren. Dies begrenzt ihre Verwendbarkeit auf einige Tage.

Breite Anwendung finden Liposomen in der Medizin: in ihrem hydrophoben Inneren können Medikamente gegen Enzyme geschützt zu ihrem Wirkungsort im Körper transportiert werden und ihren Inhalt dort gezielt freisetzen.

### 2.1.3 Black Lipid Membranes (BLMs)

Die ersten Arbeiten an Black Lipid Membranes (BLMs) wurden 1963 von Rubin et al. veröffentlicht. Sie zeigten, dass aus Gehirnextrakten von Kühen geformte BLMs selbstreparierende Eigenschaften besitzen und führten eine elektrische Charakterisierung durch. [8]

Die Herstellung einer BLM hat den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen an Lipid benötigt werden. Üblicherweise wird die Membran über eine hydrophobe Appertur mit einem Durchmesser von bis zu einigen Millimetern gespannt, welche zwei Flüssigkeitskammern voneinander trennt. Es ist bemerkenswert, dass eine nur wenige Nanometer dicke Membran in der Lage ist, eine Fläche von einigen Quadratmillimetern freischwebend zu überspannen. Dadurch sind Messungen mit praktisch vernachlässigbaren Randeffekten möglich. Allerdings wird die Membran dadurch nur von einer sehr kleinen lateralen Spannung gehalten, was bei sehr geringen Erschütterungen zum Riss der Membran führt. [9]

Die Messzelle besteht aus einem mit Elektrolytlösung gefüllten Becher, in den ein Rohr eintaucht, welches in der Mitte eine Appertur besitzt (Abb. 2.2). Sowohl im äußeren Becher als auch im Rohr befinden sich Elektroden, die an ein Potentiostat angeschlossen sind. Da das innere Rohr über den Flüssigkeitsspiegel im Becher hinausragt, ist der Stromkreis nur durch die Appertur unterbrochen und eine elektrische Charakterisierung der Membran ist möglich.

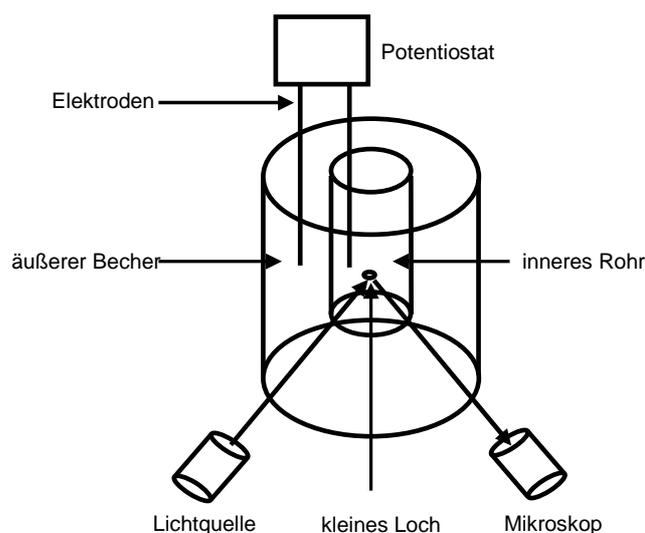


Abb. 2.2 Versuchsanordnung zur Herstellung und Charakterisierung von BLMs

Es gibt zwei Methoden mit denen eine Lipidmembran über der Appertur erzeugt werden kann. Lösungsmittelhaltige Membranen erzeugt man nach der Methode von Mueller und Rudin [8], indem man das Lipid in einem organischen Lösungsmittel wie Dekan löst und mit einem Pinsel auf die Appertur streicht. Der so entstandene Lipidfilm verdünnt sich spontan zur Membran. Diesen Vorgang kann man im Lichtmikroskop beobachten: während sich der Film verdünnt, kommt es zu farbigen Reflexionen wie an einer Seifenblase. Ist die Membran nur noch zwei Moleküle dick (Bilayer) erscheint sie völlig schwarz im Mikroskop. Dies liegt an der destruktiven Interferenz der beiden Lichtstrahlen, die an den Grenzflächen Wasser/Lipid und Lipid/Wasser reflektiert werden.

Derart hergestellte Membranen besitzen eine höhere Flexibilität als die, nach der zweiten Methode hergestellten lösungsmittelfreien Membranen nach Montal und Muller.

Hierbei wird das gelöste Lipid auf die Wasseroberfläche im inneren Rohr von Abb. 2.2 gespreitet und danach der Flüssigkeitsstand im Becher bis unterhalb der Appertur gesenkt, wobei ein Monolayer entsteht. Durch ein erneutes Anheben des Flüssigkeitsstandes über die Appertur wird die Doppelschicht vervollständigt. Diese Präparationsmethode hat den Vorteil, dass auch unsymmetrische Membranen hergestellt werden können, die in der Natur häufig auftreten. [10]

BLMs lassen sich durch das Äquivalenzschaltbild eines (RC) Elements darstellen (siehe Kapitel 3.2.4) und weisen Widerstände von mindestens  $10 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$  bei Kapazitäten von etwa  $0,5 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$  auf [11]. Damit sind sie dafür geeignet, Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Zum Einbau der Proteine gibt es viele verschiedene Techniken. So kann das Protein vor der Membranbildung zur organischen Lipidlösung hinzugegeben werden oder nach der Membranbildung in die wässrige Phase. Auch die Zugabe in Form von Proteinliposomen ist möglich. [12]

Beim Beobachten der Leitfähigkeit einer derart modifizierten Membran über einen längeren Zeitraum hinweg erkennt man Sprünge. Diese entstehen durch das Öffnen bzw. Schließen von Ionenkanälen. Durch eine genaue Analyse dieser Daten ist es möglich, die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals zu bestimmen. [13]

Mithilfe dieser Techniken kann auch die Passage ungeladener Moleküle durch Membrankanäle untersucht werden. So wurde z. B. die Entwicklung einer Methode zur DNA Sequenzierung nach diesem Prinzip diskutiert. [14, 15]

Wie jedoch zu Beginn des Kapitels erwähnt, besitzen freistehende BLMs den signifikanten Nachteil ihrer Instabilität. Damit sind sie für praktische Anwendungen in der Biosensorik ungeeignet. Eine erwähnenswerte Weiterentwicklung sind nano-BLMs. [16] Bei dieser

Technik werden Membranen über nanoporöse Substrate gespannt, was BLMs mit erhöhter Stabilität erzeugt.

#### 2.1.4 Festkörpergestützte Lipidmembranen (s-BLMs und sb-BLMs)

Das Konzept festkörperunterstützter Membranen entstand aus der Notwendigkeit heraus, die Stabilität freistehender Membranen zu erhöhen. Das feste Substrat kann ein Metall sein, ein Halbleiter, aber auch ein Nichtleiter wie Mica oder ein Polymer. Durch die feste Unterlage erhält man Zugang zu einer ganzen Reihe oberflächensensitiver experimenteller Techniken, wie Röntgen- und Neutronenreflektometrie [17], Plasmonenspektroskopie und Ellipsometrie [18], sowie zahlreichen Rastermikroskopische Methoden [19].

Sackmann unterscheidet drei Möglichkeiten, wie die Kontaktfläche zwischen Lipidmembran und festem Substrat aussehen kann [20]:

- i) Die Membran liegt direkt auf dem Substrat auf und ist entweder kovalent oder ionisch angebunden.
- ii) Zwischen Membran und Substrat befindet sich eine ultradünne (ca. 1-2nm) Wasserschicht.
- iii) Zwischen Membran und Substrat befindet sich eine ebenfalls dünne Schicht eines weichen, hydratisierten Polymer Films.

Die üblichen Herstellungsmethoden beinhalten die Techniken Langmuir Blodgett Transfer, Selbstorganisation in flüssiger Umgebung sowie Vesikelfusion [21].

Bei der Langmuir Blodgett Technik wird zunächst eine Monolage des Lipids auf einer Wasseroberfläche hergestellt. Durch einen beweglichen Schieber kann man die Lipidschicht so weit komprimieren, bis die Moleküle eine dichteste Packung bilden. Dann taucht man ein sauberes, hydrophiles Substrat in die Flüssigkeit und zieht es wieder heraus. Beim Herausziehen bildet sich ein Monolayer des Lipids auf dem Substrat. Dieser Vorgang kann wiederholt werden, um Mehrfachschichten zu erzeugen.

Bei Selbstorganisation in Flüssigkeiten verwendet man spezifische Bindungstendenzen, um Molekülschichten kovalent an Substrate zu binden. So kann man beispielsweise eine Schicht von Mercaptoalkanen auf ein Gold-Substrat aufbringen.

Bei der Vesikelfusion setzt man die hydrophile Oberfläche des Substrates einer vesikelhaltigen Lösung aus. Dadurch kommt es zur Bildung einer Lipid Doppelschicht auf dem Substrat. Hierbei unterscheidet Rädler [22] zwischen zwei verschiedenen Mechanismen, die abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit des Substrates dominieren (Abb. 2.3).

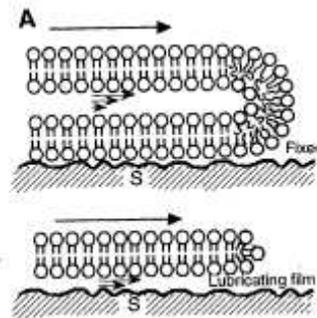


Abb. 2.3 Mechanismen der Vesikelfusion auf einem festen Substrat (übernommen aus [22])

Im oberen Fall breitet sich die Membran in einer rollenden Bewegung aus. Die Lipidmoleküle werden direkt an der Substratoberfläche adsorbiert so dass sich kein Wasserfilm unter der Membran ausbildet. Dieser Mechanismus ist dominant, wenn das Substrat die Tendenz hat, die Membran zu dehydrieren. Dies ist z. B. bei  $\text{CaF}_2$  sowie einigen mit Proteinen bedeckten Oberflächen der Fall.

Im zweiten Mechanismus breitet sich die Membran in einer rutschenden Bewegung auf einer dünnen Wasserschicht aus. Dies geschieht bei sehr hydrophilen Substratoberflächen. Die Wasserschicht bleibt unter der fertigen Membran bestehen.

Ottova beschreibt noch eine weitere Methode zur Erzeugung festkörpergestützter Membranen [23]. Hierbei wird ein mit Teflon umhüllter Metalldraht (z. B. Platin) in eine Lipid enthaltende Lösung getaucht und am Ende mit einem scharfen Messer durchgeschnitten. Danach wird der Draht in eine wässrige Elektrolyt Lösung getaucht, wobei sich an der Schnittfläche eine Membran bildet.

Eine Modifikation dieser Technik, bei der anstelle eines Teflon umhüllten Platin Drahtes ein mit Agarose-Gel gefüllter Teflon Schlauch verwendet wird, erlaubt die Herstellung einer Membran, die auf einer Hydrogel Schicht aufliegt (sb-BLM).

### 2.1.5 Angebundene Lipidmembranen (t-BLMs)

Das Konzept der festkörperunterstützten Membranen hat einige schwerwiegende Nachteile. So kann die fehlende chemische Bindung zwischen Substrat und Membran zu einer Ablösung oder der Ersetzung der Membran durch andere oberflächenaktive Substanzen führen. Deshalb ist die Lebensdauer für praktikable Anwendungen in der Sensorik nicht ausreichend. Außerdem stellt die dünne Wasserschicht unter der Membran nicht genügend Platz für Proteine mit großen Extramembrandomänen zur Verfügung. Dadurch kann es zu starken Wechselwirkungen zwischen Substrat und Protein kommen, die Folgen sind eingeschränkte Funktionalität oder gar Denaturierung des Proteins. Auch fehlt ein Ionenreservoir unterhalb der Membran. Dadurch wird die Messung von Ionenströmen durch eingebaute Ionenkanäle problematisch.

Ein Konzept zur Beseitigung dieser Probleme beinhaltet die Weiterführung eines Ansatzes, der schon bei den s-BLMs gemacht wurde: die Einführung des „tether-layers“ (engl. angebundene Schicht). Dieser ist ein zusätzliches Strukturelement welches sich zwischen Substrat und Membran befindet und eine kovalente Bindung mit (einigen) Lipidmolekülen herstellt. Dies sorgt für eine mechanische Stabilisierung, die Bereitstellung von ausreichend Platz unterhalb der Membran und bei Verwendung eines hydrophilen tether-layers die Erzeugung eines Ionenreservoirs.

Im Laufe der Jahre wurden viele synthetische Ansätze verfolgt, um eine solche Struktur zu erzeugen [24]. Drei dieser Ansätze sollen hier kurz vorgestellt werden.

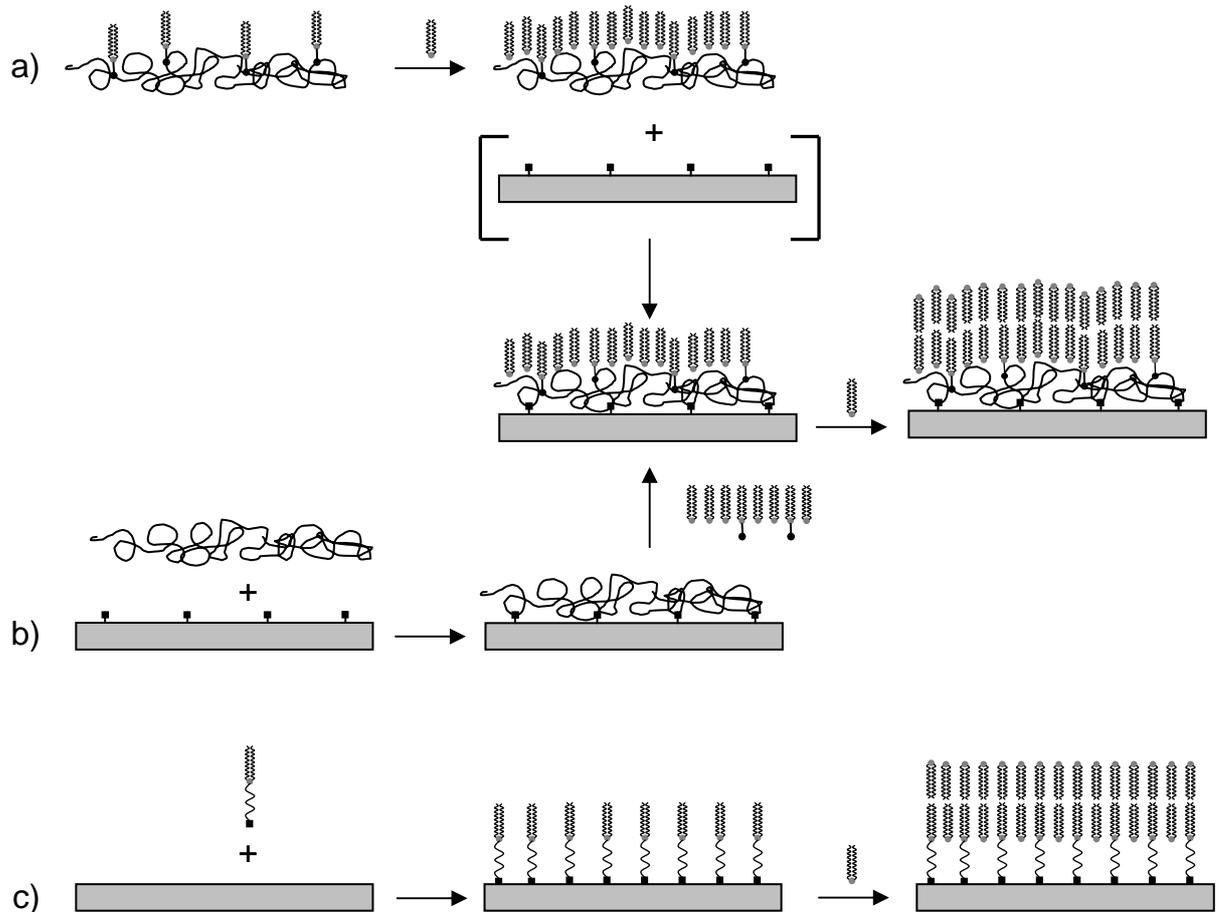


Abb. 2.4 Drei Ansätze für einen tether-layers

Im „top-down“ Ansatz (Abb. 2.4 a)) wird zunächst an der Wasser/Luft Grenzfläche ein Monolayer aus einer Lipidpolymer/Lipid Mischung hergestellt und dieser auf ein funktionalisiertes Substrat aufgebracht. Die Funktionalisierung des Substrates erlaubt die kovalente Bindung mit dem Polymer, z.B. über Benzophenon Gruppen. [25] Im zweiten Schritt erfolgt die Bildung der zweiten Lipidschicht durch LB-Transfer oder Vesikelfusion.

Das „bottom-up“ Vorgehen (Abb. 2.4 b)) sieht einen zusätzlichen Schritt vor. Hier wird zunächst nur ein Polymerfilm auf eine vorher funktionalisierte feste Oberfläche aufgebracht. Danach bringt man durch LB-Transfer eine Lage Lipidmoleküle auf, die teilweise so funktionalisiert sind, dass sie kovalent an die Polymerschicht binden [26]. Danach erfolgt wieder LB-Transfer oder Vesikelfusion der zweiten Lipidschicht.

Diese beiden recht ähnlichen Wege erlauben eine maximale Kontrolle über die Beschaffenheit des Membransystems. [27, 28] Allerdings sind die Werte für Widerstände und Kapazitäten dieser Membranen wesentlich schlechter als die von freien Membranen.

Ein anderer Ansatz setzt auf so genannte „telechelics“. (Abb. 2.4 c)) Dies sind speziell entwickelte Moleküle, die eine Ankergruppe für das jeweilige Substrat besitzen, an der sich eine oligomere Kette als Abstandshalter befindet, an deren Ende ein amphiphiler Molekülteil gebunden ist. Durch Selbstorganisation dieser Moleküle auf dem Substrat entsteht ein Monolayer, der wiederum durch LB-Transfer oder Vesikelfusion zum Bilayer vervollständigt werden kann.

Bei diesem Weg verwendet man ein einziges Molekül als „Komplettlösung“, was die Variationsmöglichkeiten erheblich einschränkt. Dafür ist dieses System relativ einfach herzustellen. Die resultierenden Membranen weisen elektrische Eigenschaften auf, die mit denen freistehender Membranen vergleichbar sind. Zahlreiche derartige Ein-Molekül-Lösungen wurden in der Literatur vorgestellt. [29-31]

Aufgrund der Wichtigkeit für diese Arbeit soll hier besonders der Ansatz von Schiller et al. von 2003 aufgeführt werden. Sie stellten das Molekül 2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol-1-tetraethylenglycol-D,L- $\alpha$ -liponsäureesterlipid (DPTL) vor.

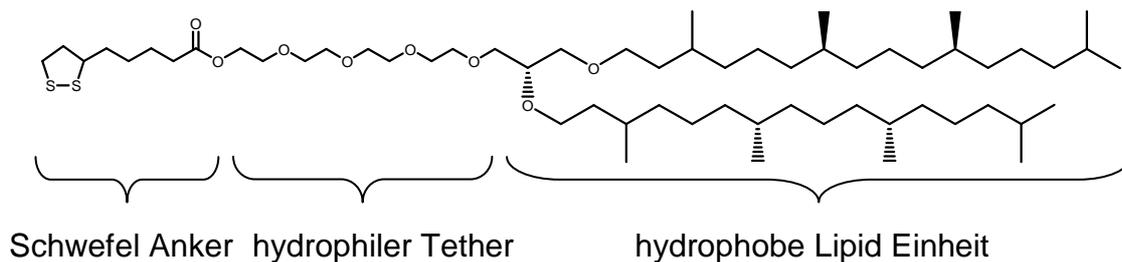


Abb. 2.5 Struktur von DPTL [31]

DPTL besitzt einen Anker aus Liponsäure, mit dem es an Gold Oberflächen binden kann. Der Abstandshalter (der im Folgenden, aufgrund der mangelhaften Übersetzung, „Tether“ genannt wird) aus vier Ethylenglykol Einheiten enthält nur hydrolysestabile Ether Bindungen. Als Lipid Komponente wurden zwei Phytanyl-Ketten über die chirale Glycerol Einheit mit dem Tether verbunden. Diese verzweigten Alkylketten weisen durch die Verzweigungen eine sehr niedrige Übergangstemperatur von  $< -80^{\circ}\text{C}$  auf, wodurch sie bei Raumtemperatur sehr fluide Membranen bilden. Das gesamte Design des Moleküls wurde in Anlehnung an die Lipidmembranen von Archaea Bakterien entwickelt, welche aufgrund der extremen Lebensbedingungen der Mikroben eine hohe Stabilität aufweisen.

Besonders in Kombination mit der Verwendung von ultraflachem Template Stripped Gold [32] konnten durch Selbstorganisation dieser Verbindung aus Ethanol, gefolgt von Vesikelfusion, Membranen mit sehr guten Eigenschaften hergestellt werden.

Auf der Basis dieser Molekülarchitektur wurde eine ganze Familie von Tetherlipiden hergestellt [33]. Dies erlaubt die Herstellung von t-BLMs auch auf Oberflächen wie Silizium oder Glas durch Verwendung von Silan-Ankergruppen. Außerdem wurden die Ankergruppen so modifiziert, dass es möglich ist, durch die Wahl des Tetherlipids die Dichte der resultierenden Membran zu bestimmen. Dies erlaubt die optimale Abstimmung der Membran auf das jeweils zu untersuchende Protein.

## 2.2 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie

### 2.2.1 Einleitung

Elektrische Impedanz Spektroskopie (electrical impedance spectroscopy, EIS) ist eine Technik, die von Materialwissenschaftlern und Elektrochemikern seit den 70er Jahren eingesetzt wird [34]. Obwohl sie ursprünglich entwickelt wurde, um Korrosionsphänomene an Metallen zu untersuchen, eignet sie sich auch hervorragend zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von biologischen Systemen [35]. Sie ist nicht invasiv und erlaubt die Untersuchung biologische Systeme in ihrer natürlichen Umgebung.

### 2.2.2 Physikalischer Hindergrund

Das Ohmsche Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen angelegter Spannung und Stromstärke im Gleichstromkreis.

$$I = \frac{U}{R} \quad (2.1)$$

Die Proportionalitätskonstante zwischen Spannung  $U$  und Stromstärke  $I$  ist also der Widerstand  $R$ . Der Widerstand ist die Fähigkeit eines Stoffes, dem Fluss von elektrischer Ladung zu widerstehen. Er geht zurück auf den spezifischen Widerstand, der als Materialkonstante unabhängig von den Dimensionen des betrachteten Stoffes ist, wobei  $l$  die Länge und  $A$  die Fläche des Leiters sind.

$$R = \frac{\rho \cdot l}{A} \quad (2.2)$$

Die Einheit des Widerstandes ist das Ohm  $\Omega$  so dass der spezifische Widerstand  $\rho$  in  $\Omega \cdot cm$  angegeben wird. Oft findet man in der Literatur auch die spezifische Leitfähigkeit  $\sigma$ , die der Kehrwert von  $\rho$  ist.

Der lineare Zusammenhang zwischen Spannung und Stromstärke gilt aber nur für einen Spezialfall: den perfekten Widerstand. Die reale Welt zeigt ein wesentlich komplexeres, nichtlineares Verhalten, daher wurde das Prinzip der Impedanz eingeführt. Die Impedanz  $Z$  ist die Fähigkeit eines Stoffes, dem Fluss einer Wechselspannung zu widerstehen. Dabei gilt analog zum Ohmschen Gesetz:

$$I_{ac} = \frac{U_{ac}}{Z} \quad (2.3)$$

Diese Beziehung ist nur dann gegeben, wenn die Anregungsamplitude sehr klein ist (man spricht auch von pseudolinearem Verhalten). Deshalb arbeitet man in der Impedanz Spektroskopie mit Spannungen von maximal 25mV.

Im Wechselstromkreis sind die Angaben von Strom und Spannung in Form von einfachen Zahlen nicht ausreichend, da es sich bei ihnen um zeitlich veränderte Größen handelt. Man muss ebenfalls ihre Phasenverschiebung zueinander angeben.

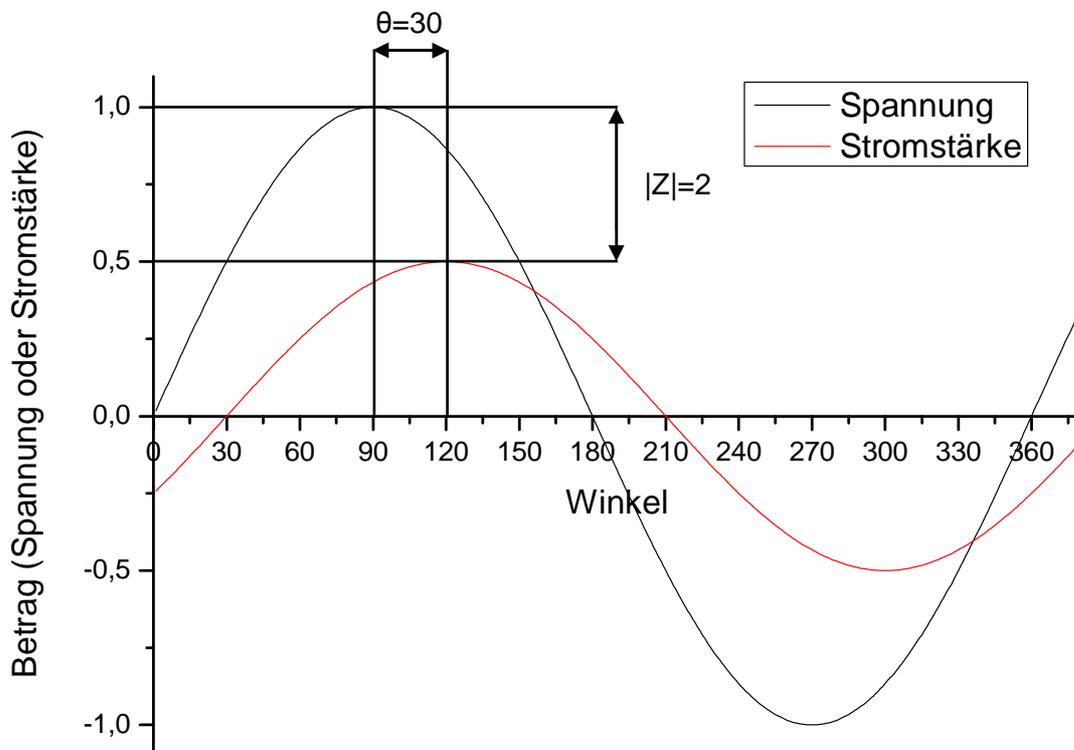


Abb. 2.6 Beispiel für das Verhalten von Spannung und Stromstärke im Wechselstromkreis

Das Beispiel in Abb. 2.6 zeigt, wie das Verhältnis aus Spannung und Stromstärke durch zwei Angaben charakterisiert wird. Die Stromstärke eilt hier der Spannung um  $30^\circ$  voraus, dies ist die Phasenverschiebung  $\Theta$ . Das Verhältnis der absoluten Werte von Spannung und Stromstärke ist hier 2, dies ist der Betrag der Impedanz,  $|Z|$ , manchmal auch Modulus genannt.

Daraus folgt, dass man die Impedanz auch als Vektor im Polarkoordinatensystem darstellen kann.

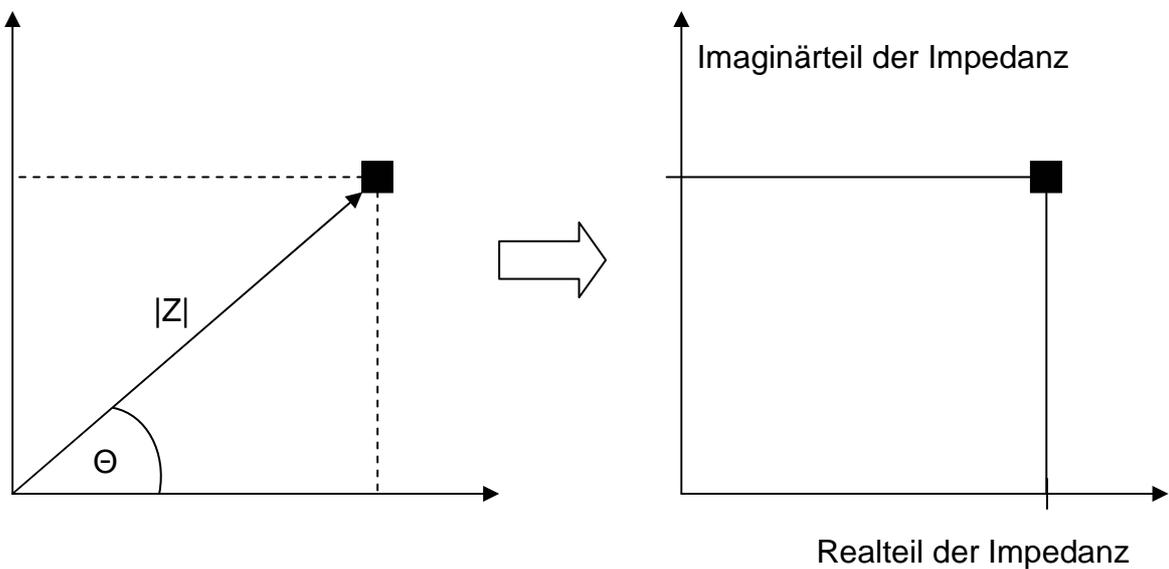


Abb. 2.7 Die Impedanz als Vektor

Im linken Teil von Abb. 2.7 ist die Impedanz als Vektor in einem Polarkoordinatensystem dargestellt, wobei der Betrag der Impedanz die Länge und die Phasenverschiebung den Winkel des Vektors festlegen. Transformiert man dies zu kartesischen Koordinaten, so bezeichnet man die X-Achse als Realteil, die Y-Achse als Imaginärteil der Impedanz. Somit ist die Impedanz eine komplexe Zahl. Dieser Zusammenhang lässt sich auch mit der Euler Beziehung darstellen.

$$Z = Z_0 \cdot \exp(i\Theta) \quad (2.4)$$

### 2.2.3 Messprinzip

Die Messung eines Impedanz Spektrums erfolgt über ein Drei-Elektroden System bestehend aus Arbeitselektrode (die Goldschicht), Referenzelektrode (ein Pt-Draht) und Gegenelektrode

(eine Ag/AgCl Elektrode). Die vom Wellengenerator erzeugten sinusförmigen Spannungssignale definierter Frequenz werden an Arbeits- und Referenzelektrode angelegt und die resultierende Stromstärke (d.h. ihre Phase und ihr Betrag) wird gemessen. Die Gegenelektrode dient nur zum Ausgleich der Ladungen, man misst also die Impedanz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode. Dies wiederholt man nun für viele andere Frequenzen über mehrere Größenordnungen des Frequenzspektrums. Die so erhaltenen Daten kann man auf verschiedene Arten darstellen: im Bode Plot trägt man den Logarithmus von  $|Z|$  sowie die Phasenverschiebung  $\Theta$  gegen den Logarithmus der Messfrequenz auf. Die andere Darstellungsweise, der Niquist Plot macht Gebrauch von der komplexen Natur der Impedanz: man trägt den Imaginärteil gegen den Realteil auf, die Frequenz taucht nicht auf. Beide Darstellungsweisen haben Vor- und Nachteile, was anhand von Beispielen deutlich gemacht werden soll.

Informationen über das tatsächliche physikalische System erhält man nun, indem man die erhaltenen Daten mit bestimmten Modellschaltkreisen vergleicht. Diese Äquivalenzschaltkreise bestehen meistens nur aus idealen physikalischen Bauteilen, wie Widerstand, Kondensator oder Spule.

#### 2.2.4 Äquivalenzschaltkreise

##### i) Der Ohmsche Widerstand

Beim idealen Ohmschen Widerstand reagiert die Stromstärke sofort auf Änderungen der Spannung. Die Phasenverschiebung im Bode Plot ist immer null. Außerdem ist der Betrag der Impedanz unabhängig von der Frequenz der Spannung, also eine konstante Zahl. Da der Winkel  $\Theta$  in Abb. 2.8 immer null ist, ist auch der Imaginärteil der Impedanz immer null und der Niquist Plot ist nur ein einziger Punkt.

