

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe

**Monomolekulare Lipopolymerschichten zum Aufbau von
biomimetischen Lipidmembranmodellen**

Anton Förtig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. K. Köhler
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken
	2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 12.08.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.11.2004 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis April 2004 am Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe im Institut für Technische Chemie der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr.-Ing. O. Nuyken und betreut von PD Dr. R. Jordan durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Oskar Nuyken für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und Herrn PD Dr. Rainer Jordan für die interessante Aufgabenstellung sowie die gute Betreuung des Themas, die Freiheit in der Durchführung und die ausgezeichneten fruchtbaren Diskussionen.

Frau Dr.-Ing. Heidi Samarian möchte ich für die vielen organisatorischen Dinge und die unermüdliche Unterstützung am Lehrstuhl danken.

Für die sehr intensive Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und die tolle Kooperation danke ich Oliver Purrucker vom Lehrstuhl für Biophysik der TU-München sowie seinem Betreuer Motomu Tanaka PhD. Nur der gegenseitigen Inspiration, den vielen Diskussionen und der Abstimmung der Experimente mit ihnen sind die vielen Ergebnisse zu verdanken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Michael Thomm, Dr. Harald Huber und Dipl.-Ing. Thomas Hader am Archaeozentrum am Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg für die Bereitstellung des Methanobacterium Thermoautotrophicum delta H.

Für die FLIC-Messungen gilt mein Dank Günter Zeck im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Fromherz vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried.

Meinen Laborkollegen Thomas Komenda, Karin Lüdtker, Daniel Käsmayr, Josef Bayer, Dr. Marcus Schäfer und Dr. Ulrich Frenzel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die stets freundschaftliche und außerordentlich gute Stimmung im Labor.

Allen „Makros“ möchte ich für die Kollegialität, Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre danken, wobei ich besonders Dr. Philipp Wieland und Mario Vierle hervorheben möchte.

Für die finanzielle Unterstützung gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 563).

Onkel Toni

Abkürzungsverzeichnis

Messgrößen

c	Konzentration
δ	chemische Verschiebung
Δ	ellipsometrische Größe (Phasenverhalten)
n	Brechungsindex
n_s	Reflektivität
k_s	Imaginärteil der Reflektivität
Ψ	ellipsometrische Größe (Amplitudenverhältnis)
T	Temperatur
t	Zeit
V	Volumen

Einheiten

Å	Angström
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
K	Kelvin
L	Liter
M	Molarität (mol/L)
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute

mL	Milliliter
mmol	Millimol
mN	Millinewton
mol%	Molprozent
μmol	Mikromol
nm	Nanometer
ppm	parts per million

Sonstiges

2C_{18}	1,2- <i>O</i> -Dioctadecyl- <i>sn</i> -glycerol
ACN	Acetonitril
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy)
BLM	schwarze Lipidmembran (engl.: black lipid membrane)
DCM	Dichlormethan
DMAc	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	N,N-Dimethylformamid
FLIC	Fluoreszenz Interferenz Kontrast Mikroskopie (engl.: fluorescence interference contrast microscopy)
FRAP	Ausheilung der Fluoreszenz nach dem Bleichen (engl.: fluorescence recovery after photobleaching)
FT	Fourier transformiert
HLB	Hydrophile/lipophile Balance
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k_i	Geschwindigkeitskonstante der Initiierung
k_p	Geschwindigkeitskonstante der Polymerisation
LB	Langmuir-Blodgett
\overline{M}_n	Zahlenmittel der molaren Masse

\overline{M}_w	Gewichtsmittel der molaren Masse
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation (engl.: matrix-assisted laser desorption ionization)
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: nuclear magnetic resonance), in diesem Zusammenhang: <ul style="list-style-type: none"> b verbreitertes Signal m Multiplett s Singulett t Triplett
OMs	Methansulfonat (Mesylat)
OTf	Trifluormethansulfonat (Triflat)
Phy	Phytanyl- (3,7,11,15-Tetramethylhexadecyl-)
Phy ₂	1,2- <i>O</i> -Diphytanylglycerol
PDI	Polydispersitätsindex
PMOx	Poly(2-methyl-2-oxazolin)
SAM	selbstorganisierte monomolekulare Schicht (engl.: self-assembled monolayer)
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
THF	Tetrahydrofuran
TEA	Triethylamin
TMS-	Trimethylsilyl-
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometrie (engl.: time-of-flight mass spectrometry)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	4
2.1	Biosensoren	4
2.2	Biomembranen	6
2.2.1	Lipide	6
2.2.2	Aufbau von Lipidmembranen	8
2.3	Lipidmembranmodelle	13
2.3.1	Schwarze Lipidmembranen (BLM)	14
2.3.2	Unterstützte Lipidmembranen.....	16
2.3.3	Polymerunterstützte Lipidmembranen	17
2.4	Oberflächenmodifizierung mit Polymeren	22
2.5	Lebende kationische Polymerisation von 2-Oxazolin	29
2.6	Messmethoden	35
2.6.1	Ellipsometrie	35
2.6.2	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	37
2.6.3	Kontaktwinkelmessungen an Lipopolymermonolagen.....	39
3	ZIELSETZUNG	41
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1	Polymermonolagen nach der „grafting from“-Methode	44
4.1.1	Präparation der Goldsubstrate	45
4.1.2	Präparation der Monolagen	48
4.1.3	„Grafting from“-Polymerisation	51

4.2	Polymermonolagen nach der „grafting onto“-Methode.....	55
4.2.1	Baukastenprinzip der Poly(2-alkyl-2-oxazolin)e	56
4.2.2	Synthese der Lipidinitiatoren	57
4.2.3	Polymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolinen	66
4.2.4	Membranspannendes Lipid aus Archaeobakterien.....	69
4.2.5	Funktionalisierte Lipopolymere	70
4.2.6	Beschichtung nach der „grafting onto“-Methode.....	77
4.3	Aufbau der polymerunterstützten Lipidmembranen	79
4.3.1	Kontaktwinkelmessungen an Lipopolymermonolagen	79
4.3.2	Monolagenübertrag mittels der Langmuir-Blodgett Technik	81
4.3.3	Polymerunterstützte Lipidmembran	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	EXPERIMENTALTEIL	108
6.1	Material	108
6.1.1	Geräte und Hilfsmittel	108
6.1.2	Chemikalien.....	110
6.2	Oberflächeninitiierte Polymerisation	110
6.2.1	Präparation der Goldsubstrate	110
6.2.2	Präparation der SAM.....	111
6.2.3	Oberflächeninitiierte Polymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolin	111
6.3	Lipidsynthesen	112
6.3.1	Phytanol (3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-1-ol)	112
6.3.2	Methansulfonsäurephytanylester (Methansulfonsäure-3,7,11,15- tetramethylhexadecylester).....	113
6.3.3	1-Benzyl-2,3- <i>O</i> -Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol	113
6.3.4	2,3- <i>O</i> -Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol (Archaeol)	114

6.3.5 Extraktion von Caldarchaeol aus dem Methanobacterium	
Thermoautotrophicum delta H	115
6.4 Lipopolymersynthesen.....	116
6.4.1 Initiatoren	116
6.4.2 Polymerisation.....	118
6.5 Herstellung der Lipopolymermonolagen.....	126
6.5.1 RCA-Reinigung der SiO ₂ -Substrate.....	126
6.5.2 Silanisierung von SiO ₂	127
7 LITERATUR	128

1 Einleitung

Die Einsatzgebiete von Polymeren haben sich in der Vergangenheit stark ausgeweitet und die Entwicklung von polymeren Werkstoffen hat den Fortschritt vieler neuer Technologien ermöglicht. Auf fast allen Gebieten der modernen Technik, der Medizin und der Biologie konnten viele entscheidende Schritte erst mit der Entwicklung der entsprechenden polymeren Materialien realisiert werden. Inzwischen existieren Kunststoffe mit nahezu beliebigen physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche teilweise bis heute noch keine Anwendung gefunden haben. Der Grund dafür ist häufig in den unzureichenden Grenzflächeneigenschaften, wie z.B. in der Inkompatibilität zu biologisch-medizinischen Systemen, zu finden. Eine gezielte Modifizierung der Oberfläche, ohne dabei die Substrateigenschaften zu beeinträchtigen, ist demzufolge seit vielen Jahren in den Fokus von Forschungsarbeiten in den Materialwissenschaften gerückt.^[1,2,3,4,5] Die Oberflächeneigenschaften sind besonders für analytische Anwendungen von Bedeutung, da sich hierbei die Problematik auf spezifische

Wechselwirkungen mit Oberflächen fokussiert. Die Modifikation von Oberflächen mit ultradünnen Schichten hat dabei in den vergangenen Jahren großes Interesse auf sich gezogen. Mögliche Einsatzgebiete für diese sind der Schutz von Oberflächen (Korrosion und Verschleißminderung), die Steuerung von Adhäsion (Haftvermittler und Schutz vor Verschmutzung) und die elektronischen Eigenschaften (Informationsspeicher, Halbleitertechnik und Analytik). Gesteuert werden kann dabei nicht nur die chemische Zusammensetzung der Schichten, sondern auch deren Orientierung auf molekularer Ebene, was auf die Eigenschaften einen großen Einfluss hat.

Ein Spezialfall in der Analytik und somit auch in der Entwicklung von Oberflächen sind Sensoren. Diese müssen kompatibel mit ihrer Umgebung sein. Chemische Sensoren bestimmen nicht nur physikalische Größen, sie sind vielmehr darauf ausgerichtet, einzelne Molekülsorten direkt aus einem Substanzgemisch heraus zu bestimmen und müssen dabei, analog einem physikalischen Sensor, reversibel arbeiten können (Definition nach IUPAC). Der große Vorteil von spezifischen Sensoren ist die enorme Verkürzung und Vereinfachung von Analyseverfahren, was Screeningverfahren deutlich beschleunigen kann. Sensoren, welche auf einer Oberfläche immobilisierte Rezeptoren bzw. Signalgeber besitzen und die Detektion gewünschter Moleküle aus biologischen Systemen ermöglichen, werden Biosensoren genannt. Bei den im Rahmen von medizinischen Untersuchungen massenhaft anfallenden Analysen könnten mittels geeigneter Sensoren bestimmte biologische Moleküle direkt im Blut, ohne weitere Vorbehandlung, nachgewiesen werden.

In biologischen Systemen findet nahezu der ganze Signal- und Stofftransport durch Zellmembranen hindurch statt. Diese Membranen sind Lipiddoppelschichten, welche aus selbstorganisierten amphiphilen Phospholipiden bestehen. Fast alle natürlich vorkommenden Rezeptoren sind an bzw. in den Zellwänden von Organismen lokalisiert.^[6] Für das Design eines Biosensors ist es nahe liegend, die in der Natur bereits vorhandenen Rezeptoren zu verwenden und diese in einer

möglichst natürlichen Umgebung einzusetzen. Auf diesem Weg kann man deren natürliche Funktion erhalten. Die Unterbindung einer Denaturierung von Membranproteinen und des damit verbundenen Funktionsverlusts bei gleichzeitiger Fixierung der Rezeptoren auf einem festen Substrat ist das Ziel der künstlichen Zellmembranmodelle. Bis heute hat sich aus der Problemstellung, stabile biomimetische Zellmembranmodelle aufzubauen, ein äußerst interessantes Wissenschaftsgebiet entwickelt, das auch in Zukunft noch intensiv beforscht werden wird. Leider gibt es bei den präparierten Membranen bislang häufig Probleme mit der Funktionalität und Stabilität der Konstrukte, was einen breiten Einsatz und die Entwicklung eines geeigneten Biosensors bislang verhindert hat. Die einfachste Möglichkeit liegt darin, die Lipiddoppelschichten (Modellmembran) direkt auf einen hydrophilen Festkörper aufzubringen. Weitere Modellkonstrukte enthalten eine hydrophile Schicht zwischen Membran und Substrat. Auf diese Weise wird eine Entkopplung der Membraneigenschaften von dem Substrat erreicht und somit eine geringere Beeinflussung durch den Festkörper. Diese Schicht kann entweder wie ein Kissen zwischen Membran und Substrat liegen oder kovalent mit der Membran, dem Substrat oder beiden verbunden sein. In dieser Arbeit wurde die polymere Grundlage gelegt, ein viel versprechendes, gut kontrollierbares polymerunterstütztes Lipidmembransystem aufzubauen und zu untersuchen. Hierbei werden auf Basis der gut kontrollierbaren Polymerisation der 2-Oxazoline funktionale Lipopolymere synthetisiert. Die Lipidkopfgruppe dieser Polymere wird in die Lipidmembran eingelagert und die Kopplungsgruppe am anderen Ende der Polymerkette bildet die kovalente Verankerung des Konstrukts am Substrat.

2 Grundlagen

2.1 Biosensoren

Biosensoren erfüllen die Aufgabe, bestimmte biologische Moleküle zu detektieren.^[7,8] Hierbei kommt es darauf an, das Zielmolekül, auch in Gegenwart vieler anderer Komponenten, zu erkennen. Als Reaktion auf das Erkennen des Zielobjektes muss ein detektierbares Signal (elektronisch, optisch, etc.) erfolgen.^[9] Ein geeigneter Biosensor für eine Impfkontrolle könnte beispielsweise spezifisch die im Blut gebildeten Antikörper an seiner Oberfläche binden. Ein durch gebundene Antikörper hervorgerufener Schichtdickenzuwachs an der Oberfläche kann dann optisch, z.B. durch Punktellipsometrie, detektiert und quantifiziert werden. Somit ist eine schnelle und direkte Impfkontrolle möglich.

Bislang erfolgen die meisten biologisch relevanten Nachweise (medizinische Diagnostik, Umweltanalytik) über eine zeit- und kostenintensive Aufreinigung (z.B. Extraktion) mit anschließender Quantifizierung. Die Möglichkeit, die Messung *in situ* durchzuführen, würde die Analytik deutlich vereinfachen und zugleich eine erhebliche Aufwands- und Kostenreduzierung bedeuten. Diese Erleichterung ist vor allem für medizinische und pharmazeutische Anwendungen interessant, z.B. bei einer kontinuierlich kontrollierten und optimierten Medikamentendosierung oder bei einer kontinuierlichen Abwassermessung in der Umweltanalytik, wo man eventuelle Verunreinigungen sofort feststellen könnte ohne auf langwierige Einzelmessungen angewiesen zu sein.^[10,11] Die Herausforderung bei der Konstruktion von Biosensoren ist die selektive Detektion eines gewünschten Moleküls bzw. einer Molekülklasse aus einer Vielzahl von teilweise sehr ähnlichen Substanzen bei einer sehr hohen Empfindlichkeit des Gesamtsystems. Über die Fähigkeit, auch in extremen Verdünnungen noch eindeutige Positivsignale zu erhalten, sollte der Sensor außerdem eine schnelle Reaktionszeit haben, da viele biologische Prozesse extrem schnell ablaufen und die Wechselwirkung zwischen Zielstruktur und Rezeptor nur sehr kurz zu detektieren ist.

Eine letzte Anforderung an einen Biosensor ist die Kompatibilität mit seiner Messumgebung. Eine unspezifische Adsorption von Proteinen oder anderen Stoffen am Sensor muss unterdrückt werden. Darüber hinaus dürfen weder Zielproteine noch andere Eiweißmoleküle am Sensor denaturieren, da dies die Messwerte stören und verfälschen würde.

Wie so oft in der Wissenschaft ist das gewünschte Ziel von der Natur bereits in Perfektion realisiert. An Zelloberflächen in lebenden Organismen ist die Sensorik sehr effizient und für viele unterschiedliche Funktionen optimiert. Sie steuern sehr exakt den Stofftransport zur Versorgung der Zellen bzw. zum Abtransport von Schadstoffen aus den Zellen und aus dem Körper. Die Einstellung von Salzkonzentrationen wird dadurch genauso gesteuert wie das Wachstum und die Weiterleitung von Reizen. Eine Methode, einen Biosensor aufzubauen, ist, die

Natur so gut wie möglich zu imitieren und somit ein biomimetisches Konstrukt als Sensor zu verwenden. In der Natur werden hierfür Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut, die Botenstoffe erkennen und binden können. Ein solches System kann auf der Basis von biomimetischen Zellmembranen entwickelt werden. Hierbei können die Funktionen membranassoziierter Rezeptoren ausgenutzt werden und so einen Biosensor ermöglichen. Die Detektion sollte dabei aber durch optische oder elektronische Methoden möglich sein.

2.2 Biomembranen

Zellen in der Natur sind immer von einer Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht umschlossen. Diese Membran legt die äußere Form und Dimension der Zelle fest und erlaubt einen Unterschied in der stofflichen Zusammensetzung und Konzentration innerhalb der Zelle zu deren Umgebung. Die Biomembran stellt einen präzisen selektiven Filter dar, der sowohl passiv als auch aktiv am Stofftransport beteiligt ist. Darüber hinaus nimmt sie weitere Funktionen für die Zelle wahr. Zu diesen zählen vor allem die Energiekonservierung, Signalaufnahme und -weiterleitung, sowie der Transport von Ionen oder Molekülen.

2.2.1 Lipide

Einen Hauptbestandteil biologischer Membranen stellen die Lipide dar. Diese amphiphilen Moleküle bestehen in der Regel aus einem Diester zweier

langkettiger Fettsäuren und Glycerin, das an einer der drei Hydroxylgruppen eine Phosphorsäureestergruppe trägt.^[12]

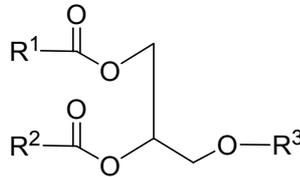


Abbildung 1: Aufbau eines Lipides mit den Alkylresten R¹ und R² der Fettsäuren oft mit Doppelbindungen und den hydrophilen Phosphorsäureestern R³.

In Abbildung 1 ist der grundsätzliche Aufbau von Lipiden gezeigt. Der Rest R³ der Lipide besteht aus Phosphorsäureestern wie z.B. dem Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Die anderen Reste R¹ und R² hingegen bilden den hydrophoben Teil des Lipides. In der Natur werden hierfür unterschiedliche Fettsäuren (langkettige Carbonsäuren) über die Esterbindung an das Glycerin gebunden. Die Alkylreste haben aufgrund ihres biosynthetischen Syntheseweges immer eine geradzahlige Kettenlänge. Neben ihrer Alkylkettenlänge unterscheiden sich die Lipide auch in der Anzahl der Doppelbindungen im Alkylrest (ungesättigte Fettsäuren). Über die Einführung von Doppelbindungen wird die Schmelztemperatur der Lipide gesenkt und somit direkt das Einfrieren der Membran unter Normalbedingungen verhindert. Die Alkylketten sind über relativ instabile Esterbindungen mit dem Glycerin verbunden. In der Natur kann diese Bindung einfach geöffnet bzw. geschlossen werden. Auf diesem Weg sind Zellen in der Lage, ihre Lipidmembranen den unterschiedlichen Anforderungen ihrer Umgebung sowie im Verlauf ihres Lebenszyklus anzupassen.

Eine andere Strategie hinsichtlich der Lipidzusammensetzung haben die extremophilen Bakterien, die sog. Archaeen. Die Lipide dieser Organismen weisen zwei wesentliche Unterschiede auf, die es Arten der Familie der Archaeen ermöglichen, bei Temperaturen von -12°C^[13] bis 113°C^[14] sauren und basischen

Umgebungen von ca. pH 0,5^[15] bis pH 9, Druck bis zu mehreren tausend Atmosphären^[16] und Kochsalzkonzentrationen von 0,05 M bis zu gesättigten Lösungen^[17] zu überleben.

Bei den Lipiden der extremophilen Bakterien, die unter anderem in heißen Schwefelquellen gefunden wurden, sind die Kohlenwasserstoffketten nicht über eine labile Esterfunktion, sondern durch die deutlich stabilere Etherbindung gebunden. Der Schmelzpunkt der Lipide in der Membran wird hierbei nicht durch oxidationsempfindliche Doppelbindungen realisiert, sondern durch Methylgruppenverzweigungen in der Alkylkette. Ein weiterer Grund für die außerordentliche Stabilität der Archaenmembran sind die membranspannenden Lipide. Diese durchspannen die Membran und erhöhen dadurch den Zusammenhalt der beiden Membranhälften.

2.2.2 Aufbau von Lipidmembranen

Erste Anzeichen für den Aufbau von Zellmembranen wurden bereits 1925 von *Gorter* und *Grendel* gefunden.^[18] Sie haben die Membranbestandteile von roten Blutkörperchen (Erythrozyten) extrahiert und anschließend im Langmuirtrog an der Wasser/Luft-Grenzfläche untersucht. Die gefundenen Kompressionsisothermen zeigten den doppelten Flächenbedarf der Gesamtlipidmenge in Bezug zur reinen Zelloberfläche. Die Schlussfolgerung daraus ist, die Struktur der Zellmembran als Doppelschicht von Phospholipiden zu beschreiben.

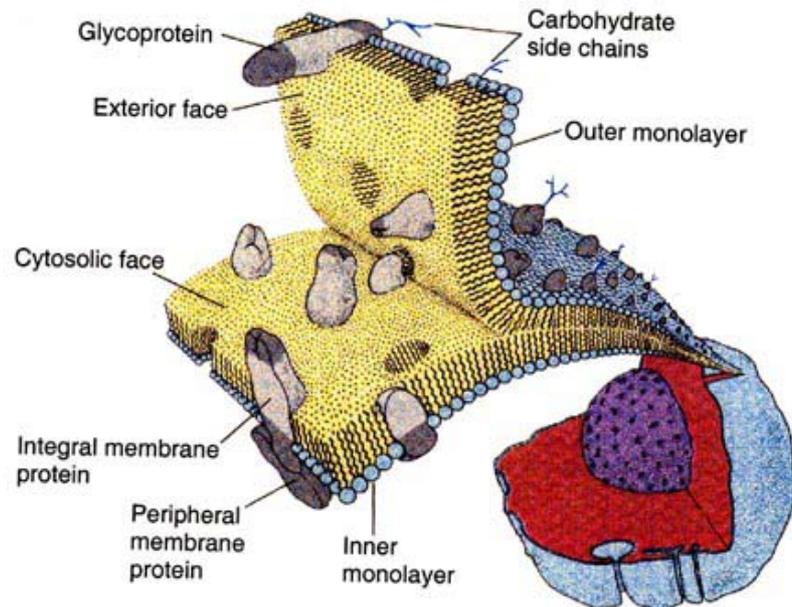


Abbildung 2: Die Zellmembran als Lipiddoppelschicht.

Die heutige Vorstellung zur Struktur von Zellmembranen ist von *Singer* und *Nicolson* 1972 vorgeschlagen worden.^[6] Sie stellten das Fluid-Mosaik-Modell vor, das von einer beweglichen Lipiddoppelschicht ausgeht. Die Lipide mit hydrophoben Kohlenwasserstoffketten und hydrophilen Kopfgruppen lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Alkylketten zusammen und bilden durch Selbstorganisation die lamellare Doppelschichtstruktur aus.^[19] Innerhalb der einzelnen Lipidschichten können sich die Lipide frei bewegen und die Membran verhält sich somit wie eine zweidimensionale Flüssigkeit. Eine Bewegung der Lipide von einer Membranhälfte in die andere, der so genannte Flip-Flop, ist möglich; die Kinetik dieses Prozesses ist allerdings langsam. Die integralen Membranproteine (z.B. Rezeptoren und Ionenkanäle) durchdringen die Doppelschicht und sind innerhalb der Membran lateral beweglich. Diese Membranproteine bilden dadurch eine Verbindung zwischen dem Zellinneren und der Umgebung. Chemisch gesehen handelt es sich bei allen Membranproteinen, wie

sich schon aus dem Namen ergibt, um Proteine, welche für den Erhalt ihrer Überstruktur und ihrer Funktion die amphiphile Umgebung einer fluiden Membran benötigen. Ist die Fluidität der Membran und somit auch die Beweglichkeit von Membranproteinen eingeschränkt, verlieren manche Rezeptoren ihre Funktion durch Denaturierung. Aus diesem Grund ist die Extraktion und Aufreinigung der meisten Membranproteine in ihrer aktiven Form sehr schwer.^[20,21] Betrachtet man nun die Dimensionen der Membran mit den entsprechenden Proteinen, so fällt auf, dass die Rezeptoren auf beiden Seiten der Membran deutlich herausragen können (vgl. Abbildung 3).

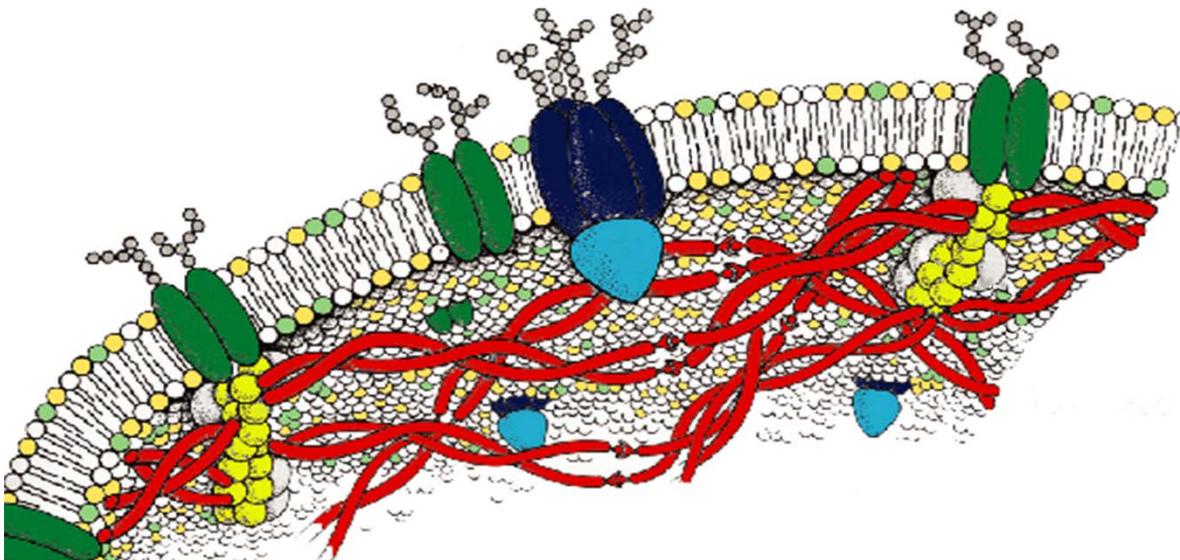


Abbildung 3: Zellmembran mit inkorporierten Membranproteinen

Die Membran selbst hat eine Gesamtdicke von ca. 40 Å. Diese setzt sich zusammen aus je zweimal 15 Å für die Alkylketten und 5 Å für die hydrophilen Kopfgruppen an den Membranoberflächen (siehe Abbildung 4).