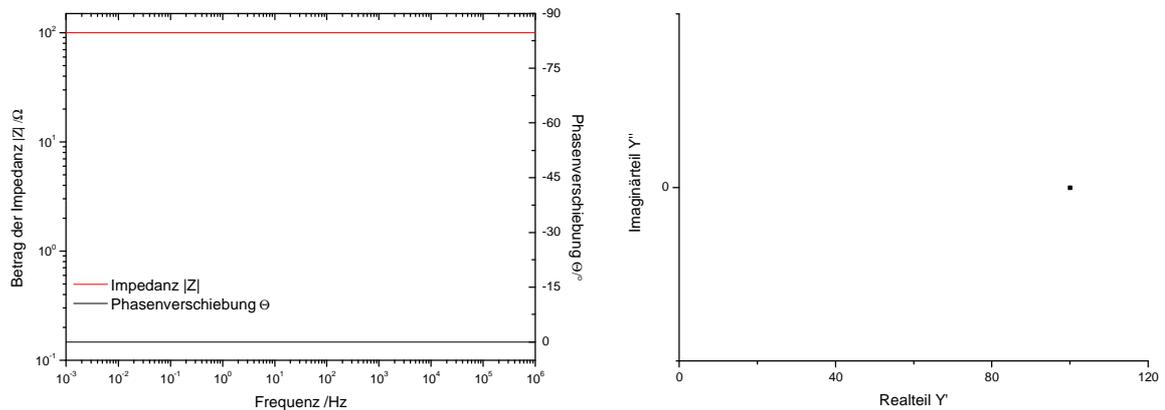


Abb. 2.8 Bode- und Niquist Plot für einen idealen Ohm'schen Widerstand

Beispiele für einen idealen Widerstand sind Elektrolytlösungen und Kabelverbindungen.

## ii) Der Kondensator

Ein Kondensator besteht aus zwei leitfähigen Platten, die durch eine Schicht eines nicht leitenden Materials (Dielektrikum) getrennt sind. Beim Anlegen einer Gleichspannung an die beiden Platten kommt es zum Aufladevorgang, bei der an der einen Platte ein Elektronenüberschuss, an der anderen ein Elektronenmangel erzeugt wird. Während dieses Vorganges fließt Strom, der mit zunehmendem Ladezustand immer geringer wird.

Im Wechselstromkreis ist ein kontinuierliches Fließen von Ladungen möglich, da die beiden Platten durch die Oszillation der Spannung zunächst geladen, danach entladen und mit umgedrehtem Vorzeichen wieder geladen werden. Hierbei kommt es zu einer Phasenverschiebung von  $90^\circ$  zwischen angelegter Spannung und Stromstärke. Aus einem sinusförmigen Spannungssignal entsteht also ein kosinusförmiges Stromsignal. Die Stromstärke erreicht ein Maximum, wenn die Änderung der Spannung beim Nulldurchgang maximal ist. Dies ist anhand des beschriebenen Vorganges verständlich: beim Nulldurchgang der Spannung wird an die negativ aufgeladene Platte des Kondensators eine positive Spannung angelegt. Dies führt verständlicherweise zu einer hohen Stromstärke. Die Größe der Stromstärke durch einen Kondensator hängt somit auch von der Frequenz der Wechselspannung ab. Bei hohen Frequenzen ändert sich die Spannung sehr schnell und die Stromstärke wird groß. Bei sehr niedrigen Frequenzen nähert sich das Verhalten des

Kondensators dem im Gleichstromkreis an: seine Impedanz wird unendlich groß. Im Bode Plot ist der Betrag der Impedanz eine lineare Funktion mit der Steigung -1.

Da die Phasenverschiebung in Abb. 2.9 immer  $90^\circ$  beträgt, ist der Realteil der Impedanz beim Kondensator immer null. Die Impedanz errechnet sich aus der Kapazität  $C$  und der Frequenz des Spannungssignals  $f$ :

$$Z_{\text{Kondensator}} = i \left[ -\frac{1}{2\pi f C} \right] \quad (2.5)$$

Die Kapazität wird durch die Fläche der Platten  $A$ , deren Abstand  $d$  sowie die Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums  $\epsilon$  bestimmt:

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{d} \quad (2.6)$$

$\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-14} \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, eine Naturkonstante.

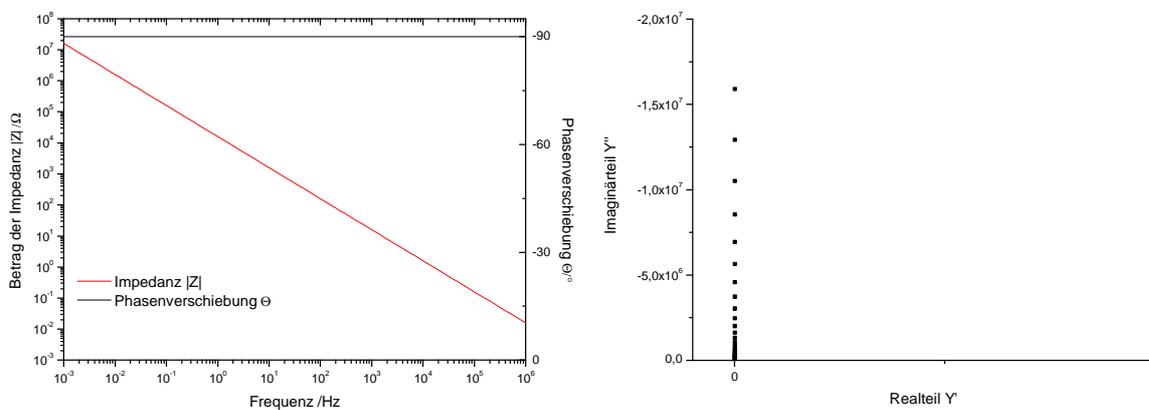


Abb. 2.9 Bode- und Nyquist Plot für einen Kondensator

Ein wichtiges Beispiel für einen Kondensator ist die elektrische Doppelschicht (siehe Kapitel 2.3).

iii) Die Randles Zelle

Die Randles Zelle ist eine einfache, aber nützliche Kombination von Widerständen und einem Kondensator. Sie beschreibt das Verhalten eines Leiters, z.B. einer Metallplatte, welche mit einem Nichtleiter (z.B. einer organischen Schicht) überzogen ist, welche in eine Elektrolytlösung eintaucht. Ihr Schaltbild sieht folgendermaßen aus:

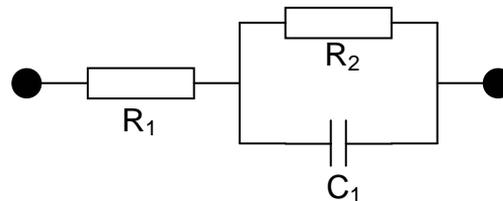


Abb. 2.10 Schaltbild einer Randles Zelle

Der Widerstand  $R_1$  repräsentiert die Elektrolytlösung zwischen der Referenzelektrode und der Oberfläche der organischen Schicht (Arbeitselektrode). Seine Größe ist abhängig von der Ionenstärke der Lösung und auch ihrer Temperatur.

Der Kondensator  $C_1$  steht für die organische, nicht leitende Schicht auf der Elektrode, die wie ein Dielektrikum wirkt. Die beiden Platten des Kondensators sind die Elektrode selbst und die Elektrolytlösung. Die Kapazität von  $C_1$  wird durch die Dicke der Beschichtung sowie deren Dielektrizitätskonstante bestimmt. (Gl. 2.6) Die verbleibende Leitfähigkeit der organischen Schicht sowie mögliche Defekte werden durch den Widerstand  $R_2$  berücksichtigt. In einem perfekten System, also einer vollständig geschlossenen organischen Schicht die keine Leitfähigkeit besitzt wäre  $R_2$  unendlich groß.

Abb. 2.11 zeigt Bode- und Niquist-Plot für eine Randles Zelle mit den Werten  $R_1=50\Omega$ ,  $R_2=1 \times 10^6\Omega$  und  $C_1=1 \times 10^{-6}\text{F}$ .

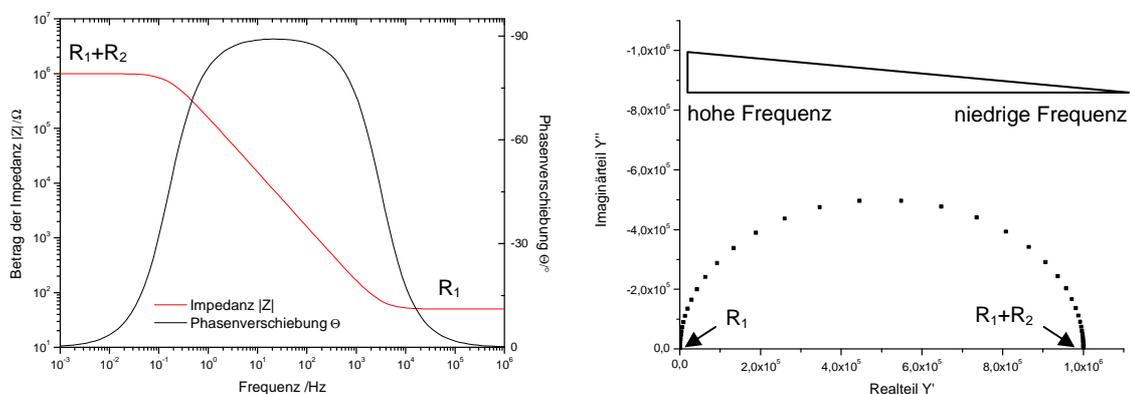


Abb. 2.11 Bode- und Niquist-Plot für eine Randles Zelle

Beim Betrachten der Extremfälle von sehr hohen und sehr niedrigen Frequenzen lassen sich diese Plots gut verstehen.

Bei sehr hohen Frequenzen wird der Realteil der Impedanz des Kondensators nach Gl. 2.5 sehr klein. Dadurch wird der dazu parallele Widerstand  $R_2$ , der eine viel höhere Impedanz besitzt, kurzgeschlossen. Damit ist  $R_1$  in diesem Frequenzbereich das einzige Element mit messbarer Impedanz. Daher kann man den Widerstand  $R_1$  an der  $|Z|$  Kurve im rechten Teil des Bode Plots ablesen. Auch die Phasenverschiebung bei hohen Frequenzen wird durch den Widerstand  $R_1$  dominiert und ist somit  $0^\circ$ .

Bei sehr niedrigen Frequenzen wird  $|Z|$  sehr groß. Dadurch fließt fast aller Strom durch den parallelen Widerstand  $R_2$ , so als ob die Kapazität nicht vorhanden wäre. Somit verbleibt eine Reihenschaltung zweier Widerstände deren Impedanzen sich addieren. Dies sieht man im horizontalen Teilstück der  $|Z|$  Funktion an der linken Seite des Bode Plots.

Bei mittleren Frequenzen kann die Kapazität nicht vernachlässigt werden. Der Betrag der Impedanz liegt zwischen den beiden Extremen. Die Steigung ist -1, wie es für eine Kapazität zu erwarten ist. Auch die Phasenverschiebung liegt bei  $-90^\circ$ .

### 2.2.5 Bestimmung von Parametern realer Systeme

Im Laufe dieser Arbeit werden weitere, komplexere Modelle entwickelt werden um die entsprechenden Systeme zu beschreiben. An die Erstellung eines Modellsystems muss mit Vorsicht herangegangen werden. So ist es sehr einfach, durch Kombination einer großen Zahl von Elementen ein Modell zu erstellen, welches auf fast alle Impedanzdaten passt. Es ist jedoch immer wichtig, die physikalische Rechtfertigung für die einzelnen Bauteile im Auge zu behalten.

Dies gilt besonders bei der Verwendung von nicht-idealen Bauteilen. So lässt sich z.B. statt eines Kondensators ein Constant Phase Element (CPE) verwenden. Dies besteht aus einer Verteilung paralleler Kondensatoren und kann eine andere Phasenverschiebung als  $-90^\circ$  besitzen.

Die Bestimmung der Parameter der einzelnen Bauteile, also Widerstände und Kapazitäten erfolgt über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach einem nicht-linearen Fit Algorithmus. Dabei werden der Software Startwerte der Parameter gegeben, die dann an die experimentellen Daten angepasst werden.

Im Auswertungsteil dieser Arbeit werden anstelle der Niquist Plots der Impedanz immer die Niquist Plots der Admittanz dargestellt. Diese haben den Vorteil, dass man Kapazitäten direkt

ablesen kann. Die Admittanz, auch komplexer Leitwert genannt ist der Kehrwert der Impedanz.

### 2.3 Die Elektrochemische Doppelschicht

Taucht eine oberflächlich geladene Metallelektrode in eine Elektrolytlösung ein, so kommt es an der Grenzfläche zwischen fester und flüssiger Phase zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht. Dabei ist es unerheblich, ob die Ladung an der Elektrode durch einen Redox-Vorgang oder eine an die Elektrode angeschlossene Spannungsquelle zustande kommt. Die Doppelschicht entsteht dadurch, dass in der Lösung enthaltene, solvatisierte Ionen bestrebt sind, sich der gegensätzlich geladenen Elektrode so weit zu nähern, wie es ihre Hydrathülle erlaubt. Somit entstehen zwei gegensätzlich geladene Schichten im Abstand von  $a/2$  (dem halben Durchmesser der solvatisierten Ionen). Dieses einfachste Modell der elektrischen Doppelschicht wurde von Helmholtz entwickelt und wird als starre Doppelschicht bezeichnet.

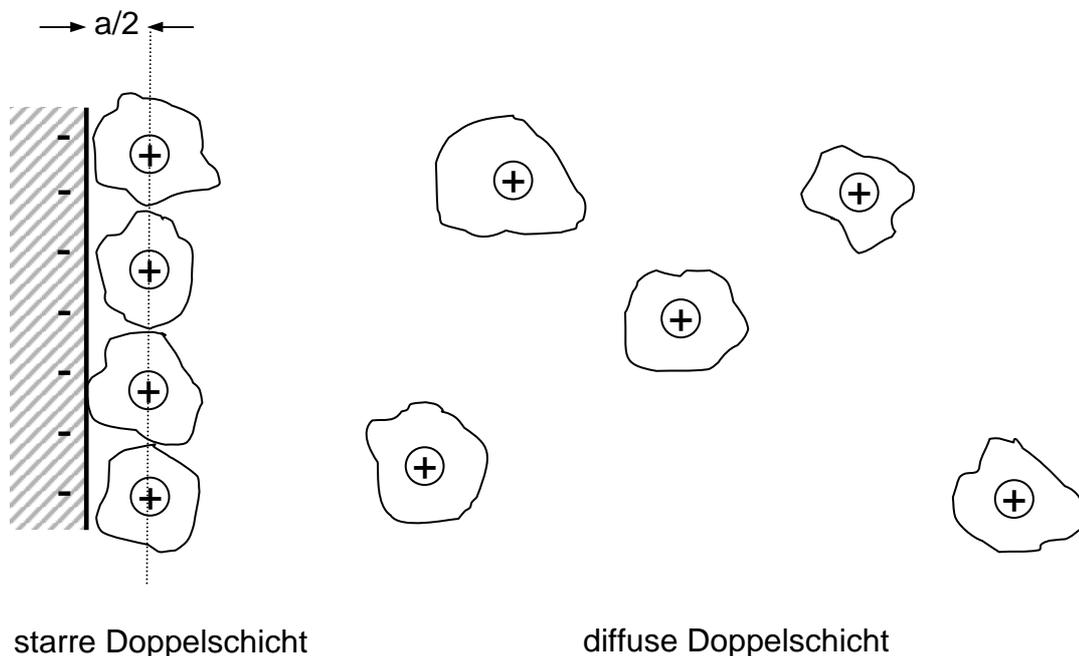


Abb. 2.12 Schematische Darstellung der Stern Doppelschicht

Diese Helmholtzschicht verhält sich wie ein Plattenkondensator mit dem Plattenabstand von  $a/2$ . Ein genaueres Modell von Gouy-Chapman berücksichtigt auch Diffusionseffekte von Ionen, welche die starre Struktur der Helmholtzschicht aufbrechen. Das Stern-Modell (Abb. 2.12) verbindet die beiden Extrema und beschreibt die Phasengrenze als eine Reihenschaltung

der starren Helmholtz- sowie der diffusen Doppelschicht Kapazität. Da der Einfluss der diffusen Doppelschicht erst bei niedriger Ionenkonzentration an Bedeutung gewinnt (unter 0,1 mol/l) kommt der Haupteffekt in dieser Arbeit hauptsächlich durch die Helmholtz Schicht zustande. Der Literatur zufolge besitzt die Helmholtz Schicht auf einer glatten Elektrode Kapazitäten zwischen 5 und 50  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  [36]. Dieser Wert ist abhängig von Metallart, Lösungszusammensetzung, Ionenstärke und Temperatur. An rauen Oberflächen kann die Kapazität bis zu 1000 mal höher sein.

## 2.4 Oberflächenplasmonen Spektroskopie

### 2.4.1 Oberflächenplasmonen

Durch optische Bestrahlung bestimmter Metalle wie z. B. Gold oder Silber, ist es möglich, deren Elektronengas an der Grenzfläche zu einem Dielektrikum zu kollektiven Oszillationen anzuregen, welche sich parallel zur Metalloberfläche ausbreiten [37]. Diese, Oberflächenplasmonen (engl. surface plasmons, SP) genannten Schwingungen sind immer p-polarisiert und werden durch eine starke Dämpfung in ihrer Ausbreitungsrichtung schnell in Wärme umgewandelt [38].

Die Anregung eines Oberflächenplasmons durch einen einfallenden Lichtstrahl ist nur möglich, wenn die Wellenvektorkomponente des Photons in Ausbreitungsrichtung  $k_{ph\phi}$  gleich der Wellenzahl des zu erzeugenden Plasmons  $k_{SP}$  ist (Impulserhaltung). Die Wellenzahl des Plasmons ist eine Funktion der elektrischen Eigenschaften des Metalls und des umgebenden Dielektrikums.

Die Impulserhaltung ist in den meisten Fällen nicht gegeben, weil  $k_{ph\phi}$  zu klein ist. Eine Möglichkeit, den Impuls des einfallenden Photons zu erhöhen ist die Prismenkopplung. Dabei wird der Lichtstrahl durch ein optisch dichtes Medium (das Prisma) auf die Metalloberfläche gestrahlt. Des Weiteren ist  $k_{ph\phi}$  abhängig von dem Einfallswinkel des Lichtstrahls in Bezug auf die Normale der Metalloberfläche.

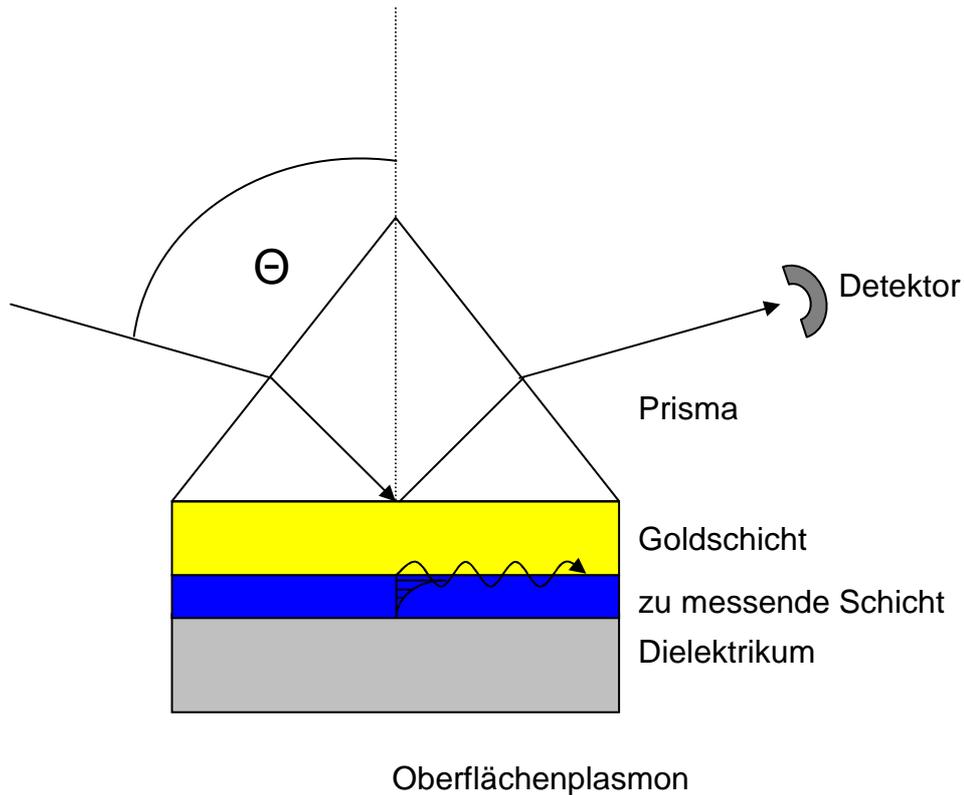
$$k_{ph\phi} = |k_{ph}| \sin \Theta \quad (2.7)$$

Durch Modifikation des Einfallswinkels  $\Theta$  ist es also möglich, die Plasmonenresonanz zu ermöglichen oder zu verbieten. Dieses Prinzip macht man sich in der Plasmonenresonanz Spektroskopie zunutze.

#### 2.4.2 Prinzip der Oberflächenplasmonen Spektroskopie

Die häufigste, auch in dieser Arbeit verwendete Realisierung der Oberflächenplasmonen Spektroskopie nennt man Kretschmann Konfiguration. Dabei fällt der p-polarisierte Lichtstrahl (Laser) durch ein Prisma unter einem Winkel größer als dem kritischen Winkel der Totalreflexion auf eine ca. 50nm dicke, aufgedampfte Goldschicht, an deren Rückseite sich das Dielektrikum befindet. Dabei fällt die Komponente des elektrischen Feldes des Lichtstrahls senkrecht zur Metalloberfläche ( $E_z$ ) exponentiell mit der Eindringtiefe ab und erzeugt so ein evaneszentes Feld im Metall. Unter der Bedingung der Impulserhaltung werden dadurch an der, dem Prisma abgewandten Seite der Goldschicht, Oberflächenplasmonen erzeugt. Dies wird am Detektor anhand eines Intensitätsminimums des reflektierten Strahls beim passenden Einfallswinkel sichtbar.

Werden nun dünne, dielektrische Schichten auf die Goldschicht aufgebracht, so verändert sich der Winkel, bei dem die Plasmonenresonanz auftritt. Grund dafür ist der veränderte Brechungsindex im Bereich des evaneszenten Feldes.



*Abb. 2.13 Kretschmann Konfiguration eines Oberflächenplasmonen Spektrometers*

#### 2.4.3 Verschiedene Messmodi in der Oberflächenplasmonen Spektroskopie

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Messtechniken der Plasmonenspektroskopie verwendet. Beim winkelabhängigen Scan wird mithilfe eines Goniometers ein bestimmter Winkelbereich abgefahren und in regelmäßigen Abständen die reflektierte Intensität gemessen. Durch die Verwendung geeigneter Modelle [37] ist es möglich, aus den Winkel/Intensität Wertepaaren einer solchen Messung bei bekanntem Brechungsindex des Materials die Dicke des Filmes zu bestimmen, oder umgekehrt.

Im kinetischen Modus wird die Messung bei einem festen Winkel durchgeführt, der üblicherweise etwas kleiner ist, als der Plasmonenresonanzwinkel der reinen Goldschicht [39]. Nun kann der zu untersuchende Prozess (z. B. eine Vesikelfusion) durchgeführt werden. Die Erzeugung eines dielektrischen dünnen Films auf der Goldoberfläche ist durch eine Erniedrigung der reflektierten Intensität detektierbar.

## 2.5 Hydrogele

Hydrogele sind definiert als ein Netzwerk von hydrophilen Polymeren. Diese Hydrophilie kann durch polare Gruppen in der Seitenkette (z.B. Polyvinylalkohol, Polyacrylamid) oder im Polymerrückrad (z.B. Polyethylenoxid) zustande kommen. Durch die Hydrophilie ist es für das Polymer energetisch günstig, möglichst viele Wassermoleküle zu koordinieren. Dabei ist es jedoch aufgrund der Vernetzung nicht möglich, dass sich das Polymer vollständig im Wasser löst. Stattdessen quillt das Polymer bei Kontakt mit Wasser nur und kann dadurch sein Volumen um das bis zu tausendfache erhöhen.

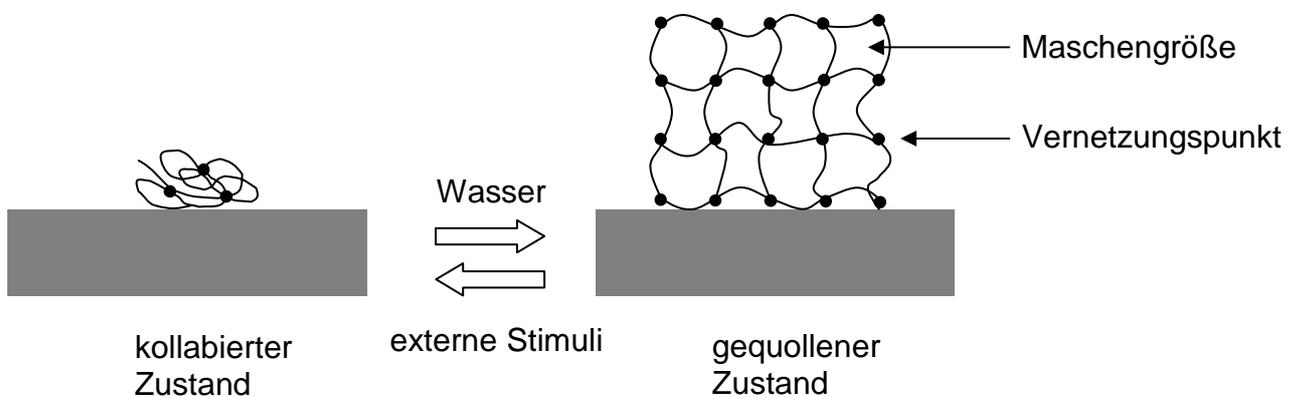


Abb. 2.14 Schematische Darstellung eines Hydrogels

Der Weg zurück zum „trockenen“ Zustand erfolgt mit der Zeit durch Verdunsten des Wassers. Da aber die Wechselwirkung zwischen Wasser und Polymer so attraktiv ist, dauert dies erheblich länger als der Verdunstungsvorgang einer gleichen Menge ungebundenen Wassers.

Eine besondere Klasse sind responsive Hydrogele [40]. Bei diesen Strukturen ist der Weg zurück zum kollabierten Zustand durch besondere Stimuli möglich. Beispiele dafür sind Änderungen in der Temperatur, im pH oder im Druck. Diese Stimuli bewirken eine Veränderung der energetischen Verhältnisse am Hydrogel, wodurch die Wechselwirkung mit Wasser repulsiv wird. Dadurch wird das Wasser aus dem Gel verdrängt und es kollabiert. In dieser Arbeit wird ein Vertreter der thermoresponsiven Hydrogele verwendet: Poly(N-Isopropylacrylamid) (PNIPAAm).

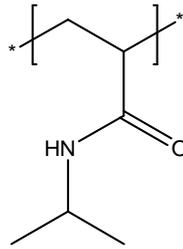


Abb. 2.15 Struktur von PNIPAAm

Durch Polymerisation des NIPAAm Monomers mit einem bifunktionalen Vernetzer kann ein Hydrogelnetzwerk hergestellt werden.

Dieses Polymer wurde in der Literatur bereits intensiv beschrieben [41]. Es ist von besonderem Interesse, weil es eine inverse Löslichkeit beim Erhitzen besitzt (normalerweise steigt die Löslichkeit mit der Temperatur). Die Kollapstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) liegt abhängig von seiner Mikrostruktur zwischen 30 und 35°C. Der Grund für das spezielle Verhalten bei Temperaturerhöhung liegt im Zusammenspiel zwischen Enthalpie und Entropie. Durch die Amidbindung ist das Polymer zur Wasserstoffbrückenbildung mit umgebenden Wassermolekülen befähigt, was für eine negative Mischenthalpie sorgt. Dazu ist jedoch eine besondere Ausrichtung der Polymerkette innerhalb der Wasserstoffbrückenstruktur des Wassers notwendig. Besonders im Bereich der hydrophoben Isopropyl-Seitenkette müssen die Wassermoleküle eine besondere, in der Literatur als klathratartig beschriebene [42] Struktur einnehmen. Dies führt zu einer starken Verringerung der Entropie beim Mischen (negatives  $\Delta S$ ). Die freie Gibbs'sche Enthalpie für den Mischvorgang berechnet sich nach der bekannten Formel:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2.8)$$

Ab einer bestimmten Temperatur, der LCST überwiegt der Entropieterm den Enthalpieterm, die freie Mischenthalpie wird positiv und Phasenseparation tritt ein. Dieser Vorgang ist reversibel, durch Erniedrigung der Temperatur kann das Hydrogel wieder zum Quellen gebracht werden.

Eine wichtige Eigenschaft eines Polymernetzwerkes ist seine Maschengröße  $\xi$ . Diese ist definiert als das Molekulargewicht zwischen den Vernetzungspunkten. Je mehr Vernetzer-Moleküle bei der Polymerisation verwendet wurden, desto kleiner ist die Maschengröße des Hydrogels und desto geringer ist die Penetrierbarkeit des Gels.

Neben Anwendungen in alltäglichen Gegenständen wie Kontaktlinsen und Babywindeln wird der Einsatz von Hydrogelen zum Transport biologisch aktiver Stoffe im Körper diskutiert [43]. Die Idee ist es, Wirkstoffe in Hydrogelkapseln einzuschließen die in die Blutbahn des Patienten gelangen und an einer genau definierten Stelle im Körper kollabieren, wobei der Wirkstoff freigesetzt wird.

### 3. Zielsetzung dieser Arbeit

#### 3.1 Einleitung

Wie bereits erwähnt, ist es das Ziel dieser Arbeit, t-BLMs durch den Einschluss in ein Hydrogel mechanisch zu stabilisieren und vor dem Austrocknen zu schützen. Dabei sollen zwei Ansätze verfolgt und miteinander verglichen werden: zum einen soll die Hydrogelschicht auf die Membran gelegt, zum anderen mithilfe eines modifizierten Lipidmoleküls kovalent an sie gebunden werden. Durch Impedanz Spektroskopie soll der Einfluss des Hydrogels auf die elektrischen Eigenschaften der Membran untersucht werden. Außerdem soll nach der Hydrogelapplikation ein Membranprotein eingebaut werden und dessen Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden. Dadurch wird der Beweis erbracht, dass die Membran durch das Hydrogel nicht zerstört wird. Des Weiteren ist es natürlich notwendig zu zeigen, dass die Aufbringung einer Hydrogelschicht tatsächlich Vorteile bei der Stabilität bietet und vor dem Austrocknen schützt.

Abb. 3.1 zeigt den schematischen „Bauplan“ für das herzustellende System.