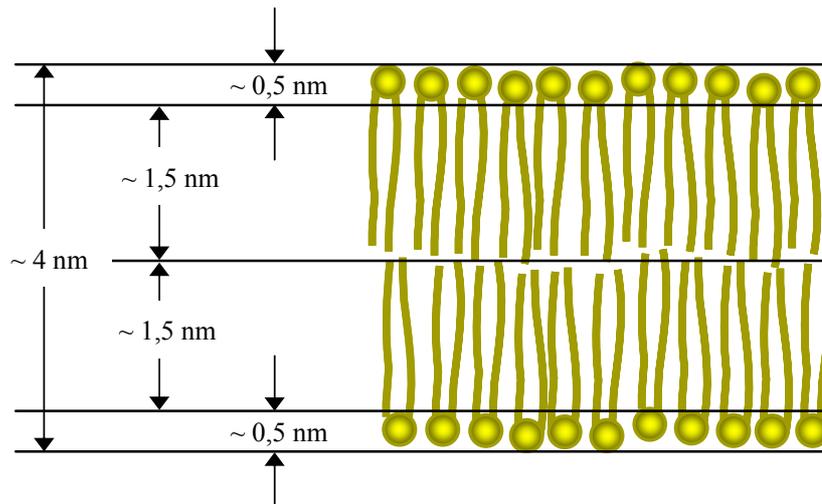


Abbildung 4: Abgeschätzte Abmessungen einer Phospholipiddoppelschicht.^[22]

Betrachtet man nun beispielsweise einen Acetylcholinrezeptor, wie er unter anderem in den elektrischen Organen des Zitterrochens gefunden werden kann, so steht dieser an der Innenseite 20 Å aus der Zellmembran heraus. An der Zellaußenseite ragt der Rezeptor sogar um 40 Å aus der Lipidschicht heraus.^[23]

Die Lipiddoppelschicht besteht allerdings nicht nur aus einer Sorte von Lipiden, es handelt sich dabei vielmehr um ein spezifisches Gemisch verschiedener Lipide, sowie von Proteinen mit definierter Zusammensetzung, die je nach Bedarf der Zelle (Zellteilung, Endozytose, Exozytose etc) variiert wird. Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Zellmembranen spiegeln sich auch in dem Protein/Lipid-Verhältnis wieder, das ebenso stark variieren kann. In Tabelle 1 sind die Werte für einige unterschiedliche Biomembranen zusammengefasst.

Tabelle 1: Gewichtsverhältnisse von Membranproteinen und Lipiden in unterschiedlichen Lipidmembranen.^[24]

Membrantyp	Protein/Lipid-Gewichtsverhältnis
Plasmamembran menschlicher Erythrozyten	1,3
Plasmamembran menschlicher Leberzelle	1,5
Plasmamembran von Bakterien	2,0 – 3,5
Äußere Mitochondrienmembran	1,1
Innere Mitochondrienmembran	3,2
Myelinmembran	0,23

Die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Mengen an Membranbestandteilen ist nicht das einzige Unterscheidungsmerkmal. Das Lipidmuster verschiedener Biomembranen variiert ebenfalls sehr stark. Dies betrifft sowohl die Kettenlänge der Fettsäurereste und die Doppelbindungsanteile in der Alkylkette als auch die chemische Struktur der Kopfgruppe der Phospholipide bzw. Lipide. Eine Reihe der verschiedenen Fettsäuren, aus denen die Lipide in Membranen zusammengesetzt sind, ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Fettsäuren (Gewichtsprozent) im Lipid Phosphatidylinositol in Tier- und Pflanzenzellen hinsichtlich ihrer Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen (18:1 entspricht einer *n*-Alkylkette mit 18 Kohlenstoffen und einer Doppelbindung).

Zelle	Fettsäure									
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4	22:3	22:5	22:6
Rinderherz ^[25]	8	40	14	1	1	1	31	1	1	2
Rinderleber ^[26]	5	32	12	6	1	7	23	4	3	5
Rattenleber ^[27]	5	49	2	2		4	35			1
Ackerschmalwand ^[28]	48	3	2	24	24					

Eine der Voraussetzungen für die Aufrechterhaltung der Biomembranfunktionen ist die Mischbarkeit von Lipiden bzw. Phospholipiden, die auch temperaturabhängig ist.^[29,30,31,32,33]

2.3 Lipidmembranmodelle

Der Begriff Modellmembran soll, im Gegensatz zur natürlichen Biomembran, diejenigen künstlichen Lipidmembranen beschreiben, die es zum Ziel haben, die Struktur, die Eigenschaften und die Funktionen von Biomembranen und deren Teilaspekte zu verstehen und nachzuahmen. Eine vollständige Simulation in der ganzen Komplexität von biologischen Systemen ist dabei in absehbarer Zeit nicht möglich und die Modellmembransysteme sind darauf ausgerichtet, partiell diese Eigenschaften nachzuahmen. Bis heute wurden viele verschiedene Methoden zum Aufbau von Membranmodellen entwickelt. Sie alle dienen zur Verbesserung des

Verständnisses von Biomembranen und membranassoziierten Transport- und Erkennungsprozessen. Darunter fallen Modelle, die sich mit Lipidmonoschichten befassen. Hierbei handelt es sich um die Simulation einer Membranhälfte an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die Membranbestandteile werden in einem Langmuir-Blodgett-Trog (LB-Trog) auf dem Wasser gespreitet und an der Grenzfläche komprimiert. Während die Lipidmoleküle zusammen geschoben werden, orientieren sie sich mit den hydrophoben Alkylketten zur Gasphase, die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser. Somit kann eine „Membranhälfte“ alleine untersucht werden. Dieses Modell ist beispielsweise geeignet, das Phasenverhalten von Lipidmonoschichten, die Mischbarkeit von unterschiedlichen Lipiden oder Wechselwirkungen von Lipidmonoschichten mit niedermolekularen Verbindungen in der Subphase zu untersuchen. Einen kompletteren Einblick in Membranprozesse bekommt man natürlich von Lipiddoppelschichten, wie bei den Loch überspannenden so genannten schwarzen Lipidmembranen (**black lipid membrane: BLM**),^[34] den unilamellaren und multilamellaren Vesikeln oder Liposomen und bei den festkörperunterstützten Lipidmembranen.

2.3.1 Schwarze Lipidmembranen (BLM)

Bereits 1962 berichteten *P. Müller et al.*^[35] von einer bimolekularen Lipidmembran an flüssig/flüssig Grenzflächen und deren grundlegenden Eigenschaften. Es gelang, in einer Küvette eine Flüssigkeitslamelle an der Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen zu spreiten (siehe Abbildung 5). Diese Membranen überspannen kleine Löcher von einem maximalen Durchmesser von 1 mm, die sich in einer ca. 10 mm² Trennwand aus Teflonfolie befinden. Diese Folie trennt die beiden wässrigen Systeme voneinander ab. An den so hergestellten Lamellen wurden Dickenmessungen und elektrische Widerstands- und Kapazitätsmessungen durchgeführt. Als Membranmaterial wurde anfänglich ein Mehrkomponentensystem

bestehend aus Eilecitin, Cholesterol und n-Decan etwa im Verhältnis 1:1:100 verwendet. Die BLM ist in erster Linie ein reines grenzflächenphysikalisches Phänomen und ähnelt in ihren Eigenschaften einer Schaumlamelle. Entscheidend für die Stabilität sind die Zusammensetzung der Mischung, die Reinheit der eingesetzten Substanzen sowie die Benetzbarkeit der Küvette.

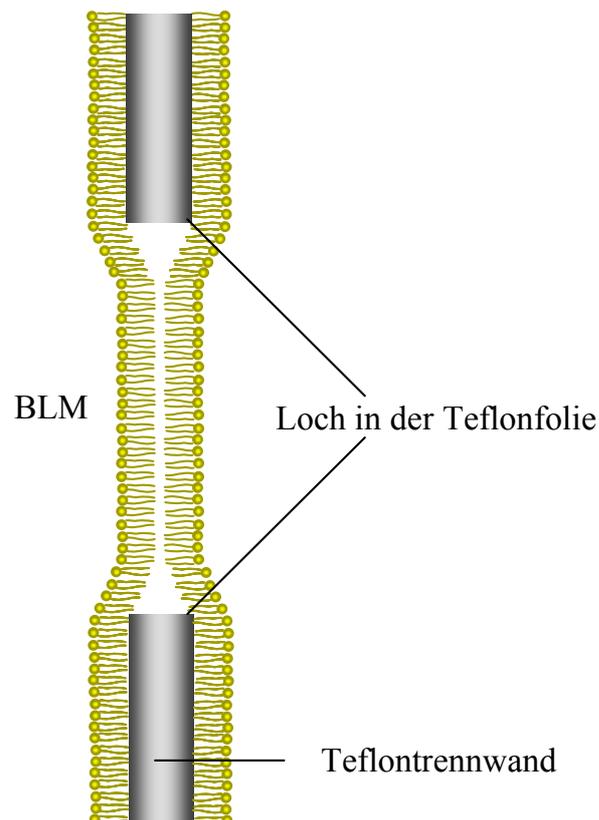


Abbildung 5: Schematische Abbildung einer BLM.

Mittels Auflichtmikroskopie wird bei der Bildung der Membran erst ein schwarzer Rand beobachtet. Später erscheint die gesamte Membran durch destruktive Interferenzen schwarz. Die schwarze Farbe gilt als ein visuelles Kriterium für das Vorliegen der Doppelschichtstruktur und war namensgebend für die Black Lipid Membrane. An BLM gelang es außerdem, Transmembranproteine zu inkorporieren und an diesen elektrische Messungen durchzuführen.^[34] Die Membraneigenschaften waren viel versprechend: Die Hoffnung, diese Membranen

als Biosensoren verwenden zu können erfüllte sich aber aufgrund der geringen Stabilität nicht. Die Entwicklung von stabileren Systemen wird deshalb bis heute von vielen Arbeitsgruppen vorangetrieben.

2.3.2 Unterstützte Lipidmembranen

Eine weitere Entwicklung in der Herstellung und Untersuchung von Lipidmembranen waren die unilamellaren und multilamellaren Vesikel. Aufgrund ihrer kugelförmigen Geometrie stehen bei diesen nur sehr wenige Charakterisierungsmethoden und Messverfahren zur Verfügung. Die Bandbreite an verschiedenen Analysemethoden ist an planaren substratgestützten Systemen bedeutend größer, insbesondere, wenn es sich dabei um ein metallisches bzw. halbleitendes Substrat oder um ein optisch transparentes Substrat handelt. Über einen Langmuir-Blodgett-Transfer (LB-Transfer) ist es möglich, eine Lipidmonolage auf hydrophile Substrate wie Glas oder oberflächenoxidiertes Silizium zu übertragen.^[36] Die zweite Moleküllage kann im Anschluss beispielsweise über einen so genannten Langmuir-Schäfer-Transfer aufgebracht werden.^[37] Das Substrat mit der ersten Monolage wird dafür horizontal in die an der Wasser/Luft-Grenzfläche vororientierte Lipidmonolage eingetaucht. Eine weitere Methode, die Membran zu vervollständigen, ist die Vesikelfusion.^[38,39] Bei dieser Methode wird ebenfalls die erste Monolage durch einen LB-Transfer aufgebracht und anschließend wird das Substrat in eine frisch bereitete Vesikellösung überführt. Die zweite Monolage bildet sich dann spontan aus. Mit dieser Methode können auch, ohne den vorherigen LB-Übertrag einer Monolage, direkt Lipiddoppelschichten erhalten werden.

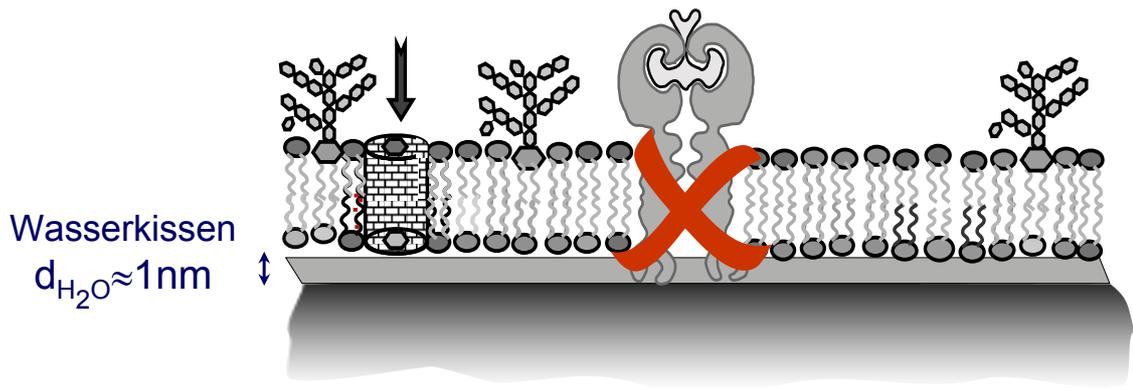


Abbildung 6: Unterstützte Lipidmembran auf dünnem Wasserfilm mit inkorporierten Membranproteinen.

Die so aufgebrauchten Lipidmembranen liegen nicht direkt auf dem hydrophilen Substrat. Die hydrophilen Kopfgruppen schwimmen auf einem sehr dünnen Wasserkissen. Der dadurch gebildete Abstand ist im Gleichgewicht mit ca. 5 – 20 Å sehr gering.^[40,41,42,43] Das gebildete Wasserreservoir ermöglicht zwar eine laterale Diffusion der Lipide in der unteren Membranhälfte, diese ist durch die erhöhte Viskosität des dünnen Wasserfilms gehindert. Die Inkorporation von kleinen Membranproteinen, wie beispielsweise das Gramacidin, ist an diesen Systemen schon mehrfach gelungen.^[44] Aufgrund des geringen Abstands zwischen Membran und Substrat denaturieren jedoch Membranproteine mit größeren intrazellulären Domänen (siehe Abbildung 6).

2.3.3 Polymerunterstützte Lipidmembranen

Für einige Experimente sind die unterstützten Membranen gut geeignet. Für größere Transmembranproteine ist der Abstand zwischen Membran und Substrat allerdings viel zu gering, weshalb diese unspezifisch an die Substratoberfläche adsorbieren und dabei denaturieren können.^[45,46] Außerdem sind die Lipide in der unteren Membranhälfte auf einem planaren Substrat stark durch dessen

Oberflächenmorphologie (Rauigkeit) beeinflusst und weisen daher eine eingeschränkte Mobilität auf.^[47,48,49] Ein weiteres Problem dieser Modellmembranen ist die geringe Stabilität. Als Lösung der Probleme wurde von *Sackmann*^[50] und *Ringsdorf*^[51] vorgeschlagen, eine weiche hydrophile Polymerzweischenschicht zur räumlichen und dynamischen Entkopplung der fluiden Membran des harten Substrates einzuführen. Auf diesem Weg wird die Lipiddoppelschicht durch eine dünne Polymerschicht weiter vom Substrat abgehoben; gleichzeitig wird die Oberflächenrauigkeit des Substrates ausgeglichen. An das Polymer selbst werden dabei besondere Anforderungen gestellt, es soll gut wasserlöslich bzw. hydrophil sein und dadurch analog zu dem Wasserfilm bei direkt aufgetragenen Lipidmembranen ein weiches Kissen bilden. Die Dicke des Wasserreservoirs soll dabei so vergrößert werden, dass Transmembranproteine nicht mehr in direktem Kontakt zum Substrat kommen und dadurch ihre Funktion erhalten. Ein weiterer Effekt, der durch das dickere Wasserkissen erreicht werden soll, ist die Entkopplung der Membran von der Oberfläche. Dies minimiert die Einschränkung der lateralen Diffusion in der unteren Membranhälfte. Auf der anderen Seite will man durch die polymere Zwischenschicht die Stabilität des Membrankonstruktes erhöhen. Diese Stabilitätsverbesserung kann entweder über Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen der Lipide und der Polymerschicht erreicht werden oder die Polymere selbst tragen Lipidendgruppen, welche in die Membran inkorporiert werden und damit als integraler Bestandteil die Membran stabilisieren. Auch bei den polymerunterstützten Lipidmembranmodellen gibt es unterschiedliche Aufbaumöglichkeiten. Die einfachste Methode geht von losen, auf das Substrat aufgetragenen polymeren Hydrogelen aus, auf denen dann die Lipidmembran aufgebracht wird. So wurden beispielsweise von *Sackmann et al.*^[52] 50 bis 100 Å dicke Cellulosefilme mit der LB-Technik auf feste Substrate übertragen. Auf diesen dünnen Filmen konnten homogene und, verglichen zu den reinen Substraten, deutlich defektfreiere Lipidmembranen aufgebaut werden.^[53] Diese Membranmodelle ermöglichen die homogene Inkorporation von großen

Transmembranproteinen wie $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Integrin,^[54] haben allerdings keine deutlichen Stabilitätsvorteile gegenüber den direkt aufgetragenen Membranen.

Die Stabilisierung von künstlichen Zellmembransystemen kann durch eine kovalente Anbindung erreicht werden. Das Substrat muss dafür mit dem Polymerfilm über eine Kopplungsgruppe fest verbunden werden, wie beispielsweise bei selbstorganisierten monomolekularen Schichten (**self assembled monolayers: SAM**). Auch für die Kopplung des Polymerfilms an die Oberfläche gibt es unterschiedliche Konzepte. Die gewünschte Stabilisierung des gesamten Membrankonstruktes kann aber nur erreicht werden, wenn auch die Lipidmembran an das Polymer angebunden ist. Dies kann z.B. durch den zusätzlichen Einbau von Lipidgruppen in das Polymer (Lipopolymer genannt) erreicht werden. Die Lipidgruppen des Polymers werden in die Membran inkorporiert und durch hydrophobe Wechselwirkungen der Alkylketten werden beide Schichten miteinander verbunden.

Eine Möglichkeit derartige Systeme zu realisieren ist der Aufbau von statistischen Terpolymeren aus funktionalen Monomeren, bei denen die resultierende Morphologie von dem Verhältnis der drei Monomere zueinander abhängt.^[55,56] Die Kontrolle über die Phasenseparation der hydrophilen und hydrophoben Teile stellt bei der statistischen Verteilung der Monomere ein Problem dar und führt oft zu lokalen Defekten und somit zu inhomogenen Schichten. Eine weitere Methode geht von selbstorganisierten monomolekularen Schichten aus, die Benzophenonfunktionen tragen. Eine unspezifische, photochemische Kopplungsreaktion der Benzophenone mit Methylengruppen des Lipopolymers ergibt die hydrophile Zwischenschicht. Bei diesem von *Frank et al.*^[57] vorgestellten System wird zuerst die selbstorganisierte Monolage auf dem Substrat gebildet. Im Anschluss wird die Lipopolymerlage mit zusätzlichen Membranlipiden durch einen LB-Übertrag aufgebracht und schließlich photochemisch mit dem funktionalisierten Substrat verbunden (Abbildung 7).

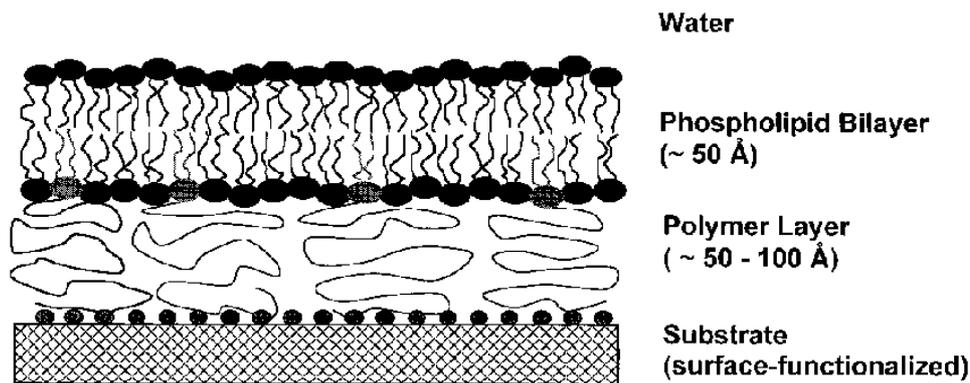


Abbildung 7: Unspezifische photochemische Anbindung von 2-Ethyl-2-oxazolinlipopolymeren an bezophenonfunktionalisierte Oberflächen.^[57]

Die zweite Lipidschicht wird durch eine Vesikelfusion aufgebaut und komplettiert damit die Membran. Obwohl dieses Membranmodell eine sehr gute Stabilität zeigt, ist bei diesem System die Kontrolle des Abstandes zwischen Substrat und Membran schwierig, da die Kopplung des Benzophenons unspezifisch an jede Methylengruppe des Lipopolymers erfolgen kann.

Ein weiteres Konzept für den Aufbau von polymerunterstützten Lipidmembranen verwendet funktionalisierte Lipopolymere. Die Polymerkette wird dabei an beiden Enden funktionalisiert. Das eine Ende trägt die Lipidfunktion, welche durch Inkorporation in die Membran die Stabilität gewährleisten soll. Das andere Ende der Polymerkette soll die oberflächenreaktive Gruppe zur Fixierung an das feste Substrat tragen. Auf diesem Weg können definiertere Membranmodelle erzeugt werden, in denen der Abstand zwischen Membran und Substrat und damit die Dicke des Wasserreservoirs über die Länge der hydrophilen Polymerkette eingestellt werden kann (siehe Abbildung 8).

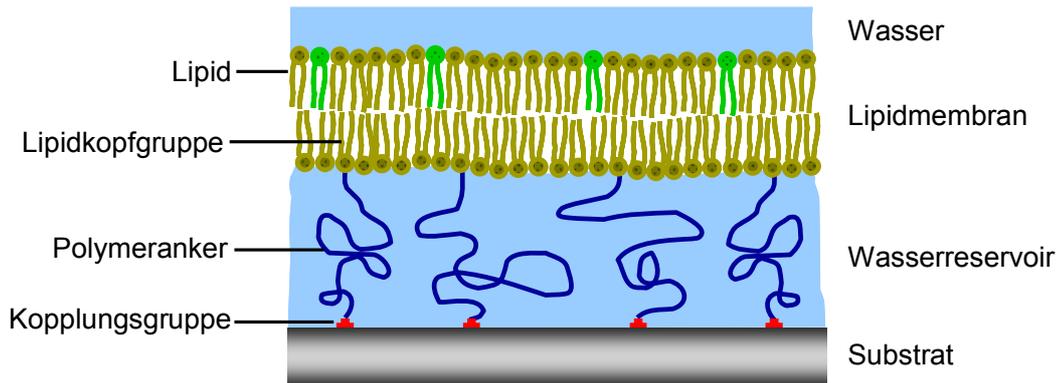


Abbildung 8: Modell einer polymerunterstützten Lipidmembran.

Eine Lipopolymer/Lipidmischung wird an der Wasser/Luft-Grenzfläche vororganisiert und mittels der LB-Technik auf das Substrat übertragen. Die so erhaltene oberflächengebundene Monolage ist über die Lipidgruppe in der unteren Membranhälfte verankert und kovalent an das Substrat gebunden. Dieses Konzept ist bereits mehrfach mit unterschiedlichen funktionalisierten Lipopolymeren realisiert worden. Als Kopplungsgruppen werden dabei sowohl Silanol und reaktive Alkoxysilane als auch Kopplungsgruppen für Goldoberflächen auf Schwefelbasis verwendet.^[58] Das hydrophile Polymerrückgrat kann aus Tetraethylenglycol,^[59,60] Polyethylenglycol,^[61] Peptiden^[62] oder Poly-2-ethyl-^[63] bzw. Poly-2-methyl-2-oxazolin^[64] bestehen. Bei der Verwendung der funktionalisierten Lipopolymere mit einem Tetraethylenglycol können homogene Lipidmembranen erhalten werden.^[60] In diesem Fall ist jedoch die Diffusion in der unteren Membranhälfte aufgrund der kurzen und somit wenig flexiblen Verankerungen stark eingeschränkt. Eine Anpassung des Systems an die Erfordernisse verschiedener, auch großer Membranproteine ist mit diesem System nicht möglich. Das System von *Wagner et al.*^[61] verwendet ein funktionalisiertes Lipopolymer auf der Basis von Polyethylenglycol mit einem Polymerisationsgrad von 77. Dieses System zeigt gute laterale Diffusionseigenschaften der Lipide in der gebildeten Lipidmembran, allerdings ist auch hier eine Anpassung an die unterschiedlichen Bedürfnisse

verschiedener Membranproteine auf kommerziell erhältliche Polyethylenglycolpolymere begrenzt. Das in dieser Arbeit vorgestellte Lipopolymersystem auf Basis der lebenden Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin eröffnet die Möglichkeit, das Lipid, die Polymerkettenlänge und die Kopplungsgruppe gezielt den spezifischen Anforderungen der Membran bzw. den inkorporierten Membranproteinen anzupassen. Mit diesem maßgeschneiderten System sollte der Abstand der Membran zum Substrat über den Polymerisationsgrad eingestellt werden können.

2.4 Oberflächenmodifizierung mit Polymeren

Für die Modifizierung von Festkörperoberflächen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Hier unterscheidet man zwei grundlegende Modifizierungsmethoden: Die Physisorption, bei der das Polymer durch rein physikalische Wechselwirkungen an der Oberfläche anhaftet. Dazu zählen nicht nur die klassische Adsorption, sondern auch ionische Wechselwirkungen.

Bei Chemisorption, d.h. Bildung von kovalenten Bindungen zwischen der Oberfläche und den Polymerketten, ist die Oberflächenmodifizierung im Allgemeinen nicht mehr reversibel und damit entstehen stabile Monoschichten.

Im Folgenden werden einige Konzepte zur Herstellung von monomolekularen Polymerschichten beschrieben. Monomolekular bedeutet in diesem Fall, dass jedes Polymermolekül in Kontakt mit der Oberfläche steht, d.h. der Film besteht aus nur einer einzigen Polymermoleküllage. Der Aufbau der Monolagen lässt sich grundsätzlich in zwei Verfahrensgruppen unterteilen: Zum einen das „grafting onto“-Verfahren, bei dem das Polymer mit einer Kopplungsgruppe synthetisiert wird und danach mit der Oberfläche reagiert. Zum anderen das sog. „grafting

from“-Verfahren, bei dem ein Initiator an der Oberfläche erzeugt wird und die Polymerketten dann durch oberflächeninitiierte Polymerisation gebildet werden.