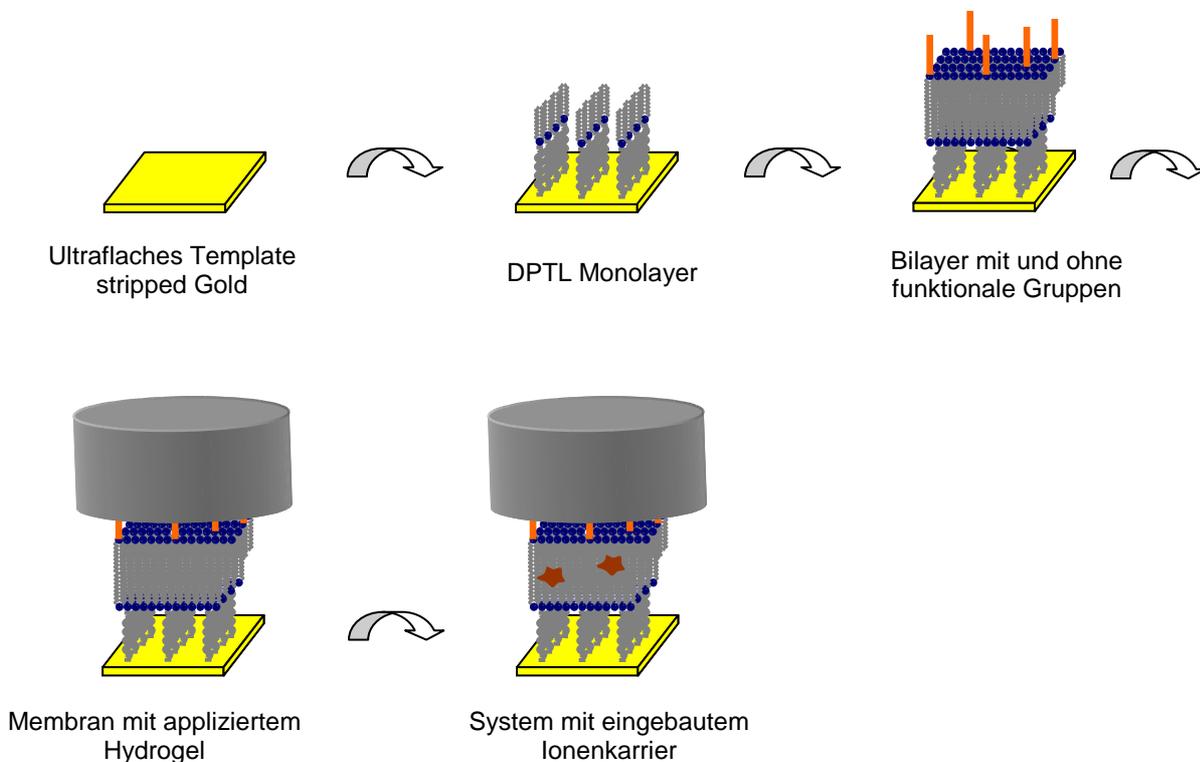


Abb. 3.1 Bauplan für das herzustellende System

### 3.2 Template Stripped Gold

Da die elektrischen Eigenschaften des Systems gemessen werden sollen, ist es nötig, ein leitfähiges Material als Unterlage der Membran zu verwenden. Aufgrund der niedrigen Rauigkeit bietet sich das vorher schon erwähnte Template Stripped Gold (TSG) an.

Dazu dampft man eine dünne Goldschicht auf die extrem glatte Oberfläche eines gereinigten Silizium Wafers. Mithilfe eines Epoxyt-Harzes klebt man dann auf diese Goldschicht einen Objektträger aus Glas. Nach dem Aushärten des Klebers kann man nun mithilfe eines Skalpell den Glasträger von Silizium abziehen (strippen). Da die Goldschicht am Kleber besser haftet als am Silizium erhält man somit einen Glasträger, auf den eine dünne Goldschicht geklebt ist. An der Außenseite besitzt das Gold die extrem hohe Glätte des Siliziums (Abb. 3,2).

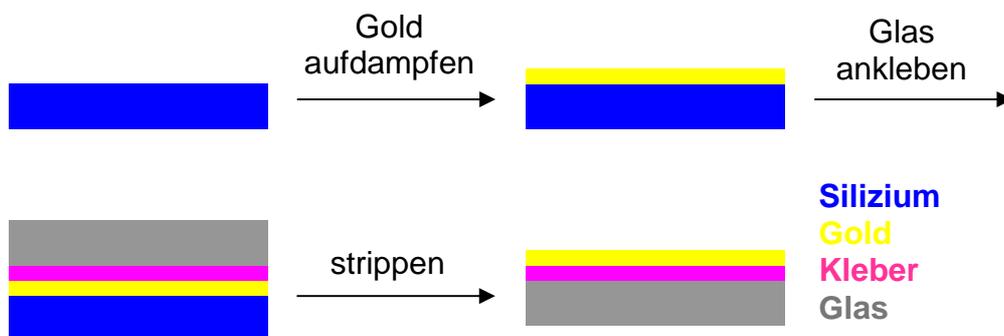


Abb. 3.2 Herstellung von Template Stripped Gold

### 3.3 DPTL Monolayer

Aufgrund ihrer Fähigkeit hervorragende Membranen auszubilden, werden in dieser Arbeit DPTL Monolayer verwendet. Die Monolayer sollen durch Selbstorganisation aus flüssiger Phase entstehen. Zur Herstellung wird DPTL in trockenem Ethanol gelöst und der frisch gestrippte Gold Träger für eine Zeit von 24 Stunden darin eingelegt. Diese Zeitspanne ergab sich aus Erfahrungswerten in unserer Gruppe.

Selbstorganisation ist ein komplexer Vorgang der noch nicht vollständig verstanden ist. Das Grundkonzept ist die spontane, spezifische Wechselwirkung zwischen zwei molekularen Einheiten. Die dabei entstehende Struktur hat neue Eigenschaften, die von der Natur der Wechselwirkung sowie der räumlichen Anordnung der einzelnen Komponenten abhängen.[44]

Es wurde an Alkylthiolen gezeigt, dass die Kinetik des Selbstorganisationsprozesses in zwei Stufen abläuft. Die erste Stufe ist ein sehr schneller Prozess von einigen Minuten, in denen Dicke und Kontaktwinkel des Monolayers etwa 80-90% ihrer Endwerte erreichen. Es handelt sich um einen diffusionskontrollierten Prozess dessen Geschwindigkeit stark von der Konzentration des Alkylthiols abhängt. Im zweiten Schritt, der mehrere Stunden dauert, nehmen die vorher ungeordneten Alkylketten eine geordnete, zweidimensional kristalline Struktur ein. [45]

Die homolytische Stärke der Gold-Schwefel Bindung ist mit 185 kJ/mol extrem hoch [46] was die hohe Stabilität der so erzeugten Monolayer erklärt. Disulfide, wie die im DPTL vorkommenden Liponsäuregruppen reagieren unter oxidativer Addition der S-S-Bindung an die Goldoberfläche.



Der DPTL Monolayer hat mit einem Kontaktwinkel von  $104^\circ$  eine ziemlich hydrophobe Oberfläche [32]. Dies ist für die im nächsten Schritt folgende Vesikelfusion von großer Bedeutung.

### 3.4 Herstellung des Bilayers

Die Vervollständigung des Monolayers zum Bilayer erfolgt in dieser Arbeit meistens durch Vesikelfusion. Die Vesikel werden durch Extrusion einer Lipidemulsion in Milli-Q Wasser hergestellt. Diese Vesikel werden in die Messapparatur mit dem Monolayer gegeben, der von einer Elektrolytlösung bedeckt ist.

Der Prozess der Bildung der äußeren Lipidschicht besteht vermutlich aus drei Schritten. Zunächst werden die Vesikel an der hydrophoben DPTL Oberfläche adsorbiert, dann platzen sie und der Lipidfilm spreitet sich über die gesamte Oberfläche. Da sich im Innern der Vesikel Milli-Q Wasser, um sie herum aber eine Elektrolytlösung befindet wird die Tendenz zum Aufplatzen durch den osmotischen Druck verstärkt. Bei der Vesikelfusion wird nicht nur die obere Hälfte der Membran hinzugefügt, es wird auch die untere Hälfte der Membran, also die Lipidketten vom DPTL-Monolayer, dichter mit Lipidmolekülen aufgefüllt. Diesen Vorgang nennt man „Backfilling“.

Das in dieser Arbeit verwendete Lipid ist 1,2-Diphytanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DPhyPC, Abb. 3.3).

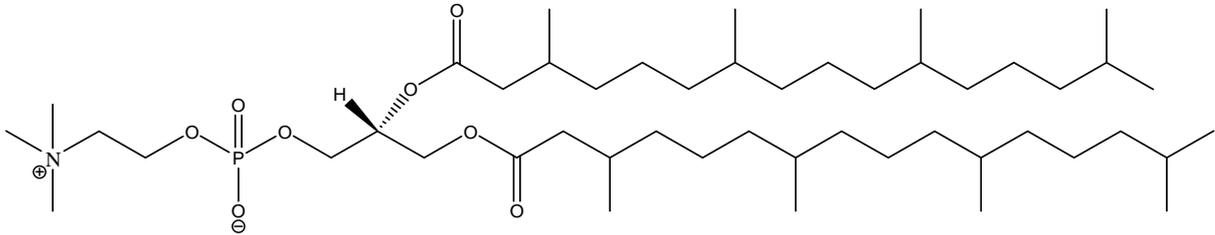


Abb. 3.3 Struktur von DPhyPC

Wie DPTL enthält auch dieses Molekül die für Archaea Bakterien typischen Phytanylketten, die für sehr stabile Membranen mit hoher Fluidität sorgen.

Um eine kovalente Bindung zwischen Hydrogel und Membran zu ermöglichen, soll außerdem ein Lipidmolekül mit einer Doppelbindungsfunktionalität an der Kopfgruppe synthetisiert werden (Acryl-DPhyPE, Abb. 3.4). Diese Doppelbindung kann bei der Polymerisation des Hydrogels als Comonomer in das Polymernetzwerk eingebaut werden.

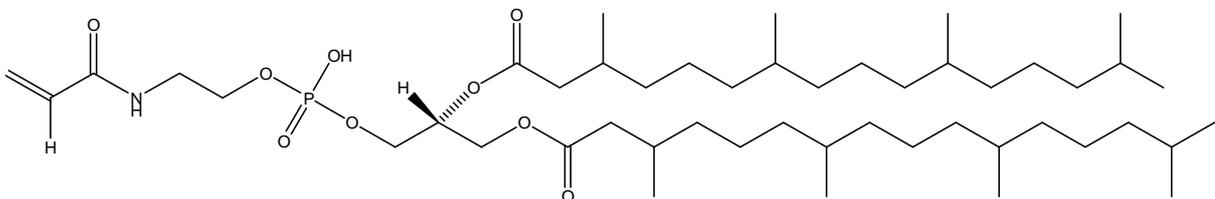


Abb. 3.4 Struktur von Acryl-DPhyPE

### 3.5 Polymerisation des Hydrogels

Als Hydrogelkomponente für dieses Projekt wurde das System N-Isopropylacrylamid (NIPAAm) mit Methylenbisacrylamid (MBA) als Vernetzer ausgewählt. Gründe für diese Wahl sind die Bioverträglichkeit des resultierenden Hydrogels sowie die Möglichkeit der einfachen, nasschemischen radikalischen Polymerisation. Außerdem besitzt Poly(NIPAAm) den bereits diskutierten, interessanten Effekt der Thermoresponsivität und lässt sich bei Bedarf einfach funktionalisieren, was für eventuelle Sensoranwendungen sehr nützlich wäre.

Die Polymerisation verläuft radikalisch und wird durch das Redoxpaar Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) initiiert (Abb. 3.5).

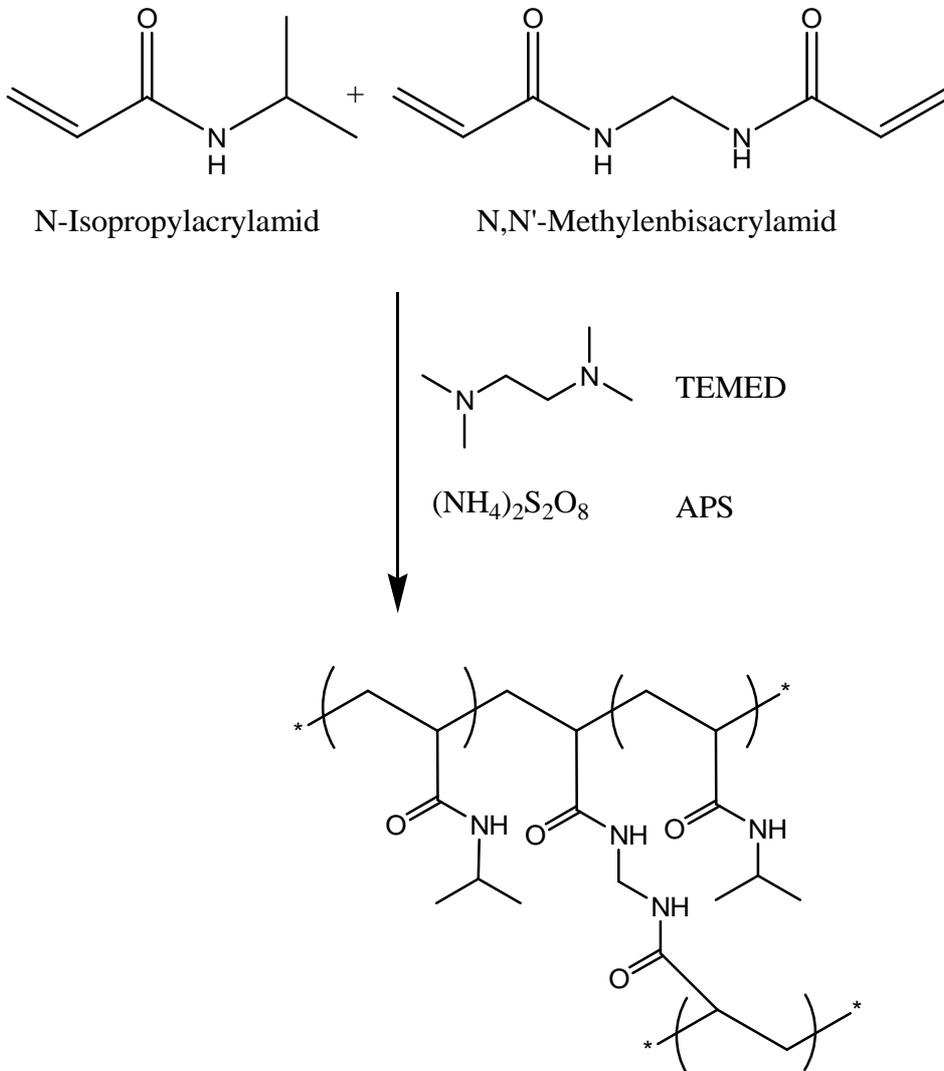


Abb. 3.5 Polymerisation von NIPAAm mit MBA als Vernetzer

De Feng et al. haben den Initiationsmechanismus durch Elektronenspinresonanz Spektroskopie (ESR) sowie Endgruppenanalyse der erzeugten Polymerer untersucht [47]. Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass unter anderem das Radikal  $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\cdot$  für den Kettenstart verantwortlich ist, welches über einen sechsgliedrigen zyklischen Übergangszustand gebildet wird (Abb. 3.6).

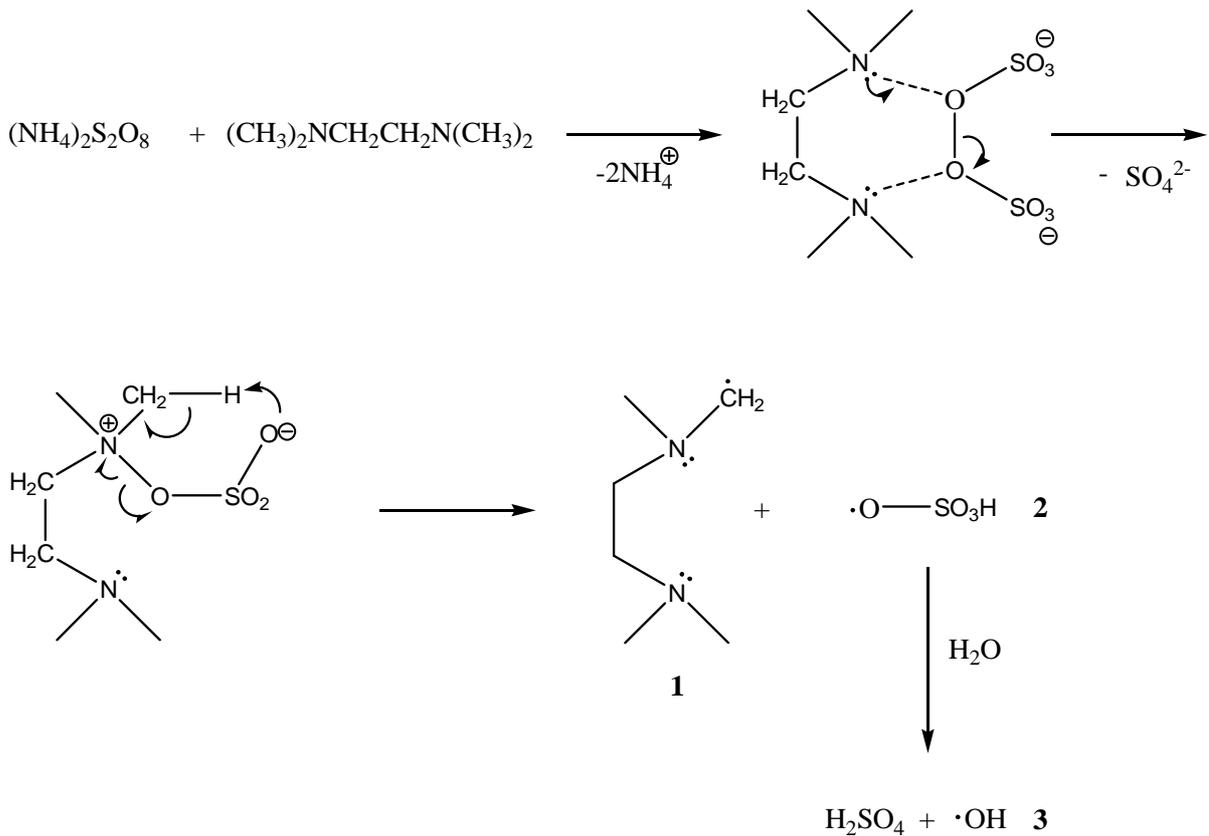


Abb. 3.6 Mechanismus der Initiierung durch APS und TEMED

Neben Verbindung 1 initiieren auch die Radikale 2 und 3 neue wachsende Ketten.

Bei der Polymerisation wird Wärme frei, die das Reaktionsgemisch erwärmt. Dabei sollte die Temperatur nicht über die LCST hinaus steigen, da die sonst eintretende Phasenseparation eine homogene Polymerisation verhindern würde. Daher gilt es, die Reaktionsparameter so zu optimieren, dass die Reaktion langsam genug abläuft, dass die Wärme abgeführt werden kann.

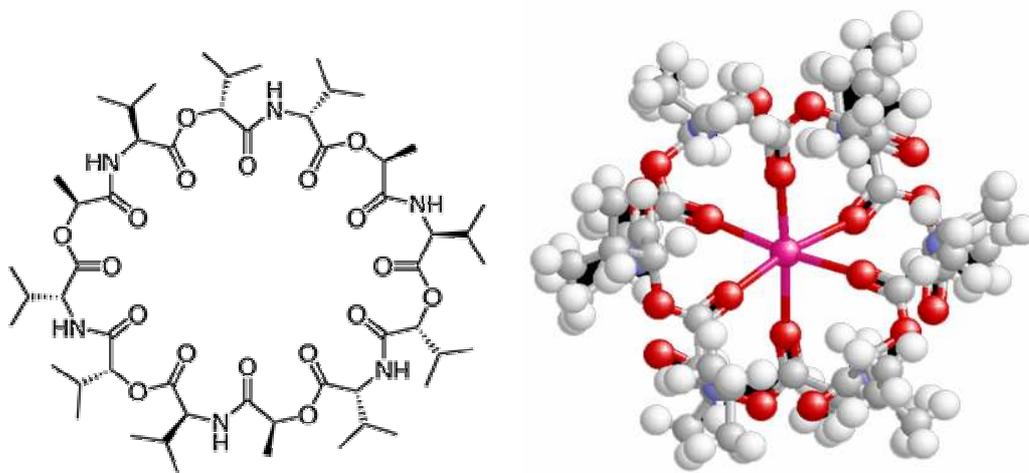
### 3.6 Einbau des Ionenkarriers Valinomycin

Um zu zeigen, dass die Membran unter der Hydrogelschicht weiterhin funktionsfähig ist, soll nach der Polymerisation ein Membranprotein auf die Gelschicht gegeben werden. Das Protein sollte durch das Gel hindurchdiffundieren und sich in die Membran einbauen.

Valinomycin ist ein kleines zyklisches Depsipeptid welches von mehreren Arten der Streptomyceten produziert wird. Es besteht aus zwölf Aminosäuren, die abwechselnd durch Amid- und Esterbindungen zu einem Ring gebunden sind (Abb. 3.7). Es enthält D- und L-

Valin, L-Lactat sowie L-Hydroxyisovalerat. Die einzelnen Bausteine sind so im Ring angeordnet, dass ihre hydrophoben Reste nach außen zeigen. Dadurch kann sich Valinomycin in das hydrophobe Innere einer Membran einbauen [48] und sich dort frei bewegen. Der hydrophile Innenraum des Peptids kann sehr selektiv Kaliumionen binden, die derart komplexiert die Membran durchqueren können.

Baut es sich in die Membran einer lebenden Zelle ein, bricht das Membranpotential zusammen und die Zelle stirbt. Daher ist Valinomycin ein sehr giftiges Antibiotikum.



*Abb. 3.7 Struktur von Valinomycin*

Nach dem Einbau in eine Modellmembran ist also bei Verwendung von Kaliumionen als Elektrolyt ein deutlicher Abfall des Membranwiderstandes zu erwarten. Dieser Effekt sollte reversibel sein, wenn die Kaliumionen durch einen anderen Elektrolyten, etwa Natriumionen ersetzt werden.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

Die verwendeten Lipide DPhyPC, DPhyPE und DMPE (Avanti Polar Lipids), Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid (Acros, 99%), Methylenbisacrylamid (Fischer Scientific, p.a.), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Carl Roth, p.a.), Ammoniumperoxodisulfat (Carl Roth, p.a.), Natriumchlorid (Acros), Kaliumchlorid (Acros), Valinomycin (Sigma Aldrich), Wasserstoffperoxid (35%, Riedel, puriss), Schwefelsäure (97%, Fluka, p.a.), Ammoniak (32%, WTL, p.a.), Chloroform (Acros, p.a.), Methanol (Carl Roth, reinst), Ethanol (Aldrich, HPLC grade) wurden verwendet wie erhalten. 2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol-1-tetraethylenglycol-D,L- $\alpha$ -liponsäureesterlipid (DPTL) wurde im Arbeitskreis nach Vorschrift synthetisiert [31], N-Isopropylacrylamid (NIPAAm, Acros, 99%) wurde vor Verwendung aus Toluol/Hexan (1:4 v/v) umkristallisiert, Triethylamin (Acros) über CaF<sub>2</sub> getrocknet. Bei allem verwendeten Wasser handelt es sich um Milli-Q-Wasser mit einem Widerstand von mindestens 18,2 M $\Omega$ , aufgereinigt mit einer Anlage von Milipore.

Des Weiteren wurden der Kleber zum Herstellen von TSG (Epotek 353 ND-4), Si-Wafer (CrysteC Berlin), Objektträger (BK-7, Menzel GmbH Deutschland) sowie 2% Helmanex Lösung (Helma Worldwide) in Milli-Q-Wasser verwendet.

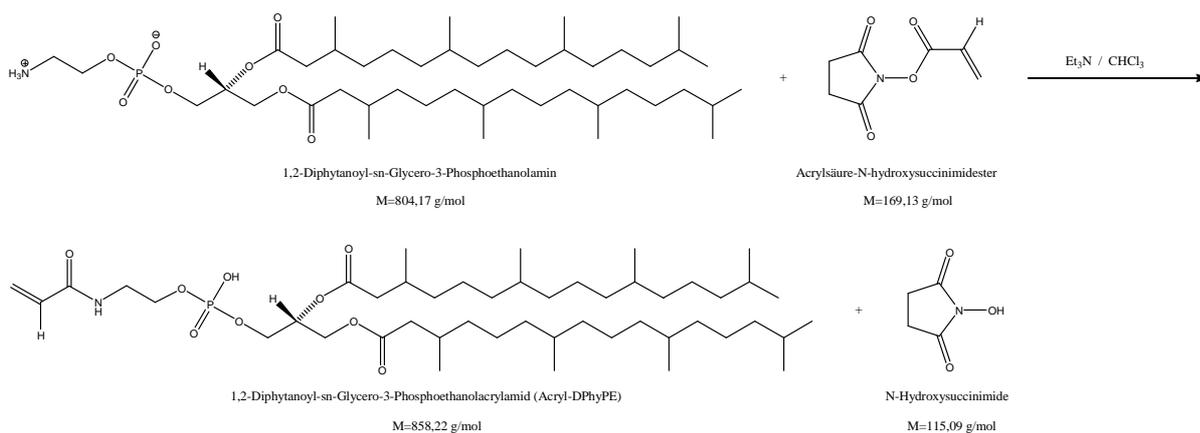
Impedanzmessungen wurden an einem Autolab PGSTAT 12 Potentiostaten (Ecco Chemie) mit der Steuersoftware FRA (Frequency Response Analysis) in einem Frequenzbereich von 2 mHz bis 1 MHz und einer Anregungsamplitude von 10 mV durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die ZView2 Software (Scribner Associates) verwendet.

Für AFM Messungen wurde ein Dimension Mikroskop (Controller Nanoscope IV, Veeco) im Tapping Mode verwendet. Der Cantilever war aus Silizium (Olympus, OMCL-AC160TS-W), hatte eine Federkonstante von  $\sim 42$  N/m und eine Resonanzfrequenz von  $\sim 300$  kHz.

## 4.2 Synthese des Acryl-DPhyPE

Die Synthese des Hydrogelanker-Lipids erfolgte unter Verwendung von Aktivesterchemie nach einer abgewandelten Literaturvorschrift von Pennefather et al. [49].

### Reaktionsgleichung:



### Ansatz:

- 100 mg DPhyPE (0,125 mmol, 1eq)
- 84 mg Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid (0,5 mmol, 4eq)
- 15 mg (20µl) Triethylamin (0,15 mmol, 1,2eq)
- 2,5 ml Chloroform

### Durchführung:

DPhyPC und Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid wurden in einen Rundkolben eingewogen, und unter Rühren in 2,5 ml trockenen Chloroforms gelöst. Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen und für 15 Minuten mit trockenem Argon durchspült. Dann wurden mit einer Hamilton Spritze 20 µl Triethylamin hinzugegeben. Die Mischung wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zwischenzeitlich wurde der Reaktionsverlauf durch die Anfertigung von Dünnschicht Chromatogrammen (DCs) verfolgt. Als flüssige Phase wurde eine Mischung aus Chloroform/Methanol (2:1 v/v) verwendet. Von den eingesetzten Edukten ist nur Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid UV-aktiv. Schon nach kurzer Zeit zeigten sich im DC des Reaktionsgemisches zwei fluoreszierende Flecken. Durch Einfärbung des DCs mit

Zuckerreagenz (eine Mischung aus Resorcinmonoethylether und Schwefelsäure in Ethanol) wurde auch das noch nicht umgesetzte DPhyPE sichtbar gemacht.

Im Laufe der Reaktion wurde das Gemisch langsam milchig. Nach sechs Stunden wurde die Mischung im Vakuum eingengt und mit 1,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1 v/v) versetzt. Ein nicht gelöster, weißer Feststoff wurde bei 10000 U/min abzentrifugiert und später im NMR als N-Hydroxysuccinimid identifiziert. Der gelöste Teil des Reaktionsgemisches wurde säulenchromatographisch mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgetrennt. Neben nicht umgesetztem Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid wurde hierbei ein weißer Feststoff isoliert, der auch nach langem Trocknen im Vakuum noch eine klebrige Konsistenz hatte.

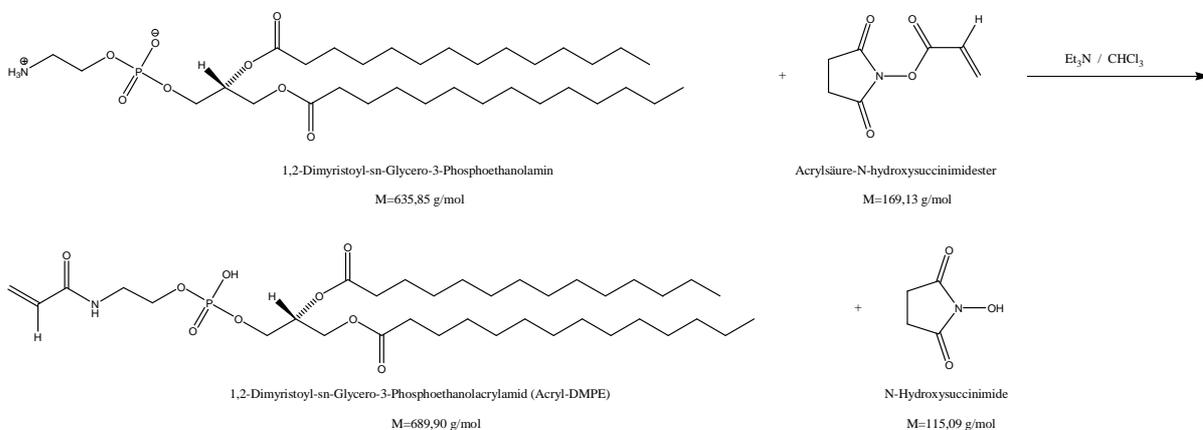
#### Ausbeute:

60,34 mg (0,07mmol) entspricht einer Ausbeute von 56%.

### 4.3 Synthese des Acryl-DMPE

In nahezu vollständiger Übereinstimmung mit der Synthese in Kapitel 4.2 wurde das Lipid 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin (DMPE) mit einer Doppelbindungsfunktion an der Kopfgruppe modifiziert.

#### Reaktionsgleichung:



Ansatz:

159 mg DMPE (0,25 mmol, 1eq)

169 mg Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimid (1 mmol, 4eq)

30 mg (40µl) Triethylamin (0,3 mmol, 1,2eq)

5 ml Chloroform

Durchführung:

Genau wie in Kapitel 4.2, nur wurde für die Säulenchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches das Fließmittel Chloroform/Methanol (1:2 v/v) verwendet.

Ausbeute:

87,20 mg (0,13mmol) entspricht einer Ausbeute von 52%.

#### 4.4 Herstellung von Template Stripped Gold

Die Objektträger wurden jeweils in zwei gleichgroße Hälften geteilt und in Färberkästen gesetzt. Danach wurde folgende Reinigungsprozedur durchgeführt:

- i) Mit Helmanex Lösung (2%) aufgefüllt und 15 Min mit Ultraschall behandelt, danach 15 mal mit Milli-Q-Wasser gespült
- ii) Mit Milli-Q-Wasser aufgefüllt und 15 Min mit Ultraschall behandelt, danach 15 mal mit Milli-Q-Wasser gespült
- iii) Mit Ethanol aufgefüllt und 15 Min mit Ultraschall behandelt, danach Ethanol abgeschüttet und mit Frischem aufgefüllt, diesen wieder abgeschüttet und die Träger im Stickstoffstrom getrocknet

Die Silizium Wafer wurden ebenfalls in Färberkästen gesetzt und für 15 Min mit Ethanol ins Ultraschallbad gestellt, um die Kunststoffversiegelung der polierten Seite zu entfernen. Nach 15-maligen Spülen mit Milli-Q-Wasser wurden die Färberboxen mit folgender Reinigungslösung (basische Piranha) aufgefüllt:

Für eine Färberbox:

50 ml Milli-Q-Wasser

10 ml  $\text{NH}_3$  32%

10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  35%

Danach wurden die Färberboxen in einem Wasserbad für eine Stunde auf  $85^\circ\text{C}$  erwärmt. Während dieser Zeit setzte eine starke Gasentwicklung ein.

Nach dem Abkühlen wurde die Reinigungslösung entsorgt und die Wafer 15 mal mit Milli-Q-Wasser gespült. Danach wurden sie mit Ethanol aufgefüllt, dieser wiederum abgeschüttet und die Träger im Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufdampfung einer 50 nm dicken Goldschicht erfolgte elektrothermisch in einem Edwards Auto 306 Evaporator.

Komponenten A und B des Klebers (10:1 m/m) wurden in einem Rundkolben gründlich vermischt. Danach wurde der Kleber für etwa 90 Minuten an einer Vakuumlinie bei etwa  $10^{-3}$  mBar entgast.

Danach wurden Glas- und Siliziumträger miteinander verklebt. Dafür wurde eine kleine Menge Kleber auf einen Glasträger gegeben und der Silizium Wafer darauf gelegt. Nun wurden die beiden Träger für einige Minuten mit einer Presse zusammengedrückt. Danach wurde der neue Träger an den Rändern mit Teflon Band umwickelt und in eine Färberbox gesetzt.

Die so präparierten Träger wurden dann zum Aushärten für 90 Minuten in einen  $150^\circ\text{C}$  heißen Ofen gestellt. Nach dem Abkühlen waren die Träger verwendungsfertig. Sie konnten nun für viele Wochen gelagert und verwendet werden.

#### **4.5 Herstellung der DPTL-Monolayer**

Zur Selbstorganisation wurden spezielle, flache Glasgefäße verwendet, in die bei einem Volumen von 10 ml genau zwei Goldträger hineinpassten. Sie wurden vor der Benutzung mit der selben Prozedur gereinigt, wie schon für die Objektträger beschrieben (siehe Kapitel 4.4) Sie wurden mit einer ethanolschen DPTL Lösung der Konzentration 0,2 mg/ml befüllt. TSG-Träger wurden mithilfe eines Skalpells gestrippt, im Stickstoffstrom von Staub- und Kleberresten befreit und mit Ethanol abgespült. Danach wurden sie für 24 Stunden in die

DPTL Lösung gelegt. Nach dieser Zeit wurden die Träger gründlich mit Ethanol gespült um DPTL Reste zu entfernen und im Stickstoffstrom getrocknet. Sie wurden in der Regel nie länger als einige Tage aufbewahrt.

#### **4.6 Herstellung von Vesikeln**

Alle verwendeten Glasgeräte wurden der beschriebenen Reinigungsprozedur mit Helmanex, Wasser und Ethanol unterzogen. In einem Glaskolben wurde eine Mischung von Lipid und Milli-Q-Wasser mit der Konzentration von 2 mg/ml hergestellt. Diese Mischung wurde mithilfe eines auf ca. 35°C erwärmten Ultraschallbades und eines Vortex-Mischers homogenisiert. Die Emulsion wurde im Kühlschrank aufbewahrt und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und gründlich durchmischt.

Der Extruder (Avestin LiposoFast-Basic) wurde mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde er mit einem 50 nm Polykarbonat Filter zusammengebaut. Eine Menge von etwa 200 µl der Lipid-Emulsion wurde in die eine Spritze aufgezogen und dann etwa 17-23 mal kräftig durch den Extruder gepresst. Die fertige Vesikellösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und nie später als 24 Stunden nach ihrer Herstellung verwendet, da die Vesikel mit der Zeit zur Aggregation neigen.

#### **4.7 Aufbau des Systems mit gleichzeitiger Impedanzmessung**

##### **4.7.1 Aufbau der Teflon Messzelle**

Die meisten Messungen in dieser Arbeit wurden in speziellen Teflon-Messzellen durchgeführt (Abb. 4.1). Diese Zellen bestehen aus einem runden Teflonblock in dem sich eine Bohrung befindet welche der eigentliche Messraum ist. An der unteren Seite des Lochs ist dessen Rand ausgefräst, so dass ein O-Ring hineingelegt werden kann. Dieser Teil der Zelle kann mit Schrauben so auf den Goldträger gepresst werden, dass keine Flüssigkeit austreten kann. Seitlich befinden sich Zugänge zum Messraum die mit Gewinden ausgestattet sind, so dass Schläuche für Zu- und Ablauf von Flüssigkeiten angebracht werden können. Die obere Seite des Messraums wird mit einem Teflon Stopfen verschlossen, der Bohrungen für Referenz- und Gegenelektrode besitzt. Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Durchmessern des Messraums verwendet, einmal mit 0,3 cm bei den kleinen Zellen und 0,5 cm bei den Großen. Dies entspricht einer Detektionsfläche von 0,28 bzw. 0,78cm<sup>2</sup>.

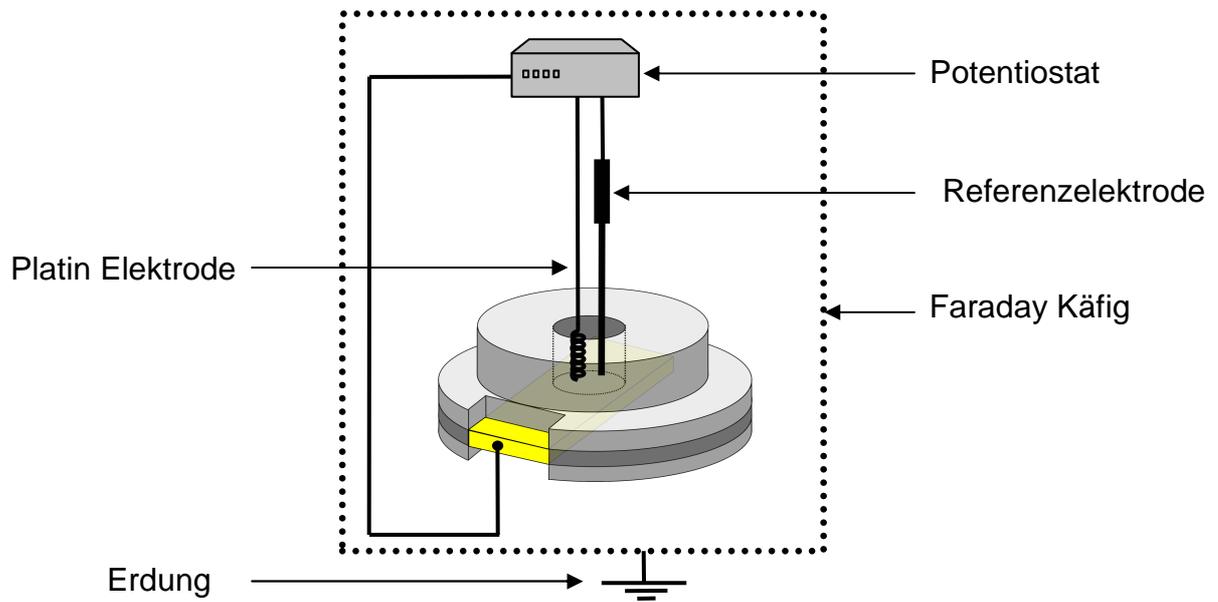


Abb. 4.1 Versuchsaufbau für die Impedanzmessung in einer Teflon Zelle

#### 4.7.2 Aufbau der Glas Messzelle

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Messzelle aus Glas hergestellt, da diese einfacher zu reinigen ist als Teflon. Sie besteht im Wesentlichen aus einem Stück Glasrohr (Innendurchmesser 9,2 mm, Länge 30 mm) an dessen einen Seite sich eine Fräsung für einen O-Ring befindet. Dieses Glasrohr kann mithilfe einer Halterung verkantungsfrei auf den Goldträger gepresst werden, wobei das Rohr mit dem O-Ring aufliegt. Aufgrund der begrenzten Bearbeitbarkeit von Glas gibt es keine Anschlüsse für Schläuche und die Zelle kann nur von oben befüllt oder entleert werden. Auch für diese Zelle wurde ein Teflon Stopfen mit Bohrungen für die beiden Elektroden hergestellt, mit dem das obere Ende des Glasrohrs verschlossen werden kann.

#### 4.7.3 Verwendetes Elektrodenmaterial

Die Impedanzmessungen wurden mit drei Elektroden durchgeführt. Dabei wurde die Goldoberfläche als Arbeitselektrode und ein aufgewickelter Platin Draht als Gegenelektrode verwendet. Als Referenzelektrode diente eine Silber/Silberchloridelektrode. Als solche wurde entweder eine kommerziell verfügbare Elektrode (DriRef-2, World Precision Instruments)



Das am Silberdraht gebildete Silberchlorid blieb daran haften, wodurch der Widerstand des Drahtes immer mehr zunahm. Am Ende war der Draht vollständig schwarz und es war keine Gasentwicklung mehr an der Platinelektrode zu erkennen. Der Silberdraht wurde mit Milli-Q-Wasser abgespült und in die Zelle eingebaut.

#### 4.7.4 Vesikelfusion

Nach dem Zusammenbau der Zelle und dem Anschluss der Elektroden an den Potentiostaten wurde der Messraum mit einer 0,1 M KCl Lösung gefüllt. Nun wurde ein EIS Spektrum des Monolayers gemessen. Nachdem die Messung fertig war wurden mit einer Eppendorf Pipette 50 µl Vesikellösung in die Zelle gegeben und die Flüssigkeit durch mehrmaliges Ein- und Ausziehen in die Pipette durchmischt. Danach wurde die Zelle wieder verschlossen und ein Messprogramm gestartet, welches mehrere Messungen hintereinander durchführte. Die Vesikelfusion wurde meist über Nacht laufengelassen. Am nächsten Tag wurde die Zelle mit 0,1 M KCl Lösung gespült und einige weitere EIS Spektren aufgenommen.

#### 4.7.5 Solvent Exchange

Das Austauschen des Lösungsmittels einer Lipidlösung („Solvent Exchange“) ist eine weitere, von Miller et al eingeführte Methode [50], einen Monolayer zur Membran zu vervollständigen. Dazu wurde zunächst ein EIS Spektrum des Monolayers in Elektrolytlösung gemessen und die Zelle nach der Messung wieder ausgeleert. Dann wurde soviel einer ethanolischen Lipidlösung der Konzentration 5 mg/ml in die Zelle gegeben, bis die Oberfläche des Goldes gerade bedeckt war. Die Zelle wurde für etwa zehn Minuten lang so stehen gelassen und danach langsam mit Elektrolytlösung durchgespült. Danach wurden mehrere Impedanz-Spektren in Folge gemessen, bis sich das System stabilisiert hatte.

#### 4.7.6 Hydrogelwachstum

Es wurden Lösungen von NIPAAm und MBA in verschiedenen Zusammensetzungen (100:1, 50:1, 25:1 n/n) mit einer Konzentration von 100 mg/ml in einer 0,1 M KCl Lösung hergestellt. Die Kolben mit der Lösung wurden mit einem Septum verschlossen und für 15 Minuten mit Argon durchspült. Diese Wachstumslösungen wurden im Gefrierfach aufbewahrt und vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

Zur Polymerisation wurde als erstes so viel Elektrolytlösung aus der Messzelle entfernt, dass die fertige Membran gerade noch bedeckt war. Nach Erfahrungswerten war dazu eine Flüssigkeitsmenge von etwa 100 µl nötig. Um reproduzierbar jedes Mal dieselbe Menge Flüssigkeit in der Zelle zu behalten wurde ein Stopfen gebaut, in dessen Mitte sich ein kleines Metallrohr befindet, mit dem die Flüssigkeit der Zelle von oben abgesaugt werden kann. Das Rohr ist mit etwas Kraftaufwand in der Höhe verschiebbar und wurde vor jeder Messung mit einem DPTL Träger (es wurde davon ausgegangen, dass dieser einen ähnlichen Kontaktwinkel besitzt wie die fertige Membran) so kalibriert, dass genau 100 µl Flüssigkeit in der Zelle verblieben.

In einem Glasgefäß wurden 4,5 mg APS eingewogen und 1 ml der Wachstumslösung dazugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurden in den meisten Fällen 100 µl dieser Lösung in die entleerte Messzelle gegeben. Danach wurde die Polymerisation durch Zugabe von 1 µl TEMED initiiert. Nach etwa zehn Minuten setzte üblicherweise die Gelierung ein doch die Polymerisation wurde immer über Nacht durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Elektroden wieder mit dem Potentiostaten verbunden und die Zelle an eine Peristaltik Pumpe angeschlossen. Nun wurde für mehrere Stunden 0,1 M KCl Lösung durch die Zelle gepumpt um nicht polymerisiertes Monomer sowie Reste des Initiators zu entfernen. Währenddessen wurden EIS Spektren gemessen. Diese Messungen wurden meist über längere Zeit fortgeführt, bis sich das System im Gleichgewicht befand.

#### 4.7.7 Zugabe von Valinomycin

Im letzten Schritt wurden 20 µl einer ethanolschen Valinomycinlösung mit der Konzentration 1 mg/ml auf das Gel gegeben. Danach wurden für einige Stunden EIS Spektren gemessen, bis ein deutlicher Effekt zu erkennen war. Dann wurde die Zelle wieder mit der Peristaltikpumpe verbunden und für längere Zeit eine 0,1 M NaCl Lösung durch die Zelle gepumpt. Während dieser Zeit wurden kontinuierlich EIS Spektren gemessen.

### 4.8 Reinigung von Teflonzellen und Elektroden

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass es extrem wichtig ist, alle Teile der Messapparatur, die mit der Hydrogelwachstumslösung in Kontakt gekommen waren gründlich zu reinigen, da diese Verunreinigung sonst die nächste Vesikelfusion stört.

Im Verlauf eines Experimentes kommen folgende Teile der Messapparatur mit der Monomerlösung in Kontakt:

- Die Messzelle selbst
- Platinelektrode
- Referenzelektrode
- Der O-Ring
- Schlauchmaterial an der Messzelle

Für diese Teile wurden im Verlauf der Arbeit viele verschiedene Reinigungsmethoden ausprobiert, von denen die meisten leider unzureichend waren. Da die einzelnen Teile aus unterschiedlichen Materialien bestehen, sind unterschiedliche Arten der Reinigung notwendig.

#### Der O-Ring:

Die Reinigung des O-Ringes ist nicht nötig, da man ihn nach einmaliger Benutzung austauschen kann.

#### Die Referenzelektrode:

Die kommerziellen Referenzelektroden haben einen Kunststoffmantel und eine Membran, die den inneren, mit KCl Lösung gefüllten Raum der Elektrode mit dem Messraum verbindet. Diese Elektroden sollten keinen allzu drastischen Bedingungen ausgesetzt werden, was ihre Reinigung schwierig machte. Deshalb wurde mit zwei Gruppen von Elektroden gearbeitet: die Elektroden der ersten Gruppe wurde nur für die Vesikelfusion verwendet, die der Zweiten für alle Schritte in denen sie mit Monomer oder Hydrogel in Kontakt kamen.

Nachdem die Elektroden, egal welcher Gruppe, mit Valinomycin in Kontakt gekommen waren, wurden sie für fünf Minuten in Natriumlaurylsulfat (SDS)-Lösung eingelegt, um das Peptid zu denaturieren.

Eine Reinigung der aus Silberdraht selbst hergestellten Referenzelektroden war nicht nötig, da sie nach einmaliger Benutzung entsorgt werden konnten.

### Das Schlauchmaterial

Mit dem Schlauchmaterial wurde genauso verfahren, wie mit den Referenzelektroden: es wurde zwischen sauberen und mit Monomer verunreinigten Schläuchen unterschieden. Also wurde jeweils nach der Vesikelfusion das Schlauchmaterial der Zelle gewechselt. Nach jedem Experiment wurden die Schläuche mit Wasser und Ethanol durchgespült und mit Ethanol im Ultraschallbad gereinigt.

### Die Teflonteile der Messzelle sowie die Platin Elektrode

Diese beiden Teile sind zu teuer um sie nach jedem Experiment zu entsorgen und eine Auswechslung der Messzelle während des Experimentes ist natürlich nicht möglich. Deshalb wurde versucht, eine Reinigungsprozedur zu finden, die alle Monomerrückstände entfernt. Glücklicherweise bestehen diese beiden Teile aus sehr widerstandsfähigen Materialien.

Folgende Reinigungsmethoden wurden ausprobiert:

- i) Die übliche Reinigungsmethode durch Ultraschall mit Helmanex-Lösung, Milli-Q-Wasser und Ethanol
- ii) Mechanische Reinigung mit Bürste und Spülmittel
- iii) Ultraschallbad mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie Chloroform und Hexan
- iv) Reinigung im Sauerstoff/Argon Plasma
- v) Auskochen in konzentrierter Schwefelsäure
- vi) Behandlung mit Piranha-Lösung

Die reinigende Wirkung von heißer Schwefelsäure besteht darin, dass sie organische Stoffe durch Wasserentzug verkohlt und so zerstört. Oft bleiben dann schwarze Rückstände an den so gereinigten Teilen.

Piranha-Lösung ist eine extrem aggressive Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (3:1 v/v). Die verkohlende Wirkung der Schwefelsäure wird hierbei durch die Bildung von elementarem Sauerstoff ergänzt, der den entstehenden Kohlenstoff zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Daher entfernt Piranha Lösung organische Verunreinigungen vollständig.

Zu ihrer Herstellung wurde die Schwefelsäure in ein sauberes, möglichst hohes Becherglas gefüllt und unter vorsichtigem Rühren das Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Diese Reihenfolge ist sehr wichtig, da das Gemisch bei einem zu hohen Peroxid Gehalt explodieren kann. Beim Mischen erwärmt sich die Lösung von selbst und eine starke Gasentwicklung

setzt ein. Dann wurden die zu reinigenden Teile vorsichtig in die Lösung gegeben. Es ist extrem wichtig, dass die heiße Piranha Lösung nicht in Kontakt mit größeren Mengen organischer Stoffe wie etwa Aceton kommt, da sie sonst explodiert. Die Gasentwicklung ließ nach etwa einer Stunde nach, die Teile wurden herausgenommen und mit viel Milli-Q-Wasser gespült. Die Lösung wurde bis zum nächsten Tag stengelassen, dann neutralisiert und entsorgt.

#### 4.9 Silanisierung der Glas Messzelle

Um die im letzten Kapitel beschriebene aufwändige Reinigung der Teflonzelle zu umgehen wurde im Verlauf der Arbeit eine Messzelle aus Glas gebaut. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Vesikelfusion in der Glaszelle nicht funktionierte, weil wahrscheinlich sämtliches Lipid über die hydrophilen Glaswände der Zelle gespreitet wurde. Deshalb wurde die Oberfläche der Glaszelle durch Silanisierung hydrophobisiert.

Zur Silanisierung von Glas muss zunächst dessen Oberfläche gründlich gereinigt und vollständig oxidiert werden. Dies wurde durch Behandeln der Zelle mit Piranha Lösung erreicht. Die nun stark hydrophile, nur aus  $-OH$  Gruppen bestehende Oberfläche wurde dann mit 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-decyltrichlorsilan zur Reaktion (Abb. 4.4) gebracht.

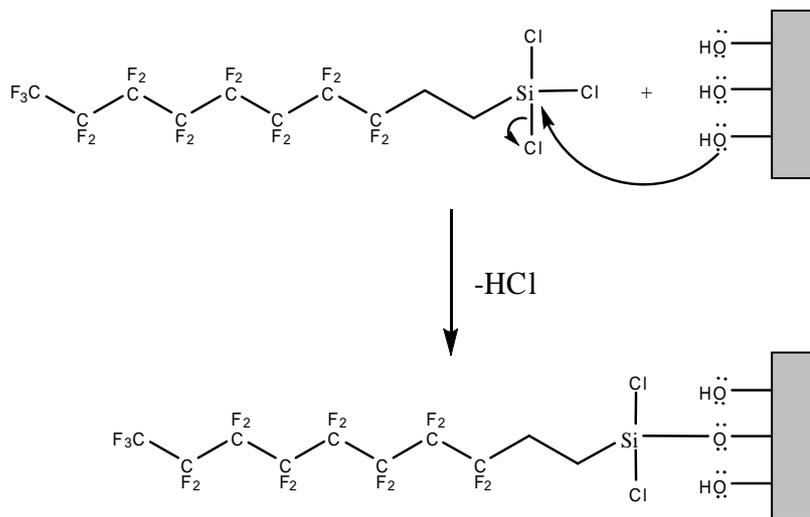


Abb. 4.4 Silanisierung einer Glasoberfläche

Dazu wurde das vorher im Ofen getrocknete Glasrohr zusammen mit einem leeren Glasgefäß in einen Exikator gelegt und dieser evakuiert. Danach wurde er mit Argon geflutet und im Argon Gegenstrom einige Tropfen des Chlorsilans in das Glasgefäß gegeben. Dann wurde der

Exikator wieder evakuiert und für eine Stunde stehengelassen. Dann wurde das Glasrohr herausgeholt und in dieser Reihenfolge mit Ethanol, Diethylether und Hexan gespült.

#### 4.10 Simultane SPR- und Impedanz-Messung

Simultane SPR- und Impedanzmessungen während der Vesikelfusion wurden in einer speziellen Teflon Messzelle durchgeführt.

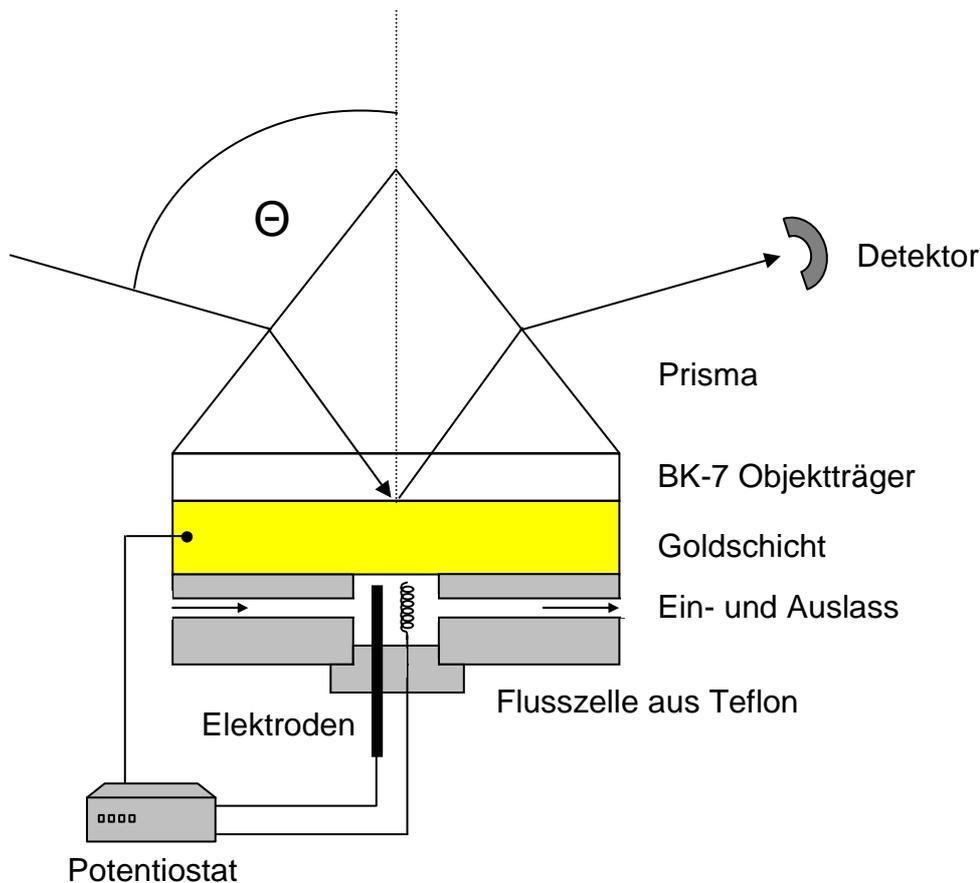


Abb. 4.5 Flusszelle für die simultane SPR- und Impedanzmessung

Aufgrund der hohen Kosten ist es nicht möglich, zur Herstellung von Template Stripped Gold LaFSN9 Gläser zu verwenden, da diese nach der Benutzung nicht mehr zu gebrauchen sind. Daher wurden neben dem Prisma aus hochbrechendem LaFSN9 Glas ( $n = 1,85$ , Hellma Optik GmbH, Jena) TSG Träger auf BK-7 Glas verwendet. Der hierbei verursachte Fehler ist wegen der geringen Dicke des Objektträgers im Vergleich zum Prisma sehr gering. Der Brechungsindex des Epoxidklebers entspricht dem von LaFSN9 Glas.

Beim Zusammenbau der Messzelle wurde ein Tropfen Immersionsöl zwischen das Prisma und den Objektträger gebracht. Die Strahlung des He/Ne Laser mit einer Wellenlänge von  $\lambda =$

632,8 nm wurde mit einem Polarisator (Glan-Thompson polarizer, Owis) linear p-polarisiert und die Reflexion mit einer Photodiode (BPW 34 B silicon photodiode, Siemens) detektiert. Das verwendete Goniometer hatte eine Winkelauflösung von  $0,005^\circ$  und wurde mittels einer Computersoftware (Wasplas, Max Planck Institut Mainz) gesteuert.

Die Justage des SPR-Setups wurde nach Vorschrift durchgeführt [51].

Es wurden winkelabhängige Scans von reinen Goldträgern sowie von DPTL Monolayern an Luft und in 0,1 M KCl Lösung angefertigt. Während der Vesikelfusion wurde im kinetischen Modus die Reflektivität bei einem Winkel von  $55,90^\circ$  gemessen.

# 5. Ergebnisse und Diskussion

## 5.1 Einleitung

In diesem Teil der Arbeit sollen die Ergebnisse der durchgeführten Experimente vorgestellt und interpretiert werden. Ein großes Problem bei der Arbeit mit biologischen Systemen, auch wenn es sich um vereinfachte Modelle handelt, ist die schlechte Reproduzierbarkeit der Experimente. So kann es vorkommen, dass ein Versuch mehrere Male durchgeführt wird, und das Ergebnis jedes Mal anders ausfällt. Grund dafür ist die hohe Komplexität solcher Systeme, durch die sehr kleine, häufig schwer zu beeinflussende Ereignisse, starke Auswirkung auf das Endergebnis besitzen. Dieses, fast chaotische Verhalten, macht es nötig, bei der Auswertung immer eine große Menge von Daten gleichzeitig zu betrachten, da ein einzelnes Ergebnis noch keinen generellen Trend anzeigen muss.

Im Folgenden werden häufig Tabellen mit elektrischen Parametern von verschiedenen Teilen des Systems präsentiert. Aus Platzgründen wurden dabei die Einheiten weggelassen. Die Einheit eines Widerstandes ist, wenn nicht anders deklariert  $1\text{M}\Omega\text{cm}^2$  und die einer Kapazität  $1\mu\text{Fcm}^{-2}$ . Die Benennung der einzelnen Parameter in den Tabellenköpfen bezieht sich immer auf das zuletzt aufgeführte Äquivalenzschaltbild, oder es handelt sich um bereits identifizierte Parameter wie den Membranwiderstand oder die Tetherkapazität, die immer die gleiche Benennung erhalten.

In Bode Plots wird die Phase immer durch kreisförmige, der Impedanzbetrag durch sterförmige Symbole dargestellt. Durchgezogene Linien stellen in den meisten Fällen berechnete Fit Funktionen dar. In einigen Fällen wurden die Fit Funktionen weggelassen und nur die Messpunkte mit einer Linie verbunden. Diese Linie steht dann in der Legende und die Messpunkte werden durch Punkte symbolisiert. Werden mehrere Messungen in einem Diagramm dargestellt, so haben sie unterschiedliche Farben.

## 5.2 Charakterisierung der Hydrogelanker-Lipide

### 5.2.1 $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY NMR Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der beiden Verbindungen werden im Anhang präsentiert, die 2d Spektren werden nicht aufgeführt, da sie keine weiteren Informationen liefern. Alle Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben.

#### Acryl-DPhyPE (700MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ , 333K)

$\delta=7,671$  (m, 1H -NH-),  $\delta=6,512$  (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ -),  $\delta=5,667$ (m, 1H, -P-O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}$ <),  
 $\delta=5,595$  (m, 1H, - $\text{CH}_2=\text{CH}$ -),  $\delta=4,813$  (m, 1H, - $\text{CH}_2$ -O-CO-),  $\delta=4,523$  (m, 1H, - $\text{CH}_2$ -O-CO-),  
 $\delta=4,359$  (m, 2H, -P-O- $\text{CH}_2$ ),  $\delta=4,261$  (m, 2H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -),  $\delta=3,798$  (m, 2H, -NH- $\text{CH}_2$ -),  
 $\delta=2,546$ - $2,129$  (5m, 6H, 2x -CO- $\text{CH}_2$ , 2x -CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}$ <),  $\delta=1,488$ - $0,934$  (m, 72H, aliphatisch)

#### Acryl-DMPE (500MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$ , 303K)

$\delta=6,254$  (m, 2H  $\text{CH}_2=\text{CH}$ -),  $\delta=5,591$  (dd, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ -),  $\delta=5,198$  (m, 1H, -P-O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}$ <),  
 $\delta=4,352$  (dd, 1H, - $\text{CH}_2$ -O-CO-),  $\delta=4,108$  (dd, 1H, - $\text{CH}_2$ -O-CO-),  $\delta=3,922$  (m, 4H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -, -P-O- $\text{CH}_2$ -),  $\delta=3,506$  (m, 2H, -NH- $\text{CH}_2$ -),  $\delta=2,290$  (m, 4H, 2x -CO- $\text{CH}_2$ -),  $\delta=1,557$  (m, 4H, 2x -CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -),  $\delta=1,269$  (m, 40H, 20x - $\text{CH}_2$ -),  $\delta=0,873$  (m, 6H, 2x - $\text{CH}_3$ )

### 5.2.2 Nachweis der Vollständigkeit der Funktionalisierung mit Ninhydrin

Um die Vollständigkeit der beiden Reaktionen in den Kapiteln 4.2 und 4.3 nachzuweisen, wurden Proben des unmodifizierten Lipids und des Acrylat-funktionalisierten Produktes auf eine DC Platte gebracht, diese in eine 1% Ninhydrin Lösung in Ethanol getaucht und danach mit der Heizpistole erwärmt. Ninhydrin reagiert mit primären Aminen in einer Reaktion, ähnlich der beim bekannten Aminosäurenachweis, zu einem stark gefärbten Produkt (Abb. 5.1). Beim unmodifizierten Lipid ist also eine Farbreaktion zu erwarten, beim modifizierten, welches eine Amidfunktionalität besitzt, dagegen nicht.

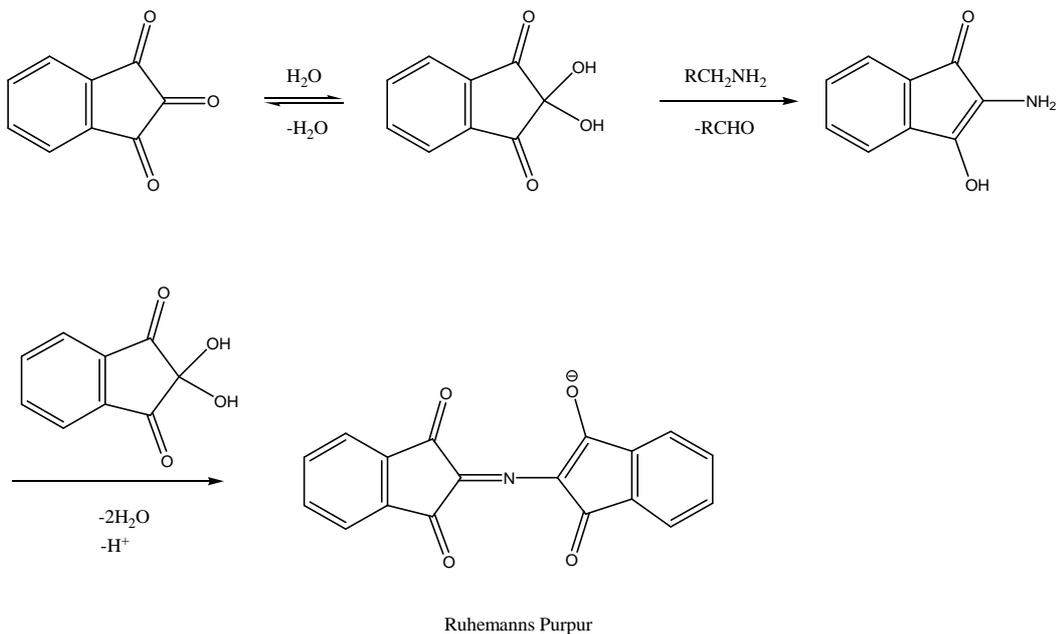


Abb. 5.1 Ninhydrin Reaktion von primären Aminen

Bei den beiden unmodifizierten Lipidproben kam es zur Bildung eines intensiv lila gefärbten Fleckens auf der DC Platte, beim den modifizierten Produkten war keine Färbung zu erkennen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieser Nachweisreaktion für primäre Amine kann man davon ausgehen, dass die verbleibende Menge unmodifizierten Lipids im Endprodukt sehr gering ist.