Bei den „grafting onto“-Verfahren existieren verschiedene Möglichkeiten zur Anbindung der Polymermonolage an die Oberfläche, die von der Struktur und der chemischen Zusammensetzung des Polymers abhängig sind. Die Struktur von chemisorbierten bzw. physisorbierten Polymeren an Festkörperoberflächen ist durch die chemische Zusammensetzung des Makromoleküls und den daraus resultierenden Wechselwirkungen des Polymers mit der Grenzfläche bestimmt. Liegen keine selektiven Adsorptionsstellen im Polymer vor, adsorbiert das Makromolekül unspezifisch an der freien Oberfläche und bildet je nach Art des Polymers (Molmasse, Löslichkeit in der flüssigen Phase, etc.) mehr oder weniger dicke unstrukturierte Polymerschichten aus. Bei niedrigen Schichtdicken beobachtet man sog. ‚trains‘ (Züge, d.h. mehrere aufeinander folgende Kontaktstellen), ‚loops‘ (Schlaufen, d.h. Segmente, die durch Kontaktstellen begrenzt sind) und ‚tails‘ (Schwänze, d.h. Endsegmente, die in die flüssige Phase hineinreichen) (Abbildung 9a).

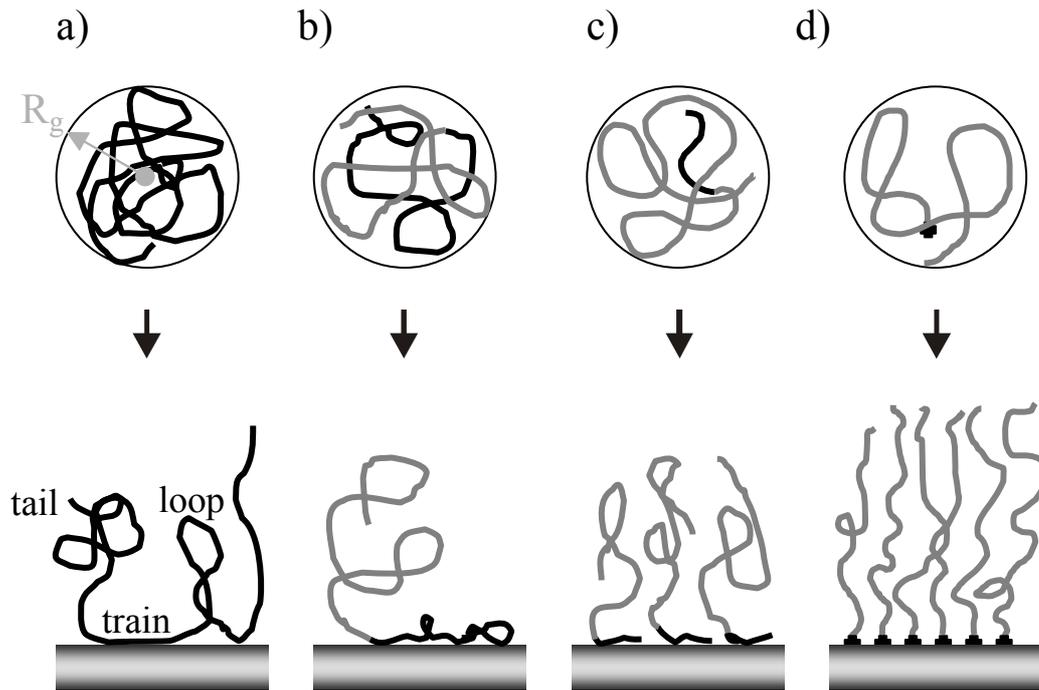


Abbildung 9: a) adsorbiertes Polymer, b) Blockcopolymer mit langem Adsorptionsteil, c) Blockcopolymer mit kurzem Adsorptionsteil, d) Polymer mit einem Adsorptionsteil.

Der Anteil der ‚trains‘ und somit der Kontaktstellen entlang der Polymerkette erhöht sich, wenn das Polymer eine schlechtere Löslichkeit in der flüssigen Phase hat oder wenn starke Wechselwirkungen zwischen Polymer und Oberfläche eine Adsorption fördern. Hohe Anteile an ‚tails‘ und ‚loops‘ sind bei Polymeren mit schwächeren Wechselwirkungen mit der Grenzfläche zu beobachten, respektive bei Adsorption aus guten Lösemitteln. Bei sehr guten Lösemitteln und negativen Wechselwirkungsenergien kommt es zur Depletion, d.h. Vermeidung des Kontaktes des Polymers mit der Grenzfläche. Ob Adsorption oder Depletion auftritt, kann grob aus den Grenzflächenspannungen abgeschätzt werden. Ist die Grenzflächenspannung Festkörper/Lösemittel größer als die Grenzflächenspannung Festkörper/Polymer, kommt es zur Adsorption. Bei Blockcopolymeren, bei denen ein Block deutlich stärker an der Oberfläche adsorbiert, der andere jedoch eine gute Löslichkeit in der flüssigen Phase zeigt, ergibt sich überwiegend eine ‚train-tail‘-Struktur (Abbildung 9b). Schon bei relativ niedrigen Belegungsgraden ist es den

freien Kettensegmenten aufgrund der nahen Oberfläche nicht mehr möglich, eine statistische Knäuelstruktur anzunehmen. Bei höheren Belegungsgraden kommt es durch die benachbarten Polymerketten zwangsläufig zu einer stärkeren Streckung (Abbildung 9b, 9c). Bei Blockcopolymeren ist der Belegungsgrad durch den Flächenbedarf des adsorbierten Blocks^[65] und das energetische Gleichgewicht bestimmt (Entropieverlust durch Streckung des Polymers, Enthalpiegewinn durch die Adsorption). Reduziert man den adsorbierenden Block auf eine Kontaktstelle mit hoher Adsorptionenthalpie, so sind dies terminal und kovalent gebundene Polymere an Festkörperoberflächen (Abbildung 9d). Die maximal erreichbare Pflropfungsdichte ist jedoch durch den Adsorptionsvorgang aus der Lösung limitiert. Bereits gebundene Polymere schirmen mögliche Bindungsstellen ab und verlangsamen so die Adsorption weiterer Makromoleküle. Lösemittel wie Wasser, die mit oxidischen Oberflächen wie SiO₂ stark wechselwirken, unterwandern möglicherweise die Polymerschichten und führen dadurch zur Depletion der Polymere. Diese Problematik kann durch eine kovalente Verknüpfung, eine Art Anker zwischen Polymer und Substratoberfläche, gelöst werden. Das Lipopolymer muss dementsprechend eine weitere reaktive Gruppe tragen. Diese kann entweder eine endständige Ankergruppe sein oder in den Seitengruppen liegen. Die kovalente Anbindung kann aber nicht nur über eine Kopplungsgruppe am Polymer, sondern auch über eine Kopplungsgruppe an der Oberfläche erfolgen, wenn am Polymer Anknüpfungspunkte vorhanden sind. Diese Methode ist allerdings aufwendiger und wird in dieser Arbeit nicht näher ausgeführt.

Für die Anbindung von Molekülen an Festkörperoberflächen ist eine Vielzahl an Substrat-Adsorbat-Paaren vorgestellt worden:^[66,3]

- Chlor- und Alkoxysilane auf hydroxyliertem Silizium sowie Siliziumdioxid^[67]
- Aliphatische oder aromatische Thiole auf Gold, Silber und anderen Metallsubstraten^[68,69,70,71]
- α -Olefine auf hydriertem Silizium^[72]

- Carboxylate auf Aluminiumoxid,^[73] Silber^[74] und Kupfer^[75]
- Alkohole und Amide auf Platin^[76]
- Pyridiniumsalze auf Glimmer^[77]
- Thiole auf Galliumarsenid^[78,79]

Alkanthiole oder auch die entsprechenden Disulfide lassen sich im Gegensatz zu Silanen sehr einfach und definiert aus verschiedenen Lösemitteln auf Goldoberflächen adsorbieren. Die hohe Affinität des Schwefels zu Gold führt zu einer relativ hohen Stabilität der Monolagen und ermöglicht dadurch die Verwendung von Thiolen mit einer großen Vielfalt an möglichen funktionellen Gruppen. Über die Art der Bindung zwischen Gold und Schwefel hat es in der Literatur viele Diskussionen gegeben. Inzwischen ist man sich aber relativ sicher, dass sowohl Thiole als auch Disulfidgruppen zu einer stark polarisierten kovalenten Gold-Schwefelbindung führen. Das Rätsel über den Verbleib des Wasserstoffes der Mercaptane ist noch nicht gelöst, es wird aber angenommen, dass dieser elementar freigesetzt wird.^[66] Die Disulfide werden demgegenüber kontrovers diskutiert. Mehr Zuspruch findet dabei die Variante, die von dem analogen Produkt wie bei den Thiolen ausgeht. Einige Messungen sprechen allerdings auch für eine Dimerenbildung auf der Goldoberfläche. Exakt geklärt ist die Lage der gebundenen Schwefelatome, die in einer hexagonalen Anordnung auf der Gold(111)-oberfläche liegen (siehe Abbildung 10).

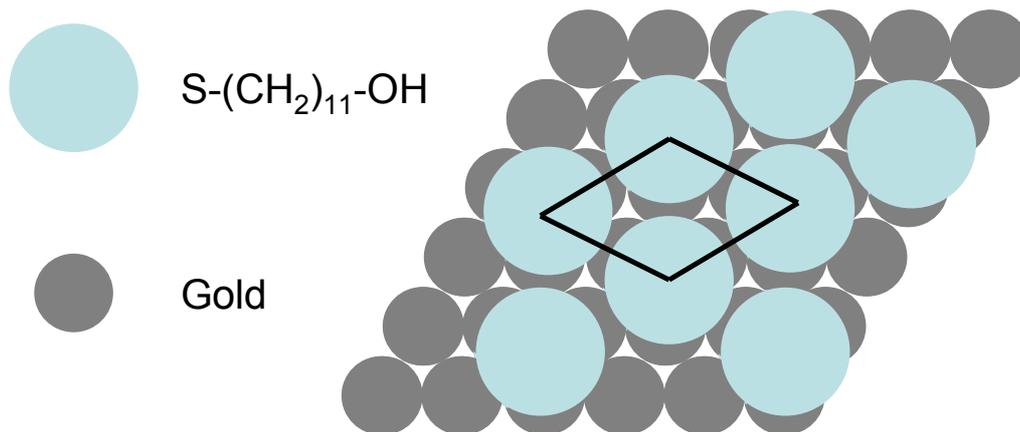


Abbildung 10: Lage von Alkylthiolen auf einer Gold(111)-oberfläche.^[3]

Mechanistisch einfacher zu klären ist die Anbindung von Alkoxy- bzw. Chlorsilanen an Siliziumhydroxidoberflächen. Die Kupplung erfolgt über einen zweistufigen Mechanismus, bei dem zuerst die Alkoxygruppe hydrolysiert wird und im Anschluss durch Kondensation die Kupplung (Silanisierung) stattfindet.^[80]

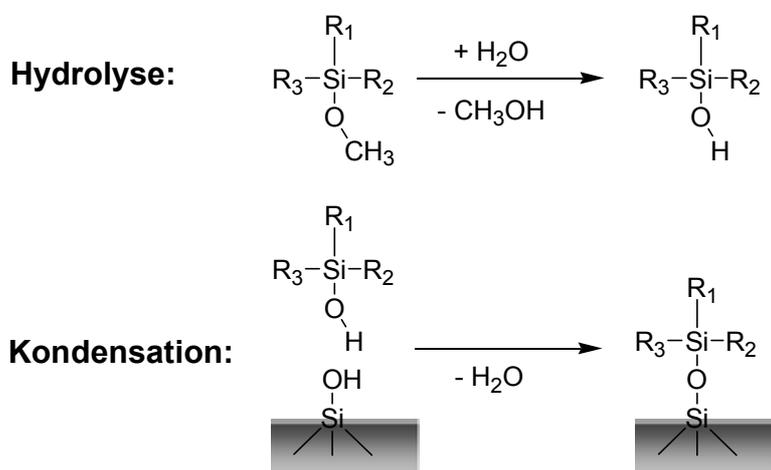


Abbildung 11: Zweistufiger Mechanismus der Kopplung von Alkoxyasilanen an Silanole.

Einen großen Einfluss auf die Eigenschaften einer Polymerschicht hat nicht nur die Art des Polymers und deren Anbindungsmethode, sondern auch deren Pfropfungsdichte. Bei geringen Pfropfungsdichten binden die Ketten mit der

Kopplungsgruppe an die Oberfläche. Das Polymer wird durch die geringe Belegung in seiner Beweglichkeit nicht von benachbarten Polymermolekülen gestört und wird, nur durch die Nähe der Oberfläche eingeschränkt, ein statistisches Knäuel mit dem entsprechenden hydrodynamischen Radius bilden. Ist also der Platz pro Molekül auf der Oberfläche größer als der hydrodynamische Radius, befindet man sich im sog. Pilz-Regime. Wird die Konzentration erhöht, binden immer mehr Moleküle an der Oberfläche und der vorhandene Platz pro Molekül nimmt stetig ab, bzw. die oberflächengebundenen Polymere nähern sich gegenseitig aneinander an bis der Pfropfungsabstand kleiner wird als der hydrodynamische Radius des Polymers. Das Resultat der Annäherung ist eine Störung der Kettenkonformation. Die Ketten müssen sich stark strecken und damit steigt die Schichtdicke deutlich an. Dieser Bereich wird anschaulich Bürstenregime genannt. In diesem Zusammenhang ist besonders der Übergang vom Pilz- in das Bürstenregime interessant, denn bei zunehmender Konzentration von Polymeren an der Oberfläche muss für die Adsorption eine immer größere Energiebarriere überwunden werden (Streckung der Ketten) und für freie Polymerketten wird es immer schwieriger, eine Kopplungsstelle an der Oberfläche zu erreichen. Die Bildung eines Bürstenregimes ist dabei zeit-, temperatur- und konzentrationsabhängig sowie eine Funktion des Energiegewinns bei der chemischen Anbindung bzw. den physikalischen Wechselwirkungen. Somit existiert beim „grafting onto“-Verfahren ein Maximum für die erreichbare Pfropfungsdichte, die deutlich geringer ist als die sterisch mögliche. Abhängig ist die Ausbildung der Regime dabei nicht nur von der Pfropfungsdichte; auch die intermolekularen Polymer-Polymer-Wechselwirkungen sowie die Wechselwirkungen mit dem Lösemittel bestimmen die Struktur des Polymerfilms.

Eine höhere Pfropfungsdichte und somit noch stärkere Streckung der Polymere (Bürstenstruktur) kann durch das „grafting from“-Verfahren erreicht werden. Bei diesem Verfahren werden selbstorganisierte Monolagen (SAM) auf den entsprechenden Metalloberflächen aufgebaut. Die Monolage sollte dabei eine reaktive Endfunktion besitzen, die als Initiatorfunktion einer Polymerisation genutzt

werden kann. Während der Polymerisation können aus sterischen Gründen nicht alle Initiationsstellen auch eine Polymerkette aufbauen. Wie viele der Initiatoren an der Oberfläche letztendlich eine Polymerkette bilden, ist schwierig zu bestimmen. Es wird aber angenommen, dass die resultierende Polymerkonzentration in etwa einem Fünftel der Initiatorkonzentration entspricht. Die Pfropfungsdichte ist dabei jedoch deutlich höher als bei „grafting onto“-Verfahren. Der Grund dafür liegt im wesentlich geringeren sterischen Anspruch der Monomere. Es ist ersichtlich, dass es für kleine Monomermoleküle leicht ist, die Initiatorfunktionalität an der Oberfläche der Schicht zu erreichen und dort zu reagieren. Ein großes Polymer hingegen muss bis zur Substratoberfläche durch die bereits vorhandene Polymerschicht hindurch diffundieren, bevor es zur Anbindung kommen kann.

2.5 Lebende kationische Polymerisation von 2-Oxazolinen

Der Begriff „lebende Polymerisation“ beschreibt eine Polymerisation, bei der die Startreaktion schnell und quantitativ vor der Wachstumsreaktion abläuft und während der Wachstumsreaktion keine terminierenden Konkurrenzreaktionen existieren.^[81,82] Dementsprechend reagiert ein aktives Kettenende nur mit weiterem Monomer. Die Konzentration der wachsenden Ketten bleibt über die gesamte Reaktionszeit konstant. Dadurch verteilt sich das Monomer gleichmäßig, die resultierenden Kettenlängen sind eng verteilt (Poisson-Verteilung), und das Kettenende bleibt auch nach Umsatz aller Monomeren aktiv, also „lebend“.



mit I = Initiator; M = Monomer; A^\pm = aktive Spezies; P_{n+1}^\pm = wachsende Kette.

Die Polymere werden in der Regel durch die experimentell ermittelten Größen des Zahlenmittels und des Gewichtsmittels der Molmasse, sowie deren Verhältnis, dem Polydispersitätsindex, beschrieben. Diese Größen sind wie folgt definiert:

Zahlenmittel:
$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i \cdot M_i}{\sum_i n_i}$$

Gewichtsmittel:
$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i m_i \cdot M_i}{\sum_i m_i} = \frac{\sum_i n_i \cdot M_i^2}{\sum_i n_i \cdot M_i}$$

mit n_i = Anzahl der Spezies der Masse M_i

und m_i = Masse der Spezies n_i .

Polydispersitätsindex:
$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

Die Polymere einer lebenden Polymerisation zeichnen durch eine enge Molmassenverteilung mit einem Polydispersitätsindex nahe eins aus.

Aufgrund der aktiven Kettenenden bietet die lebende Polymerisation auch die Möglichkeit, durch Zugabe eines zweiten Monomertyps Blockcopolymere zu bilden^[83] oder mittels eines Abbruchreagenzes eine terminale funktionelle Gruppe einzuführen.^[84,103]

Ein Beispiel für einen lebenden Reaktionsmechanismus ist die kationische ringöffnende Polymerisation von 2-substituierten 2-Oxazolinen. Die Verwendung dieser Monomere erlaubt den gezielten Aufbau von Materialien, deren Struktur und Eigenschaften in einem weiten Rahmen definiert variiert werden können. Der lebende Charakter der Reaktion ermöglicht die einfache Herstellung von endfunktionalisierten Polymeren und Blockcopolymeren. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften können dabei durch die Substituenten an der 2-Position vielseitig gestaltet werden, denn diese seit den 60er Jahren etablierte Monomerklasse zeigt eine breite Variationsvielfalt.^[85,86]

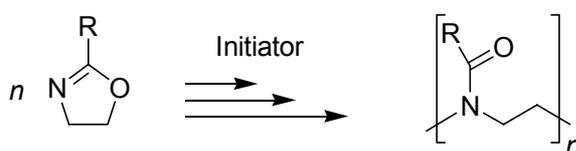


Abbildung 12: Ringöffnende Polymerisation von 2-substituierten 2-Oxazolinen.

Bereits seit dieser Zeit sind die Monomere, zyklische Iminoether, präparativ gut zugänglich und die Polymerisation ist von *Seeliger*,^[87] *Kagiya*,^[88] *Tomalia*^[89] und *Litt*^[90] systematisch untersucht worden.

Thermodynamisch liefern zwei Aspekte einen Beitrag zur Polymerisation der 2-Oxazoline. Der Fünfring wird bei der Polymerisation geöffnet und dabei die Ringspannung aufgehoben. Außerdem verläuft die Polymerisation durch die Isomerisierung der Iminoetherverbindung zur thermodynamisch stabileren

Amidverbindung unter Energiegewinn, der je nach Substitution des Monomers zwischen 60 und 110 kJ/mol liegt.^[91]

Zum Start der Polymerisation können unterschiedliche Initiatoren mit einem ausreichend elektrophilen Zentrum verwendet werden.^[92] Lebende Polymerisationen werden aber nur erreicht, wenn der Initiationsschritt deutlich schneller als das Wachstum verläuft. Dies ermöglichen starke Brønstedsäuren, Lewissäuren und deren Salze, Sulfonsäureester und -anhydride, Alkylhalogenide, sowie Elektronenakzeptorverbindungen. Durch geeignete Wahl der Initiatorverbindung kann auf diesem Weg eine Endfunktionalisierung in das Polymer eingeführt werden, wie in Abbildung 13 ersichtlich ist.

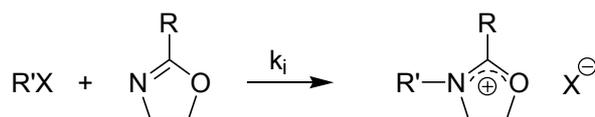


Abbildung 13: Startreaktion der Polymerisation von 2-substituierten 2-Oxazolinen.

Der nukleophile Iminostickstoff des Oxazolins greift am elektrophilen Zentrum der Initiatorverbindung an und bildet das Oxazoliniumkation. Dieses polymerisiert unter Ringöffnung, wobei sich das nächste Monomer regioselektiv an die 5-Position des Oxazoliniumringes anlagert.

Die Polymerisation kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Entweder ist die wachsende Spezies ein Oxazoliniumkation oder eine offenkettige, kovalente Spezies (Abbildung 14). Die Lage des Gleichgewichtes (k_1/k_2) wird durch die Substitution des Monomers, den Initiator, das Gegenion und die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Lösemittel) bestimmt. Je elektrophiler der Initiator ist, desto weiter liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Oxazoliniumkations.

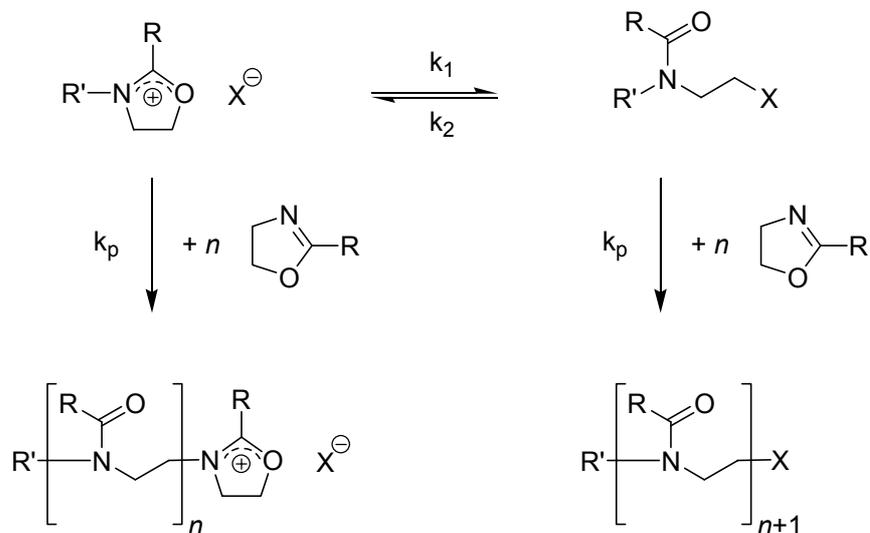


Abbildung 14: Wachstumsreaktionen der Polymerisation von 2-Alkyl-2-Oxazolinen.

Eine lebende kationische Polymerisation mit enger Molmassenverteilung kann man nur gewährleisten, wenn Verunreinigungen wie Wasser, Alkohole, Carbonsäuren oder andere Nucleophile ausgeschlossen werden, da diese zum Abbruch der Polymerisation führen.

Die Funktionalisierung der Polymere kann sowohl durch den Initiator als auch durch ein Abbruchreagenz erfolgen.^[84]

Als Terminationsreagenzien eignen sich Nucleophile, die unter Ringöffnung des Oxazoliniumions an das lebende Kettenende addieren. Dabei ist eine Addition sowohl an der 5- als auch an der 2-Position des Oxazoliniumions möglich (Abbildung 15).

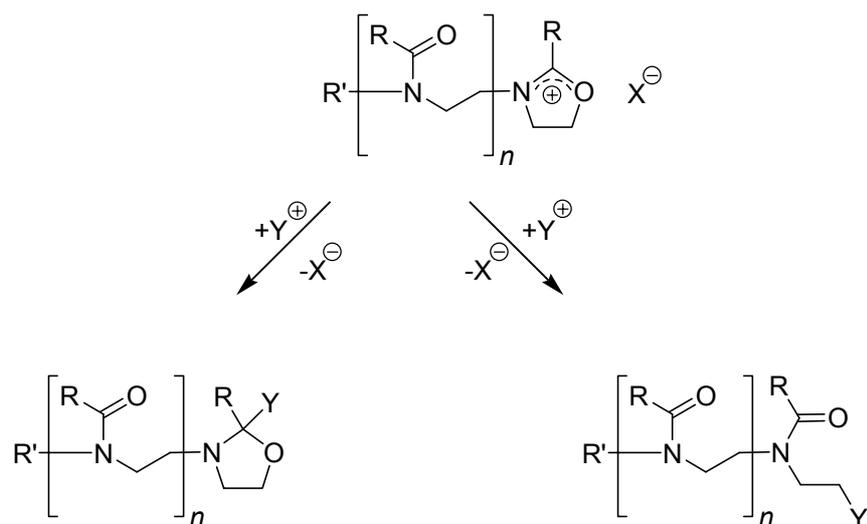


Abbildung 15: Abbruchreaktion durch nukleophilen Angriff an der 2- oder 5-Position.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Triflat als Gegenion wird eine schnelle, quantitative Abbruchreaktion durch Angriff an der 5-Position beschrieben.^[93]

2.6 Messmethoden

2.6.1 Ellipsometrie

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Dickenbestimmung von ultradünnen Schichten ist die Ellipsometrie. Hierbei werden aus der Änderung der Polarisierung des reflektierten Lichts an einer Grenzfläche Informationen über die Schichtdicke bzw. den Brechungsindex gewonnen.^[94]

Abbildung 16 zeigt den experimentellen Aufbau und das Messprinzip eines Punktelipsometers.

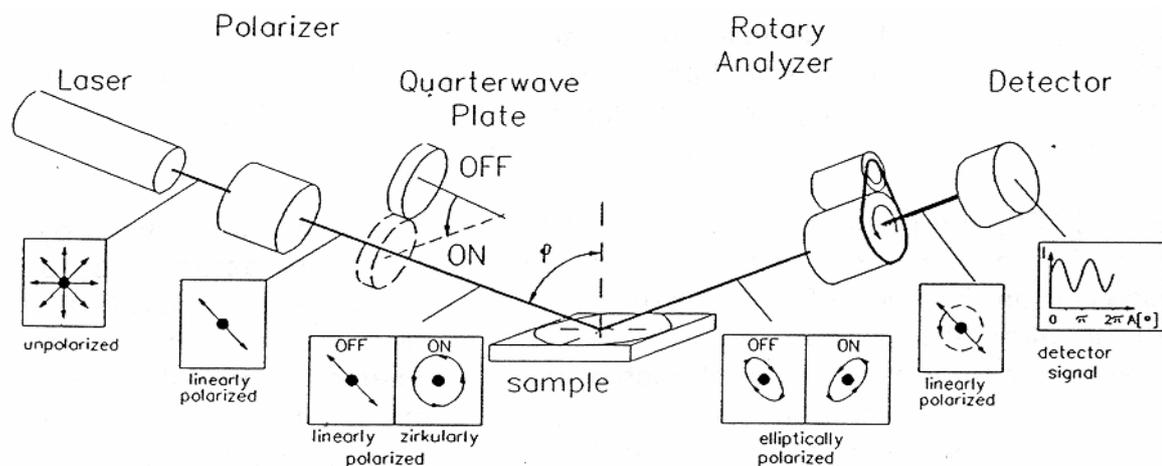


Abbildung 16: Messprinzip der Ellipsometrie.^[95]

Bei der Messung wird monochromatisches Licht (HeNe-Lasers) mittels eines Polarisators linear p-polarisiert (p: parallel zur Oberflächennormalen) und an der Substratoberfläche reflektiert. Der Ein- und Ausfallwinkel des Lichtstrahls beträgt im Allgemeinen 70° (Null-Ellipsometrie). Die dabei entstehende Wechselwirkung des elektromagnetischen Felds mit der Probe resultiert in einem polarisierten Lichtstrahl, der einen p-polarisierten und einen s-polarisierten (s: orthogonal zur

Oberflächennormalen) Anteil besitzt. Der ursprünglich p-polarisierte Lichtstrahl wird somit elliptisch polarisiert und führt durch einen weiteren drehbaren Polarisator (Analysator). Im Detektor wird die Licht-Intensität in Abhängigkeit des Winkels des Analysators aufgezeichnet. Gemessen werden somit die relativen Polarisationszustände des einfallenden und reflektierten Lichts.

Bildet man das Verhältnis der komplexen Reflektionskoeffizienten (s- und p-Anteil des Lichtes), so erhält man die Fundamentalgleichung der Ellipsometrie:

$$(\tan\Psi)e^{i\Delta} = \frac{R_s}{R_p}$$

Darin beschreiben die ellipsometrischen Größen Δ und Ψ sowohl das Verhältnis der Amplituden (Ψ) der s- und p-polarisierten Anteile der Wellen vor und nach dem Kontakt zur Probe als auch das Verhalten der jeweiligen Phasen (Δ).

Aus den experimentell zugänglichen Größen Δ und Ψ lässt sich bei der Annahme eines Schichtmodells mit definiertem Brechungsindex und der vorher bestimmten Reflektivitätskoeffizienten des nativen Substrates die Schichtdicke des Films ermitteln. Der Brechungsindex kann bei ultradünnen organischen Filmen mit Schichtdicken in der Größenordnung von wenigen Nanometern auch über andere Messmethoden nicht exakt bestimmt werden, weshalb ein Wert angenommen wird, der in der Regel auf Messungen der Probe in Substanz beruht. Eine weitere Einschränkung der Ellipsometrie betrifft nur Schichten mit einer Dicke von über 200 nm. Nachdem die Ellipsometerwinkel periodisch wiederkehren, existieren Mehrfachlösungen, die bei der entsprechenden Messanordnung und einem entsprechenden Brechungsindex in einem Bereich knapp unter 300 nm liegen. Nachdem die hier betrachteten Schichtdicken aber deutlich geringer sind, spielt diese Problematik hier keine Rolle. Die Ellipsometrie liefert dementsprechend

eindeutige Werte bezüglich der Schichtdicke mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,1$ Å. Aufgrund der Uneinheitlichkeit der Proben sind Schwankungen von 0,2 nm zu erwarten.

2.6.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Eine Methode zur Visualisierung von Oberflächenstrukturen ist die Kraftmikroskopie, die 1986 von *Binnig* und *Rohrer* entwickelt wurde und eine Auflösung im Mikrometer-Bereich bis zu atomaren Auflösungen ermöglicht.^[96]

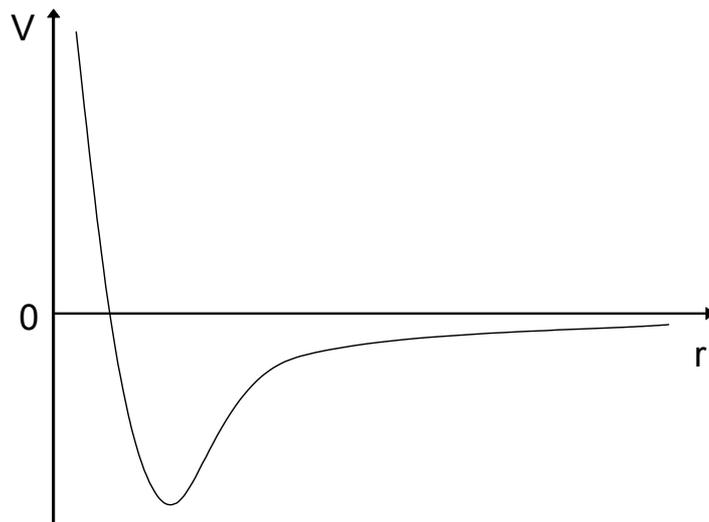


Abbildung 17: Potentialkurve für die Annäherung zweier Atome.

Bei dieser Methode wird eine feine Messspitze (Tip) durch einen piezoelektrischen Halter (Cantilever) über der Probenoberfläche positioniert. Bei der Annäherung von der Spitze und der Probe treten nach Durchlaufen einer auf Anziehungskräften beruhenden Potentialmulde ab einem bestimmten Abstand abstoßende Kräfte auf (vgl. Abbildung 17). Dies macht man sich beim AFM zunutze. Bei der Messung im Kontakt der Tip zur Oberfläche (contact mode) wird

im Bereich der abstoßenden Kräfte gearbeitet. Die Spitze, die sich auf einem federnden Tip-Halter befindet, wird an die Oberfläche angenähert. Die Abstoßung führt zu einer Biegung der Feder und resultiert in einer Ablenkung des am Tip-Halter reflektierten Laserstrahls (vgl. Abbildung 18). Über eine Anpassung der Spitzenlage in z-Richtung wird immer auf eine konstante Abstoßungskraft eingestellt und dementsprechend die Oberflächentopographie nachgefahren und die Analyse des Piezomotors, der die Spitze steuert, ergibt das Höhenprofil der Oberflächenstruktur.

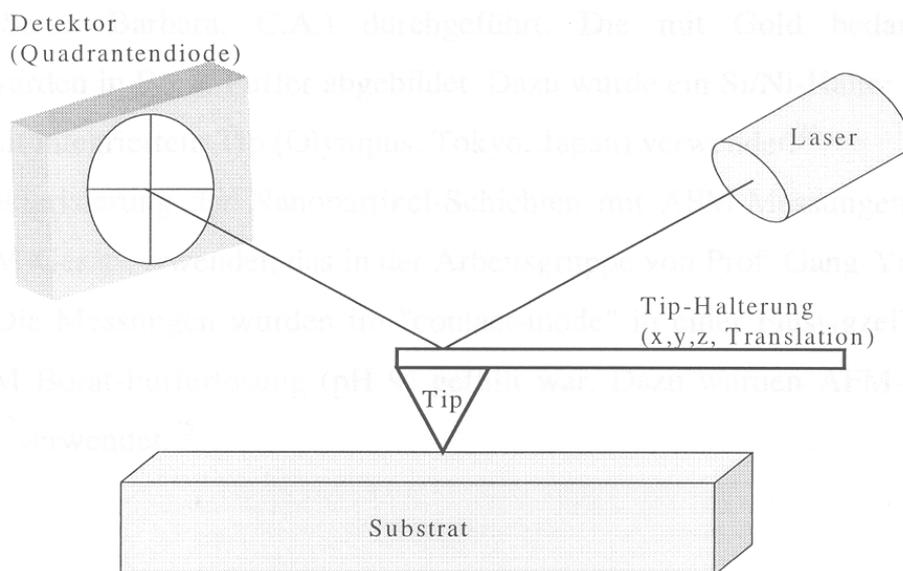


Abbildung 18: Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie (AFM).

In einem weiteren Messverfahren (tapping mode) wird die Spitze in resonante Schwingungen versetzt. Die Spitze wird dann so nahe an die Oberfläche angenähert bis die auftretenden Kräfte die Schwingung abdämpfen. Über die Nachregelung in z-Richtung wird die Topographie bei konstanter Dämpfung nachgefahren und visualisiert. Diese berührungslose Methode wird besonders für weiche und zerstörungsempfindliche Substrate (Polymere) eingesetzt.

2.6.3 Kontaktwinkelmessungen an Lipopolymermonolagen

Eine einfache und sehr sensitive Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der Benetzbarkeit von Oberflächen mit unterschiedlichen Flüssigkeiten ist die Messung des Kontaktwinkels eines Flüssigkeitstropfens auf einem planaren Substrat.

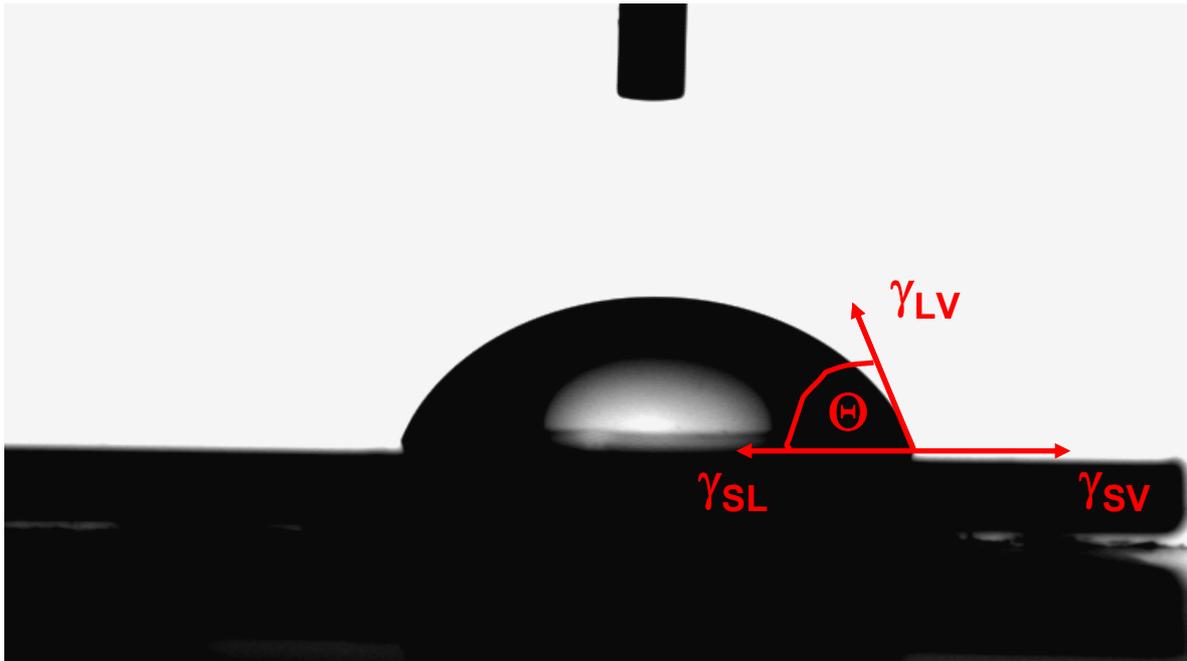


Abbildung 19: Nadelspitze über einem liegenden Tropfen auf einem planaren Substrat (Foto aus einer Messung) mit der Oberflächenenergie des Festkörpers (γ_{SV}), der Flüssigkeit (γ_{LV}) und der Grenzflächenenergie an der Fest-Flüssig-Grenzfläche (γ_{SL}).

In der Regel wird hierbei der Winkel Θ zwischen der Oberfläche und einer Tangente beobachtet, die am Berührungspunkt zwischen Tropfen und Substrat entlang des Tropfens angelegt wird. Dieser Kontaktwinkel resultiert aus der freien Energie der Oberfläche und der freien Energie der Flüssigkeit. Physikalisch wird der resultierende Kontaktwinkel in Zusammenhang mit der Oberflächenenergie mit der Young'schen Gleichung gebracht.

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cdot \cos \Theta$$

Dabei ist γ_{SV} die Oberflächenspannung des Festkörpers, γ_{LV} die der Flüssigkeit und γ_{SL} die Grenzflächenspannung an der Fest-Flüssig-Grenzfläche. Die Gleichung ist aber an die Bedingung geknüpft, dass sich der stationäre Tropfen im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und die Oberfläche perfekt planar ist.^[97] Nach dieser Gleichung sollte eine bestimmte ideale Oberfläche immer den gleichen Kontaktwinkel ergeben. Reale Systeme weichen aber von der Theorie ab, so befinden sie sich nie in einem thermodynamischen Gleichgewicht (Verdunstung des Lösemittels). Außerdem gibt es keine perfekt planaren und homogenen Oberflächen. Ein weiteres Problem der realen Systeme ist die Dreiphasenlinie, die nur makroskopisch beschrieben und beobachtet eine Linie ist. Darüber hinaus ist die Messmethode auch sehr sensibel gegenüber Verunreinigungen und Heterogenitäten und zeigt bei den realen Oberflächen eine große Variation des Kontaktwinkels. Die Verunreinigungen können durch Adsorption von Molekülen aus der Luft hervorgerufen werden. Inhomogenitäten sind auf die Rauigkeit des Substrates, Reorientierung der Moleküle an der Oberfläche oder auch die Löslichkeit von Oberflächenbestandteilen in der verwendeten Flüssigkeit zurückzuführen. Dementsprechend ergeben sich auf realen Oberflächen unterschiedliche Kontaktwinkel für einen stationären Tropfen (stationärer Kontaktwinkel), für einen wachsenden Tropfen (fortschreitender Kontaktwinkel) und einen zurückziehenden Tropfen (zurückziehender Kontaktwinkel). Aufgrund der Sensibilität dieser Messmethode haben sich im Laufe der Zeit mehrere Methoden entwickelt wie der Tropfen aufgebracht und der Winkel bestimmt wird.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein lang diskutiertes Konzept für polymerunterstützte Modellmembranen auf planaren Substraten zu realisieren. In diesem Zusammenhang war die Darstellung strukturell definierter Polymermonoschichten auf Festkörpern nötig. Auf diesem Forschungsgebiet gibt es bislang eine Reihe unterschiedlicher Systeme, welche als biomimetisches System für natürliche Zellmembranen dienen sollen. Leider haben die bislang bekannten Systeme keine universelle Einsetzbarkeit der Membranmodelle erreicht, da entweder die Inkorporation größerer Membranproteine wegen Denaturierung an der Substratoberfläche nicht gelang oder die Stabilität der Modellsysteme für einen breiteren Einsatz zu gering war. Die Systeme, die auf der Unterstützung der Lipidmembran über einen weichen, hydrophilen Polymeranker beruhen, sind momentan die aussichtsreichsten, insbesondere wenn es darum geht, die Funktionen einer natürlichen Membran mit den Anforderungen an Biokompatibilität, Stabilität und Kontrolle der Morphologie zu ermöglichen. Ein solches Membrankonstrukt lässt sich auf der Seite der Polymere grundsätzlich auf zwei unterschiedliche

Weisen aufbauen. Die Polymerschicht sollte nach dem „grafting from“-Prozess, also schrittweise von der Oberfläche wachsend aufgebaut werden. Dieser Aufbau der Polymerschicht benötigt zuerst eine oberflächengebundene Initiationsgruppe für die Polymerisation. Geeignete Monomere sollten durch den Initiator zu den entsprechenden Polymeren umgesetzt werden. Die Lipidfunktionalität sollte mit einer Abbruchsreaktion am Ende der Polymerkette eingeführt werden. Durch die Synthesesequenz ist die Lipopolymerschicht strukturell vororganisiert, das heißt das Polymer ist zwischen Substrat und Lipidengruppen lokalisiert. Des Weiteren sind bei der „grafting from“-Methode deutlich höhere Pfropfungsdichten möglich, wodurch eine bessere Abschirmung der Oberfläche sowie eine erste Vororganisation zu erwarten ist. Natürlich hat dieses System nicht nur Vorteile. Eine genaue Analyse der Zusammensetzung der gebundenen Polymere, sowie eine Bestimmung des Pfropfungsgrades, ist nicht trivial. Auch die Reproduzierbarkeit der Synthese ist schwierig.

Bei der zweiten Methode zum Aufbau der definierten Schichtsysteme werden die Polymere zunächst in Lösung synthetisiert, wobei die Lipopolymere zusätzlich mit einer terminalen Kopplungsgruppe zur Anbindung an die Substratoberfläche funktionalisiert werden („grafting onto“-Methode). Am Ende der Synthese können diese Polymere gereinigt und eingehend charakterisiert werden. Mit diesen Polymeren kann und soll die Polymerschicht nicht nur durch Adsorption aus Lösung aufgebaut werden. Eine weitere Möglichkeit zu den gewünschten polymerunterstützten Lipidmembranen zu kommen ist die, funktionalisierte Lipopolymere an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu spreiten, durch Kompression zu organisieren und anschließend auf das Substrat zu übertragen. Der sog. Langmuir-Blottget-Transfer (LB-Transfer) stellt damit die dritte Variante zum Aufbau von Lipidmembranen dar. Der Abstand zwischen Lipidmembran und Substrat sollte über den Polymerisationsgrad, also über die Länge der hydrophilen Polymerkette einstellbar sein. Darüber hinaus dient das beidseitig fixierte Polymer (Chemisorption am Substrat auf der einen und Verankerung der Lipidengruppen in

der Membran auf der Seite) zur Stabilisierung des Membrankonstruktes.

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung geeigneter Lipopolymerstrukturen, mit der ein kontrollierter Aufbau von strukturell definierten und zudem stabilen Lipidmembranmodellen realisiert werden kann. Hierbei sollte unter anderem auch die praktikabelste und am besten kontrollierbare Methode zum Aufbau der Membranmodelle gefunden und untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Polymermonolagen nach der „grafting from“-Methode^[98,99]

Der Aufbau der membranunterstützenden polymeren Anker sollte zunächst mittels der „grafting from“-Methode erfolgen. Auf einem Substrat werden Initiatorfunktionalitäten erzeugt, die eine Polymerisation an der Oberfläche erlauben. Aufgrund der guten Kenntnisse über selbstorganisierte monomolekulare Schichten von Alkylthiolen auf Goldoberflächen wurde dieses System als Kopplungssystem an das Substrat verwendet.

4.1.1 Präparation der Goldsubstrate

Die Grundlage für die Bildung von SAMs ist eine geeignete polykristalline Gold-(111)-oberfläche. Qualitätskriterien hierfür sind die Reinheit des Metalls und die Kristallinität der Oberfläche sowie deren Morphologie. Nach gründlicher Reinigung der Objektträger (Glas) durch Ultraschallbehandlung in Ethanol und O₂-Plasmareinigung wurden diese im Vakuum von 10⁻⁷ mbar bei 300 °C getempert. Dies bewirkte eine Wasserabspaltung der hydrophilen Silanolgruppen zu den hydrophoberen Siloxangruppen an der Oberfläche. Diese Vorbehandlung der Oberfläche machte die Präparation einer ansonsten notwendigen haftvermittelnden Chromzwichenschicht überflüssig.^[100] Das Gold wurde über eine Widerstandsheizung erwärmt, bis eine konstante Verdampfungsgeschwindigkeit erreicht war. Bei einer Aufdampfgeschwindigkeit von 0,2 – 0,3 nm/s wurde die beste Qualität der Goldoberfläche erzielt. Während des Aufdampfungsprozesses wurden die Objektträger weiterhin beheizt. Dies, sowie das Tempern für einen weiteren Tag bei 300 °C, führte zu einer deutlichen Vergrößerung der Goldkristallite, wie die AFM-Aufnahmen (vgl. Abbildung 20) zeigen.

Die AFM-Bilder zeigen den Größenunterschied der Kristallite auf der Oberfläche, sowie die sehr unterschiedlichen Rauigkeiten auf der Nanometerskala bei den unterschiedlichen Präparationsmethoden. Die optimierte Präparation und thermische Nachbehandlung ergibt Goldoberflächen mit Kristalliten mit typischen Plateaudurchmessern zwischen 100 - 300 nm. Die Rauigkeit der einzelnen (111)Goldkristalle liegt bei 0,1 – 0,2 nm. Unter Beachtung des Rauschens des Messsignals handelt es sich hierbei um atomar glatte Goldoberflächen.

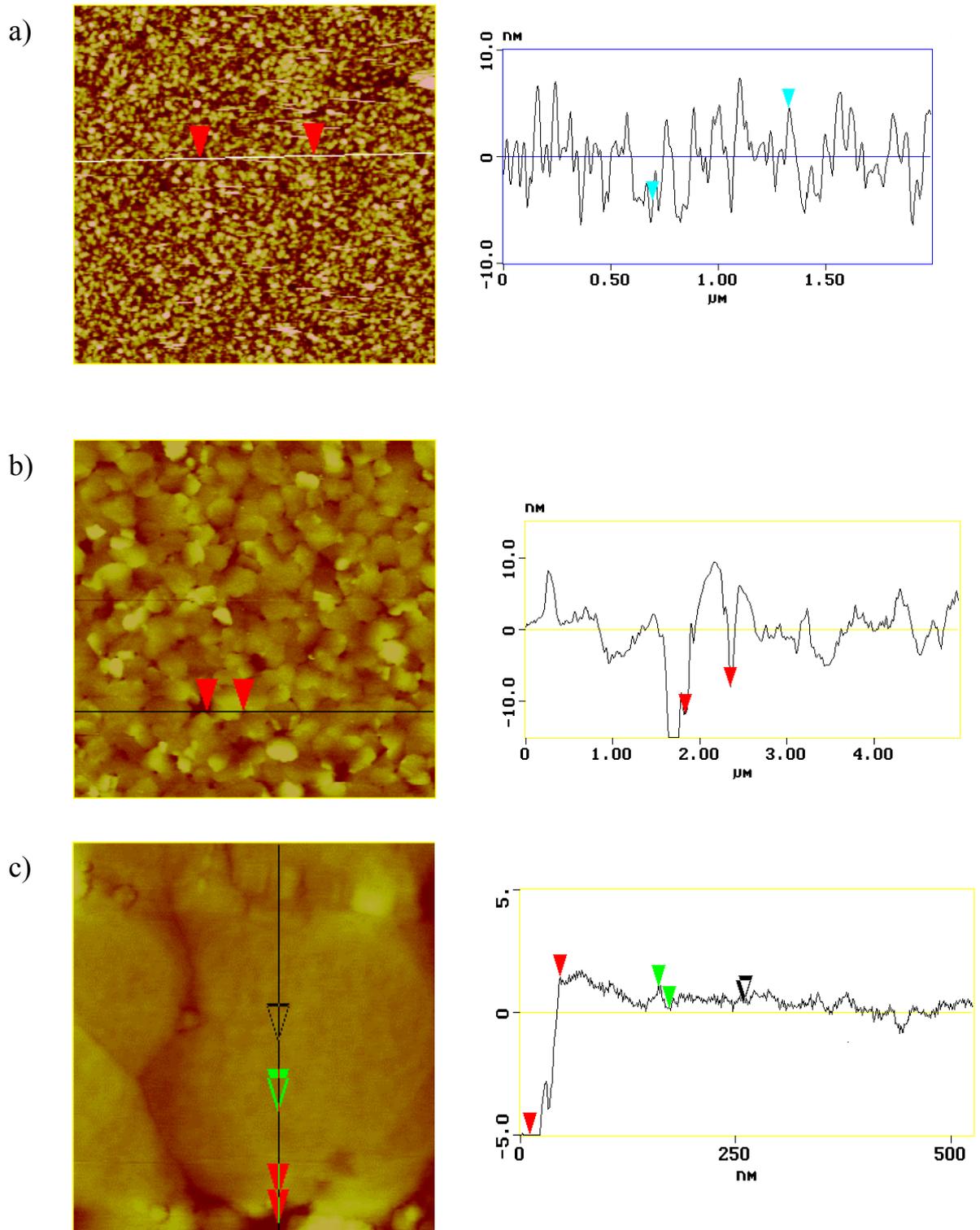


Abbildung 20: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen Goldoberflächen.

a) $2 \times 2\text{-}\mu\text{m}^2$ -Scan; ohne Tempern bei 300°C \Rightarrow mittlere Kristallitgröße ca. 50 nm.

b) $5 \times 5\text{-}\mu\text{m}^2$ -Scan, mit Tempern bei 300°C \Rightarrow mittlere Kristallitgröße ca. 250 nm.

c) Detail einer getemperten Goldoberfläche $0,5 \times 0,5\text{-}\mu\text{m}^2$ -Scan.

Neben der Rauigkeit sind die Hauptkriterien für die Qualität der Goldoberfläche die Reflektivität (n_s) und der komplexe Anteil der Reflektivität (k_s), die mittels Ellipsometrie bestimmt wurden. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse für die einzelnen Substrate aufgeführt. In der Literatur werden für die optischen Konstanten von Goldoberflächen die Werte $n_s = 0,186$ und $k_s = 3,400$ angegeben.^[100]

Tabelle 3: Gemessene n_s und k_s -Werte der Goldsubstrate. Die Messwerte wurden aus 3 - 4 Messpunkten gemittelt, die wiederum jeweils aus 5 Messwerten gemittelt wurden.