### 5.2.3 Herstellung einer Membran aus reinem Acryl-DMPE

Um zu überprüfen, ob die modifizierten Lipide Vesikel bilden und eine Membran erzeugen können, wurde eine Vesikelfusion mit reinem Acryl-DMPE durchgeführt. Aus einem eher schlechten Monolayer der dritten Kategorie (siehe Kapitel 5.4) entstand eine Membran mit mittelmäßigen elektrischen Eigenschaften. In diese Membran konnte erfolgreich der Ionenkarrier Valinomycin eingebaut werden, was durch eine drastische Verringerung des Membranwiderstandes sichtbar wurde. Nach dem Spülen mit einer NaCl Lösung erhöhte sich der Widerstand der Membran wieder bis knapp unterhalb dem des Originalzustandes. Damit ist der Beweis erbracht, dass die Lipide, trotz Modifizierung, noch durch Vesikelfusion funktionierende Membranen bilden können.

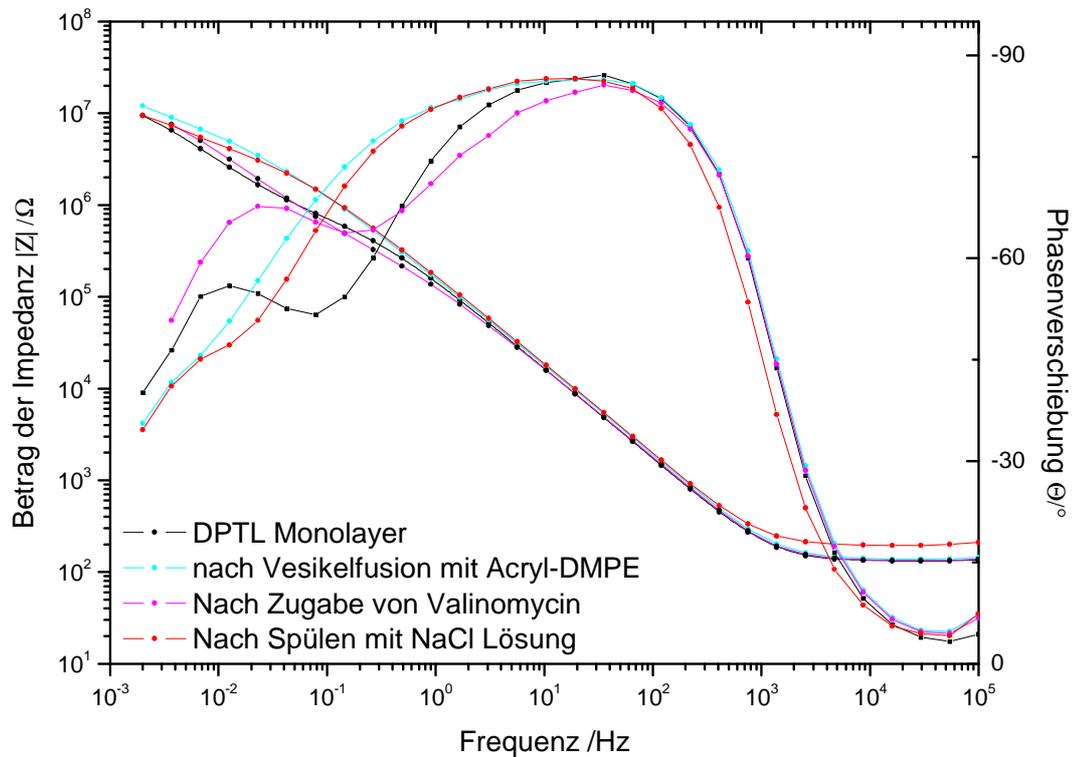


Abb. 5.2 Bode Plots der Experimente mit Acryl-DMPE

Im Anschluss wurde auch noch eine Hydrogelschicht auf diese Membran polymerisiert (siehe Kapitel 5.3.1, Experiment 2). Durch die starke kovalente Verbindung zwischen Membran und Hydrogel kam es allerdings zu einem schnellen Abbau des Membranwiderstandes beim Quellvorgang des Gels.

### 5.3 Template Stripped Gold

Um Membranen mit guten elektrischen Eigenschaften herzustellen, werden Goldoberflächen mit sehr niedriger Rauigkeit benötigt. Um die Qualität der Goldträger als Fehlerquelle auszuschließen, wurden diese einer kraftmikroskopischen Untersuchung mit einem AFM (atomic force microscope) unterzogen.

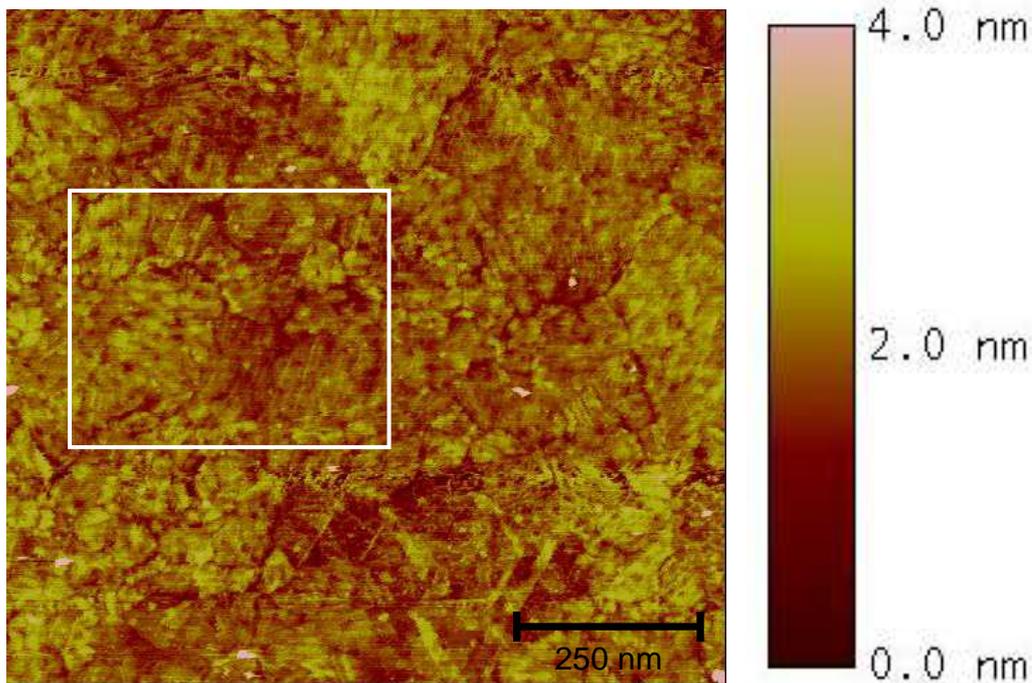


Abb. 5.3 Höhenbild einer  $1 \times 1 \mu\text{m}$  großen Fläche von Template Stripped Gold

Die Bestimmung der durchschnittlichen Rauigkeit innerhalb der markierten Fläche ergab einen Wert von  $0,266 \text{ nm}$ . Dies ist im Vergleich zur Literatur [32] (durchschnittliche Rauigkeit etwa  $1 \text{ nm}$ ) ein sehr guter Wert.

Außerdem wurden Impedanz Spektren eines frisch gestrippten Goldträgers in  $0,1 \text{ M KCl}$  Lösung aufgenommen (Abb. 5.4).

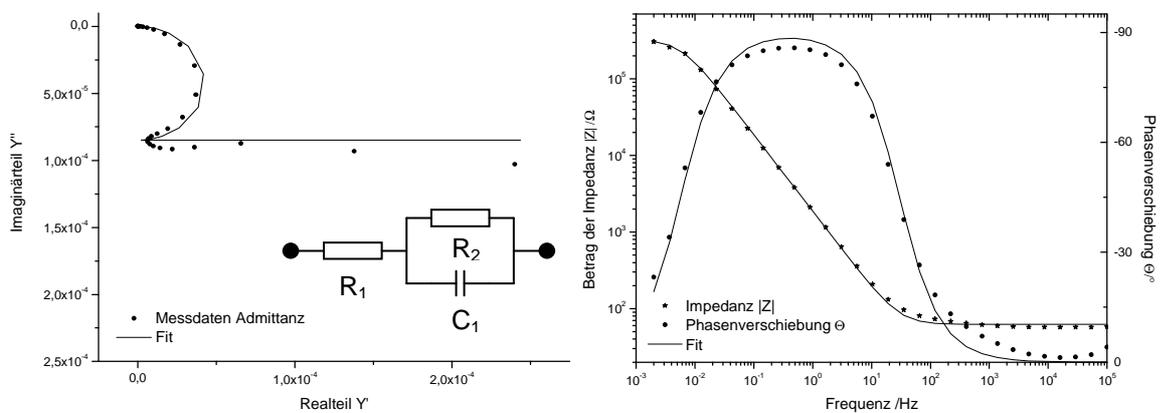


Abb. 5.4 Nyquist- und Bode-Plot eines reinen Goldträgers in  $0,1 \text{ M KCl}$

Die Impedanz Daten wurden an ein Randles Modell angefügt, welches einen Widerstand  $R_2$  von  $254 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  sowie eine Kapazität  $C_1$  von  $109 \text{ }\mu\text{Fcm}^{-2}$  ergab. Die Kapazität kommt durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, zustande. Die Elektrolytkonzentration ist mit  $0,1 \text{ mol/l}$  gerade noch hoch genug, um die elektrische Doppelschicht mit dem Helmholtz Modell beschreiben zu können. Der Wert der Helmholtz Kapazität ist etwas höher als in der Literatur beschrieben ( $5\text{-}50 \text{ }\mu\text{Fcm}^{-2}$ ) [36]. Die Interpretation des Widerstandes  $R_2$  ist nicht einfach. Möglicherweise handelt es sich dabei um Defektstellen innerhalb des Helmholtz Layers, hervorgerufen durch Fehler in der Goldbeschichtung.

Diese Parameter änderten sich im Laufe der Zeit. Im zweiten EIS Spektrum (etwa 30 Minuten später) betrug die Kapazität schon nur noch  $81 \text{ }\mu\text{Fcm}^{-2}$ . Dies zeigt, dass sich die Beschaffenheit der Helmholtz Schicht mit der Zeit ändert. Eine mögliche Ursache ist die Adsorption geringer Mengen an Verunreinigungen aus der Elektrolytlösung auf der Goldoberfläche. Dadurch nimmt die Dicke des Dielektrikums zwischen den beiden Platten des Kondensators (Gold und Elektrolyt) zu, wodurch seine Kapazität abnimmt. Auch der Widerstand  $R_2$  wird mit der Zeit größer. Bei der Zugabe geringer Mengen der Hydrogel-Wachstumslösung in die Zelle, kam es zu noch drastischeren Veränderungen der elektrischen Parameter. Dies zeigt den Einfluss der umgebenden Lösung auf die Struktur der Helmholtz Schicht.

#### **5.4 Impedanzmessung einer Hydrogelschicht auf TSG**

Um die elektrischen Eigenschaften des Zielsystems besser deuten zu können, wurden Hydrogele mit verschiedenen Dicken (eingestellt über die verwendete Menge an Wachstumslösung) und verschiedenen Vernetzungsdichten auf frisch gestrippte TSG Träger polymerisiert. Da die Polymerisation bei recht hoher Konzentration stattfand, war das entstandene Gel nicht vollständig hydratisiert. Daher sollte ein Quellen des Gels stattfinden, wenn die Zelle mit Elektrolyt gespült wird. Während des Spülvorganges wurden so lange EIS Spektren gemessen, bis die Parameter konstant waren.

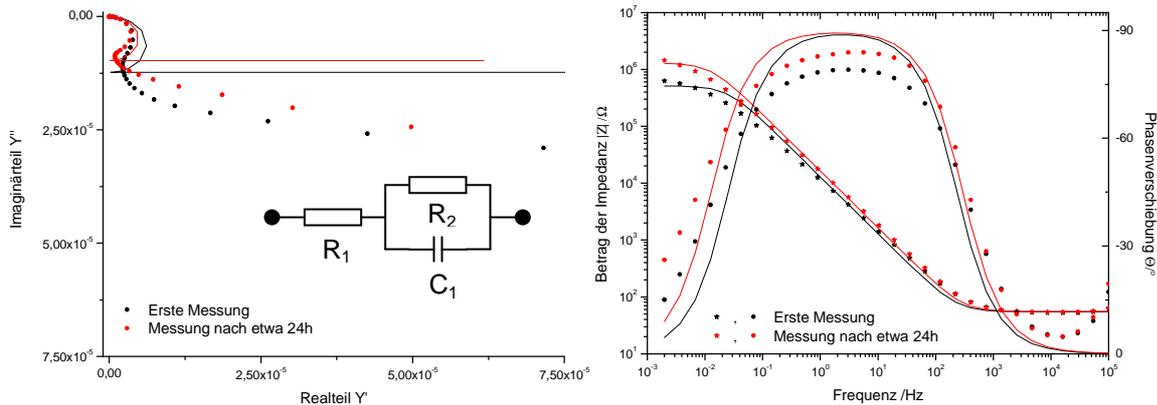


Abb. 5.5 Niquist- und Bode Plot einer Hydrogelschicht auf TSG in 0,1 M KCl

Die aufgenommenen Spektren ähneln von der Form her dem des reinen Gold Trägers. Daher wurde auch hier das Randles Modell zum Fitten verwendet. Man beachte aber, dass die Kapazität erheblich kleiner ist als beim reinen Gold. Abweichungen von diesem Modell sieht man im Niquist Plot unter dem ersten Halbkreis. Die Einführung einer weiteren Kapazität würde die Qualität des Fits verbessern was dann aber einen Vergleich der Daten zwischen reinem Gold und solchem mit einer Hydrogelschicht unmöglich machen würde. Aus dem gleichen Grund wurde auf die Verwendung eines Constant Phase Elements statt der Kapazität verzichtet.

	erste Messung			im Gleichgewicht		
Hydrogel	R1	R2	C1	R1	R2	C1
100μl 1:25	55,07	0,40	15,80	55,36	1,01	12,46
200μl 1:25	57,19	1,45	10,07	57,05	2,00	9,92
100μl 1:50	48,11	0,63	25,53	48,29	2,02	15,66
100μl 1:100	41,53	0,32	14,94	42,48	0,86	13,42

Tab. 5.1 Elektrische Eigenschaften verschiedener Hydrogele

Tabelle 5.1 zeigt jeweils die erste und letzte Messung eines Experimentes. Zunächst fällt auf, dass der Feed-Widerstand mit dem Vernetzungsgrad des Hydrogels ansteigt. Des Weiteren weist das Polymer mit der doppelten Dicke auch einen leicht höheren Feed-Widerstand auf. Allerdings sollte hierbei keine quantitative Betrachtung angestellt werden, da die Eintauchtiefe der Referenzelektrode nicht sehr genau eingestellt werden konnte und diese einen großen Einfluss auf den Feed-Widerstand hat. Dennoch kann man aus den Daten

schließen, dass sich die Applikation eines Hydrogels durch in einem Anstieg des Feed Widerstandes äußert, der umso stärker ausfällt, je dicker und dichter das Hydrogel ist. Außerdem sieht man, dass sich der Feed-Widerstand während des Experimentes nicht nennenswert ändert. Möglicherweise gleichen sich beim Quellvorgang zwei Effekte aus. Durch die Volumenzunahme des Gels erhöht sich dessen Dicke, was den Widerstand erhöht. Gleichzeitig nimmt die Größe der Maschen im Hydrogel beim Quellen zu, was die Ionenbewegung erleichtert und so den Widerstand senkt. Zusammen bleibt der Feed Widerstand somit unverändert. Die andere Möglichkeit ist natürlich, dass der Quellvorgang generell einen zu niedrigen Effekt besitzt, um ihn mit der Impedanz Spektroskopie sichtbar zu machen.

Die Kapazitäten  $C_1$  sollten hier ebenfalls als Helmholtz Kapazitäten interpretiert werden. Sie liegen in dem Größenbereich, den auch der reine Goldträger aus dem vorigen Kapitel besaß, nachdem eine kleine Menge Monomerlösung zur Messzelle gegeben worden war. Wahrscheinlich kommt es auch hier zu Adsorptionseffekten am Gold, die sich während des Quellvorganges, möglicherweise unterstützt durch den Elektrolyten, fortsetzen. Es ist eher unwahrscheinlich, dass der Quellvorgang selbst die Ursache der Änderung von  $R_2$  und  $C_1$  ist, da das Hydrogel aufgrund seiner Leitfähigkeit nicht als Dielektrikum wirken kann und seine Dicke somit keine Kapazität beeinflussen sollte.

## 5.5 DPTL-Monolayer

### 5.5.1 Einleitung

Die Qualität des DPTL Monolayers ist von großer Wichtigkeit für die Erzeugung einer elektrisch dichten Membran im nächsten Schritt. Nur ein ausreichend dichter Monolayer verfügt über genügend im Substrat verankerte Gruppen, um die spätere Membran anzubinden. In der Literatur [32] wurden die EIS Spektren der DPTL Monolayer mit dem R(RC)C Äquivalenzschaltbild gefittet:

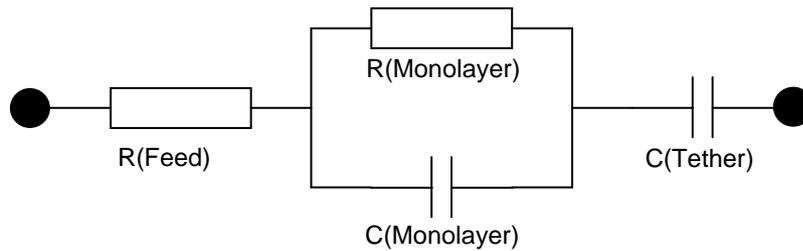


Abb. 5.6 Äquivalenzschaltbild für den DPTL Monolayer  $R(RC)C$

Dieses Model besteht aus einer Randles Zelle für den organischen Film auf der Goldelektrode sowie einer dazu in Reihe geschalteten Kapazität. Diese repräsentiert hierbei die Reihenschaltung aus starrer sowie diffuser Doppelschichtkapazität auf der Goldoberfläche [29]. Dies zeigt, dass sich sowohl Wasser als auch Ionen im Inneren des PEG-Spacers befinden und er somit seine Aufgabe als Ionenreservoir erfüllt. Die Modellierung der Doppelschicht durch eine Parallelschaltung von Kapazität und Widerstand wie bei den reinen Goldschichten ist hier im Normalfall nicht notwendig. Dieser scheinbare Widerspruch zeigt, dass es oft nicht möglich ist, die einzelnen elektrischen Bauteile eines solchen Systems völlig sauber voneinander zu trennen.

Die elektrischen Parameter eines DPTL Monolayers auf TSG werden in der Literatur [32] mit  $0,71-0,80 \mu\text{Fcm}^{-2}$  für die Kapazität und  $3,1-4,9 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$  für den Widerstand angegeben.

Die elektrischen Eigenschaften der im Laufe dieser Arbeit hergestellten Monolayer zeigten eine erheblich größere Streuung als diese Angaben. So wurden sowohl erheblich höhere als auch niedrigere Widerstände und Kapazitäten gemessen. Die Verteilung der Werte soll hier kurz dargelegt werden.

### 5.5.2 Statistische Betrachtung und Kategorisierung von Monolayern

Die insgesamt 71 in dieser Arbeit gemessenen DPTL Monolayer wurden anhand von Form und Fitbarkeit ihrer Impedanz Daten an das Model in Abb. 5.6 in drei Kategorien eingeteilt.

Spektren von Monolayern der ersten Kategorie sehen dem vom fertigen Bilayer sehr ähnlich. Ihr Phasenplot besitzt ein Plateau bei  $-90^\circ$  und der Niquist Plot zeigt einen kompletten und einen angedeuteten Halbkreis. Die Fitbarkeit ist extrem gut. 22 der gemessenen Monolayer gehörten dieser Gruppe an.

Bei Monolayern der zweiten Kategorie ist das Plateau weniger stark ausgeprägt. Die Phase geht entweder gar nicht auf  $-90^\circ$  oder es ist keine Parallele zur X-Achse erkennbar. Ansonsten

stimmt aber die Form mit der aus der ersten Kategorie überein und die Daten sind mit dem Modell von Abb. 5.6 zu fitten. Hiervon gab es 18 Monolayer.

Die restlichen 31 Spektren wurden der dritten Kategorie zugeordnet, weil sie eine völlig andere Form haben und mit diesem Modell nicht zu beschreiben sind.

Vesikelfusionen wurden im Normalfall nur mit Monolayern der ersten und zweiten Kategorie durchgeführt.

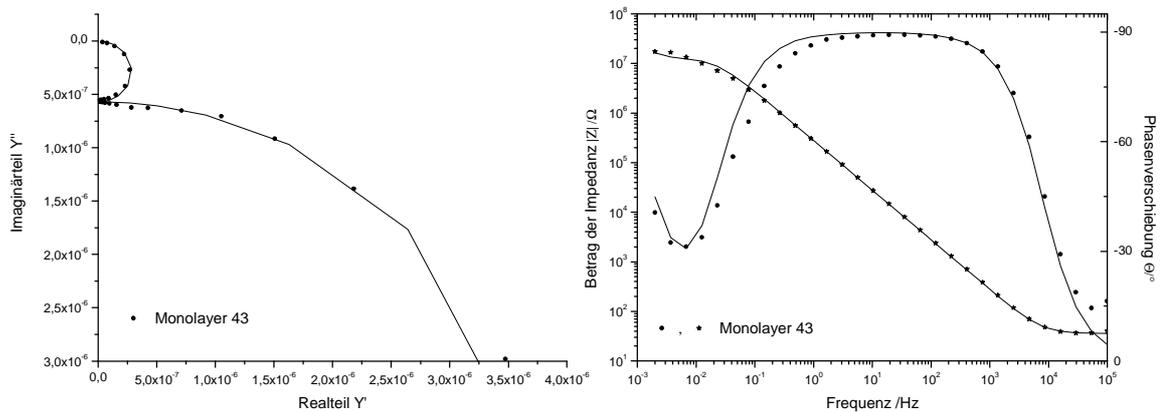


Abb. 5.7 Niquist- und Bode Plot von Monolayer 43, Beispiel für die erste Kategorie

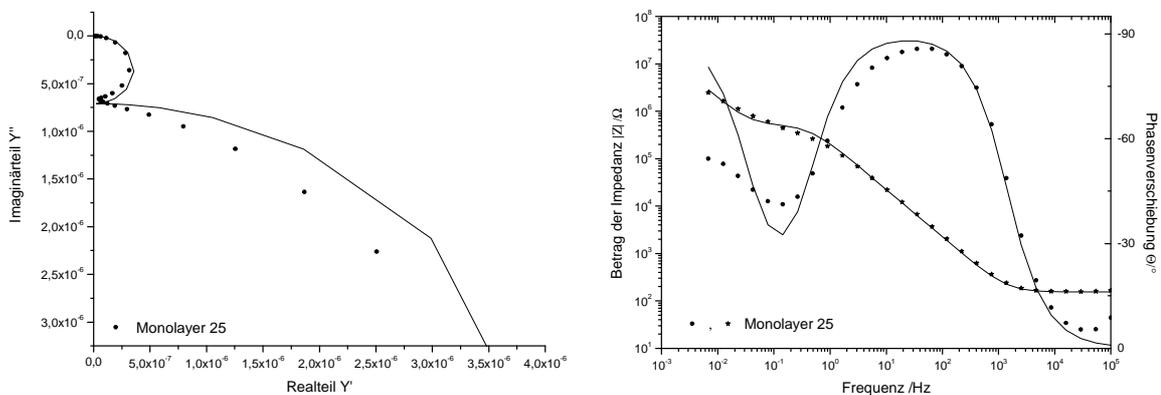


Abb. 5.8 Niquist- und Bode Plot von Monolayer 25, Beispiel für die zweite Kategorie

Die Ergebnisse der Auswertung aller Spektren aus den Kategorien eins und zwei sind in den Tabellen 5.2 und 5.3 zusammengefasst.

Nummer	R(Mono)	$\Delta R(\text{Mono})$ /%	C(Mono)	$\Delta C(\text{Mono})$ /%	C(Tether)	$\Delta C(\text{Tether})$ /%
26	180,35	32	0,70	15	na	na
29	33,83	7	0,84	3	11,7	38
50	18,68	12	1,06	4	3,4	12
63	17,24	9	1,10	4	8,2	20
21	15,69	8	0,93	3	4,8	12
36	13,16	3	0,55	1	14,2	14
19	11,68	7	0,94	3	5,1	10
1	10,98	6	0,99	2	6,3	15
23	9,48	27	1,26	11	1,6	11
43	9,06	5	0,79	2	9,8	10
27	8,21	7	0,99	3	12,9	20
34	7,95	24	1,06	10	4,2	31
24	5,86	5	0,80	2	6,3	11
39	7,61	6	0,70	3	18,4	20
10	5,63	19	1,16	7	2,5	14
42	5,27	10	0,71	4	7,5	14
67	4,80	8	1,48	3	7,0	14
20	3,27	11	1,15	4	8,1	12
40	3,18	7	0,73	4	27,7	21
70	1,73	7	0,70	3	5,4	14
15	1,66	13	1,45	5	2,5	8
12	1,41	8	1,28	3	10,5	11
Durchschnitt	17,12	11	0,97	5	8,5	16

Tabelle 5.2 Elektrische Eigenschaften aller Monolayer der ersten Kategorie

Nummer	R(Mono)	$\Delta R(\text{Mono})$ /%	C(Mono)	$\Delta C(\text{Mono})$ /%	C(Tether)	$\Delta C(\text{Tether})$ /%
69	1,10	7	0,80	3	3,6	6
17	0,87	9	1,08	3	3,2	5
3	0,81	8	1,31	4	17,7	15
44	0,61	13	1,56	5	7,8	9
71	0,50	11	0,93	5	5,4	9
16	0,45	18	1,43	6	2,4	6
22	0,39	6	1,02	3	5,5	4
25	0,36	8	0,99	4	10,8	7
41	0,36	15	0,83	6	5,1	12
28	0,34	10	1,75	4	8,6	10
30	0,32	9	0,82	4	5,3	6
37	0,21	12	0,93	5	3,4	7
68	0,18	10	1,16	4	3,8	4
31	0,10	9	0,94	4	5,4	5
4	0,04	8	1,27	4	7,6	5
6	0,03	13	1,62	6	11,0	8
33	0,03	10	1,15	4	3,7	4
45	0,01	19	2,02	7	3,4	6
Durchschnitt	0,37	11	1,20	5	6,3	7

Tabelle 5.3 Elektrische Eigenschaften aller Monolayer der zweiten Kategorie

Beim Vergleich der Werte für den Monolayerwiderstand sieht man, dass die Kategorisierung, obwohl dies nicht beabsichtigt war, die Monolayer anhand des Widerstandes aufteilt. So ist der niedrigste Widerstand in Gruppe eins  $1,4 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ , der Größte in Gruppe zwei  $1,1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Bei den Kapazitäten ist die Aufteilung weniger deutlich. Zwar ist die durchschnittliche Monolayerkapazität in der ersten Gruppe um etwa 20% kleiner als in der Zweiten, jedoch gibt es auch in dieser Gruppe Monolayer mit niedrigerer Kapazität als in der Ersten. Ein niedriger Monolayerwiderstand bedeutet also nicht zwangsläufig das Vorhandensein einer hohen Kapazität. Eine mögliche Erklärung für dies könnte das Auftreten von Multilayern sein, die eine große Dicke, aber keine gute Dichtigkeit besitzen. Durch die erhöhte Dicke nähme nach Gl. 2.6 die Kapazität auf Werte ab, die eigentlich nur elektrisch sehr dichten Monolayern vorbehalten sind. Einige der Monolayer aus Kategorie zwei (30, 31, 37, 41) könnten während des Selbstorganisationsprozesses Multilayer gebildet haben, die trotz Spülens mit Ethanol erhalten blieben.

Die Fehlerangaben in Prozent sind ein Maß für das Fehlerquadrat aus der Fitprozedur. Die Durchschnittswerte der Fehler in beiden Kategorien sind fast genau gleich. Jedoch fällt auf, dass die Fehler in der ersten Gruppe wesentlich stärker streuen als in der Zweiten. So gibt es Monolayer, die extrem stark vom Modell abweichen, (z. B. 26 und 23) und welche auf die es extrem gut passt (z. B. 36, 24, 43). In der zweiten Gruppe sind die Fehler recht gleichmäßig verteilt.

### 5.5.3 Monolayer die vom üblichen Modell abweichen: die dritte Kategorie

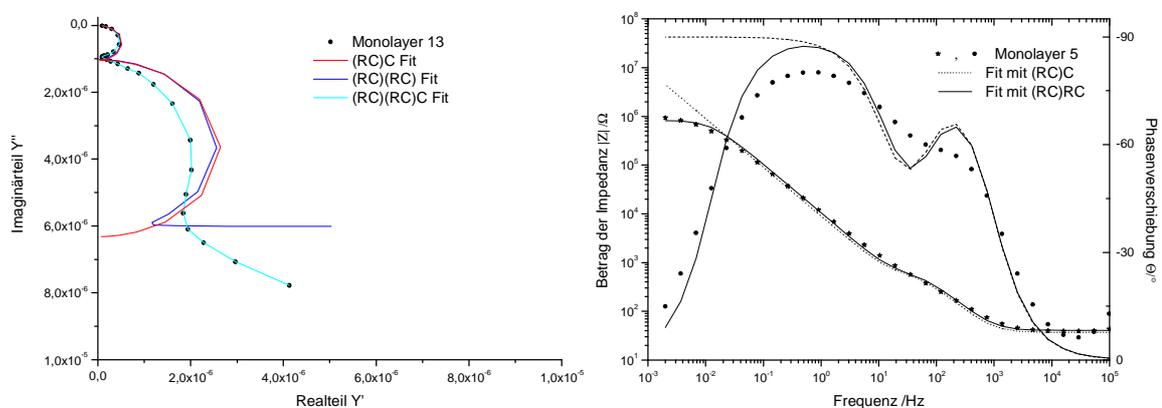


Abb. 5.9 Nyquist- und Bode Plots der Monolayer 13 (links) und 5 (rechts)

Die rechte Seite von Abb. 5.9 zeigt den Bode Plot für einen Monolayer der dritten Kategorie. Man sieht deutlich, dass der R(RC)C Fit (gestrichelte Linie) die Charakteristik der Daten nicht richtig beschreibt. Die Phase geht bei niedrigen Frequenzen wieder gegen null und es gibt einen zweiten Knick im Betrag der Impedanz. Dies weist darauf hin, dass zur korrekten Modellierung ein weiterer Widerstand, parallel zur Tether Kapazität benötigt wird. Der mit einem R(RC)(RC) Modell durchgeführte Fit (durchgezogene Linie) beschreibt die Messwerte erheblich besser. Hierbei entspricht die Modellierung des Tether Layers genau der des Helmholtz Layers bei einer reinen Goldschicht.

Im Niquist Plot auf der linken Seite von Abb. 5.9 zeigt sich die Abweichung vom R(RC)C Modell noch deutlicher. Viele der Monolayer aus der dritten Kategorie besitzen hier einen vollständigen zweiten Halbkreis, und einen angedeuteten dritten.