Substratnummer	Goldschichtdicke in nm	n_s	k_s
W 25	150	0,226	-3,341
W 26	150	0,233	-3,328
W 27	150	0,239	-3,325
W 33	150	0,198	-3,391
W 34	150	0,210	-3,363
W 37	150	0,174	-3,469
W 38	150	0,168	-3,477
W 39	150	0,168	-3,477
W 41	150	0,178	-3,404
W 42	150	0,201	-3,347
W 44	150	0,199	-3,354
W 45	150	0,155	-3,500
W 46	150	0,157	-3,494
W 49	150	0,154	-3,464
W 56	150	0,150	-3,475

4.1.2 Präparation der Monolagen

Bei der Bildung von SAMs handelt es sich um eine spontane Selbstorganisation oberflächenaktiver Moleküle an der Oberfläche. Da die Reinheit des Substrates von entscheidender Bedeutung ist, wurden entweder frisch präparierte oder gereinigte Substrate benutzt. Die polykristalline Goldoberfläche wurde zur Beschichtung unter Schutzgasbedingungen (N_2) in die Thiollösung überführt. Diese $10\ \mu\text{M}$ Lösung von 11-Hydroxyundecanthiol (HUT) in absolutem THF wurde unter Sauerstoffausschluss aufbewahrt und verhinderte somit eine Oxidation der Thiolgruppen. Für die Adsorption der Thiole auf die Goldoberfläche und die Selbstorganisation der Monolage wurde das Substrat für 16 Stunden bei Raumtemperatur in der Lösung beschichtet, wobei eine ausreichende Durchmischung der Flüssigkeit mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom erreicht wurde. Während dieser Zeit adsorbierten die Alkylthiole erst an das Substrat und organisierten sich mit steigender Pfropfungsdichte parallel zueinander an, bis ein Gleichgewicht von Adsorption und Desorption eingestellt war. Die dabei eingestellte maximale Belegungsdichte bestimmt über die jedem Molekül zur Verfügung stehende Fläche den Tiltwinkel der Alkylketten zur Oberfläche und damit auch die Schichtdicke der Monolage.

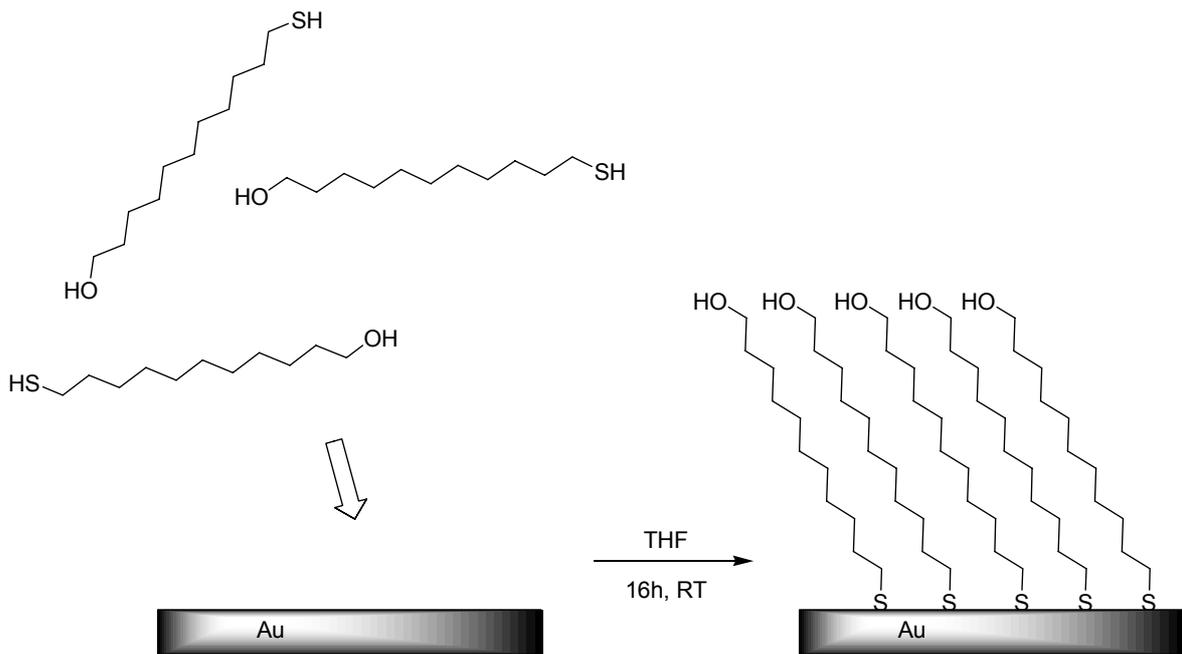


Abbildung 21: Bildung einer Alkylthiolmonolage auf einem Goldsubstrat.

Der Erfolg der Beschichtung der Goldoberfläche mit einer selbstorganisierten Monolage wird mit der Ellipsometrie kontrolliert.

Die terminale Hydroxyfunktion des HUT bildet nach dem Selbstorganisationsprozess die neue Oberfläche und steht damit für weitere Reaktionen zur Verfügung.

Die ermittelten Schichtdicken der HUT-Monoschichten unterschieden sich teilweise deutlich, was aber auf die spätere Polymerisation nur einen bedingten Einfluss hatte. Die Schichtdicke der Monolage wird in der Literatur mit 1,4 nm angegeben.^[100]

In Tabelle 4 ist exemplarisch die Mittelwertbildung für die Schichtdickenangabe der HUT-Schicht für das Substrat W 25 mit den gemessenen Ψ - und Δ -Werten angegeben. Die entsprechenden n_s - und k_s -Werte für die jeweiligen Substrate aus Tabelle 3 wurden für jedes Substrat bei der Schichtdickenberechnung eingesetzt.

Als Brechungsindex wurde für die Monoschichten in Anlehnung an den Brechungsindex in Substanz ein Wert von $n = 1,462$ angenommen.^[3]

Jeder der angegebenen Messwerte entspricht einem Messpunkt auf der Probe und ist ein Mittelwert von 5 Einzelmessungen.

Tabelle 4: Bestimmung des Mittelwertes der optischen Schichtdicke.

Ψ	Δ	Schichtdicke
in Grad	in Grad	in nm
43,026	105,878	0,90
43,097	105,810	0,98
43,209	106,192	0,61
43,175	106,044	0,76
Mittelwert der Schichtdicke in nm :		0,81 \pm 0,13

Nachfolgend wird jeweils der Mittelwert der optischen Schichtdicke für das Substrat angegeben, dem jeweils 20 Einzelmessungen zugrunde liegen. Die gemittelten Werte der HUT-Monoschichten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Berechnete optische Schichtdicken der HUT SAM.

Substratnummer	Schichtdicke
	in nm
W 25	0,81
W 26	0,58
W 27	0,81
W 34	3,95
W 38	1,62
W 53	0,97
W 54	1,08
W 55	1,11

Die Schichtdicke auf Substrat W 43 entspricht einer HUT Multischicht. Durch intensive Reinigung wird das HUT bis auf die Monolage wieder abgelöst, da die Multischichten nicht kovalent gebunden sind. Laut *Ulman et al.* haben homogene SAMs aus HUT eine Schichtdicke von $1,4 \pm 0,2$ nm.^[101] Diese Schichtdicke kommt durch gestreckte HUT-Moleküle mit einer leichten Neigung (Tilt-Winkel) zustande. Bei den Abweichungen der gemessenen Schichtdicken unterhalb von 1,4 nm liegt eine Submonolage der Alkylthiole vor, sie kam durch eine geringere Pflropfungsdichte und eine dadurch größere Neigung der Alkylketten zur Oberfläche hin zustande.

4.1.3 „Grafting from“-Polymerisation

Ausgehend von den HUT-Monoschichten werden die Hydroxyfunktionalitäten an der Oberfläche durch eine Veresterung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in die entsprechenden Initiatorfunktionen für die Polymerisation überführt. Nach der ellipsometrischen Messung der Schichtdicken wurden die frisch hergestellten Substrate in einen Reaktor überführt. Die Atmosphäre im Reaktionsgefäß wurde durch trockenen, sauerstofffreien Stickstoff ersetzt und einige Tropfen Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugefügt. Bei der Zugabe des Anhydrids wurde darauf geachtet, einen direkten Kontakt mit der selbstorganisierten Schicht zu vermeiden. Der Reaktor wurde verschlossen und der Flüssigkeitsfilm am Reaktorboden sowie die darüber befindliche Reaktionsatmosphäre wurden mit einem Magnetrührer gut durchmischt ohne die Flüssigkeit zu verspritzen. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Anhydrid sowie die entstandene freie Säure im Vakuum entfernt. Das Reaktionsschema der Veresterung der terminalen Hydroxyfunktion zur Synthese der oberflächengebundenen Initiatorfunktionalität ist in Abbildung 22 gezeigt.

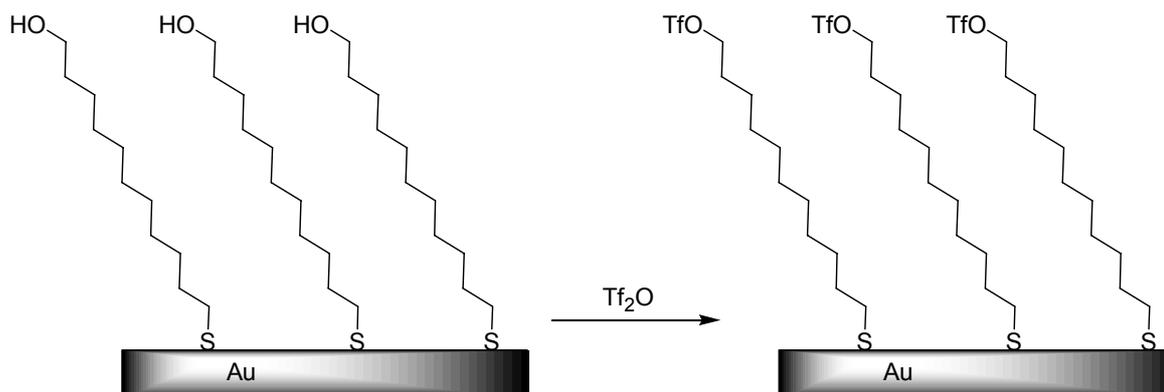


Abbildung 22: Gasphasenveresterung der 11-Hydroxyundecanethiol Monolage mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid.

In denselben Reaktor und zu den darin vorbereiteten SAM mit Triflat-funktionalitäten an der Oberfläche wurde sowohl das Monomer 2-Methyl-2-oxazolin bzw. 2-Ethyl-2-oxazolin, als auch das Lösemittel Acetonitril gegeben und druckdicht verschlossen. Das Reaktionsgefäß wurde in ein vorgeheiztes Ölbad (80°C) überführt.

Im Laufe der Polymerisation (siehe Abbildung 23) war meist eine leichte Verfärbung der Reaktionslösung nach Gelb und Orange zu beobachten.

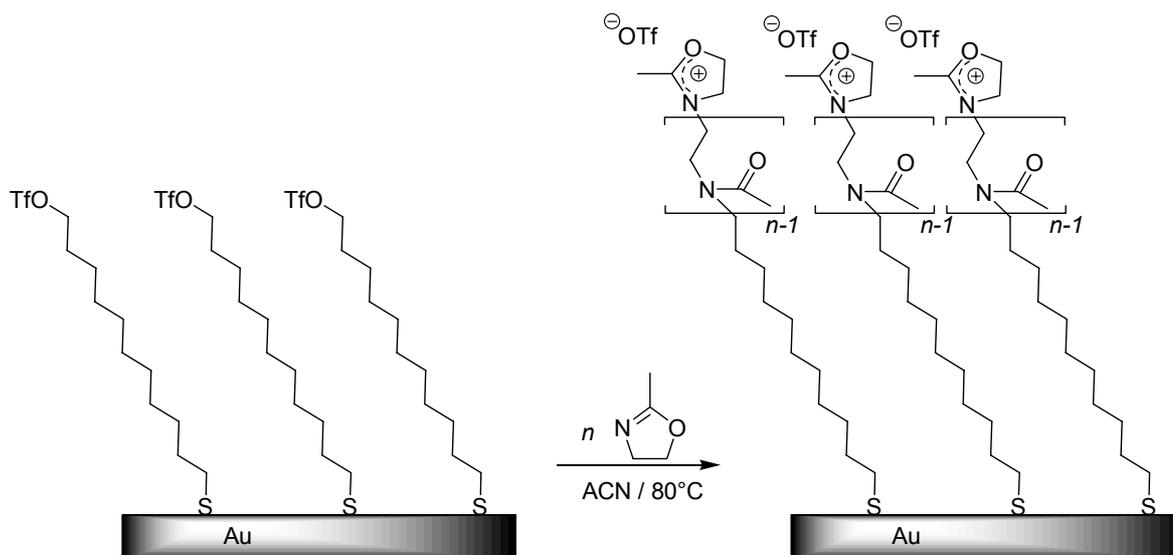


Abbildung 23: Oberflächeninitiierte Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin.

Am Ende der Reaktionszeit wurde der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine quantitative Endfunktionalisierung kann mit sekundären Aminen, in diesem Falle Piperidin, erreicht werden.

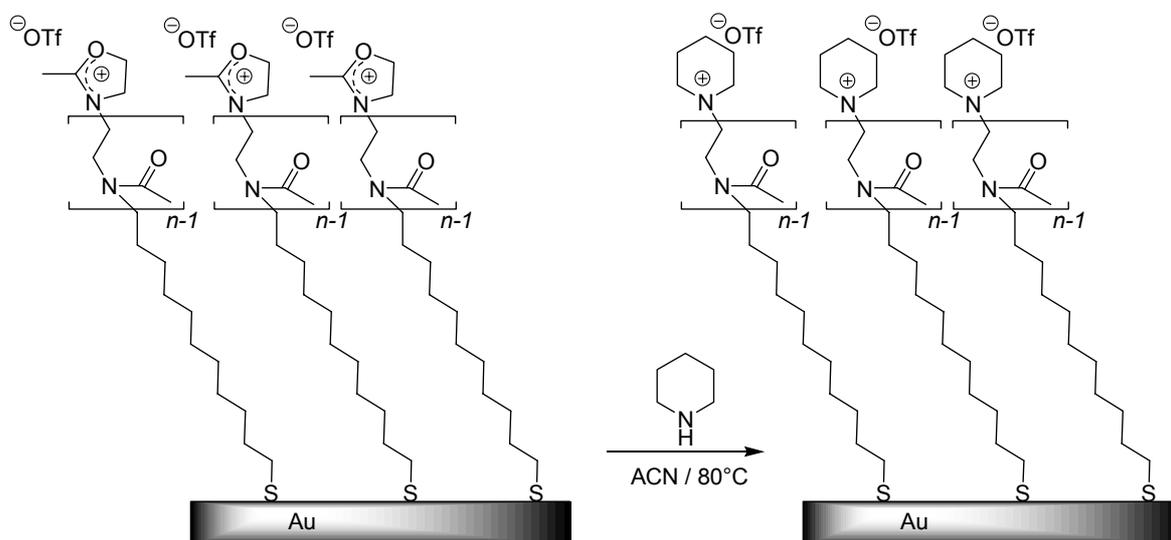


Abbildung 24: Endfunktionalisierung mittels der Abbruchsreaktion mit Piperidin.

Nach beendeter Reaktion wurden die Substrate aus dem Reaktor entfernt und

gründlich mit Aceton und Chloroform gespült. Dies entfernte letzte Monomerreste sowie physisorbiertes Poly(2-methyl-2-oxazolin), das durch Polymerisation in Lösung entstanden war.

Für die Berechnung der optischen Schichtdicke wurde für die Polymerschicht ein Brechungsindex von 1,520 angenommen.^[102] Die angegebenen Werte errechnen sich aus der ermittelten optischen Schichtdicke der Gesamtschicht abzüglich der Dicke der Thiolmonolage. Maximal wurde jedoch 1,40 nm als Wert für eine HUT Monolage von der gemessenen Gesamtschichtdicke abgezogen. Die so erhaltenen Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Berechnete Schichtdicken der Poly(2-alkyl-2-oxazolin)schichten.

Substratnummer	Monomer	Reaktionszeit Schichtdicke	
		in Tagen	nm
W 25	2-Ethyl-2-oxazolin	6	3,24
W 26	2-Ethyl-2-oxazolin	6	1,46
W 27	2-Ethyl-2-oxazolin	6	1,38
W 33	2-Ethyl-2-oxazolin	6	1,64
W 34	2-Ethyl-2-oxazolin	6	2,43
W 37	2-Ethyl-2-oxazolin	5	2,55
W 39	2-Ethyl-2-oxazolin	5	1,80
W 42	2-Methyl-2-oxazolin	10	4,62
W 44	2-Methyl-2-oxazolin	10	2,61
W 45	2-Methyl-2-oxazolin	14	3,98
W 46	2-Methyl-2-oxazolin	18	3,58
W 49	2-Methyl-2-oxazolin	17	3,60

Die Polymerisation nach der „grafting from“-Methode konnte zwar mit Erfolg durchgeführt werden, allerdings konnte die Schichtdicke durch die Reaktionsführung nicht kontrolliert werden. Die kationische Polymerisation ist sehr anfällig für nukleophile Verunreinigungen wie beispielsweise Wasser oder Amine. Auf einem planaren Substrat sind die Reaktionszentren in 2 Dimensionen verteilt und aus diesem Grund sind an der Reaktion, verglichen mit einer Polymerisation in Lösung, extrem geringe Stoffmengen beteiligt. Nachdem selbst kleinste Spuren von Verunreinigungen das lebende Kettenende terminieren, ist der Einfluss der Verunreinigungen bei Polymerisationen an Oberflächen deutlich größer. Im Laufe der Arbeiten ist es nicht gelungen, diese Verunreinigungen so weit zu reduzieren, dass eine gute Kontrolle über die oberflächeninitiierte Polymerisation gelang. Aus diesem Grund wurde der „grafting from“-Ansatz zum Aufbau von definierten Lipopolymerschichten für die Lipidmembranunterstützung mit hohen Pfropfungsdichten nicht weiter verfolgt.

4.2 Polymermonolagen nach der „grafting onto“-Methode

Eine Alternative zur „grafting from“-Methode bietet das „grafting onto“-Verfahren, bei dem die Polymere nicht direkt auf dem Substrat erzeugt werden, sondern in Lösung synthetisiert und in einem weiteren Schritt an das Substrat gebunden werden. Bei der Analytik der Polymere stehen alle standardmäßig in der Polymerchemie und organischen Synthese verwendeten Analysemethoden zur Verfügung. Außerdem kann man größere Produktmengen herstellen, was den Aufbau vergleichbarer Oberflächen ermöglicht, ohne die polymerisationsbedingten Probleme des „grafting from“-Verfahrens für jede Polymerschicht erneut bewältigen zu müssen. Die Polymerisation sollte weiterhin ermöglichen, die

Zusammensetzung der Polymere und somit die Morphologie der Polymerschichten zu kontrollieren. Im Laufe der Synthese muss sowohl eine Kopplungsgruppe für ein Substrat als auch eine Lipidfunktion an den Polymerkettenenden eingeführt werden können. Außerdem sollte für die polymerunterstützten Lipidmembranen ein wasserlösliches Polymer gewählt werden.

4.2.1 Baukastenprinzip der Poly(2-alkyl-2-oxazolin)e

Die Anforderungen an ein Polymersystem für den Einsatz in gepfropften Lipopolymeren für die Unterstützung von künstlichen Zellmembranen sind vielseitig. Alle diese Anforderungen erfüllt die lebend kationisch ringöffnende Polymerisation der 2-Oxazoline. Zudem erlaubt diese Polymersynthese, ähnlich einem Baukastensystem, strukturelle und chemische Variationen an nahezu allen Stellen (Abbildung 25).

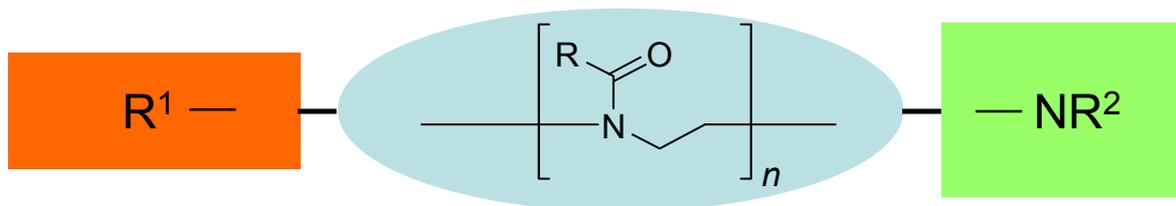


Abbildung 25: Baukastenprinzip bei der Polymerisation der 2-Oxazoline.

Die Bausteine dafür sind die Initiatoren (Variation an R^1), die Monomere (Variation an R) und die Abbruchreagenzien (Variation an R^2). Diese Vielfalt ermöglicht es, das Polymer für die gewünschte Anforderung maßzuschneidern. Angefangen bei den Initiatoren kann in diesem Fall ein entsprechend derivatisiertes Lipid verwendet werden und somit die Wechselwirkungen mit der Membran zu

optimieren (siehe Abbildung 8). Größe und Art des Lipides erlauben die Einstellung der hydrophilen lipophilen Balance (HLB) des Lipopolymers und somit die Anpassung des Aggregationsverhaltens an Grenzflächen. Im Membrankonstrukt übernimmt es die Stabilisierung der Membran durch Inkorporation. Eine Variation dieser Lipidkopfgruppe wird einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und Homogenität der Membran haben. Die Bindung an ein festes Substrat wird durch die Kopplungsfunktion am anderen Ende der Polymerkette realisiert.^[103] Auch die Wahl der Kopplungsgruppe und somit die Art der Bindung an das Substrat ist für eine geeignete Stabilität des Konstrukts wichtig. Bei der Wahl der Monomere wurden die beiden hydrophilen 2-Methyl-2-oxazolin und 2-Ethyl-2-oxazolin als geeignet erachtet, da sie beide die einfache Synthese von wasserlöslichen Polymeren mit gut kontrollierbarer Kettenlänge und engen Molekulargewichtverteilungen erlauben. Die Polymerkettenlänge hat wiederum direkten Einfluss auf die HLB des funktionalisierten Lipopolymers und bestimmt zudem die Dicke der Polymermonolage. Nachdem im Voraus nicht erkennbar war welche Zusammensetzung des Lipopolymers hinsichtlich Lipidkopfgruppe, Monomer und Polymerisationsgrad am besten für den Aufbau einer polymerunterstützten Lipidmembran geeignet ist, war eine große Flexibilität für der Synthese unterschiedlicher Lipopolymere wichtig für eine synthetische Annäherung an ein möglichst optimales System.

4.2.2 Synthese der Lipidinitiatoren

Die Lipopolymere sollen später mit einer Lipidgruppe in die Membran inkorporiert sein und auf diesem Weg das Membrankonstrukt stabilisieren. Für eine Erhöhung der Stabilität ist es deshalb notwendig, eine gute Mischbarkeit und sterische Verträglichkeit mit den Membranlipiden sicherzustellen. Es darf keine Phasenseparation von Lipopolymer und Lipiden bei der Einlagerung entstehen. Ein

weiteres Kriterium ist die chemische Beständigkeit der Lipopolymere. Lipide in biologischen Membranen bestehen in der Regel aus Estern der entsprechenden Fettsäuren und Glycerinderivaten. Nachdem Ester bei hohen bzw. niedrigen pH-Werten zur Hydrolyse neigen, werden für die Synthese der Polymere Etherlipidinitiatoren verwendet. Die verwendeten Lipide sind somit stabil unter den Reaktionsbedingungen sowohl der Initiatorsynthese als auch während der Polymerisation und ermöglichen außerdem eine gute Langzeitstabilität.

Als gute Initiatoren für die Polymerisation von 2-Oxazolinen sind die Trifluormethansulfonsäureester bekannt, die direkt aus Alkoholen herzustellen sind.^[104] Bei größeren Polymerisationsgraden und einkettigen Lipidfunktionen ist die HLB stark auf der hydrophilen Seite und ein LB-Übertrag ist nicht mehr möglich, da sich die Lipopolymere nicht stabil an der Wasser/Luft-Grenzfläche organisieren können, sondern sich in der Wassersubphase lösen. Als Alternative können sterisch anspruchsvolle Lipide mit zwei Alkylketten gewählt werden. Diese beeinflussen auch bei längeren hydrophilen Polymerketten die HLB derartig, dass stabile LB-Schichten erzeugt werden können. Des Weiteren ähneln sie strukturell den natürlichen Lipiden und gewährleisten somit eine gute Einbindung der Lipopolymeranker in die Membran. Die doppelt veretherten Glycerinderivate, die gleichzeitig noch eine freie Alkoholfunktion für die Überführung in das Triflat besitzen, sind für die Synthese der Lipopolymere bestens geeignet.

4.2.2.1 Dioctadecylglycerylinitiator

Bei den natürlichen Lipiden ist häufig ein hoher Anteil an Stearinsäure enthalten. Nachdem in dieser Arbeit bei der Lipopolymersynthese aus Stabilitätsgründen nur Etherlipide Verwendung finden sollten, wurde der Diether des homologen Octadecanols verwendet. Dieses 2,3-*O*-Dioctadecylglycerol ist kommerziell erhältlich und kann direkt in das entsprechende Triflat überführt werden (vgl. Abbildung 26).^[105]

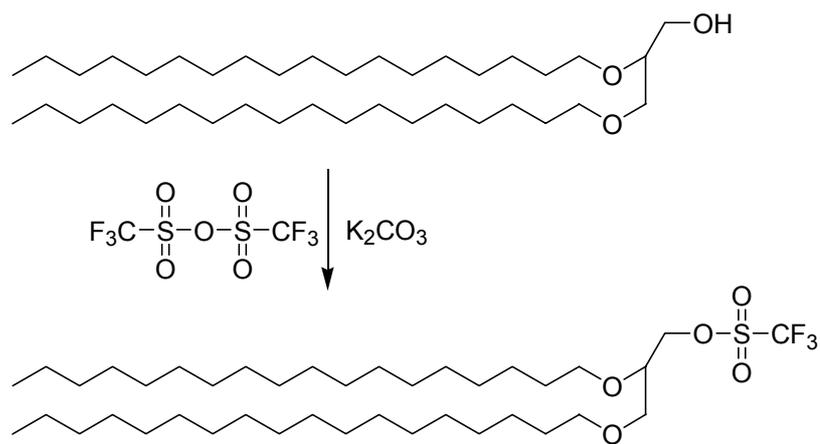


Abbildung 26: Triflatisierung von 2,3-O-Dioctadecylglycerol.

Der Alkohol wird dazu in Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Bei langsamer Zugabe von Triflatanhydrid wird die Reaktionslösung intensiv durchmischt. Ein quantitativer Umsatz des Alkohols in den entsprechenden Trifluormethansulfonsäureester wird durch einen Überschuss des Anhydrids und eine geeignete Reaktionsführung erreicht. Die Lösung war bei Reaktionsbeginn auf 0 °C gekühlt und wurde über Nacht auf Raumtemperatur äquilibriert. Für die Reinigung des feuchtigkeitsempfindlichen Produktes wurde das Carbonat abfiltriert und das überschüssige Triflatanhydrid im Ölpumpenvakuum entfernt. Letzte Spuren des Anhydrids und anderer flüchtiger Verunreinigungen wurden durch eine Gefriertrocknung mit Benzol entfernt. Das erhaltene Triflat liegt als farbloser Feststoff vor. Die quantitative Umsetzung wurde mittels NMR nachgewiesen.

4.2.2.2 *Phythanolinitiator*

Das Dioctadecylglycerol birgt hinsichtlich der Verträglichkeit mit den natürlichen Lipiden der Membran die Gefahr der Kristallisation bzw. einer Phasenseparation und somit zu Inhomogenitäten im Membrankonstrukt. Diese

Inhomogenitäten bewirken eine Störung der Diffusion in der Membran oder verhindern die Bildung einer homogenen Membran. Eine Erniedrigung des Schmelzpunktes des Lipids durch den Einsatz verzweigter Alkylketten sollte diesbezüglich eine Verbesserung bringen. Solche Alkylketten werden in der Natur auch von Bakterien verwendet, die unter extremen Bedingungen leben, den sog. Extremophilen oder Archaeobakterien. Zum Einsatz kommen dabei hauptsächlich 3,7,11,15-Tetramethylhexadecanyl-derivate. Die Verzweigungen erhöhen den sterischen Anspruch der Alkylkette sowie den hydrophoben Charakter und erniedrigen gleichzeitig den Schmelzpunkt. Der einfachste Vertreter ist das 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol, das sog. Phythanol. Dieses konnte durch Hydrierung der Doppelbindung aus dem kommerziell erhältlichen Phytol (3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) erhalten werden. Bei ersten Hydrierungsversuchen wurde ein Palladiumkatalysator verwendet, bei dem das Metall auf der Oberfläche von Aktivkohle abgeschieden ist. Dieser Katalysator hat allerdings einen leicht sauren Charakter. Bei der Hydrierung erhält man quantitativ das 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan (Abbildung 27), das vermutlich durch Hydrierung der Doppelbindung, Eliminierung von Wasser und nochmaliger Hydrierung der so gebildeten Doppelbindung entstanden ist.

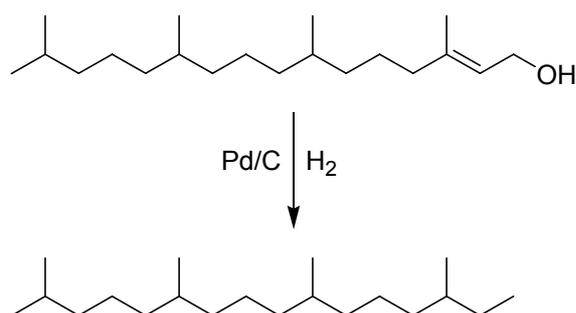


Abbildung 27: Hydrierung des Phythols mit Pd/C.

Der genaue Reaktionsablauf wurde nicht näher untersucht. Das gewünschte

Phytanol konnte allerdings mit einem etwas basischeren Hydrierungskatalysator, dem Raney-Nickel, erhalten werden (Abbildung 28).^[106] Eine hohe Wasserstoffkonzentration in der Lösung wurde durch mehrmaliges Evakuieren und Spülen des Reaktionsgefäßes mit Wasserstoff erreicht. Dieser Schritt wurde im Laufe der Reaktion häufiger durchgeführt, was eine hohe Wasserstoffkonzentration in der Reaktionslösung und somit auch am Katalysator über die gesamte Reaktionszeit sicherstellen sollte. Während der Reaktion wurde auf eine gute Durchmischung der Reaktionslösung geachtet; damit wurde die Diffusion des Wasserstoffs aus der Gasphase in die Flüssigkeit erleichtert.

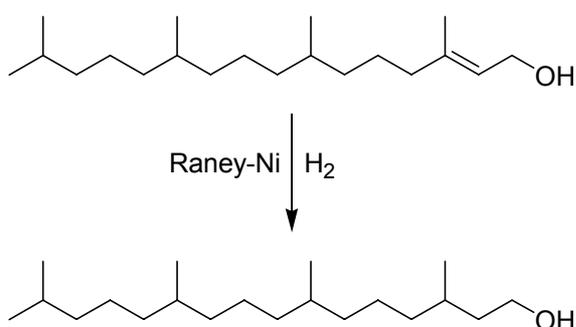


Abbildung 28: Hydrierung des Phytols mit Raney-Nickel.

Die Aufreinigung erfolgte durch Abfiltrieren des Katalysators und Entfernen des Lösemittels im Ölpumpenvakuum. Eine quantitative Hydrierung war nach 3 Tagen Reaktionszeit erreicht.

Die Synthese des Initiators erfolgte analog der oben genannten Synthese des 2,3-*O*-Dioctadecylglyceryltriflats mit Triflatanhydrid bei 0 °C (vgl. Abbildung 29).

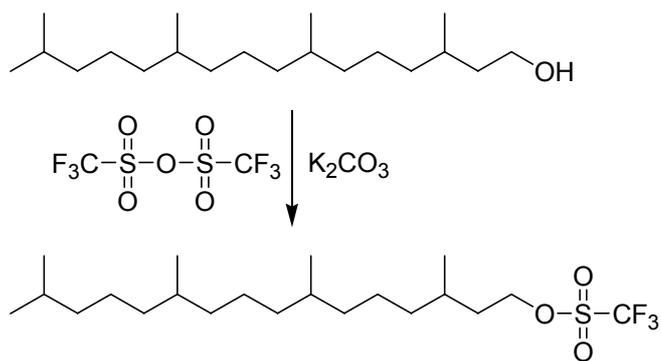


Abbildung 29: Triflatisierung von 3,7,11,15-Tetramethylhectadecanol.

Das Triflat kann mit quantitativen Ausbeuten erhalten werden und bedarf außer der Entfernung der unlöslichen und der flüchtigen Bestandteile keiner weiteren Aufreinigung. Das Phytanyltriflat fällt als leicht braun gefärbtes Öl an und muss vor Hydrolyse gegen Luftfeuchtigkeit geschützt werden.

4.2.2.3 Diphytanylinitiator

Der Phytanolinitiator ist als einkettiger Kohlenwasserstoff mit Verzweigungen sterisch anspruchsvoller als lineare Alkylketten. In natürlichen Membranen sind allerdings nur zweikettige Lipide enthalten, und dieser Punkt ist für die Stabilisierung der Membran mittels Lipopolymeren von Bedeutung. Eine Verdoppelung der Alkylketten hat einen deutlichen Einfluß auf die HLB des Lipopolymers. Es ist zu erwarten, dass ein inkorporiertes Lipid mit zwei Alkylresten stärker in der Membran gebunden ist als ein entsprechendes einkettiges Lipid. Lipopolymere mit kleinem Lipidrest zeigen vor allem bei größeren Polymerkettenlängen eine Instabilität an der Wasser/Luft Grenzfläche, da das hydrophile Polymer das Lipid in die Wassersubphase ziehen kann. Den genannten Problemen bei kleinen Lipiden und n-Alkylseitenketten wurde mit der Synthese des

2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol (Abbildung 30) begegnet.

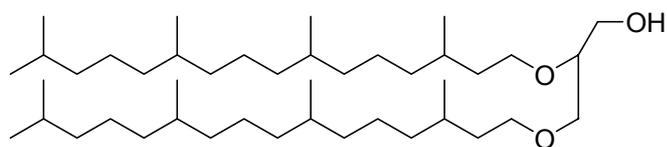


Abbildung 30: 2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol (Archaeol)

Dieses Lipid kommt als entsprechender Phosphorester auch in der Natur vor. Es ist eines der häufigsten Lipide in den Membranen der Extremophilen. Nachdem das 2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol das am weitesten verbreitete Lipid der Archaeen ist, wird es auch Archaeol genannt. Bei dessen Synthese wird von dem vorher beschriebenen Phytanol ausgegangen, das durch Umsetzung mit Methansulfonsäurechlorid in das entsprechende Mesylat, eine gute Abgangsgruppe, überführt wird (Abbildung 31).

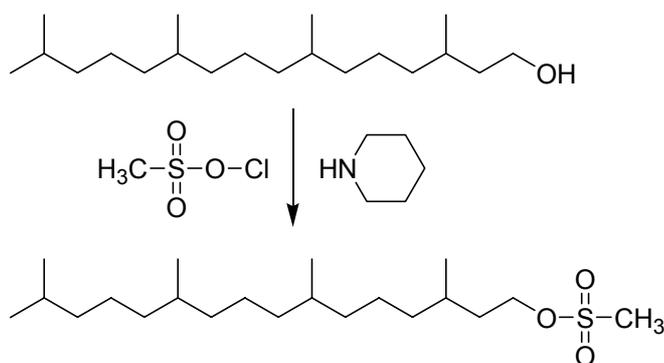


Abbildung 31: Synthese des Methansulfonsäurephytanylester.

Über eine klassische Williamson-Ethersynthese konnte die Bindung von zwei Phytanolresten an das 1-Benzylglycerol erfolgen (Abbildung 32). Dafür wurden die

freien Hydroxyfunktionen mittels NaH quantitativ deprotoniert. Durch die Zugabe des Methansulfonsäurephytanylester konnten dann die Etherbindungen gebildet werden.

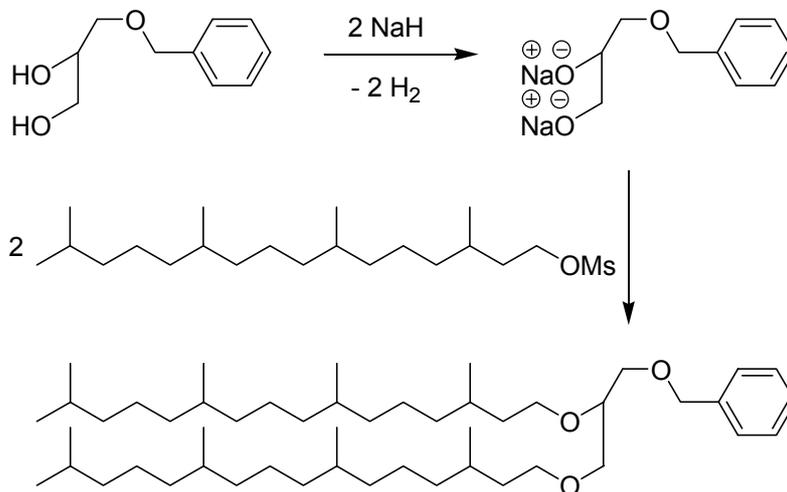


Abbildung 32: Synthese des 1-Benzyl-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol.

Zur Aufreinigung wurde das entstandene 1-Benzyl-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol extrahiert und anschließend säulenchromatographisch von den Nebenprodukten getrennt. Die Benzylschutzgruppe des Glycerins wurde anschließend reaktiv abgespalten. Hierfür wurde analog der Hydrierung des Phytols mit Palladiumkohle verfahren (Abbildung 33). Wichtig für eine quantitative Abspaltung ist eine hohe Konzentration des Wasserstoffs in der flüssigen Phase. Dies wurde ohne großen apparativen Aufwand durch eine starke Durchmischung der Lösung und häufiges Evakuieren und anschließendes Begasen mit Wasserstoff erreicht.

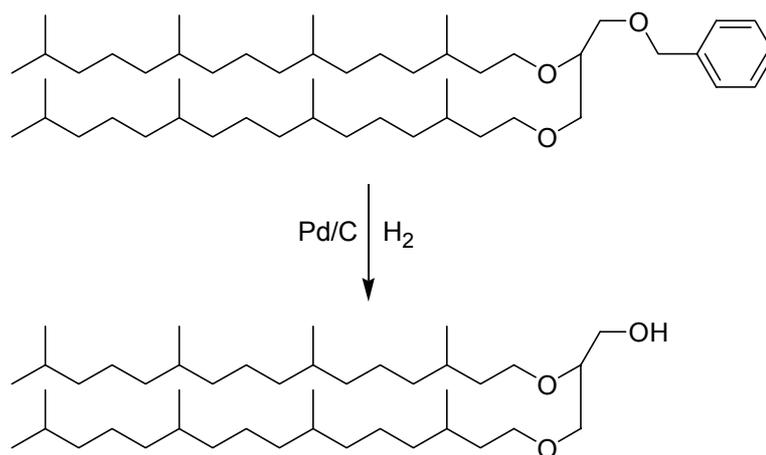


Abbildung 33: Entschützung des 1-Benzyl-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl) glycerol.

Nach 4 Tagen war die Reaktion beendet und eine säulenchromatographische Reinigung ergab das gewünschte Archaeol mit einer Gesamtausbeute von 60% bezogen auf das 1-Benzylglycerol.

Auch in diesem Fall wurde die durch die Entschützung wieder freie Alkoholfunktion in den Trifluormethansulfonsäureester überführt, wie in Abbildung 34 dargestellt.

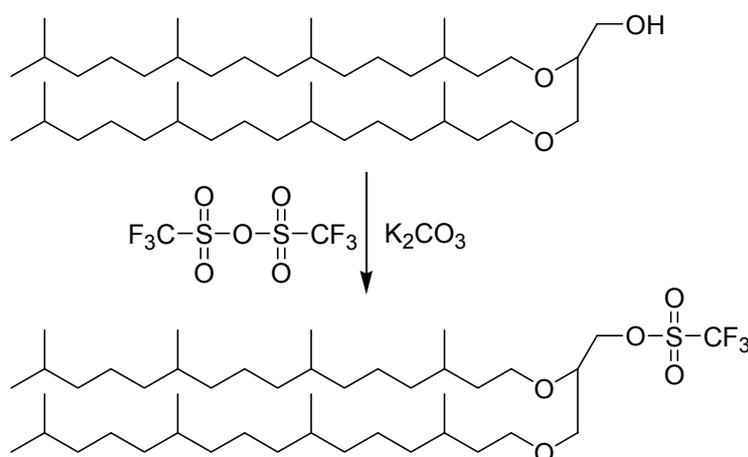


Abbildung 34: Triflatisierung von 2,3-O-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol.

Die Reaktionsführung erfolgte analog der vorher beschriebenen Arbeitsweise. Bei Zugabe des Triflatanhydrids war eine leichte Rotfärbung der Reaktionslösung zu beobachten. Im Laufe der Reaktion intensivierte sich diese Verfärbung bis zu einem dunklen Braun, das sich gegen Ende der Reaktionszeit wieder zu einem schwachen Gelb entfärbte. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man den Initiator als braunes Öl. Trotz der Färbung konnten keine Hydrolyseprodukte des Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerylester festgestellt werden.

4.2.3 Polymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolinen

Aufgrund des lebenden Charakters der Polymerisation der 2-Oxazoline bietet diese Monomerklasse die Möglichkeit, bei quantitativem Umsatz die Kettenlänge des Polymers über das Monomer zu Initiator Verhältnis einzustellen. Darüber hinaus ist es möglich, durch geeignete Initiatoren und Abbruchreagenzien eine gezielte Endfunktionalisierung der Polymere an beiden Enden zu erreichen und somit Telechele zu synthetisieren.

Die Triflate sind als sehr gute Initiatoren der kationischen Polymerisation der 2-Oxazoline bekannt und sollten enge Molmassenverteilungen der Polymere erlauben. Für die Polymerisation wurde der entsprechende Initiator (Lipidtriflat) in einem druckfest verschließbaren Reaktor vorgelegt und das Lösemittel zugegeben. Die Initiatorlösung wurde vor der Zugabe des Monomers auf 0 °C gekühlt, um einen vorzeitigen Start der Polymerisation während der Zugabe des Monomers zu unterbinden. Ein gleichzeitiger Start der lebenden Polymerisation ist für die Synthese von Polymeren mit niedrigem PDI entscheidend. Bei den ersten Polymerisationen wurde, wie bei den „grafting from“-Polymeren Acetonitril als Lösemittel verwendet. Nachdem sich die hydrophoben Lipidinitiatoren aber erst bei

erhöhten Temperaturen in Acetonitril vollständig auflösten, wurden alle übrigen Polymerisationen in Chloroform durchgeführt.

Der gekühlten Lösung des Initiators wurde das Monomer zugegeben und der Reaktor druckdicht verschlossen. Die Polymerisation wurde gestartet, indem der Reaktor aus dem Eisbad direkt in ein vortemperiertes Ölbad überführt wurde. Auch eine intensive Durchmischung der Reaktionslösung musste sichergestellt werden. Dies sollte ein möglichst homogenes Aufheizen des Lösemittels bewirken und somit den gleichzeitigen Start des Polymerkettenwachstums an allen Initiator-molekülen erreichen.

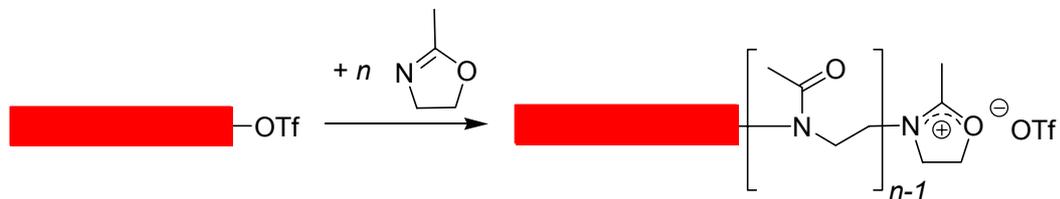


Abbildung 35: Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin.

Diese Vorgehensweise erlaubt es, Polymere mit sehr engen Molekulargewichtsverteilungen zu realisieren. Somit haben die Polymere später in der Polymermonolage eine nahezu gleiche Länge, was den Aufbau von homogenen Polymerschichten mit einheitlicher Schichtdicke erlaubt. Die Temperatur des Ölbad betrug bei Acetonitril $80\text{ }^\circ\text{C}$, bei Chloroform wurde sie zwischen $65\text{ }^\circ\text{C}$ und $55\text{ }^\circ\text{C}$ variiert. Die niedrigeren Temperaturen verlangsamten zwar die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich, sollten aber Nebenreaktionen wie z.B. Kettenabbruch oder Kettenübertragung auch bei höheren Polymerisationsgraden einschränken. Auf diesem Weg konnte eine Polydispersität von 1,3 bei einem Polymerisationsgrad von 100 realisiert werden. Die Reaktionszeiten wurden dem gewünschten Polymerisationsgrad und der Temperatur angepasst und betragen zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen. Nach beendeter Reaktionszeit wurde der Reaktor

möglichst schnell in ein Eisbad überführt und somit ein weiteres Polymerwachstum unterbunden. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe des Trimethoxyaminopropylsilans terminiert (Abbildung 36).

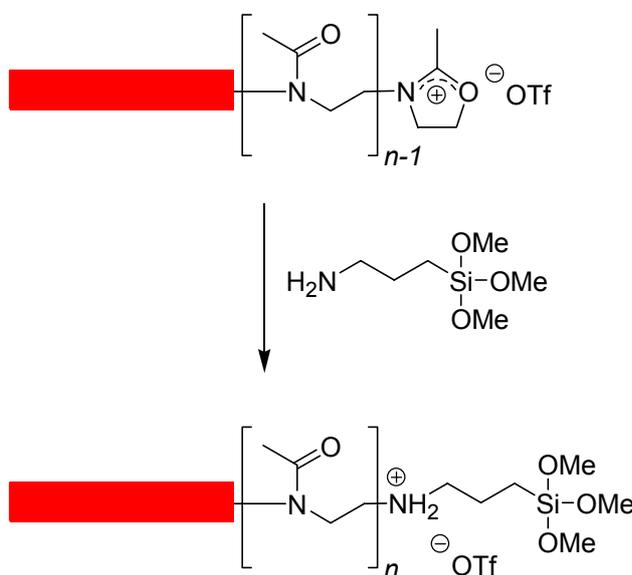


Abbildung 36: Endfunktionalisierung mit Trimethoxyaminopropylsilan.

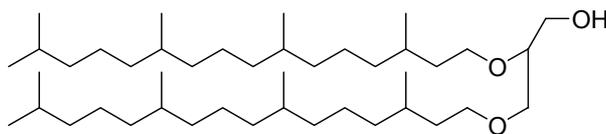
Die Silankomponente wurde vor der Abbruchreaktion frisch von den durch Polykondensation gebildeten Oligomeren abdestilliert. Der Abbruch von zwei lebenden Kettenenden durch ein Trimethoxyaminopropylsilan wurde durch Zugabe des Abbruchreagenzes im hohen Überschuss vermieden. Die Reaktion fand über Nacht bei Raumtemperatur statt. Die Reinigung des Lipopolymers erfolgte durch Fällen in Ethylether. Hierfür wurde die Reaktionslösung nach der Abbruchreaktion zu einer viskosen Polymerlösung eingeeengt. Aus dieser Lösung wurde das Polymer in gekühltem Ether ausgefällt und anschließend filtriert. Das Trifluormethansulfonat wurde durch Lösen des Polymers in Chloroform und Rühren mit Kaliumcarbonat entfernt. Nochmaliges Ausfällen des Polymers mit anschließender Gefriertrocknung ergab das gewünschte Polymer in Form eines farblosen Pulvers, das unter striktem Ausschluss von Luftfeuchtigkeit gelagert wird. Auf Grund der Hygroskopie des

2-Methyl-2-oxazolins wird leicht Wasser aus der Luft durch die Polymere aufgenommen und führt bei längerer Lagerung zu Polykondensation der Silankopplungsgruppen und somit zur Vernetzung der Polymere. Auf diesem Weg vernetzte Lipopolymere sind unlöslich und können nicht weiter verwendet werden.

4.2.4 Membranspannendes Lipid aus Archaeobakterien

Eine Sonderstellung im Reich der Lebewesen stellen die Bakterien in extremen Lebensräumen wie z.B. heißen Schwefelquellen dar. Die Extremophilen, auch Archaeen genannt, können unter Extrembedingungen existieren. Diese Bedingungen müssen natürlich auch die Zellmembranen der Archaeen überstehen. Die Zellmembranen bestehen nicht aus Glycerinestern, sondern aus den entsprechenden Ethern und besitzen außerdem Lipide in Form eines Makrozyklus mit zwei Glycerinen (vgl. Abbildung 37 unten). Das Lipid durchspannt die Bakterienmembran und trägt so über Wechselwirkungen auf beiden Seiten der Membran zur Stabilisierung der Membran bei.

Archaeol



Caldarchaeol

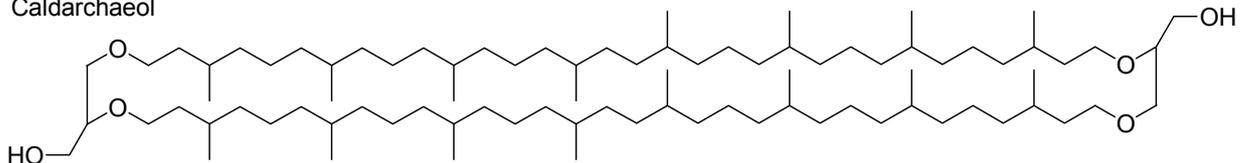


Abbildung 37: Die häufigsten Lipide in Zellmembranen von Archaeen.

Aufgrund der Häufigkeit der in Abbildung 37 gezeigten Lipide in der Membran des Methanobacterium Thermoautotrophicum delta H sind diese eine ideale Quelle für das Caldarchaeol. Deshalb wurde versucht, dieses Lipid aus dem Bakterium zu extrahieren. Zellmasse des Bakteriums wurde vom Archaeozentrum der Universität Regensburg erhalten und gefriergetrocknet. Im Anschluss wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und in einer „French Press“ wurden die Zellen aufgebrochen. Das Lipid wurde daraufhin nach einer Modifikation der *Blight-Dyer* Prozedur^[107] extrahiert.^[108] Hierzu wurde die aufgebrochene Zellmasse mit Chloroform, Methanol und Wasser mehrmals extrahiert. Die abzentrifugierten Zellreste wurden für mehrere Tage mit Chloroform und Methanol in einer Soxhlett-Apparatur extrahiert. Nachdem die organischen Phasen vereint wurden, konnten die Phospholipide in Hexan ausgefällt werden. Nach einer Hydrolyse der Phospholipide mit Salzsäure konnte das gewünschte Lipid durch säulenchromatographische Reinigung allerdings nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten werden. Die geringe Ausbeute war auf eine unzureichende Hydrolyse zurückzuführen. Der Einsatz des Caldarchaeol in der Synthese von funktionalisierten Lipopolymeren und Untersuchungen zur Stabilisierung von polymerunterstützten Lipidmembranen sind Gegenstand weiterführender Arbeiten.

4.2.5 Funktionalisierte Lipopolymere

Auf dem oben beschriebenen Weg ist eine ganze Reihe unterschiedlicher Lipopolymere synthetisiert worden. Hierbei spielte nicht nur der Unterschied in den Lipidkopfgruppen eine wichtige Rolle, sondern auch die Polymerkettenlänge, welche in dem Membransystem den Abstand zwischen Substrat und Membran einstellen sollte. Der Polymerisationsgrad wird dabei durch das Stoffmengenverhältnis von Monomer zu Initiator eingestellt und ist in Tabelle 7 für die jeweiligen Polymere angegeben. Die Monomereinheiten hingegen sollten für den

Einsatz in den Membranen hydrophil sein. Untersuchungen von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)en an der Wasser/Luft-Grenzfläche zeigten eine geringe, jedoch unerwünschte Amphiphilie der Monomereinheiten durch die Ethylseitengruppen.^[109] Diese bewirkt, dass sich die Ethylseitengruppen bei niedrigem Filmdruck an der Wasser/Luft-Grenzfläche organisieren. Nachdem die Polymerschicht einen rein hydrophilen Charakter haben sollte wurde bei der Lipopolymersynthese ausschließlich mit 2-Methyl-2-oxazolin als Monomer gearbeitet. Als Kopplungsgruppe zum Substrat dient eine Trimethoxysilanfunktion an einem Propylamin (Sil abgekürzt). Sie wurde nur einmal, bei dem PhyPMO_x₁₂Pip, mit Piperidin variiert. In Tabelle 7 sind außer dem eingestellten Monomer zu Initiator Verhältnis auch alle synthetisierten Polymere mit den entsprechenden Initiatorlipiden, dem verwendeten Lösemittel, sowie Polymerisationstemperatur und -zeit angegeben. Bei der Synthese von Poly-2-oxazolin mit größeren Polymerisationsgraden wurden Kettenübertragungen und eine damit einhergehende Verbreiterung des PDI beschrieben.^[110,111] Zur Minimierung der Übertragungen wurden die Polymere mit einem Monomer zu Initiator Verhältnis bei 55°C für deutlich längere Zeit polymerisiert.