Man sieht, dass auch das R(RC)(RC) Modell noch nicht völlig ausreicht, um alle Charakteristika dieser Daten komplett zu fitten. Erst durch die Einführung einer dritten Kapazität, also der Verwendung eines R(RC)(RC)C Modells würde der Fit vollständig auf die Daten passen. Allerdings fällt die Rechtfertigung des zusätzlichen Bauteils anhand von im realen System vorhandenen Parametern recht schwer.

#### 5.5.4 Kriterien für die Herstellung guter Monolayer

Die Qualität der hergestellten Monolayer hängt von zahlreichen Faktoren ab. Die Rauigkeit der Goldoberfläche, sowie die Anzahl von Defekten in derselben spielen eine große Rolle. Da für die Messungen immer die Stelle auf dem Träger verwendet wurde, die augenscheinlich am wenigsten Defekte aufwies, kommt die Goldträgerqualität besonders bei Verwendung von Messzellen mit großer Detektionsfläche ( $0,78\text{cm}^2$  im Vergleich zu  $0,28\text{cm}^2$  bei den kleinen Zellen) zum Tragen, da es dann viel schwerer ist, eine vollständig defektfreie Stelle zu finden. Der zweite Faktor der die Monolayerqualität bestimmt, ist die Sauberkeit der ethanolischen DPTL Lösung, die für die Selbstorganisation verwendet wurde. Gerade in den letzten Monaten dieser Arbeit konnten gute Monolayer der ersten Kategorie nur mit absolut frischer DPTL Lösung erzeugt werden. Eine zweite Verwendung der Lösung führte zu sehr schlechten Monolayern der dritten Gruppe. Dies ist ein erstaunliches Phänomen, denn in den ersten Monaten der Arbeit konnten die Lösungen problemlos mehrere Wochen lang verwendet werden, ohne dass die Qualität der Monolayer abnahm. Zahlreiche Parameter wurden daraufhin variiert um die Lösung wieder mehrfach verwenden zu können. Verschiedene Säuberungsmethoden der gestripten Goldträger wurden verwendet, bevor diese in die

Lösung getan wurden. Der Selbstorganisationsprozess wurde unter Kühlung durchgeführt, im Dunklen, unter leichtem Schütteln der Lösung sowie unter Ausschluss von Luft. Außerdem wurde das verwendete Ethanol vor dem Lösen entgast. Dies alles schien jedoch keinen Einfluss auf die Qualität der Monolayer zu haben.

## 5.6 Vesikelfusion

### 5.6.1 Einleitung

Während der Vesikelfusion bildet sich auf dem DPTL Monolayer eine zweite Schicht aus Lipidmolekülen und es entsteht eine Lipidmembran. Diesen Vorgang kann man durch zahlreiche Messmethoden für den Experimentator sichtbar machen. Auf der Seite der elektrischen Eigenschaften erwarten wir eine Zunahme des Widerstandes, sowie eine Abnahme der Kapazität des Monolayers (ab hier sprechen wir vom Bilayer). Der Widerstand der fertigen Membran ist höher als der des Monolayers, weil die Lipid Doppelschicht für Ionen eine wesentlich effektivere Barriere darstellt, als die einfache Schicht. Da sich die Kapazität einer organischen Schicht antiproportional zu deren Dicke (der des Dielektrikums) verhält und der Monolayer durch die zweite Lipidschicht dicker wird, erwarten wir eine Abnahme der Kapazität während der Vesikelfusion. Die Zunahme der Dicke der Lipidschicht kann man auch direkt mit der Oberflächenplasmonen Spektroskopie (SPR) messen. Natürlich ist es sehr interessant, die Daten aus der kinetischen SPR Messung mit denen aus der gleichzeitig durchgeführten EIS Messung zu vergleichen.

Eine dritte Möglichkeit, die hier jedoch nicht praktiziert wurde ist die Messung der Massenzunahme der organischen Schicht mithilfe eines Quarzmikrowaagenexperimentes.

Die Auswertung der Daten von verschiedenen Vesikelfusionen kann aus zwei verschiedenen Blickwinkeln geschehen. Zum einen kann die Änderung der Eigenschaften im Vordergrund stehen, man vergleicht also, wie die Eigenschaften der fertigen Membran von denen des Monolayers abhängig sind. Der andere Blickwinkel zielt eher auf den Weg vom Monolayer zur Membran hin ab, die Frage ist also nach welcher Kinetik die Vesikelfusion abläuft.

### 5.6.2 Vergleich der kinetischen Daten einiger Vesikelfusionen

Abb. 5.10 zeigt den Verlauf einer Vesikelfusion, bei der simultan EIS und SPR im Kinetikmodus gemessen wurden. Man sieht deutlich, dass die Graphen für Reflektivität und Widerstand ziemlich genau parallel zueinander verlaufen. Die Änderungen in Widerstand und Dicke der Membran sind also proportional zueinander. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zunahme des Widerstandes eine direkte Folge der Erhöhung der Dicke des Monolayers durch eine zweite Lipidschicht ist. Auch die Sättigung der Steigung tritt bei beiden Detektionsmethoden zum gleichen Zeitpunkt, bei etwa 300 Minuten ein.

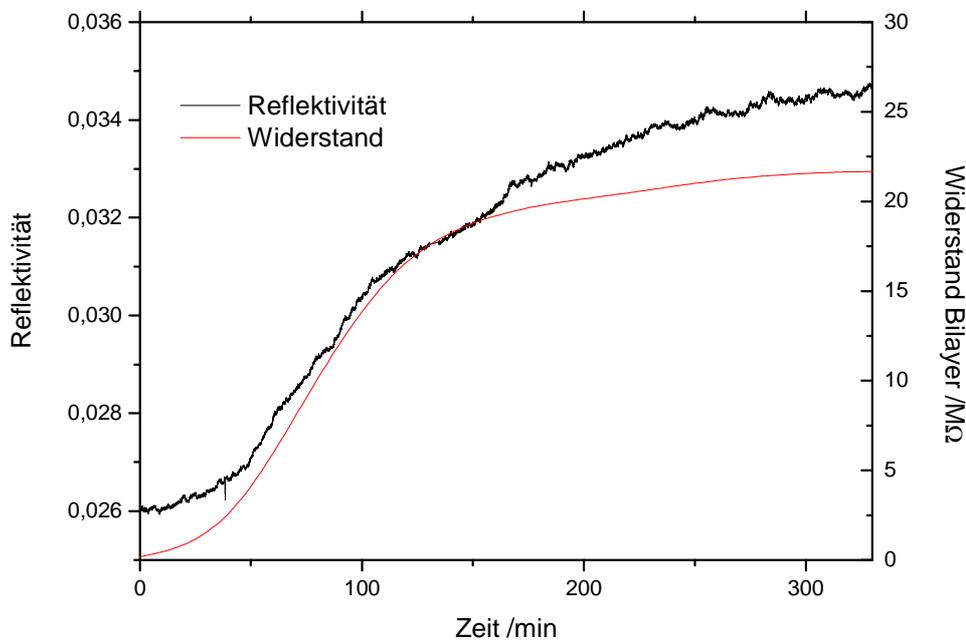


Abb. 5.10 Simultane SPR- und Impedanzmessung während einer Vesikelfusion

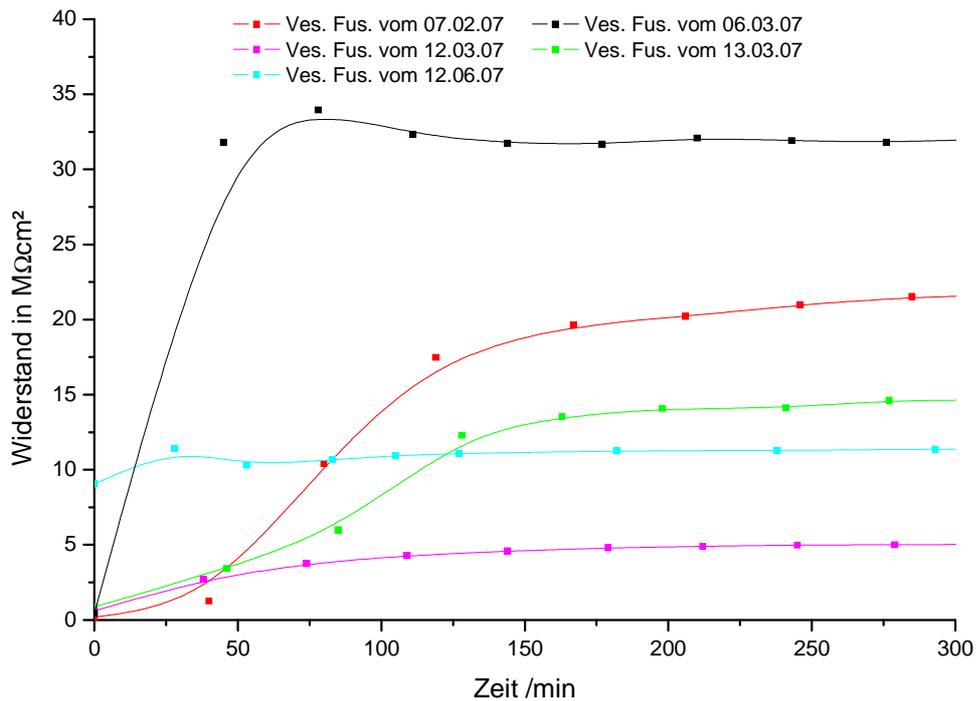


Abb. 5.11 Entwicklung des Membranwiderstandes bei verschiedenen Vesikelfusionen

In Abb. 5.11 sind die Widerstandsänderungen als Funktion der Zeit für mehrere Vesikelfusionen dargestellt. Man sieht, dass es offensichtlich keine Regelmäßigkeit in der Kinetik des Prozesses gibt. Der cyanfarbene Graph weist auf einen exponentiell abklingenden Wachstumsverlauf hin. Dieser ist auch beim schwarzen Graphen sichtbar, allerdings gibt es hier nach etwa 80 Minuten ein kleines Widerstandsmaximum, welches im weiteren Verlauf der Vesikelfusion nie mehr erreicht wird. Dieses Maximum gibt es auch beim hellblauen Graphen, jedoch fällt bei diesem die Erhöhung des Widerstandes sehr niedrig aus. Der rote Graph folgt mit seiner sigmoidalen Form ziemlich genau einer Gauss-Funktion während der grüne Graph fast linear ansteigen zu scheint. Die Graphen haben aber alle gemeinsam, dass die Änderung des Widerstandes nach etwa 300 Minuten im Wesentlichen abgeschlossen ist.

### 5.6.3 Vergleich der Eigenschaften von Monolayer und resultierender Membran

Zum Anfitzen der Impedanz Daten der Vesikelfusionen und des fertigen Bilayers wurde das gleiche Modell verwendet, wie für die Monolayer (Abb. 5.6), nur dass es jetzt  $R(Bi)$  sowie  $C(Bi)$  enthält.

Nummer	Vor der Vesikelfusion			Am Ende der Vesikelfusion			Nach dem Spülen		
	C(Mono)	R(Mono)	C(Tether)	C(Bi)	R(Bi)	C(Tether)	C(Bi)	R(Bi)	C(Tether)
3	1,16	5,63	2,46	0,73	41,08	2,4	0,74	39,98	2,4
6	1,43	0,45	2,40	1,09	32,82	1,5	1,05	37,13	1,5
8	1,10	17,24	8,21	1,07	23,16	4,0	1,09	23,08	4,4
1	1,16	0,18	3,76	0,89	22,89	2,6	1,06	14,43	1,7
10	0,79	9,06	9,76	0,81	13,44	6,4	0,82	12,99	6,8
7	1,08	0,87	3,16	0,73	13,46	4,6	0,75	12,57	3,5
9	1,15	3,27	8,06	0,93	26,26	3,5	1,12	10,40	3,7
5	1,48	4,80	6,97	0,96	9,58	10,5	1,01	9,26	9,5
4	1,45	1,64	2,48	1,00	9,79	4,7	1,01	8,07	5,1
11	1,56	0,61	7,84	1,32	4,61	12,0	1,38	4,00	10,7
2	1,27	0,04	7,57	0,85	0,48	7,2	0,86	0,53	6,6

*Tab. 5.4 Elektrische Eigenschaften zu verschiedene Stadien einiger Vesikelfusionen*

Tabelle 5.4 zeigt eine Übersicht über die elektrischen Eigenschaften der Membranen einiger ausgewählter Vesikelfusionen zu verschiedenen Stadien. Die einzelnen Experimente sind nach sinkendem Widerstand der fertigen Membranen sortiert.

Bei allen Experimenten ist der Membranwiderstand gestiegen und die Membrankapazität gesunken. Die Tetherkapazität ändert sich durch die Vesikelfusion meistens deutlich, jedoch gibt es sowohl Fälle, bei denen sie sich erhöht als auch solche, bei denen sie niedriger wird.

Die erzeugten Bilayer besitzen nach dem Spülen Membranwiderstände zwischen 0,53 und 39,98  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^2$  sowie Kapazitäten von 0,74 bis 1,38  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Wie bei den Monolayern scheinen Membrankapazität und –widerstand nicht direkt miteinander verbunden zu sein. Zwar besitzt der Bilayer mit dem höchsten Widerstand (Nr. 3) auch die niedrigste Kapazität, dagegen hat der Bilayer mit dem zweithöchsten Widerstand (Nr. 6) eine recht hohe Kapazität. Auch der widerstandsschwächste Bilayer (Nr. 2) hat keine besonders hohe Kapazität.

Des Weiteren ist kein deutliches Muster zu erkennen, ob gute Membranen eher aus starken oder schwachen Monolayern entstehen. Die fünf stärksten Bilayer entstanden aus Monolayern mit Widerstandswerten zwischen 0,18 bis 17,24  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ . Es scheint jedoch das Muster zu geben, dass sich der Widerstand sehr starker Monolayer im Laufe der Vesikelfusion nur noch wenig ändert, wodurch man aus sehr starken Monolayern nur mittelstarke Membranen erhalten kann.

#### 5.6.4 Auswirkung des Spülens auf die Membran

Anhand der Tabelle 5.4 kann man auch untersuchen, wie sich das nach der Vesikelfusion durchgeführte Spülen auf die elektrischen Eigenschaften der Membran auswirkte.

Man sieht, dass sich, von einigen Ausnahmen abgesehen, der Widerstand der Membran durch das Spülen erniedrigt und sich die Kapazität erhöht, die Qualität des Bilayers also abnimmt. Durch den Spülvorgang wird also ein Teil des Effektes der Vesikelfusion wieder „rückgängig“ gemacht. Die Tether Kapazität änderte sich durch den Spülvorgang in keinem der Versuche nennenswert, auch dann nicht, wenn es zu einer starken Änderung der übrigen Parameter (Versuch 9) kam. Daraus kann man folgern, dass die Tether Kapazität nicht mit den Eigenschaften der weiter außen liegenden Membran korreliert ist. Sie reagiert immer nur auf Änderungen der Zusammensetzung der Flüssigkeit im Tether Bereich, und ist somit ein guter Indikator dafür, ob während eines Versuches Stoffe die Membran penetrieren.

Über die Auswirkungen der Flüssigkeitsbewegung in der Zelle während des Spülvorganges kann nur spekuliert werden. Durch die Bewegung in der flüssigkristallinen Struktur der Membran könnten die Lipidmoleküle eine energetisch günstigere Position einnehmen. Zum anderen sollten an der Membran anhaftende Vesikel und freie Lipide durch die Strömung entfernt werden. Die Einstellung eines Gleichgewichtes nach dem Spülen dauerte in einigen Fällen nur etwa 1,5 Stunden (drei Impedanzmessungen), in anderen länger und manchmal wurde auch nie ein Gleichgewichtszustand erreicht.

#### 5.6.5 Probleme bei der Vesikelfusion

Bei sehr vielen Experimenten trat das Problem auf, dass das System nach dem Spülen keinen Gleichgewichtszustand erreichte, sondern die Qualität des Bilayers sukzessive schlechter wurde.

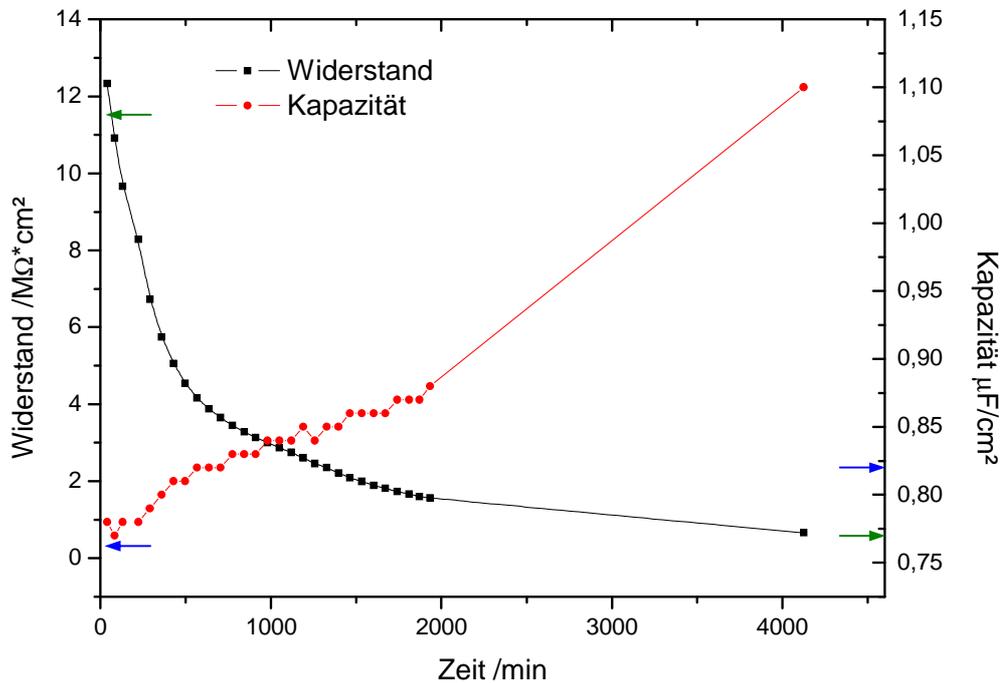


Abb. 5.12 Verhalten von Widerstand und Kapazität nach dem Spülvorgang

Abb. 5.12 zeigt einen sehr typischen Verlauf des Widerstandes und der Kapazität eines Bilayers in Abhängigkeit der Zeit nach dem Spülvorgang. Die grünen Pfeile zeigen Widerstand und Kapazität am Ende der Vesikelfusion, die blauen Pfeile die Eigenschaften des Monolayers.

Man sieht, dass der Membranwiderstand direkt nach dem Spülen etwas höher ist als davor, dann beginnt er jedoch in einer Exponentialfunktion abzunehmen. Die Funktion der Membrankapazität hat vor allem zu Beginn der Messungen einige Schwankungen, zeigt aber über den gesamten Zeitraum gesehen fast linear ansteigendes Verhalten. Dabei übersteigt sie schon nach kurzer Zeit den Wert des DPTL Monolayers. Der Membranwiderstand lag in diesem Beispiel nach einigen Tagen noch knapp über dem Wert des Monolayers, es gab aber auch viele Fälle, bei denen dies nicht der Fall war.

Es wurde aber gezeigt, dass die Funktionsfähigkeit der Membran trotz dieses Verlustes an Dichtigkeit erhalten blieb. So wurde erfolgreich Valinomycin in einen derart „geschwächten“ Bilayer eingebaut, was bei einem reinen DPTL Monolayer nicht möglich ist. Der Bilayer bleibt also während dieses Vorganges intakt, er verliert nur einen Großteil seiner elektrischen

Dichtigkeit. Auch die Tether Kapazität nimmt während des Vorganges immer zu. Dies spricht für eine langsame Erhöhung der Ionenstärke im Innern des Tether Bereiches.

Ein weiteres Problem, welches während der Vesikelfusionen auftrat, scheint eng mit diesem Vorgang verwandt zu sein. Bei Vesikelfusionen, in denen der Membranwiderstand in der ersten Zeit extrem stark und schnell anstieg, passierte es häufiger, dass der Membranaufbau plötzlich „kippte“ und sich die elektrischen Eigenschaften wieder verschlechterten. In Abb. 5.13 sind einige Bode Plots zu verschiedenen Stadien einer derart fehlgeschlagenen Vesikelfusion dargestellt.

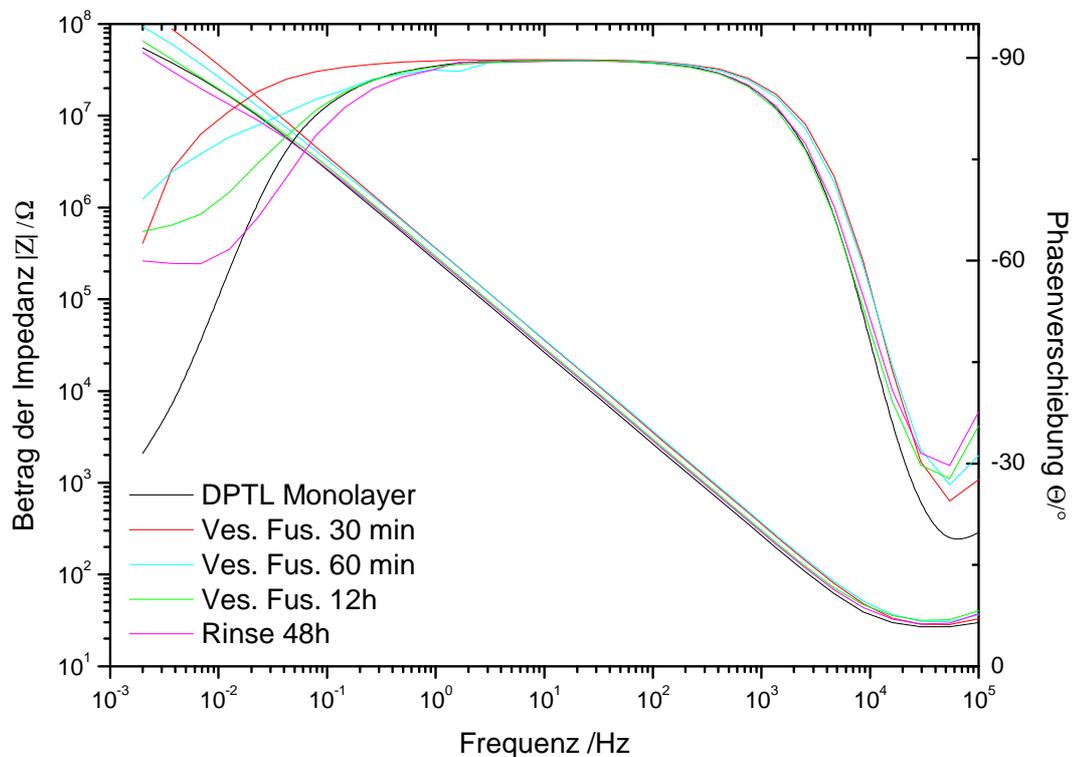


Abb. 5.13 Bode Plots zu verschiedenen Stadien einer fehlgeschlagenen Vesikelfusion

Nach der ersten Impedanz Messung (30 Minuten) ist der Widerstand des ohnehin schon sehr dichten Monolayers stark angestiegen. Eine Messung später (60 Minuten) flacht die Phasenkurve ab und das Plateau bei  $-90^\circ$  wird kürzer. Nach dem Spülen hatte die Phasenkurve eine völlig andere Form.

Abb. 5.14 zeigt die Ergebnisse des gesamten Experimentes.

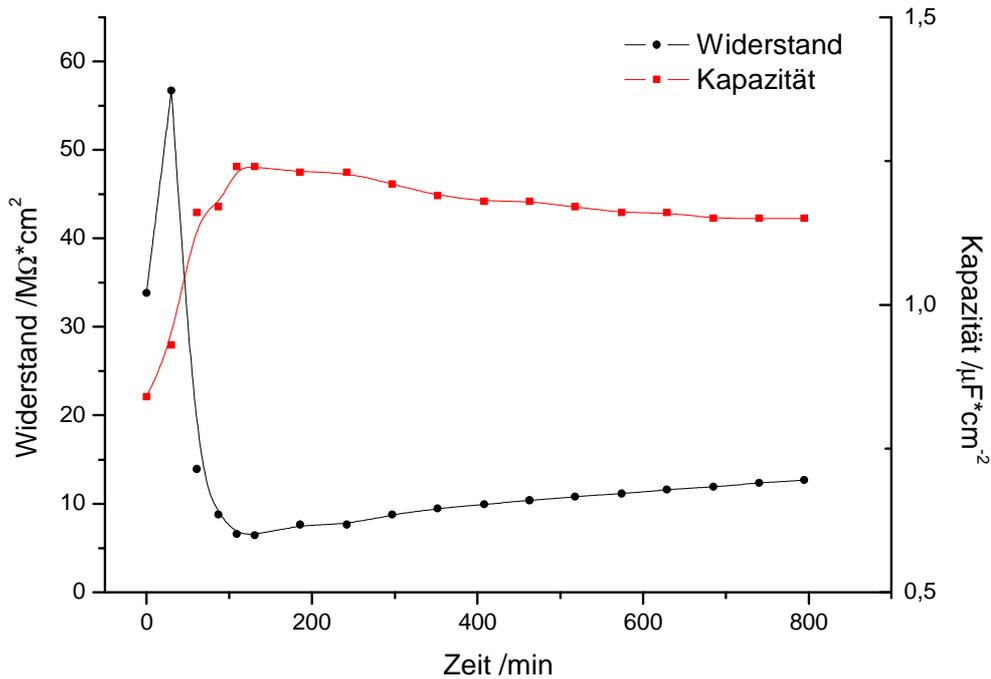


Abb. 5.14 Verhalten von Widerstand und Kapazität während der Vesikelfusion

Man sieht, dass der Widerstand des Monolayers erst sehr stark zunimmt, um dann einen Sprung nach unten zu machen. Nach einiger Zeit beginnt er wieder langsam zu steigen. Nach 800 Minuten wurde das System gespült und der Widerstand begann in ähnlicher Weise wie in Abb. 5.12 wieder zu sinken.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass in der Anfangsphase der Vesikelfusion trotz der deutlichen Erhöhung des Membranwiderstandes die Membrankapazität zu- statt abnimmt. Abb. 5.15 zeigt den Niquist Plot zu verschiedenen Stadien dieser Vesikelfusion. Auf den ersten Blick scheint die Membrankapazität während der Vesikelfusion abzunehmen, da der obere Halbkreis des Monolayers kleiner wird. Der Fit zeigt jedoch, dass nur die Tetherkapazität einen starken Sprung nach unten macht, die Monolayerkapazität dagegen leicht ansteigt.

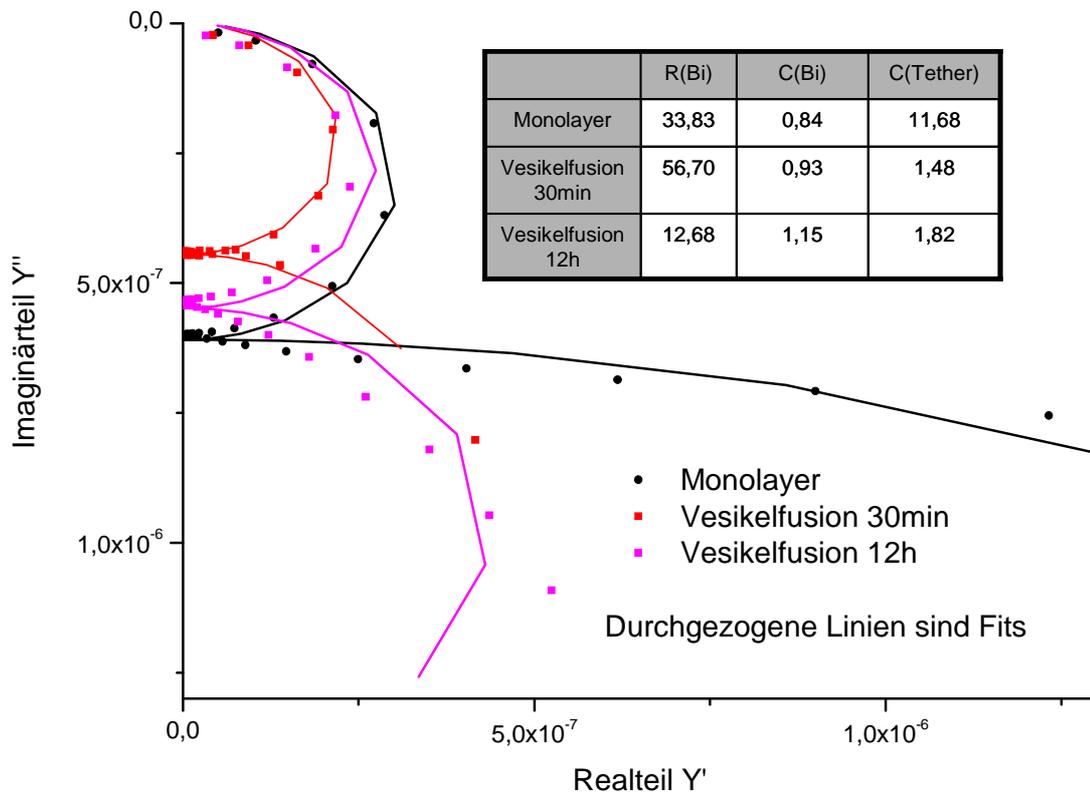


Abb. 5.15 Nyquist Plot zu verschiedenen Stadien der fehlgeschlagenen Vesikelfusion

Zusammenfassend kann man feststellen, dass zwei Effekte beobachtet wurden, die die Vesikelfusion stören. Zum einen kam es nach dem Spülen einer ansonsten normal verlaufenen Vesikelfusion zur sukzessiven Verschlechterung der elektrischen Eigenschaften der Membran bis unter die des Monolayers. Zum anderen kam es während der Vesikelfusion zu einer plötzlichen Verschlechterung der elektrischen Eigenschaften der Membran. Dies kündigte sich dadurch an, dass die Membrankapazität während der Vesikelfusion zu- statt abnahm.

Diese beiden Effekte stellten ein erhebliches Problem für diese Arbeit dar, da für die genaue Untersuchung des Einflusses einer Hydrogelschicht auf die Membran diese möglichst stabile elektrische Eigenschaften haben muss.

Es scheint, als ob diese beiden Probleme nur in solchen Vesikelfusionen auftraten, bei denen Teile der Messapparatur bereits einer gewissen Verunreinigung durch die Bestandteile der Hydrogel-Wachstumslösung ausgesetzt worden waren. In neuen oder ausgeliehenen Teflonzellen wurden völlig stabile Membranen hergestellt. Offensichtlich enthält die Wachstumslösung einen oder mehrere Stoffe, die eine normale Vesikelfusion unmöglich machen. Dieser Stoff muss an einem Teil der Messapparatur haften bleiben und sich im

nächsten Experiment in sehr geringer Konzentration in der Elektrolytflüssigkeit lösen, wodurch die Vesikelfusion den oben beschriebenen Verlauf nimmt.

Wie im Experimententeil beschrieben wurden zahlreiche Reinigungsprozeduren für die nicht austauschbaren Teile der Apparatur getestet. Die Probleme bei der Vesikelfusion tauchten aber trotzdem in gewissem Maße auf. Die besten Erfolge bei der Reinigung wurden durch ein mehrstündiges Aufheizen der Teile in konzentrierter Schwefelsäure, gefolgt von einer mehrtägigen Lagerung in derselben erzielt. Nach dieser Behandlung konnten relativ stabile Membranen erzeugt werden, die jedoch immer noch schlechter waren als solche in völlig neuen Messzellen.

Um herauszufinden, welche Komponente der Wachstumslösung so hartnäckig an den Bauteilen der Messapparatur haften bleibt, wurde eine normal gesäuberte Messzelle für 24h mit Milli-Q Wasser gefüllt stengelassen. Die so erhaltene, potentiell verunreinigte Flüssigkeit wurde mit verschiedenen Massenspektroskopischen Methoden untersucht. Allerdings konnten dabei abgesehen von Kaliumionen keine eindeutigen Massenpeaks neben dem Untergrundrauschen detektiert werden. Trotzdem bleibt die Theorie der Verunreinigung die einzig schlüssige Erklärung.