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen der synthetisierten Polymere.

Polymer	Initiator	$[M]_0/[I]_0$	Lösemittel	Temperatur in °C	Reaktionszeit in h
MePMO _{x13} Sil	Me-OTf	16	CHCl ₃	60	35
MePMO _{x22} Sil	Me-OTf	24	CHCl ₃	60	28
PhyPMO _{x12} Sil	Phy-OTf	10	CHCl ₃	60	24
PhyPMO _{x12} Pip	Phy-OTf	10	CHCl ₃	60	24
PhyPMO _{x21} Sil	Phy-OTf	20	CHCl ₃	60	40
PhyPMO _{x32} Sil	Phy-OTf	30	CHCl ₃	60	48
Phy ₂ PMO _{x11} Sil	Phy ₂ -OTf	10	CHCl ₃	60	30
Phy ₂ PMO _{x21} Sil	Phy ₂ -OTf	20	CHCl ₃	60	40
Phy ₂ PMO _{x43} Sil	Phy ₂ -OTf	40	CHCl ₃	60	50
Phy ₂ PMO _{x75} Sil	Phy ₂ -OTf	80	CHCl ₃	55	312
2C ₁₈ PMO _{x12} Sil	2C ₁₈ -OTf	10	ACN	80	11
2C ₁₈ PMO _{x14} Sil	2C ₁₈ -OTf	10	CHCl ₃	60	20
2C ₁₈ PMO _{x17} Sil	2C ₁₈ -OTf	15	ACN	80	20
2C ₁₈ PMO _{x18} Sil	2C ₁₈ -OTf	20	CHCl ₃	60	40
2C ₁₈ PMO _{x33} Sil	2C ₁₈ -OTf	40	CHCl ₃	60	50
2C ₁₈ PMO _{x104} Sil	2C ₁₈ -OTf	100	CHCl ₃	55	360

Die Abkürzungen für die Polymere wurden folgendermaßen gewählt: Die Lipide sind mit 2C₁₈ für das 1,2-*O*-Dioctadecyl-*sn*-glyceryl, Phy für das Phythanoyl und Phy₂ für das 1,2-*O*-Diphythanyl-glyceryl abgekürzt, sowie Me für Methyl. Das Poly(2-methyl-2-oxazolin) wird mit PMO_x bezeichnet. Der Polymerisationsgrad wird in den Index gesetzt. Die Silankopplungsgruppe wird mit einem Sil beschrieben. Ein Poly(2-methyl-2-oxazolin) mit einem Polymerisationsgrad (bestimmt nach einer NMR-Endgruppenanalyse) von 12, einer 1,2-*O*-Dioctadecyl-*sn*-glyceryl Lipidfunktion und der Silankopplungsgruppe wird folglich 2C₁₈PMO_{x12}Sil abgekürzt.

Die Polymerkettenlänge, wie sie in der Nomenklatur der Polymere verwendet

wurde, ist anhand der NMR-Spektroskopie ermittelt worden. Es wurde eine Endgruppenanalyse durchgeführt, bei der die Verhältnisse der Integrale der Alkylendgruppen mit denen der Polymerkette ins Verhältnis gesetzt wurden. In Abbildung 38 sind die Signale der Phy_2 -Endgruppe bei einer Verschiebung zwischen 0,7 ppm und 1,7 ppm zu erkennen. Die Signale in diesem Bereich entsprechen 78 Protonen der Alkylkette. Die Protonen der Methylgruppe des Monomers sind, polymerbedingt, verbreitert und im Bereich von 1,9 ppm bis 2,2 ppm zu finden. Die Polymerhauptkette und die darin vorkommenden vier Protonen liegen im NMR-Spektrum bei einer chemischen Verschiebung von 3,2 ppm bis 3,5 ppm.

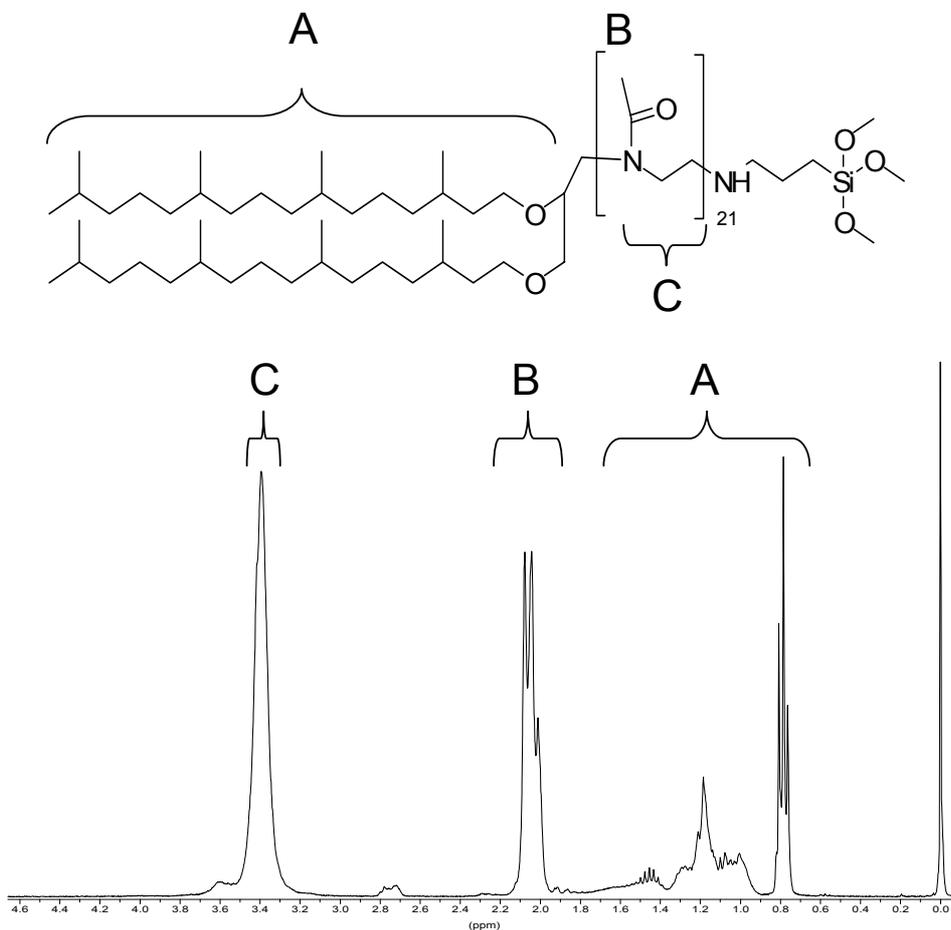


Abbildung 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des $\text{Phy}_2\text{PMO}_{x21}\text{Si}$ mit den für die Endgruppenanalyse verwendeten Signale.

Nachdem sich die berechnete Polymerkettenlänge beim Vergleich von Lipid und Methylseitengruppe bzw. Lipid und Polymerhauptkette oft etwas unterschieden, wurde immer der Mittelwert beider Berechnungsmethoden als Polymerkettenlänge verwendet. Die Werte sind in der Nomenklatur der Polymere in Tabelle 7 angegeben.

Der Polydispersitätsindex (PDI) wurde mittels der Gelpermeationschromatographie (GPC) gemessen. Als Laufmittel wurde dabei meist Chloroform, ein gutes Lösemittel für die Polymere, verwendet. Die Kalibrierung der GPC wurde mit Polystyrolstandards im Falle von Chloroform als Laufmittel und mit Polymethylmetacrylatstandards im Falle von Dimethylacetamid (DMAc) als Laufmittel durchgeführt. Die Detektion der Polymere erfolgte über die Änderung des Brechungsindex des Laufmittels im RI-Detektor. Das $2C_{18}PMOx_{104}Sil$ zeigte bei dem Laufmittel Chloroform keine Veränderung des Brechungsindex und musste deshalb mit DMAc als Laufmittel gemessen werden. Die mittels GPC erhaltenen Molekulargewichte waren aufgrund der Eichung mit Polystyrolstandards, bzw. Polymethylmethacrylatstandards nicht sehr aussagekräftig.^[112] Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die GPC repräsentative Aussagen über die Molmassenverteilung erlaubt. Die Ergebnisse der GPC-Messungen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Ergebnisse GPC-Messungen.

Polymer	Lösemittel	\overline{M}_n	\overline{M}_w	PDI
MePMO _{x13} Sil	CHCl ₃	777	958	1,23
MePMO _{x22} Sil	CHCl ₃	1279	1512	1,18
PhyPMO _{x12} Sil	CHCl ₃	1407	1582	1,12
PhyPMO _{x12} Pip	CHCl ₃	1337	1562	1,17
PhyPMO _{x21} Sil	CHCl ₃	2111	2440	1,16
PhyPMO _{x32} Sil	CHCl ₃	2348	2681	1,14
Phy ₂ PMO _{x11} Sil	DMAc	1777	1853	1,04
Phy ₂ PMO _{x21} Sil	CHCl ₃	1564	1681	1,07
Phy ₂ PMO _{x43} Sil	DMAc	4580	5305	1,16
Phy ₂ PMO _{x75} Sil	DMAc	8635	11789	1,37
2C ₁₈ PMO _{x12} Sil	CHCl ₃	1364	2104	1,54
2C ₁₈ PMO _{x14} Sil	CHCl ₃	855	933	1,09
2C ₁₈ PMO _{x17} Sil	CHCl ₃	2453	2858	1,17
2C ₁₈ PMO _{x18} Sil	CHCl ₃	1191	1582	1,33
2C ₁₈ PMO _{x33} Sil	CHCl ₃	1496	1950	1,30
2C ₁₈ PMO _{x104} Sil	DMAc	9369	12186	1,30

Die Polydispersitätsindices (PDI) der Polymere sind entsprechend dem lebenden Polymerisationsmechanismus mit Werten zwischen 1,04 und 1,37 sehr eng und selbst das Phy₂PMO_{x75}Sil und das 2C₁₈PMO_{x104}Sil mit hohen Polymerisationsgraden zeigen keine deutlich größeren PDI. Eine Ausnahme bildet das 2C₁₈PMO_{x12}Sil. Der PDI von 1,54 für dieses Polymer ist darauf zurückzuführen, dass es sich dabei um das erste synthetisierte Lipopolymer handelte und die einzelnen Arbeitsschritte noch optimiert werden mussten.

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts ist die matrixunterstützte Laserdesorption/ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie

(MALDI TOF-MS). Nachdem bei dieser Methode nicht mit einer Fragmentierung der Proben zu rechnen ist,^[103] kann die Polymerkettenlänge der einzelnen Moleküle berechnet werden. Aufgrund der Hygroskopie des 2-Methyl-2-oxazolins und einer Probenvorbereitung ohne Ausschluss von Luftfeuchtigkeit waren bei den beobachteten Verteilungen meist eine oder zwei der Methoxysilanfunktionen zu den entsprechenden Silanolgruppen hydrolysiert.

Tabelle 9: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS.

Polymer	Polymerisationsgrad	\overline{M}_n	\overline{M}_w	PDI
MALDI-TOF-MS				
MePMO _x ₁₃ Sil	12	1372	1488	1,08
PhyPMO _x ₁₂ Sil	13	1667	1775	1,06
PhyPMO _x ₁₂ Pip	13	1595	1692	1,06
PhyPMO _x ₂₁ Sil	18	2086	2272	1,09
Phy ₂ PMO _x ₁₁ Sil	9			
Phy ₂ PMO _x ₂₁ Sil	17	2351	2484	1,06
2C ₁₈ PMO _x ₁₂ Sil	15	1968	2072	1,05
2C ₁₈ PMO _x ₁₄ Sil	8	1469	1607	1,09
2C ₁₈ PMO _x ₁₈ Sil	18	2055	2288	1,01

Die mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Polymerisationsgrade aus der MALDI-MS (siehe Tabelle 9) sind zwar in der Größenordnung übereinstimmend mit denen nach der NMR-Endgruppenanalyse, bei den gefundenen Massen besteht jedoch eine Abweichung um bis zu 2,5 m/z vom theoretischen Wert. Nachdem die Abstände der Populationen meist zwischen 0,1 und 0,2 m/z von den theoretischen Massenschritten für 2-Methyl-2-oxazolin (85,05 g/mol) abweichen, sind die Unterschiede im Rahmen der Messgenauigkeit zu erklären. Die Polydispersitäten, bestimmt mittels MALDI-TOF-MS, sind deutlich geringer als die nach der GPC-

Methode gemessenen Werte. Aufgrund einer Diskriminierung von höheren Massen in der Massenspektroskopie und der Tatsache, dass nur Lipopolymere bis zu einem Polymerisationsgrad von 20 ionisiert und zum Fliegen gebracht werden konnten, sind diese Werte unter Vorbehalt zu werten.

4.2.6 Beschichtung nach der „grafting onto“-Methode

Für die selbstorganisierende Beschichtung mit den Lipopolymeren können alle Festkörper mit Hydroxylgruppen an der Oberfläche als Substrat dienen. Entscheidend für eine homogene Polymermonolage ist dabei die einheitliche Verteilung der Silanolgruppen auf der Siliziumdioxidoberfläche. Dem entsprechend wurde in dieser Arbeit mit geschnittenen Wafern aus Siliziumeinkristallen gearbeitet, die eine natürliche SiO₂-Schicht an der Oberfläche tragen. Alternativ wurden Glassubstrate verwendet.

4.2.6.1 RCA-Methode

Eine intensive Reinigung der Substrate sollte vor dem „grafting onto“-Prozess eine einheitliche Verteilung und Zugänglichkeit der Silanolgruppen sicherstellen. Dies ermöglicht eine einheitliche Pfropfung und minimiert Defekte und Inhomogenitäten in der Lipopolymermonolage. Zur Reinigung planarer SiO₂-Substrate sind zahlreiche Methoden bekannt, darunter vor allem nasschemische Säure- und/oder Basenbehandlungen sowie oxidative Plasmabehandlung. In dieser Arbeit wurde zur Vorbereitung der Substrate für die Pfropfung ausschließlich eine modifizierte Variante^[113] der von der amerikanischen Firma ‚RCA‘ entwickelten Methode^[114] angewendet. Zur Vorbehandlung wurden die Substrate mit einem weichen Tuch und Ethanol sowie Aceton abgewischt, bevor die RCA-Reinigung begonnen wurde. Der

erste Schritt des Verfahrens besteht aus einer basischen Desorption von organischen und anorganischen Verunreinigungen sowie einem kontrollierten Ätzen der Siliziumdioxidschicht. Diese wurde in einer Reinigungslösung aus Wasser, Ammoniak und Wasserstoffperoxid durchgeführt. Eine gute Reinigungswirkung wurde mit einer Ultraschallbehandlung bei 80°C Wasserbadtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser verdünnt und mehrmals mit reinem Wasser gespült. Die zweite Reaktionslösung, verdünnte Salzsäure mit Wasserstoffperoxid, wurde auf 80°C vortemperierte, bevor sie zum Substrat gegeben wurde. Auf der Substratoberfläche bewirkte sie eine oxidative Rehydroxylierung. Nach intensivem Spülen der Substrate mit Wasser wurden die Substrate direkt in das Gefäß für die Beschichtung überführt und möglichst schnell weiter verwendet. Die Einhaltung der Konzentrationen und Temperaturen ist für die Reproduzierbarkeit und möglichst geringe Oberflächenrauigkeit der Substrate wichtig.

4.2.6.2 Pffropfungsreaktion

Die synthetisierten Lipopolymere wurden über die trifunktionelle Silan-kopplungsgruppe an die Si/SiO₂-Substrate gebunden. Hierzu wurden frisch gereinigte Substrate aus Wasser schrittweise in trockenes Acetonitril überführt, bevor sie in die Reaktionslösung (Lipopolymer in trockenem Acetonitril) gebracht wurden. Bei einer Temperatur von 80 °C wurde das Substrat für eine Stunde im Ultraschallbad beschichtet. Nach der Beschichtungsreaktion war ein intensives Waschen der Substrate mit Acetonitril und Aceton nötig, da ansonsten die Bildung von Multischichten auftreten konnte.

4.3 *Aufbau der polymerunterstützten Lipidmembranen*^[115]

Die Monolage, der erste Schritt zur polymerunterstützten Lipidmembran, wurde nach dem „grafting onto“-Verfahren hergestellt und sollte, nach einer Vororientierung der Lipidkopfgruppen an der Oberfläche über die gezielte Quellung des hydrophilen Polymerteils in Wasser, eine Stabilisierung der Membran bewirken. Die Komplettierung der Membran sollte im Anschluss durch Erzeugung einer zweiten Lipidlage erreicht werden. Mittels einer Vesikelfusion wurde versucht, die zweite Lipidmonolage aufzubauen. Eine Vesikelfusion funktioniert über Wechselwirkungen der Lipidvesikel mit einer hydrophoben Lipidmonolage, die zur Öffnung des Vesikels und einem Abrollen der Lipidmonolage auf die Oberfläche führt. Die Fusion auf den nach der „grafting onto“-Methode hergestellten Lipopolymermonolagen konnte nicht erreicht werden.

4.3.1 **Kontaktwinkelmessungen an Lipopolymermonolagen**

Nachdem eine Vesikelfusion nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde die Dynamik bzw. Reorientierung der Oberfläche von Lipopolymermonolagen, die nach der „grafting onto“-Methode hergestellt worden sind, näher untersucht. Die Monoschichten aus einem hydrophilen Polymer mit hydrophoben Lipidengruppen sollte sich durch eine selektive Quellung in eine Lipidschicht und eine darunter liegende Polymerschicht, wie von *Jordan et al.* beschrieben,^[116,117] strukturieren lassen. Diese Strukturierung der Monoschicht sollte mittels Kontaktwinkelmessungen näher untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden dazu Wassertropfen ($V = 9\mu\text{L}$) für die statischen Kontaktwinkelmessungen an das Ende der Spritzennadel gehängt. Diese Spitze

wurde dann an die Oberfläche angenähert, bis der Tropfen an der Nadel abriss und auf dem Substrat auflag. Die Tropfenform wurde über eine Kamera erfasst und anschließend vom Computer analysiert. Dabei wird eine Ellipse an die Projektion der Tropfenform angepasst und der Winkel der Ellipsenlinie zur Oberflächenlinie an deren Berührungspunkt ermittelt.

Der Kontaktwinkel von Wasser an den gebildeten Lipopolymermonolagen wurde direkt im Anschluss an die Beschichtung nach der „grafting onto“-Methode und dem Waschen in Acetonitril gemessen. Die Substrate wurden danach in Aceton überführt und der Winkel wurde nach dem Verdunsten des Acetons nochmals gemessen. In Tabelle 10 sind die entsprechenden Werte der Kontaktwinkel angegeben.

Tabelle 10: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung.

Polymer	Kontaktwinkel nach waschen in Acetonitril	Kontaktwinkel nach waschen in Aceton
PhyPMO _x ₁₂ Sil	82°	85°
PhyPMO _x ₂₁ Sil	61°	68°
PhyPMO _x ₃₂ Sil	56°	64°

Die Behandlung der Monolagen mit Acetonitril, einem selektiven Lösemittel für den Polymerteil, sollte eine Strukturierung der Monolage bewirken. Die so strukturierte Oberfläche sollte deutlich hydrophober sein als eine unstrukturierte, wie sie durch Waschen der Monolage mit Aceton, einem guten Lösemittel für Polymer- und Lipidteil, erreicht wird. Diese Unterschiede konnten aber nicht festgestellt werden. Die Kontaktwinkel nach der Acetonbehandlung waren sogar geringfügig höher als die nach der Acetonitrilbehandlung. Ein eindeutiger Trend der Verringerung des Kontaktwinkels war hingegen mit steigender Polymerkettenlänge

der Lipopolymere festzustellen. Dieser Trend ist durch den unterschiedlichen sterischen Anspruch des Polymer- und des Lipidteils zu erklären. Der Lipidanteil in der Monolage ist so gering, dass eine kontinuierliche, durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierte Lipidschicht nicht aufgebaut werden kann. Bei den Messungen fiel auf, dass der Kontaktwinkel mit Kontaktzeit des Tropfens der Oberfläche kontinuierlich abnahm. Bei Kontakt der Lipopolymermonolage zu Wasser können sich die hydrophilen Polymerketten anscheinend zum Wasser hin orientieren, wobei die Lipidengruppen in die Polymerschicht eintauchen. Diese Reorientierung der der Monoschicht führt zu einer hydrophileren Oberfläche und somit zur Verringerung des Kontaktwinkels.

4.3.2 Monolagenübertrag mittels der Langmuir-Blodgett Technik

Nachdem die nach der „grafting from“-Methode hergestellten Lipopolymermonolagen in Wasser eine Reorientierung der hydrophoben Lipidengruppen zeigten, musste eine Möglichkeit zur Stabilisierung einer Lipidschicht auf der hydrophilen Polymerschicht gefunden werden. Ein Lösungsansatz war der Langmuir-Blodgett-Übertrag (LB-Übertrag) einer gemischten Lipid/Lipopolymermonolage, der für ein ähnliches Lipopolymersystem erfolgreich von *Wagner et al.*^[61] durchgeführt wurde. Die relativ schnelle Reorganisation wird dabei durch die bessere Vororganisation der Lipopolymerschicht sowie die Komplettierung der Lipidschicht mit Kolipiden (z.B. SOPC: 1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) unterdrückt. Auf diesem Weg wird eine Lipidschicht aufgebaut, die sich durch hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisieren kann und somit weniger zu einer Reorganisation neigt.

Bei der Langmuir-Blodgett-Technik wird eine Lösung eines Amphiphils in einem leicht flüchtigen Lösemittel auf der Wasseroberfläche in einem Teflontrog

gespreitet. Das Lösemittel verdampft, der hydrophile Teil des Moleküls orientiert sich zur Subphase (Wasser), der hydrophobe Teil zur Gasphase. Die lateral beweglichen Moleküle können durch eine Barriere an der Wasseroberfläche komprimiert werden. Den Lipid/Lipopolymer-Mischungen wird ein kleiner Anteil an fluoreszenzfarbstoffmarkierten Lipiden zugegeben. Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und Betrachtung der Fluoreszenz mit einem sog. Fluoreszenzmikroskop kann die Homogenität der Verteilung der markierten Lipide untersucht werden.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Lipid/Lipopolymer-Monolage an der Wasser/Luft-Grenzfläche konnten keine Inhomogenitäten festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Lipopolymere und der Lipide an der Phasengrenze zumindest mikroskopisch homogen verteilen.

Zur Ermittlung der geeigneten Lipid/Lipopolymer-Mischung wurden LB-Isothermen mit unterschiedlichen Mischungen durchgeführt.

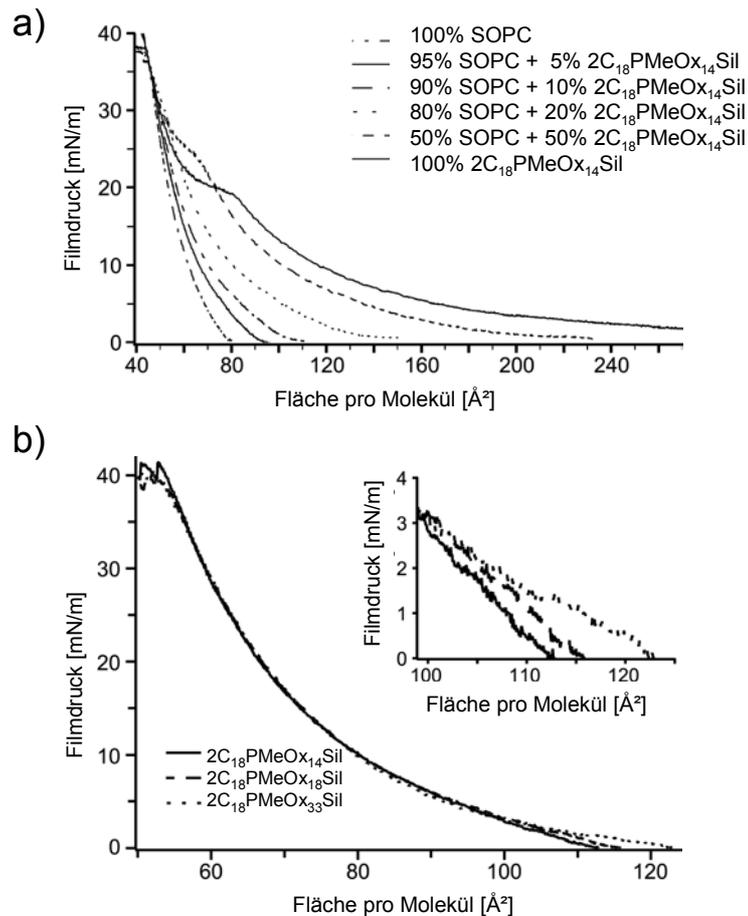


Abbildung 39: Druck-Flächenisotherme von LB-Monolagen a) mit unterschiedlichen Lipid/Lipopolymer Verhältnissen und b) mit Lipopolymeren unterschiedlicher Polymerkettenlänge.

In Abbildung 39a sind die Druck-Flächenisotherme der Lipid/Lipopolymer-Mischungen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen gezeigt. Mit ansteigendem Lipopolymeranteil kann ein Anstieg des durchschnittlichen Flächenbedarfs der Moleküle beobachtet werden, der auf den größeren hydrophilen Rest (Polymerteil) der Lipopolymere verglichen zu den Matrixlipiden zurückgeführt wird. Ab einer Lipopolymerkonzentration von 20% ist bei einem Filmdruck von ca. $\pi \geq 20 \text{ mNm}^{-1}$ eine Schulter in der LB-Isoterme zu beobachten. Unter diesen Bedingungen werden die Polymer-Polymer-Wechselwirkungen so groß und die Polymerketten behindern sich gegenseitig so stark, dass eine druckinduzierte

Streckung der Ketten stattfindet. Solch eine Schulter im Druck-Flächendiagramm ist an ähnlichen Lipopolymeren bereits beobachtet worden.^[118] Bei Lipopolymeren mit einem Polymerteil aus 2-Ethyl-2-oxazolin wurde von *Baekmark et al.* noch eine zweite Schulter beobachtet, die auf den Phasenübergang von einem Pilzregime in ein Bürstenregime zurückgeführt wird.^[119]

Bei der Messung von Lipid/Lipopolymer-Mischungen mit 5% Lipopolymeren unterschiedlicher Polymerkettenlänge zeigt sich zu Beginn der Kompression ein Druckanstieg, der durch die Streckung der Polymerketten bedingt ist (siehe Abbildung 39b). Bei höherem Filmdruck konnte bis zum Kollabieren der Monolage kein Unterschied festgestellt werden. Beim Kollaps wird der laterale Filmdruck zu groß und ein Teil der Moleküle wird in die Subphase gedrückt. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Isothermen bei einem Filmdruck oberhalb von 5 mN/m sind Störungen des Systems aufgrund von Polymer-Polymer-Wechselwirkung bis zu einem Lipopolymeranteil bis zu 5% nicht zu erwarten.