Um die Probleme mit der Verunreinigung zu umgehen wurde eine Messzelle aus Glas konstruiert, deren Reinigung wesentlich einfacher sein sollte. Leider stellte sich die Vesikelfusion in einem Glasgefäß als sehr problematisch dar. In der unmodifizierten Zelle fand die Vesikelfusion überhaupt nicht statt, weil vermutlich die Membran über die hydrophile Glasoberfläche gespreitet wurde. Nach einer Silanisierung des Glases startete die Vesikelfusion, es wurde aber auch keine stabile Membran erhalten. Die Ursache dafür konnte leider bis zum Ende nicht ermittelt werden.

Des Weiteren wurde versucht, die Vesikelfusion zu umgehen und stattdessen Membranen durch die Solvent Exchange Methode herzustellen. Nach dem Austausch des Ethanol gegen wässrige Elektrolytlösung hatten sich die elektrischen Eigenschaften des Monolayers eindeutig in Richtung Bilayer verändert. Nach einiger Zeit kam es jedoch, genau wie nach der Vesikelfusion, zur kontinuierlichen Abnahme des Membranwiderstandes.

## 5.6.6 Einfluss des Elektrolyten auf die Vesikelfusion

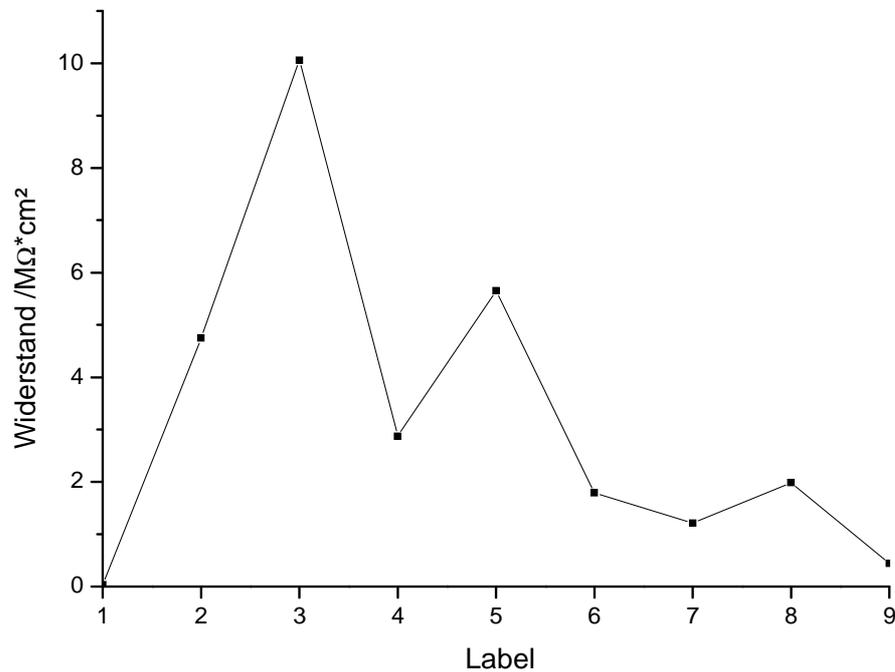


Abb. 5.16 Widerstand einer Membran in Abhängigkeit der Elektrolytlösung

Nach dem Auftreten der oben beschriebenen Problematik bei der Vesikelfusion wurde getestet, ob der Wechsel zu einem anderen Elektrolyt möglicherweise eine Änderung der Situation herbeiführt. Abb. 5.16 gibt einen Überblick über den Widerstand der Membran zu verschiedenen Stadien (die Zahlen auf der X-Achse) dieses Experimentes. Zur Vesikelfusion mit dem Monolayer (1) wurde statt der sonst üblichen KCl Lösung eine NaCl Lösung verwendet (2). Nach dem Spülen der Zelle mit NaCl Lösung, wobei sich der Widerstand kurzfristig erhöhte (3), kam es zum bereits bekannten allmählichen Absinken der elektrischen Dichtigkeit (4). Nach dem erneuten Spülen der Zelle mit NaCl Lösung kam es wieder zu einer kurzfristigen Erhöhung des Widerstandes (5), die aber niedriger ausfiel als beim ersten Spülen, gefolgt von einem weiteren Dichtigkeitsverlust mit der Zeit (6) Am nächsten Tag wurde die Zelle mit einer KCl Lösung gespült (7) was diesmal nicht zur kurzzeitigen Erhöhung des Widerstandes führte. Ein weiteres Spülen mit NaCl Lösung erzielte immer noch den Effekt der kurzzeitigen Widerstandserhöhung (8).

Eine Erklärung dieser Beobachtungen ist nicht einfach. Die Konzentrationen der beiden Elektrolytlösungen waren gleich, was sich auch im sehr ähnlichen Feed-Widerstand der Messungen zeigte. Trotzdem scheint es einen Unterschied zu machen, mit welcher

Elektrolytlösung die Membran gespült wird. Bei der Verwendung von NaCl Lösung kommt es zu einer kurzzeitigen Erhöhung des Widerstandes, bei KCl Lösung nicht. Auch dies kann jedoch nicht den allmählichen Abbau der elektrischen Dichtigkeit verhindern.

Eine solche Differenzierung des Verhaltens der Membran zwischen Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-haltiger Umgebung lässt das Vorhandensein von Valinomycin in der Membran vermuten. Es wurde bei diesem Versuch aber sehr genau darauf geachtet, dass kein Valinomycin ins System gelangen konnte.

## **5.7 Applikation des Hydrogels**

### 5.7.1 Einleitung

Wenn sich eine Membran nach längerer Beobachtungszeit als ausreichend stabil gezeigt hatte, wurde, wie im Experimenterteil beschrieben, eine Hydrogelschicht auf die Membran gebracht. Wesentliche Variationsparameter waren hierbei die Dicke des Hydrogels (einstellbar über die Menge an Wachstumslösung), die Konzentration an Monomeren und Initiator, sowie der Vernetzungsgrad des Hydrogels (einstellbar über das Monomer/Vernetzer Verhältnis).

Während in den ersten Experimenten sehr dicke Hydrogelschichten aufgebracht wurden (im Bereich von Zentimetern) wurde die Technik im Verlauf der Arbeit verbessert, so dass später Dicken von wenigen Millimetern erreicht wurden. Nichtsdestotrotz zeigen einige der ersten Experimente, bei denen die gesamte Messzelle mit Hydrogel gefüllt wurde, dass es möglich ist, auf einen flüssigen Elektrolyten vollständig zu verzichten.

Die genaue Einstellung der in der Zelle verbleibenden Menge an Elektrolytlösung war ein sehr wichtiger Punkt. Wurde zu wenig Flüssigkeit in der Zelle gelassen, lief die Membran an einigen Stellen trocken und verlor deutlich an Qualität. Außerdem lief die Polymerisation bei zu hoher Initiatorkonzentration zu schnell ab, so dass die Reaktionswärme die Temperatur des Systems über die LCST ansteigen ließ. Dies erzeugte ein weißes, unregelmäßig geformtes Hydrogel. Verblieb zu viel Flüssigkeit in der Zelle, so war die Monomer- oder Initiatorkonzentration zu niedrig und die Polymerisation fand nicht statt.

Tabelle 5.5 zeigt eine Zusammenfassung aller Experimente, bei denen das Zielsystem vollständig aufgebaut wurde.

Nummer	Menge Monomerlösung	Vernetzungsgrad	verwendetesLipid
1	komplette Zelle	1:100	DPhyPC
2	komplette Zelle	1:100	Acryl-DMPE
3	komplette Zelle	1:100	DPhyPC
4	100 $\mu$ l	1:100	DPhyPC
5	100 $\mu$ l	1:50	DPhyPC
6	100 $\mu$ l	1:25	DPhyPC
7	200 $\mu$ l	1:100	DPhyPC
8	100 $\mu$ l	1:100	Acryl-DPhyPE + DPhyPC 1:10

*Tab. 5.5 Auflistung aller vollständig hergestellten Systeme*

Für die Auswertung sollen diese acht Experimente in zwei Gruppen aufgeteilt werden. In der ersten Gruppe ist zur Beschreibung der EIS Spektren des Systems aus Membran und Hydrogel immer noch das R(RC)C-Modell gültig, welches auch für die reinen Membranen verwendet wurde.

In der zweiten Gruppe hat die Applikation des Hydrogels erheblich stärkere Auswirkungen auf die Impedanz Daten und zu deren Beschreibung muss das bisher verwendete Modell verändert werden.

### 5.7.2 Beschreibung des Systems mit einem R(RC)C-Modell

Bei den vier, in diesem Kapitel ausgewerteten Experimenten, wurde keine fundamentale Veränderung der Impedanz Spektren durch die Applikation eines Hydrogels auf die Membran beobachtet. Daher konnte zur Fittung der Daten das gleiche Modell wie für die Membranen verwendet werden. In Tabelle 5.6 sind die elektrischen Eigenschaften der Systeme zu verschiedenen Stadien ihrer Herstellung dargestellt.

Genau wie die Membran nach dem Spülen im Anschluss an die Vesikelfusion einige Zeit benötigte, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen, verhält sie sich auch hier. Nach dem Spülen des polymerisierten Systems dauerte es teilweise viele Stunden, bis die elektrischen Parameter des Systems stabil waren. In diesem Fall gibt es nun zwei Elemente im System, die einen Gleichgewichtszustand erreichen müssen: die Membran und das Hydrogel.

Nr.	reine Membran				mit Hydrogel				mit Hydrogel im GG			
	Feed*	R(Bi)	C(Bi)	C(Tether)	Feed*	R(Bi)	C(Bi)	C(Tether)	Feed*	R(Bi)	C(Bi)	C(Tether)
1	278,5	35,70	1,07	1,50	403,3	33,01	0,87	2,52	343,7	26,05	0,88	2,45
3	274,2	12,57	0,75	3,46	365,3	11,95	0,74	4,29	322,8	1,55	0,77	3,80
4	13,8	9,11	0,97	9,16	38,4	7,32	1,01	14,24	37,2	2,99	1,10	9,94
5	29,8	23,08	1,09	4,41	40,4	6,51	0,95	25,67	42,5	9,79	1,16	4,45

\* in  $\Omega\text{cm}^2$

*Tabelle 5.6 Verschiedene Stadien der Experimente 1, 3, 4, 5*

Der Widerstand der Membran nimmt während des Polymerisationsvorganges immer ab. Die Größe des Dichtigkeitsverlustes schwankt zwischen einem Faktor von 0,95 bei Experiment 3 und 0,28 bei Experiment 5. Dieser ist nachvollziehbar, da das radikalische Kettenwachstum der Polymerketten mit Sicherheit die Anordnung der Lipidmoleküle beeinflusst und somit die Dichtigkeit der Membran erniedrigt. Des Weiteren tritt bei jedem Versuch eine Erhöhung des Feed Widerstandes der Elektrolytlösung auf. Dies wurde auch bei der Polymerisation von Hydrogelen auf reine Gold Schichten beobachtet. Offensichtlich behindert das feste Hydrogel die Ionenwanderung stärker als eine flüssige Elektrolytlösung. Während sich die Membrankapazität durch das Hydrogel nur geringfügig verändert, beobachten wir einen deutlichen Anstieg in der Tether Kapazität. Dies spricht wieder für die Beeinflussung der chemischen Doppelschicht auf der Goldoberfläche durch die Monomere. Um dies zu bestätigen, wurde eine fertige Membran mit Wachstumslösung gespült, ohne diese zu polymerisieren. Dabei kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Tether Kapazität. Bestandteile der Wachstumslösung penetrieren also die Lipidmembran und gelangen so in den Tether Bereich. Hier bewirken sie eine Erhöhung der Kapazität der chemischen Doppelschicht. Bei einer unmodifizierten Goldoberfläche verhielt sich die Situation genau gegensätzlich: hier wurde die Kapazität der Helmholtz Schicht durch die Wachstumslösung erniedrigt.

Die bis hierher besprochenen Auswirkungen der Hydrogelapplikation bezogen sich nur auf die erste Messung des fertigen Systems. Während dieses seinen Gleichgewichtszustand erreichte, wurden weitere Daten gesammelt.

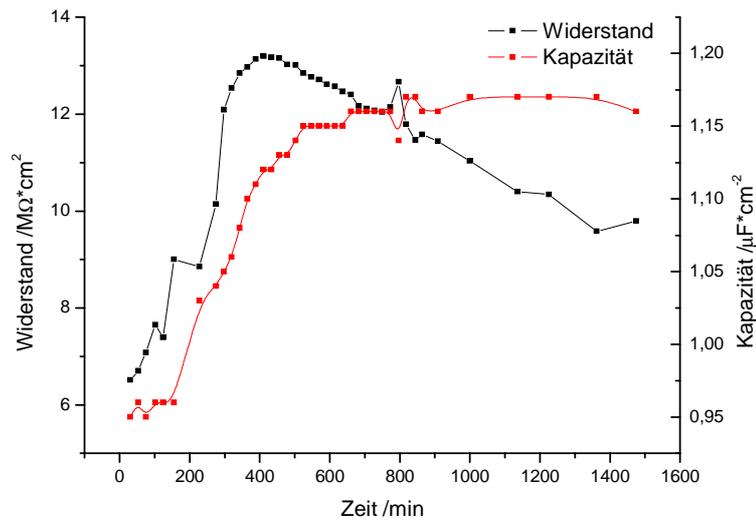


Abb. 5.17 Verhalten des polymerisierten Systems nach dem Spülen

Abb. 5.17 zeigt das Verhalten des Systems aus Experiment 5 nach dem Spülen. Der Membranwiderstand steigt von 6,5 auf zwischenzeitlich über 13  $M\Omega \cdot \text{cm}^2$ , erreicht aber nicht mehr die Höhe der reinen Membran. Danach bleibt der Widerstand für kurze Zeit fast konstant und beginnt dann linear abzufallen. Nach etwa 24 Stunden scheint der Widerstand einen Gleichgewichtswert erreicht zu haben. Die Kapazität steigt zu Beginn mit dem Widerstand und flacht ab, während die Widerstandskurve ihr Maximum erreicht. Danach bleibt sie konstant.

Für dieses Verhalten gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum einen kann es sich bei den beobachteten Änderungen der elektrischen Eigenschaften der Membran um eine Folge des Quellens des Hydrogels handeln. Die dabei auftretenden mechanischen Spannungen verformen die Lipidmembran und beeinflussen so deren Dichtigkeit. Die andere Möglichkeit ist, dass es sich dabei wieder um eine Änderung der Zusammensetzung der Flüssigkeit im Tether Bereich handelt. Direkt nach der Polymerisation war dieser abgeschlossene Bereich gefüllt mit nicht polymerisierten Resten der Wachstumslösung. Durch das Spülen wurde nur die Flüssigkeit im Raum oberhalb der Membran ausgetauscht, die Flüssigkeit in Tether Bereich blieb dort eingeschlossen. Erst im Laufe der Zeit kam es durch langsame Diffusion durch die Membran zu einer allmählichen Verdünnung der Stoffe im Tether Bereich.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Phänomene durch eine Kombination dieser beiden Vorgänge hervorgerufen wurden.

### 5.7.3 Beschreibung des Systems mit einem R(RC)(RC)-Modell

Bei den anderen Experimenten aus Tabelle 5.5 kam es zu einer viel stärkeren Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten Membran und Hydrogel. Nach der Hydrogelapplikation war eine Modellierung mit dem R(RC)C Schaltkreis nicht mehr möglich, da der Niquist Plot (linke Seite von Abb. 5.18) nach dem zweiten Halbkreis noch nicht endete. Er ähnelte damit sehr den Monolayern der dritten Kategorie (vergleiche Abb. 5.9) Die elektrische Doppelschicht musste also wieder durch die Parallelschaltung von Kapazität und Widerstand modelliert werden.

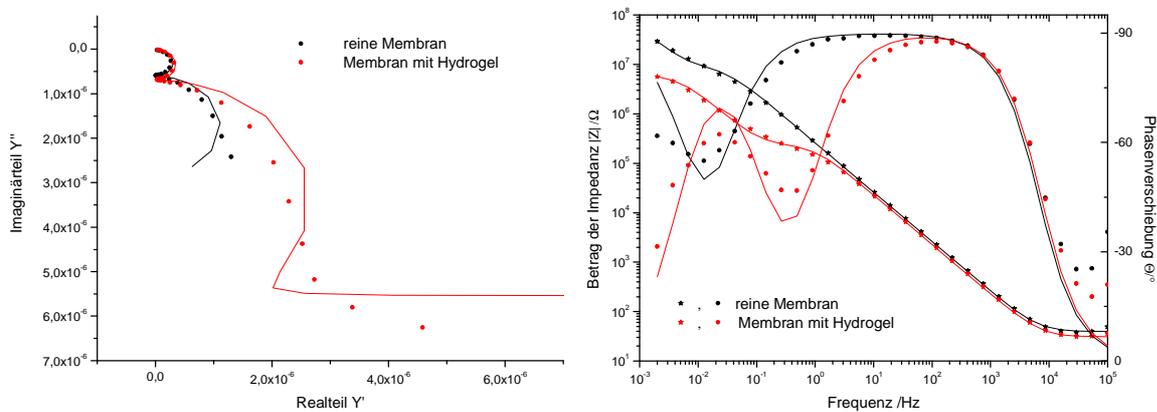


Abb. 5.18 Niquist- und Bode Plot nach der Hydrogelapplikation im Experiment 6

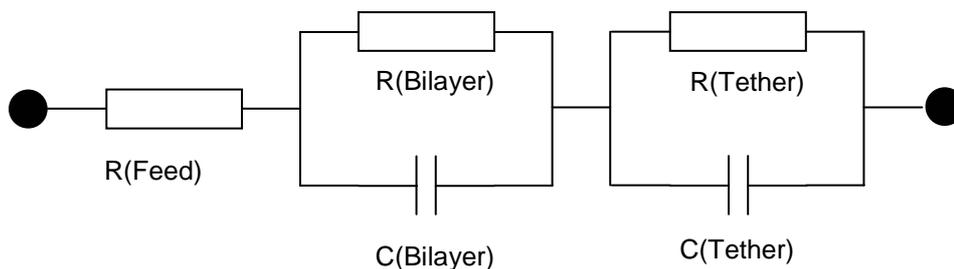


Abb. 5.19 R(RC)(RC) Modell

Am Bode Plot (rechte Seite von Abb. 5.18) erkennt man die Anwesenheit des zweiten Widerstandes deutlich am Vorhandensein eines zweiten Knickes in der Impedanzkurve. Aufgrund von später durchgeführten Experimenten mit Valinomycin wurde geschlossen, dass der Knick bei niedrigerer Impedanz den Membranwiderstand repräsentiert.

Tabelle 5.7 fasst die Ergebnisse der beiden Experimente zusammen.

Nr	ohne Hydrogel				mit Hydrogel					mit Hydrogel im GG				
	Feed <sup>+</sup>	R1	C1	C2	Feed <sup>+</sup>	R1	C1	R2	C2	Feed <sup>+</sup>	R1	C1	R2	C2
6	39,6	5,36	0,99	3,63	31,1	0,14	1,02	4,08	7,58	34,3	0,16	0,98	8,99	9,11
7	39,1	10,40	1,12	3,66	50,5	0,98	1,21	6,30	8,38	64,9	0,55	1,23	16,04	11,12

\*in  $\Omega\text{cm}^2$

*Tabelle 5.7 Verschiedene Stadien der Experimente 6 und 7*

Die Änderungen der elektrischen Parameter durch die Hydrogelapplikation entsprechen denen der Experimente 1,3,4 und 5. Allerdings fällt die Verringerung des Membranwiderstandes hier besonders deutlich aus. Möglicherweise kam es aufgrund dieser niedrigen Membrandichtigkeit auch zu einer solch starken Wechselwirkung zwischen Membran und Hydrogel, so dass der Wechsel des Modells nötig wurde. Diese These wird durch das im nächsten Kapitel besprochene Experiment gestützt.

#### 5.7.4 Hydrogelwachstum auf einer Membran, die Hydrogelanker enthält

In diesem Experiment wurde eine Membran hergestellt, die aus einer Mischung von Acryl-DPhyPE und DPhyPC im molaren Verhältnis 1:10 bestand. Die Membran hatte mittelgute elektrische Eigenschaften und zeigte eine noch stärkere Wechselwirkung mit der aufgetragenen Hydrogelschicht als die Experimente im letzten Kapitel. Abb. 5.20 zeigt die Bode Plots des Systems zu vier verschiedenen Stadien.

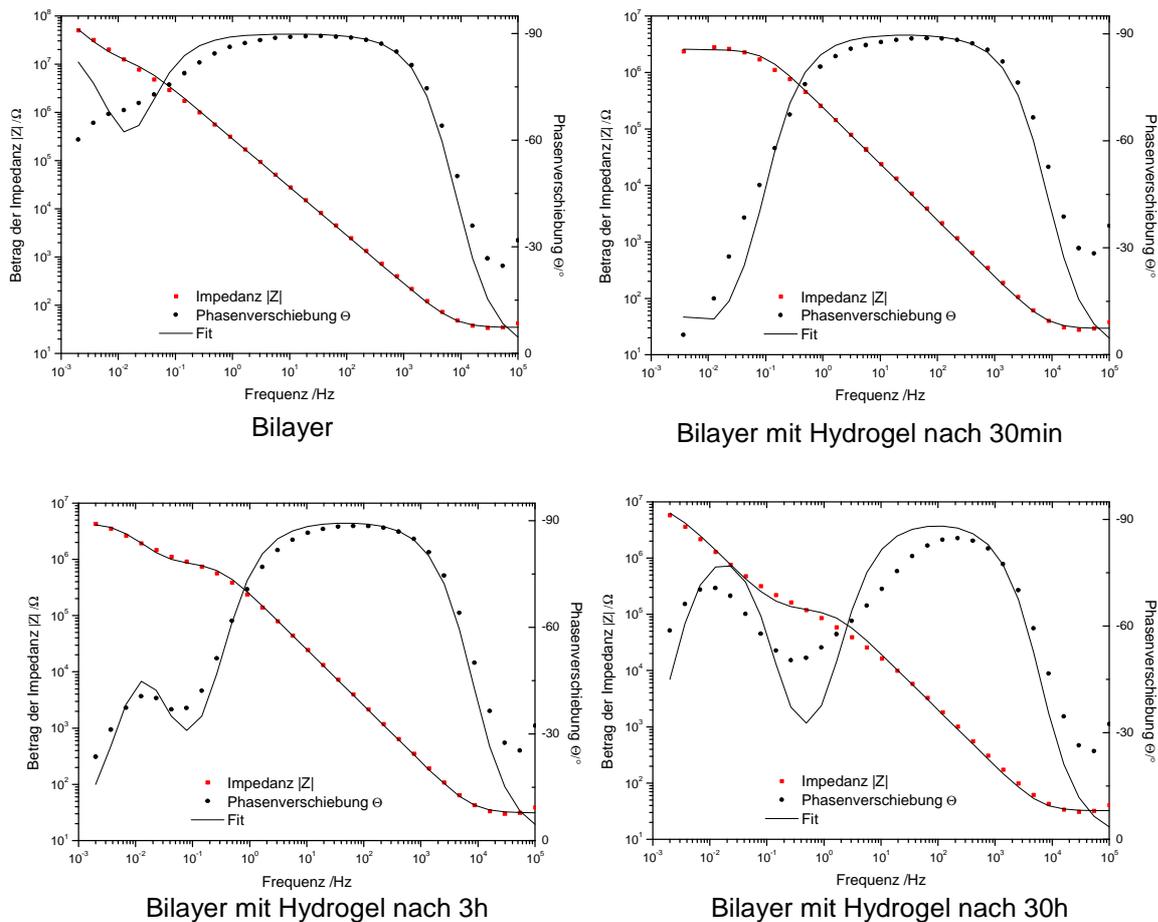


Abb. 5.20 Bode Plots verschiedener Stadien des Experimentes 8

Direkt nach dem Hydrogelwachstum hatte der Widerstand der Membran etwas abgenommen, der Graph ließ sich aber noch mit dem R(RC)C Modell fitten. Mit der Zeit änderte sich die Form des Bode Plots aber erheblich, so dass ein Wechsel zum R(RC)(RC) Modell nötig wurde. Auch im Niquist Plot wurde der dritte Halbkreis, wie im linken Teil von Abb. 5.18 sichtbar. Beim Wechsel der Modelle (von 115 auf 137 min) macht der Membranwiderstand einen Sprung mit einem Faktor von etwa zwei. Die vor dem Modellwechsel vorhandenen Trends setzen sich aber danach fort. Der Membranwiderstand verringert sich kontinuierlich bis zum Ende der Messung. Vermutlich werden durch den Quellvorgang des Hydrogels die Hydrogelanker aus der Lipidmembran herausgerissen, wodurch immer mehr Defekte in der Membran entstehen.

Außergewöhnlich im Vergleich zu den anderen Experimenten ist hier das Verhalten der Membrankapazität. Während sie normalerweise nur ganz leicht durch die Hydrogelapplikation anstieg, macht sie hier einen deutlichen Sprung nach unten. Dies

bedeutet, dass die Dicke der Membran zugenommen hat. Das ist dadurch zu erklären, dass durch die Einbindung der Kopfgruppen einiger Lipidmoleküle in das Polymer die organische, nicht leitende Schicht zwischen Gold und Elektrolytlösung dicker geworden ist.

Ebenfalls auffällig ist, dass die Änderung der Tether Kapazität hier noch viel stärker ausfiel, als in den anderen Experimenten. Die erste Messung nach der Hydrogelapplikation könnte wieder mit einem reinen Randles Modell gefittet werden, weil die Tether Kapazität so groß ist. In der zweiten Messung war sie sogar noch größer, begann danach aber sehr schnell abzufallen und stabilisiert sich auf einem üblichen Wert.

Die Messergebnisse dieses Experimentes lassen sich am besten in Tabellenform präsentieren (Tab. 5.8)

Zeit [min]	R1	C1	R2	C2
-	5,66	1,13	-	2,00
30	1,99	0,85	-	147,83
51	1,70	0,85	-	242,86
73	2,11	0,84	-	104,17
94	2,27	0,85	-	84,66
115	2,20	0,85	-	67,80
137	1,01	0,89	2,13	9,10
158	0,88	0,88	2,31	9,61
180	0,76	0,88	2,47	9,68
201	0,67	0,88	2,61	9,82
222	0,60	0,88	2,78	10,09
330	0,42	0,90	3,50	10,35
444	0,36	0,91	4,31	10,59
552	0,32	0,93	5,01	10,68
660	0,29	0,95	5,66	10,82
768	0,27	0,96	6,26	10,95
876	0,24	0,98	6,68	11,24
985	0,22	0,99	6,96	11,18
1095	0,19	1,01	7,21	11,30
1204	0,16	1,03	7,08	11,47
1313	0,14	1,05	6,97	11,59
1422	0,12	1,07	6,97	11,81
1534	0,11	1,08	6,88	11,78
1646	0,10	1,10	6,97	11,80
1756	0,09	1,12	6,91	11,81
1867	0,08	1,13	6,86	11,51

*Tab. 5.8 Entwicklung der elektrischen Parameter in Experiment 8*

Über die Ursache des auffälligen Verhaltens der Tether Kapazität in diesem Experiment kann nur spekuliert werden. Sicher ist, dass die kovalente Bindung zwischen Membran und

Hydrogel deren Wechselwirkung erheblich erhöht, was im Endeffekt zur Zerstörung der Membran führt. Interessant ist aber der Umstand, dass der Verlust an elektrischer Dichtigkeit erst erfolgte, als das System gespült wurde. Dies stellt eine Untermauerung der These dar, dass sich der Quellvorgang des Hydrogels auf die Membran auswirkt. In einem wichtigen Experiment, welches aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden konnte, müsste das Hydrogel in einer niedrigeren Konzentration polymerisiert werden, so dass beim Spülen kein weiteres Quellen erfolgen würde. Dann würde die Membran möglicherweise stabil bleiben. Nichtsdestotrotz war die Membran in diesem Experiment auch noch funktionsfähig: im letzten Teil des Experimentes wurde erfolgreich Valinomycin eingebaut.

## **5.8 Einbau des Ionencarriers Valinomycin**

### 5.8.1 Einleitung

Nach der Zugabe des Ionencarriers Valinomycin in die Flüssigkeitssäule über dem Hydrogel kam es, im Gegensatz zur reinen Membran nicht zu einer sofortigen Absenkung des Membranwiderstandes, sondern der Prozess trat zeitverzögert ein. Dies war zu erwarten, denn bei einer vollständig geschlossenen Hydrogelschicht über der Membran muss das Valinomycin durch das Gel hindurchdiffundieren. Da das Molekül nach außen hin stark hydrophob ist, ein Hydrogel aber hydrophilen Charakter hat, ist es verständlich, dass dieser Prozess viel Zeit benötigt. Der Effekt des Valinomycins war in den meisten Fällen ab der zweiten oder dritten Impedanzmessung nach der Zugabe sichtbar. Dabei kam es zu einer drastischen Verringerung des Widerstandes, die nach einigen Stunden abklang. Nach etwa einem Tag befand sich das System wieder im Gleichgewicht. Bei den meisten Experimenten wurde dann die KCl Umgebung gegen NaCl ausgetauscht. Da der Elektrolyt auch im Hydrogel gebunden war, reichte ein einfaches Spülen nicht aus, sondern es musste über einen längeren Zeitraum mit einer Peristaltik Pumpe NaCl Lösung durch die Zelle gepumpt werden.

### 5.8.2 Elektrische Eigenschaften nach dem Einbau von Valinomycin

Abb. 5.21 zeigt die Bode Plots einiger Ausschnitte aus dem Experiment 5, in Tabelle 5.9 sind die Ergebnisse aller Experimente aufgeführt.

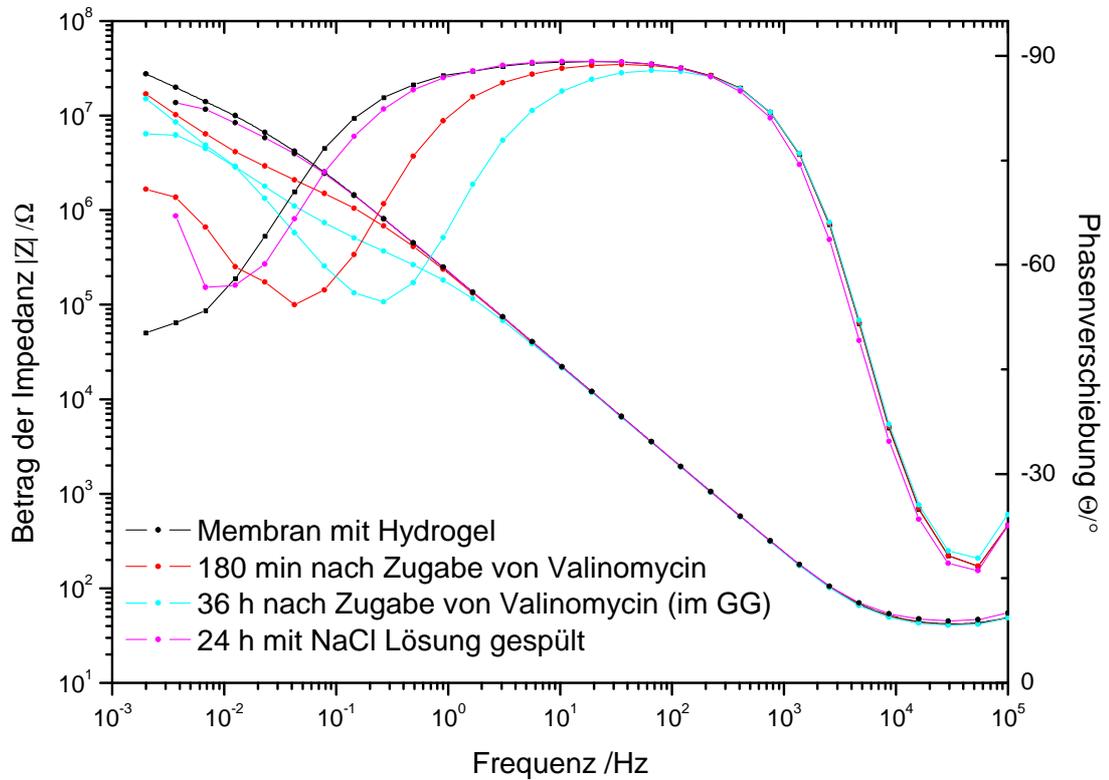


Abb. 5.21 Bode Plots der Valinomycinzugabe bei Experiment 5

Nr.	mit Hydrogel im GG					mit Valinomycin im GG					mit NaCl Lösung gespült				
	Feed*	R1	C1	R2	C2	Feed*	R1	C1	R2	C2	Feed*	R1	C1	R2	C2
1	343,7	26,05	0,88	-	2,4	259,4	1,66	0,86	-	2,6	-	-	-	-	-
3	322,8	1,55	0,77	-	3,8	320,8	0,04	0,85	46,12	3,4	331,2	0,12	0,80	39,54	3,9
4	37,3	2,99	1,10	-	9,9	35,1	0,03	1,34	10,80	5,5	48,3	2,29	1,18	10,73	7,4
5	42,6	9,79	1,16	-	4,5	41,5	0,28	1,11	-	5,6	47,0	4,48	1,18	-	3,9
6	34,3	0,16	0,98	8,99	9,1	37,5	1,46**	1,03	34,67	8,2	-	-	-	-	-
7	64,9	0,55	1,23	16,04	11,1	46,3	1,62**	1,24	12,46	8,7	49,7	0,03	1,25	20,33	6,7

\* in  $\Omega\text{cm}^2$

\*\* in  $\text{k}\Omega\text{cm}^2$

Tab. 5.9 Verschiedene Stadien der Experimente mit Valinomycin

Bei den Experimenten 3 und 4 mussten die Impedanz Daten nach dem Einbau von Valinomycin auch mit dem R(RC)(RC) Modell gefittet werden. Die charakteristische Form des Niquist Plots mit den drei Halbkreisen blieb dabei auch nach dem Ionenaustausch noch erhalten. Dies zeigt, dass der Modellwechsel nicht nur durch den erniedrigten Widerstand

nötig wird, sondern tatsächlich eine Änderung der chemischen Doppelschicht im Tether Bereich stattfindet.

Auffällig ist die unterschiedliche „Wirksamkeit“ von Valinomycin, welches immer in derselben Konzentration zugegeben wurde. Tabelle 5.10 zeigt das Verhältnis der Widerstände vor und nach der Valinomycinzugabe, sortiert nach fallendem Anfangswiderstand.

Nummer	Widerstand vor der Valinomycinzugabe	Verhältnis Widerstand vor/nach Valinomycinzugabe
1	26,05	15,7
5	9,79	34,7
4	2,99	85,9
3	1,55	43,0
7	0,55	336,8
6	0,16	106,6

*Tabelle 5.10 Verhältnis der Widerstände vor und nach der Zugabe von Valinomycin*

Man erkennt den Trend, dass die Widerstandssenkung durch Valinomycin bei sehr starken Bilayern niedriger ausfällt, als bei schwachen. Möglicherweise ist der Einbau des Moleküls bei besonders dichten Membranen erschwert.

Nach dem Spülen mit NaCl Lösung wurde nie mehr der Widerstand vor der Valinomycinzugabe erreicht. Dafür gibt es zwei Gründe: zum einen besitzt Valinomycin auch eine, wenn auch sehr geringe Koordinationsfähigkeit für Natrium Ionen. Zum anderen lässt sich das im Hydrogel gebundene KCl vermutlich nie vollständig aus dem System entfernen.

### 5.8.3 Vergleich der Kinetiken des Einbaus bei den verschiedenen Experimenten

Um zu untersuchen, wie sich die Maschengröße des Gels sowie dessen Dicke auf den Diffusionsprozess auswirken, wurden die Membranen mit Gelen unterschiedlichen Vernetzungsgrades und verschiedener Dicken überzogen. Nach der Valinomycinzugabe wurden in Abhängigkeit der Zeit Impedanzspektren gemessen. Um die Daten aus diesen Experimenten vergleichen zu können, wurde jeweils der normierte Widerstand, also der Widerstand zu einer bestimmten Zeit dividiert durch den Widerstand zum Zeitpunkt null aufgetragen.

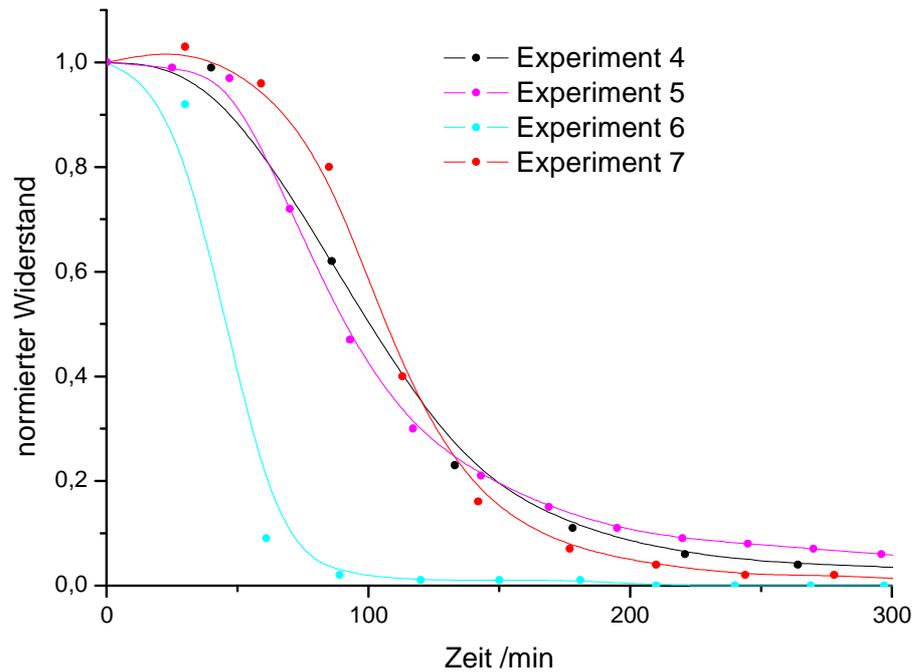


Abb. 5.22 Verlauf der normierten Widerstände mit der Zeit nach der Valinomycinzugabe

Es konnte keine Abhängigkeit der Diffusionsgeschwindigkeit des Moleküls vom Vernetzungsgrad des Hydrogels nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die Maschen des Gels viel größer als das Valinomycin, so dass eine Halbierung oder Verdopplung ihrer Größe überhaupt keinen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit hat. Außerdem gibt es zwei große Probleme, die die Zuverlässigkeit einer solchen Messung stark einschränken. Zum einen ist die Zeitauflösung einer Impedanz Messung sehr schlecht, da ein Scan mindestens 20 Minuten dauert, was es schwierig macht, auf diese Weise eine Kinetik zu untersuchen. Zum anderen wurde im vorigen Kapitel gezeigt, dass die Inkorporationsbereitschaft des Valinomycins vom Anfangswiderstand der Membran abhängt, so dass diese Daten nur schlecht miteinander verglichen werden können.

Nichtsdestotrotz beweist der Graph in Abb. 5.22, dass die Zeitverzögerung in der Wirkung des Valinomycins eindeutig von der Diffusion durch das Gel herrührt, da die Reaktionszeit in Experiment 7, in dem die Hydrogelschicht doppelt so dick war, um einiges länger ist.

### 5.9 Auswirkung der Hydrogelschicht auf die Stabilität der Membran

Um dem eigentlichen Ziel dieser Arbeit gerecht zu werden, wurden einige Experimente gemacht, um die Stabilität einer gewöhnlichen, ungeschützten Membran mit der eines Membran-Hydrogel Verbundsystems zu vergleichen. Dazu wurden beide Systeme in identischen Zellen aufgebaut. Der Füllstand an Elektrolytlösung war in beiden Fällen identisch, nur dass beim Hydrogelsystem ein Teil der Flüssigkeit im Gel gebunden war. Die beiden Zellen wurden offen, unter Raumtemperatur für 24 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit war die Flüssigkeit über der ungeschützten Membran völlig verdunstet und nur noch eine Salzkruste vorhanden. Eine Impedanzmessung ergab einen Bode Plot in der Form, die einem Monolayer der dritten Kategorie ähnelte (Abb. 5.24). In der anderen Zelle war natürlich auch die Flüssigkeitssäule über dem Hydrogel verdunstet, das Gel selbst lag also jetzt an der Luft. Nach dem Auffüllen mit Elektrolytlösung wurde eine Impedanzmessung durchgeführt, die nur wenig veränderte elektrische Eigenschaften offenbarte (Abb. 5.23).

Ein weiterer Vorteil der Hydrogelschicht ist, dass sie der Membran mechanische Stabilität, sowie einen gewissen Schutz vor der Gravitation bietet. So konnte das System problemlos geschüttelt und auch auf den Kopf gestellt werden, ohne elektrische Dichtigkeit zu verlieren.

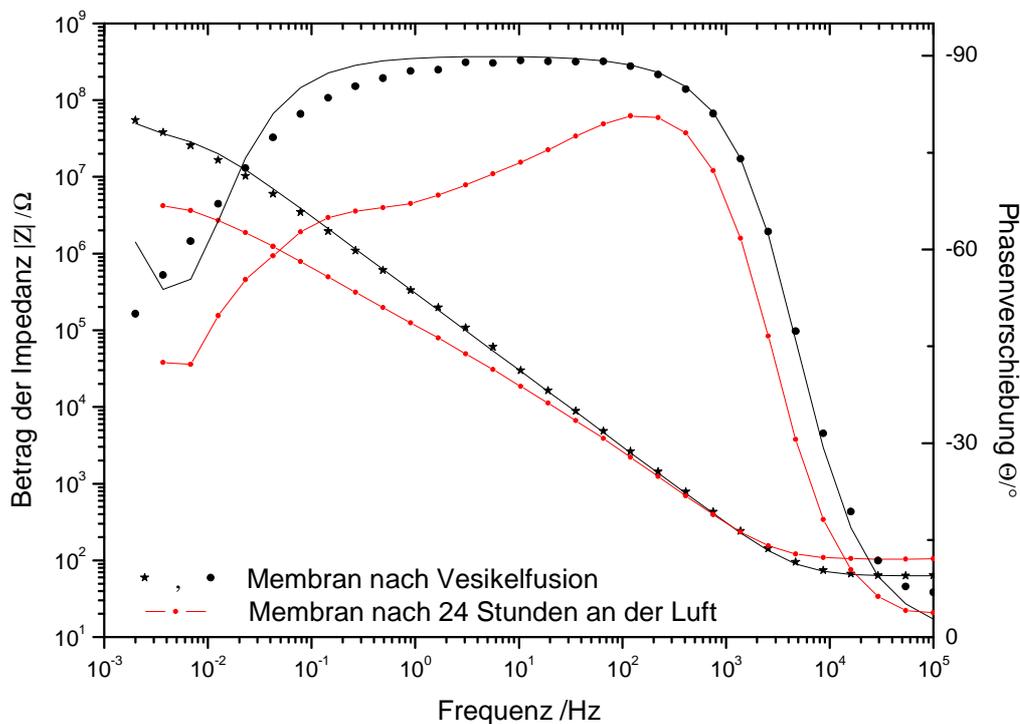


Abb. 5.23 Normale Membran vor und nach 24 Stunden an der Luft

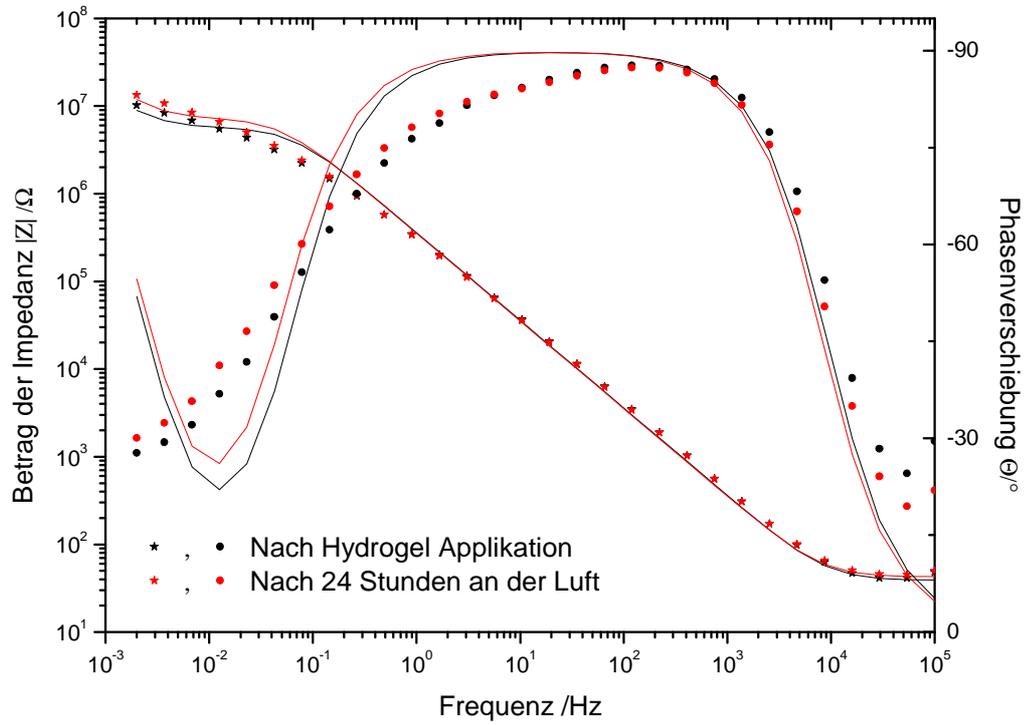


Abb. 5.24 Hydrogelgeschützte Membran vor und nach 24 Stunden an der Luft

## 6. Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit, die Verstärkung von oberflächengebundenen Lipidmembranen (tBLMs) mit Hydrogelschichten, wurde erreicht. Die Strukturen wurden durch die radikalische Polymerisation von N-Isopropylacrylamid und Methylenbisacrylamid als Vernetzer auf den fertigen Membranen hergestellt. Sie erwiesen sich als widerstandsfähiger gegenüber mechanischer Belastung als die ungeschützten Membranen und es konnte gezeigt werden, dass sie für längere Zeit an der Luft stehen können ohne auszutrocknen. Durch den erfolgreichen Einbau des Ionencarriers Valinomycin konnte die Funktionsfähigkeit der Lipidmembran unter der Hydrogelschicht bewiesen werden.

Es wurde untersucht, welche Auswirkung die Hydrogelschicht auf die elektrischen Eigenschaften der darunter liegenden Membran hat. Das Vorhandensein der Hydrogelschicht auf der Membran äußert sich in einer Erhöhung des Feed Widerstandes sowie in einer deutlichen Veränderung der Natur der chemischen Doppelschicht auf der Goldoberfläche. Außerdem kommt es nach der Hydrogelapplikation zu einem Verlust an elektrischer Dichtigkeit der Membran, der mit dem Quellverhalten des Hydrogels in Verbindung zu stehen scheint.

Es wurden erfolgreich zwei verschiedene Lipidmoleküle synthetisiert, welche eine Acrylatfunktion an der Kopfgruppe besitzen und dadurch mit in das Hydrogel hineinpolymerisieren können. Nach der Erzeugung der Polymerschicht über diesen Membranen wurden außergewöhnliche elektrische Eigenschaften, wie etwa eine erniedrigte Membrankapazität gemessen. Der Quellvorgang des Hydrogels führte allerdings zu einer allmählichen Zerstörung dieser Membranen.

Auf dem Weg zur Herstellung des Zielsystems wurden zahlreiche DPTL Monolayer hergestellt, die durch Vesikelfusion zum Bilayer ergänzt wurden. Der Vorgang wurde mit Impedanzspektroskopie sowie Oberflächenplasmonen Spektroskopie verfolgt. Die große Anzahl der durchgeführten Experimente erlaubte eine statistische Betrachtung der Eigenschaften von Monolayern und Membranen.

Ein großes Problem, welches im Laufe der Arbeit nicht befriedigend gelöst werden konnte, ist die Unverträglichkeit einer Komponente des Hydrogelsystems mit den Lipidmembranen, welche in vielen Fällen zu einem langsamen Abbau der elektrischen Dichtigkeit der Letzteren führte. Auf dieser Erkenntnis aufbauend, wäre es interessant in Zukunft andere

Hydrogelsysteme als Ergänzung der Lipidmembranen zu testen. Erste Schritte mit photovernetzbaeren Polymeren wurden dazu schon unternommen

## 7. Literaturverzeichnis

1. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-731.
2. Nikolelis, D. and C. Siontorou, *Ammonium Ion Minisensors from Self-Assembled Bilayer Lipid Membranes Using Gramicidin as an Ionophore. Modulation of Ammonium Selectivity by Platelet-Activating Factor*. Analytical Chemistry, 1996. **68**: p. 1735-1741.
3. Yin, P., et al., *A tethered bilayer sensor containing alamethicin channels and its detection of amiloride based inhibitors*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. **18**: p. 289-297.
4. Ottova, A., et al., *Molecular Electronics and Bioelectronics*, ed. R. Birge Adv. Chem. Series No 240, 1994.
5. Ottova, A. and H.T. Tien, *The Lipid Bilayer Principle: A Historic Perspective and Some Highlights*. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, 2005. **1**.
6. Breffa, C., *Doktorarbeit: New Synthetic Strategies to Tethered Bilayer Lipid Membranes*. p. 3.
7. Sackman, B. and E. Neher, *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York, 1995.
8. Mueller, P., et al., *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions*. Journal of physical Chemistry, 1963. **67**: p. 534-535.
9. Winterhalter, M., *Black lipid membranes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2000. **5**: p. 250-255.
10. Wiese, A., M. Munstermann, and T. Gutschmann, *Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport*. J. Membr. Biol., 1998. **162**: p. 127-138.
11. Wiegand, G., et al., *Electrical properties of supported lipid bilayer membranes*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**: p. 4245-4254.
12. Schindler, H., *Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions*. Methods Encymol., 1989. **171**: p. 225-253.
13. Van Gelder, P., F. Dumas, and M. Winterhalter, *Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes*. Biophysical Chemistry, 2000. **85**: p. 153-167.
14. Akeson, M., et al., *Microsecond time-scale discrimination among polycytidic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules* Biophys. J., 1999. **77**: p. 3227-3233.
15. Deamer, D. and M. Akeson, *Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing*. Trends Biotechnol., 2000. **18**: p. 147-151.
16. Römer, W. and C. Steinem, *Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina*. Biophysical Journal, 2004. **86**: p. 955-965.
17. Schmidt, A., et al., *Streptavidin Binding to Biotinylated Lipid Layers on Solid Supports - a Neutron Reflection and Surface-Plasmon Optical Study*. Biophysical Journal, 1992. **63**(5): p. 1385-1392.
18. Spinke, J., et al., *Polymer-Supported Bilayer on a Solid Substrate*. Biophysical Journal, 1992. **63**(6): p. 1667-1671.

19. Tamm, L.K., et al., *Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy*. Thin Solid Films, 1996. **285**: p. 813-816.
20. Sackmann, E., *Supported membranes: Scientific and practical applications*. Science, 1996. **271**: p. 43-48.
21. McConnel, H.M., et al., *Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system*. Biochimica et Biophysica Acta, 1986. **864**: p. 95-106.
22. Rädler, J., H. Strey, and E. Sackmann, *Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces*. Langmuir, 1995. **11**: p. 4539-4548.
23. Ottova, A., et al., *Self-assembled BLMs: biomembrane models and biosensor applications*. Supramolecular Science, 1997. **4**: p. 101-112.
24. Knoll, W., et al., *Functional tethered lipid bilayers*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2000. **74**: p. 137-158.
25. Prucker, O., et al., *Photochemical attachment of polymer films to solid surfaces via monolayers of benzophenone derivatives*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(38): p. 8766-8770.
26. Knoll, W., N. Bunjes, and M. Denyer, *Preparation, structural characterization and functional coupling of tethered membranes to solid substrates*. Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics, 1998.
27. Erdelen, C., et al., *Self-Assembled Disulfide-Functionalized Amphiphilic Copolymers on Gold*. Langmuir, 1994. **10**: p. 1246-1250.
28. Heibel, C., et al., *Polymer-supported biomembrane models*, in *Organic Thin Films*. 1998. p. 104-118.
29. Cornell, B.A., et al., *A biosensor that uses ion-channel switches*. Nature, 1997. **387**: p. 580-583.
30. Terrettaz, S., M. Mayer, and H. Vogel, *Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins*. Langmuir, 2003. **19**: p. 5567-5569.
31. Schiller, S.M., et al., *Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces*. Angewandte Chemie, 2003. **42**(2): p. 208-211.
32. Naumann, R., et al., *Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces*. Langmuir, 2003. **19**(13): p. 5435-5443.
33. Atanasov, V., et al., *Highly insulating tethered bilayer membranes. A generic approach for various substrates*. Bioconjugated Chemistry, 2006. **17**: p. 631-637.
34. Loveday, D., P. Peterson, and B. Rodgers, *Evaluation of organic Coatings with Electrochemical Impedance Spectroscopy*. JCT Coatings Tech, 2004: p. 46-52.
35. Wang, E. and X. Han, *Electrochemical Study of the Bilayer Lipid Membrane*. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, 2005. **2**: p. 264-303.
36. Hamann, C.H. and W. Vielstich, *Elektrochemie*. Wiley-VCH, 1998: p. 114.
37. Knoll, W., *Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves*. Annual Review of Physical Chemistry, 1998. **49**: p. 569-638.
38. Rothenhausler, B., *On the Decay of Plasmon Surface-Polaritons at Smooth and Rough Ag-Air Interfaces - a Reflectance and Photo-Acoustic Study*. 1984. **137**: p. 373-383.
39. Jean Francois Tassin, R.L.S., Wing T. Tang, Georges Hadziioannou, Jerome D. Swalen, Barton A. Smith, *Kinetics of adsorption of block copolymers revealed by surface plasmons*. Journal of physical Chemistry, 1989. **93**: p. 2106 - 2111.
40. Qiu, Y. and K. Park, *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **53**: p. 321-339.

41. Schild, H.G., *Poly(N-Isopropylacrylamid): Experiment, Theory and Application*. Progr. Polym. Sci., 1992. **17**: p. 163-249.
42. Franks, P. and D. Eagland, Crit. Rev. Biochem., 1985. **4**: p. 165.
43. Piskin, E., *Hydrogels - a Carrier of Bioactive Agents*. International Journal of Artificial Organs. **7**: p. 283-288.
44. Tecilla, P., et al., *Hydrogen-Bonding Self- Assembly of Multichromophore Structures*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**: p. 9408-9410.
45. Ulman, A., *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*. Chemical Reviews, 1996. **96**: p. 1533-1554.
46. Dubois, L.H., *Synthesis, Structure and Properties of Model Organic Surfaces*. Annual Reviews in Physical Chemistry, 1992. **43**: p. 437-463.
47. De Feng, X., X.Q. Guo, and K.Y. Qiu, *Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*. Makromol. Chem., 1988. **189**: p. 77-83.
48. Naumann, R., et al., *Kinetics of valinomycin-mediated K<sup>+</sup> ion transport through tethered bilayer lipid membranes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2003. **550-551**: p. 241-252.
49. Ng, C.C., Y. Cheng, and P.S. Pennefather, *One-Step Synthesis of a Fluorescent Phospholipid-Hydrogel Conjugate for Driving Self-Assembly of Supported Lipid Membranes*. Macromolecules, 2001. **34**: p. 5759-5765.
50. Miller, C., P. Cuendet, and M. Grätzel, *K<sup>+</sup> sensitive bilayer supporting electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1990. **278**: p. 175-192.
51. Horn, N., *Justage eines Prismen – Plasmonenspektrometers*. 2005.

**Anhang A: Abkürzungsverzeichnis**

a	Durchmesser eines solvatisierten Ions
A	Fläche einer Kapazität
Abb.	Abbildung
AC	<i>engl.</i> alternating current
Acryl-DMPE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolacrylamid
Acryl-DphyPE	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolacrylamid
AFM	<i>engl.</i> atomic force microscope
APS	Ammonuimperoxodisulfat
Bi	Bilayer
BK-7	Bezeichnung für einen universellen Glastyp
BLM	<i>engl.</i> black lipid membrane oder bilayer lipid membrane
C	Kapazität
COSY	<i>engl.</i> correlation spectroscopy
CPE	<i>engl.</i> constant phase element
d	Dicke (eines Dielektrikums)
d	Dublett
$\Delta$	Fehler einer Messgröße
DC	Dünnschicht Chromatogramm
DMPE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
DPTL	2,3-di-O-phytanoyl- <i>sn</i> -glycerol-1-tetraethylenglycol-D,L- $\alpha$ -liponsäureesterlipid
DPhyPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DPhyPE	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
EIS	<i>engl.</i> electrical impedance spectroscopy
eq	Equivalent
ESR	Elektronenspinresonanz
$E_z$	elektrische Feldstärke in Z-Richtung
f	Frequenz
G	freie Enthalpie

---

Gl.	Gleichung
H	Enthalpie
i	imaginäre Einheit
I	Stromstärke
Im	Imaginärteil
$k_{\text{Ph}, \varphi}$	Wellenvektorkomponente eines Photons in Ausbreitungsrichtung
$k_{\text{SP}}$	Wellenzahl eines Plasmons
l	Länge (eines Leiters)
LASER	<i>engl.</i> light amplification by stimulated emission of radiation
LaSFN9	Bezeichnung für einen hochbrechenden Glastyp
LCST	<i>engl.</i> lower critical solution temperature
LB	Langmuir-Blodgett
m	Multipllett
MBA	Methylenbisacrylamid
Mono	Monolayer
NIPAAm	N-Isopropylacrylamid
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
p. a.	<i>lat.</i> pro analysi (Reinheitsgrad)
pH	<i>lat.</i> Potentia Hydrogenii
PEG	Polyethylenglycol
P(NIPAAm)	Poly(N-Isopropylacrylamid)
$\rho$	spezifischer Widerstand
R	Widerstand
Re	Realteil
S	Entropie
s-BLM	<i>engl.</i> supported bilayer lipid membran
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
SP	<i>engl.</i> surface plasmon
SPR	<i>engl.</i> surface plasmon resonance
Tab.	Tabelle
t-BLM	<i>engl.</i> tethered bilayer lipid membrane
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
$\theta$	Phasenverschiebung (bei EIS) Einfallswinkel (bei SPR)

---

TSG	<i>engl.</i> template stripped gold
U	Spannung
UV	Ultraviolett
v	Volumen
$\xi$	Maschengröße eines Hydrogels
Z	Impedanz
$ Z $	Betrag der Impedanz
z. B.	zum Beispiel

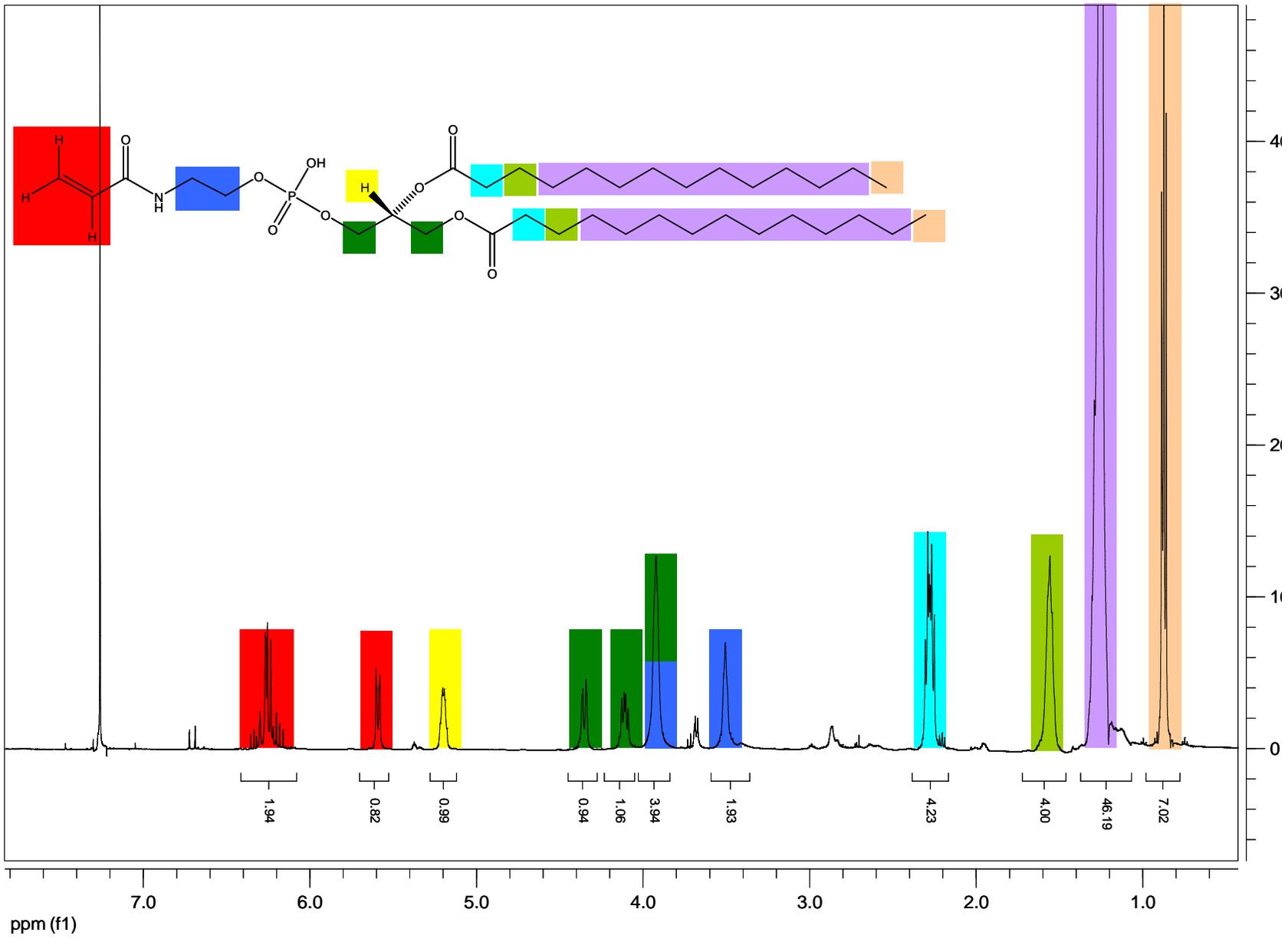


## **Anhang B: NMR Spektren**











### **Anhang C: Danksagung**

Ich danke Lifang Niu, Inga Vockenroth, Claire Rossi und Nicolas Vogel für zahlreiche anregende Gespräche und Diskussionen. Marei Reinheimer war mir vor allem zu Beginn meiner Arbeit eine große Hilfe, weil sie mir die ersten Schritte in einem für mich völlig neuem Gebiet beibrachte.

Ich bedanke mich herzlich bei Martina Knecht und Basit Yameen für die angenehme Atmosphäre im Labor und zahlreiche Ratschläge und Hilfestellungen.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt und der Glasbläserei für die Anfertigung zahlreicher, für die Arbeit unentbehrlicher Teile.

Petra Kindervater und Manfred Wagner danke ich für ihre freundliche Hilfe bei allen Fragestellungen zur NMR Spektroskopie.

Vielen Dank auch an Matthias Junk, der mit mir die AFM Messungen durchführte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie, meiner Freundin Katrin Glaser und meinen Freunden dafür, dass sie immer für mich da sind und wir so eine tolle Zeit miteinander haben.

**Anhang D: Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mir ist bewusst, dass unrichtige Angaben dem Tatbestand § 23 DiplPro (1991) unterliegen.

Frankenthal, den 27. September 2007

---

Unterschrift