Bei einem Lipopolymeranteil von 5% und einem Filmdruck von $\pi = 30 \text{ mNm}^{-1}$ hat jedes Lipopolymer einen Abstand von $d \approx 3,3 \text{ nm}$. Dieser ist deutlich größer als der hydrodynamische Radius $R_h = 1,0 \pm 0,2 \text{ nm}$ für Poly(2-methyl-2-oxazolin) mit einem Polymerisationsgrad von 26.^[120] Aus diesem Grund und gestützt auf die homogene Verteilung der Lipide in der Monolage ist eine Vernetzung der Trimethoxysilangruppen des Lipopolymers nicht zu erwarten.

Nach intensiven Untersuchungen von *Langmuir* an den nach ihm benannten Filmen^[121] gelang es *Blodgett*,^[122] diese Filme auf planare Substrate zu übertragen. Für diesen Übertrag gibt es unterschiedliche Möglichkeiten für den Schichtaufbau. Der einfachste und hier verwendete Übertrag der oben beschriebenen Monolagen ist in Abbildung 40 gezeigt.

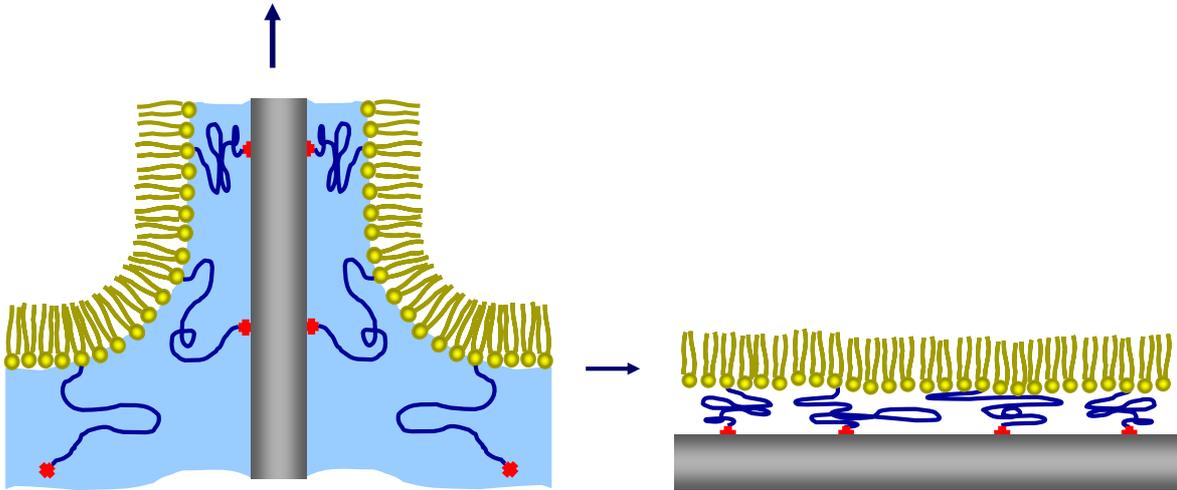


Abbildung 40: LB-Übertrag eines komprimierten Lipid/Lipopolymer-Films auf ein planares hydrophiles Substrat. Bei konstantem Filmdruck wird das Substrat aus der Wasserphase gezogen, dabei wird die Monolage von der Wasser/Luft Grenzfläche auf das Substrat übertragen.

Bei dieser Beschichtung wurde ein hydrophiles Substrat (SiO_2) in das Wasser eingetaucht, bevor das Amphiphil gespreitet und komprimiert wurde. Langsames Herausziehen des Substrates bei konstantem Filmdruck sollte einen 1:1 Übertrag gewährleisten. Die Methoxysilanfunktionen wurden im Laufe der Spreitung und Kompression hydrolysiert. Die Kopplungsreaktion mit den Silanolgruppen der Oberfläche sollte dann nach dem Übertrag beim Trocknen der Schicht ablaufen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach dem Übertrag an der Wasser/Luft-Grenzfläche homogener Filme auf planare SiO_2 -Substrate zeigten eine inhomogene Verteilung der Fluoreszenz in Form eines Streifenmusters.^[123] Eine Strukturierung ist beim LB-Übertrag nicht unbekannt, allerdings waren alle bislang beobachteten Streifen parallel zur Wasseroberfläche, also normal zur Übertragungsrichtung.^[124,125,126,127] Die hier beobachteten Streifen waren im Gegensatz dazu immer parallel zur Zugrichtung des Substrates ausgerichtet. Die Streifen hatten Abstände von einigen μm und waren bis zu mehrere Zentimeter lang. Eine genauere Untersuchung der Streifenbildung sollte deren Ursache klären. Zu diesem Zweck

wurde zunächst der Einfluss der Übertragungsgeschwindigkeit näher betrachtet.

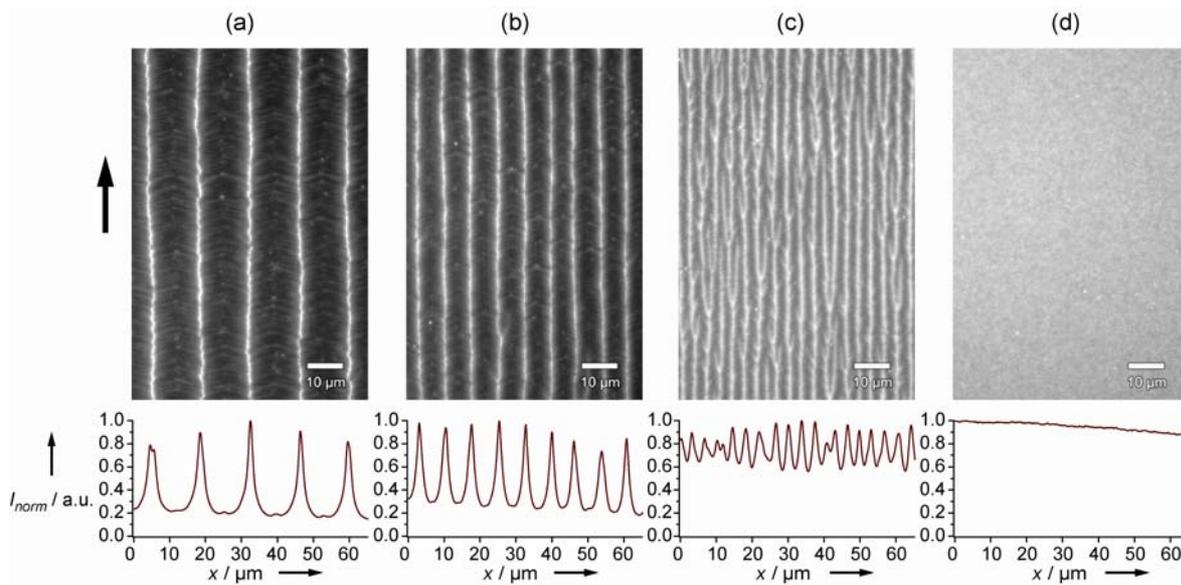


Abbildung 41: (oben) Fluoreszenzaufnahmen von Lipid/Lipopolymer-Monoschichten bestehend aus 5 mol% $2C_{18}PMO_{x_{14}}Sil$, 94,8 mol% SOPC und 0,2 mol% Texas Red-PE, übertragen bei einer Geschwindigkeit von a) 50 $\mu\text{m/s}$, b) 80 $\mu\text{m/s}$, c) 180 $\mu\text{m/s}$ und d) 500 $\mu\text{m/s}$ bei unterschiedlichem Filmdruck (der Pfeil markiert die Übertragsrichtung). (unten) Normiertes Fluoreszenzintensitätsprofil eines Querschnitts aus den jeweils darüber liegenden Bildern. Der Pfeile deutet die Übertragsrichtung an.

In Abbildung 41 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die dazugehörigen Intensitätsprofile der übertragenen Lipid/Lipopolymer-Monoschichten bei unterschiedlichen Übertragungsgeschwindigkeiten gezeigt. Bei der Betrachtung der Fluoreszenz und somit der Verteilung der farbstoffmarkierten Lipide in der Monoschicht sind eindeutig Anreicherungen in Streifenform zu erkennen. Mit steigender Übertragungsgeschwindigkeit konnte eine Verringerung des Streifenabstands von 13,7 μm bei einer Geschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$ über 7,27 μm bei einer Geschwindigkeit von 80 $\mu\text{m/s}$ auf 3,4 μm bei einer Geschwindigkeit von 180 $\mu\text{m/s}$ beobachtet werden. In Abbildung 41c zeigen sich außerdem Verzweigungen der Streifen und der Kontrast in der Fluoreszenzintensität nimmt ab. Bei einer Übertragungsgeschwindigkeit von 500 $\mu\text{m/s}$ sind keine Inhomogenitäten

der Fluoreszenz mehr zu erkennen. Die hier gezeigte Abhängigkeit der Streifenbildung von der Übertragungsgeschwindigkeit weist auf einen dynamischen Prozess der Strukturbildung während des Übertrages hin.

Der Grund für die hier beobachtete Phasenseparation sollte durch weitere Experimente untersucht werden. So wurde die Polymerkettenlänge als weiterer möglicher Parameter für die Streifenbildung variiert. Die Polymerkettenlänge beeinflusst die Viskosität der Flüssigkeit direkt an der Phasengrenze und somit auch beim Übertrag am Meniskus.

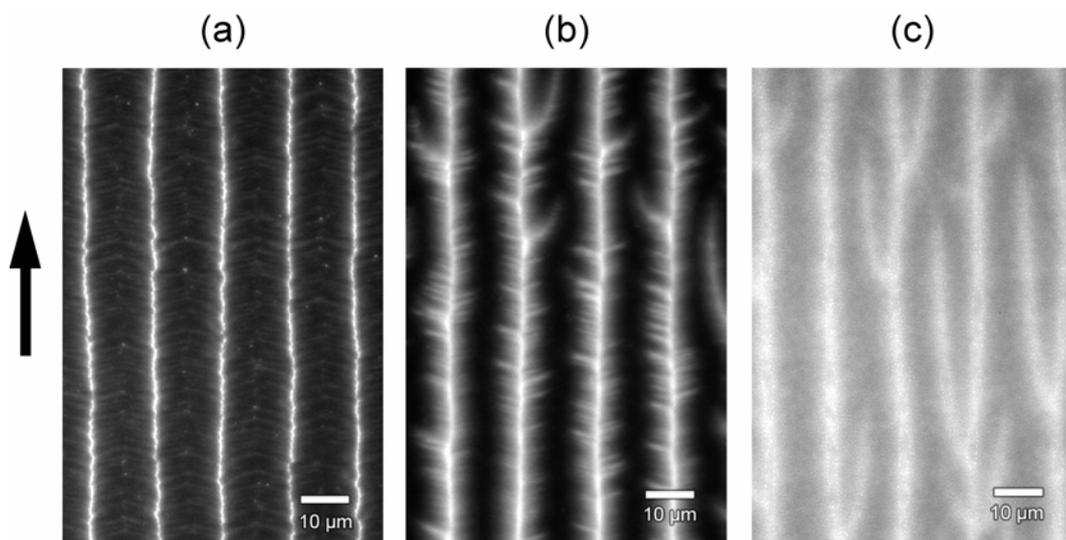


Abbildung 42: Fluoreszenzaufnahme einer Lipid/Lipopolymer-Monolage jeweils 5 mol% Lipopolymer. Als Polymer wurde a) $2C_{18}PMOx_{14}Sil$, b) $2C_{18}PMOx_{33}Sil$ und c) $2C_{18}PMOx_{104}Sil$ eingesetzt.

Der Einfluss der Polymerkettenlänge auf die Streifenbildung ist in Abbildung 42 gezeigt. Bei der Präparation der Monoschichten wurden jeweils 5 mol% des Lipopolymers mit einer Kettenlänge von 14, 33 und 104 eingesetzt; die Übertragungsgeschwindigkeit ($50 \mu\text{m/s}$) und der Filmdruck (30 mN/m) wurden konstant gehalten. Wie in Abbildung 42 a-c zu sehen, führt eine Erhöhung der Polymerkettenlänge von separierten Streifen bei einem Polymerisationsgrad von 14

zu einem verzweigten Streifenmuster mit geringerem Kontrast der Fluoreszenz. Der Abstand der Streifen voneinander ist aber nahezu unverändert und wird dementsprechend nicht von der Polymerkettenlänge beeinflusst.

Anhand dieser Ergebnisse konnte die Viskosität der Flüssigkeit am Meniskus als Grund für die Phasenseparation jedoch nicht ausgeschlossen werden. Nachdem die Viskosität im Meniskus auch über die Subphase beeinflusst werden kann, wurde eine Mischung aus Wasser und Glycerin im Gewichtsverhältnis 1:1 eingesetzt. Bei gleichen Übertragsbedingungen wie in Abbildung 42a, allerdings mit der veränderten Subphase, verschwindet das Streifenmuster in den Fluoreszenzaufnahmen nahezu vollkommen (Abbildung 43). Bei noch höheren Übertragungsgeschwindigkeiten ist kein Streifenmuster mehr zu erkennen und es ergibt sich eine homogene Fluoreszenz (nicht gezeigt).

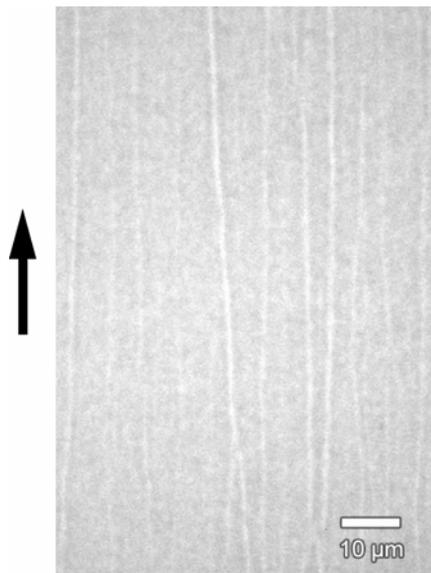


Abbildung 43: Fluoreszenzaufnahme einer Lipid/Lipopolymer-Monolage die analog der Bedingungen bei Abbildung 44a übertragen wurde, jedoch mit der Subphase aus gleichen Gewichtsanteilen Wasser und Glycerin.

Eine Phasenseparation der Lipide als Grund für die Bildung des Streifenmusters wurde ebenso näher untersucht. Hierfür wurden Monoschichten hergestellt, die das Archaeol als Lipidmuster für das Lipopolymer und die Lipidkomponente enthalten.

Diese Lipide können aufgrund der Methylverzweigungen der Alkylketten nicht kristallisieren und haben im betrachteten Temperaturbereich keinen Phasenübergang.

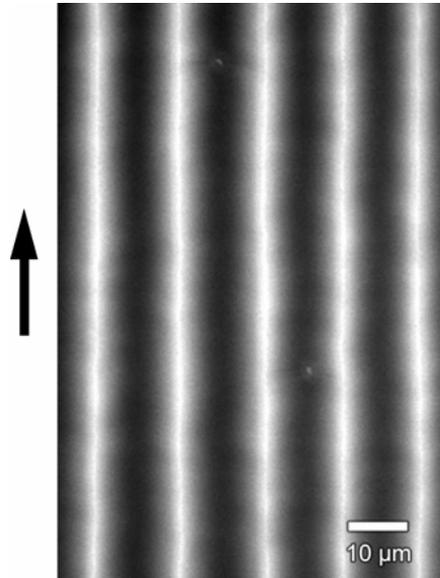


Abbildung 44: Fluoreszenzaufnahme einer Lipid/Lipopolymer-Monolage der Zusammensetzung 94,8 mol% DPhPC, 0,2 mol% Texas Red-PE und 5 mol% $\text{Phy}_2\text{PMO}_{x_{21}}\text{Sil}$. Übertragen bei einer Geschwindigkeit von $50\mu\text{m/s}$ und einem Filmdruck von 30 mN/m .

Eine bei gleichen Bedingungen wie in Abbildung 42 übertragene Lipid/Lipopolymer-Monolage, bestehend aus 94,8 mol% DPhPC, 0,2 mol% Texas Red-PE und 5 mol% $\text{Phy}_2\text{PMO}_{x_{21}}\text{Sil}$, ist in Abbildung 44 zu sehen. Es zeigt sich ein nahezu identisches Streifenmuster mit nahezu gleichem Abstand der Streifen voneinander wie bei Lipiden mit n-Alkylketten.

Der Nachweis, dass es sich bei dem hier vorgestellten Streifenmuster um eine Entmischung von Lipiden und Lipopolymer handelt, konnte durch den gleichzeitigen Einsatz von fluoreszenzmarkierten Lipiden und einem mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierten Lipopolymer^[128] erbracht werden. Es wurde eine Lipid/Lipopolymer-Monolage der Zusammensetzung 0,2 mol% $2\text{C}_{18}\text{PMO}_{x_{13}}\text{TRITC}$, 4,8 mol% $2\text{C}_{18}\text{PMO}_{x_{18}}\text{Sil}$, 94 mol% SOPC und 1 mol% NBD-

PE auf der Wasser/Luft-Grenzfläche gespreitet, komprimiert und auf das Substrat übertragen. Die unterschiedlichen Farbstoffe wurden für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einzeln angeregt, es konnte von demselben Bereich jeweils ein Bild für jeden Farbstoff erhalten werden. Legt man diese beiden Bilder übereinander (Abbildung 45 oben in der Mitte), so ist eine teilweise Entmischung von Lipiden und Lipopolymeren zu erkennen. Ein Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitätsprofile (Abbildung 45 unten) bestätigt dies. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine quantitative Entmischung. Bei den Streifen handelt es sich vielmehr um Bereiche einer Lipid- bzw. einer Lipopolymeranreicherung.

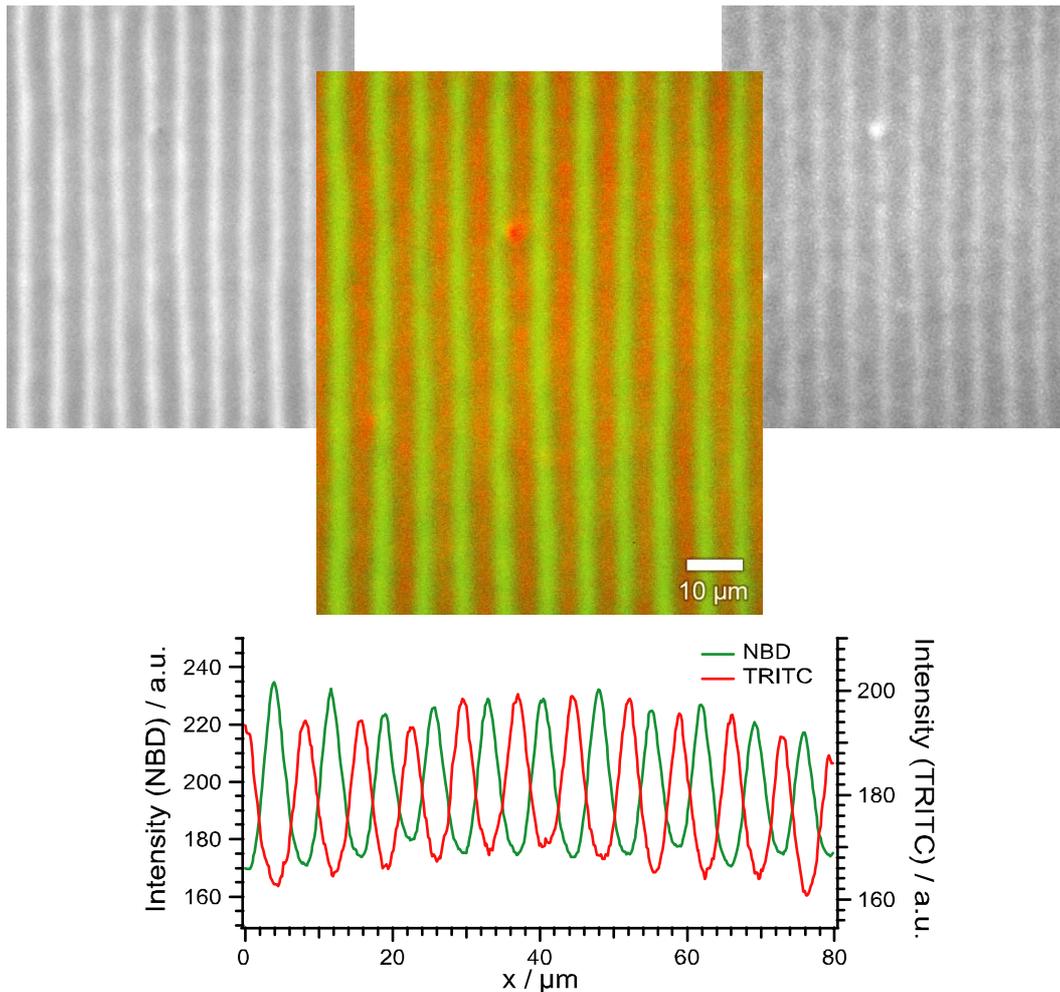


Abbildung 45: Fluoreszenzaufnahmen einer Lipid/Lipopolymer-Monolage zusammengesetzt aus 0,2 mol% $2C_{18}PMOx_{15}$ -TRITC, 4,8 mol% $2C_{18}PMOx_{18}$ Sil, 94 mol% SOPC und 1 mol% NBD-PE) (oben). Aufnahme bei der Anregung des NBD-Farbstoffes. (rechts) Anregung des TRITC-Farbstoffes (links). Überlagerung der beiden Bilder (Mitte). Normiertes Intensitätsprofil eines Querschnitts aus den Bildern oben rechts und oben links (unten).

Mittels der AFM-Technik sollten die Lipid/Lipopolymer-Monoschichten auch topographisch untersucht werden. In Abbildung 46 ist die Oberflächentopographie von zwei Messungen derselben Stelle gezeigt. Bei Abbildung 46 (links) war die Abtastrichtung im Vergleich zu Abbildung 46 (rechts) um 90° gedreht. Ein Höhenunterschied der polymer- und lipidreichen Bereiche der phasenseparierten Monoschicht konnte allerdings durch die AFM nicht festgestellt werden. Vielmehr

zeigt sich bei einer Messung desselben Bereiches mit um 90° gedrehter Abtastrichtung ein Höhenprofil, das auf ein Artefakt in der Messung zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die Phasenseparation der Monoschicht nicht oder nicht in einem mit der AFM-Technik messbaren Maße auf die Topographie der Oberfläche auswirkt.

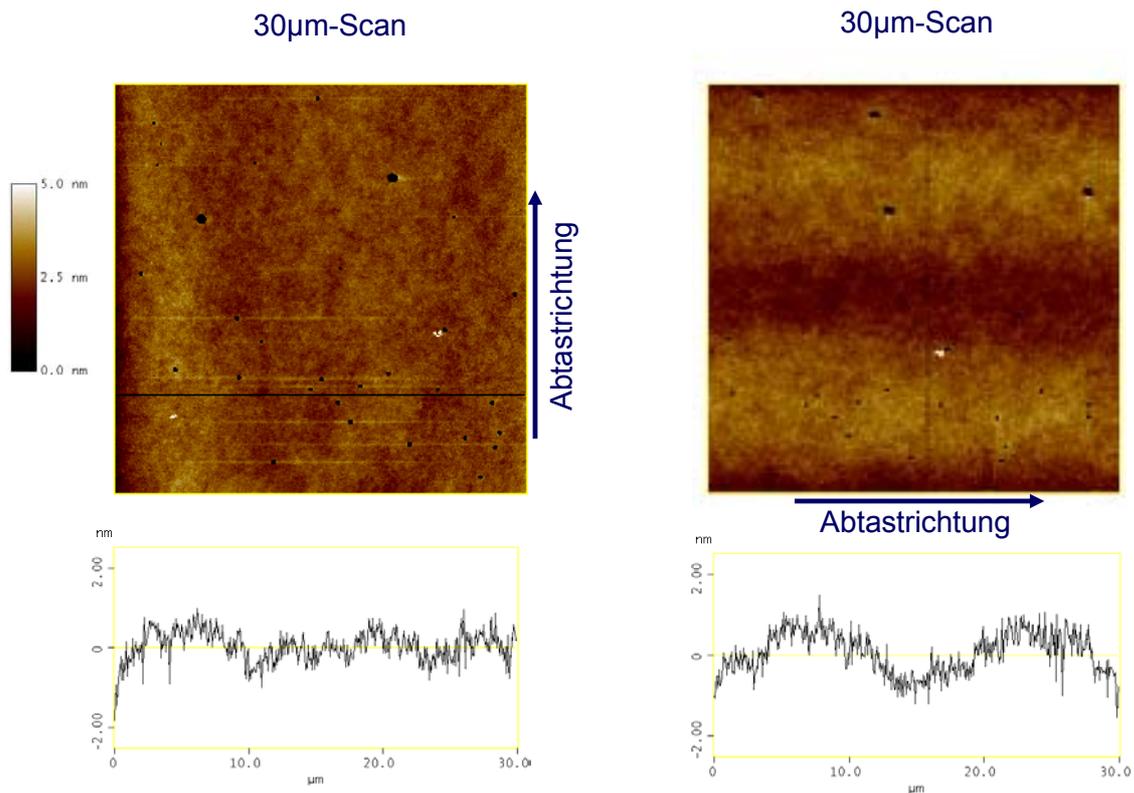


Abbildung 46: Oberflächentopographie einer Lipid/Lipopolymermonalage der Zusammensetzung 10 mol% PhyPMOx10SiI, 89,8 mol% DPhPC, 0,2 mol% Texas Red-PE, die in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ein Streifenmuster zeigt. Beide Bilder zeigen denselben Ausschnitt, die Abtastrichtung wurde jedoch um 90° gedreht.

Wie vorherige Experimente zeigten, wird die Entmischung in lipidreiche und lipopolymerreiche Bereiche bei steigender Übertragungsgeschwindigkeit sowie der Abstand der Streifen immer geringer, bis sich bei Übertragungsgeschwindigkeiten über $400 \mu\text{m/s}$ keine Inhomogenität der Fluoreszenz mehr feststellen lässt.

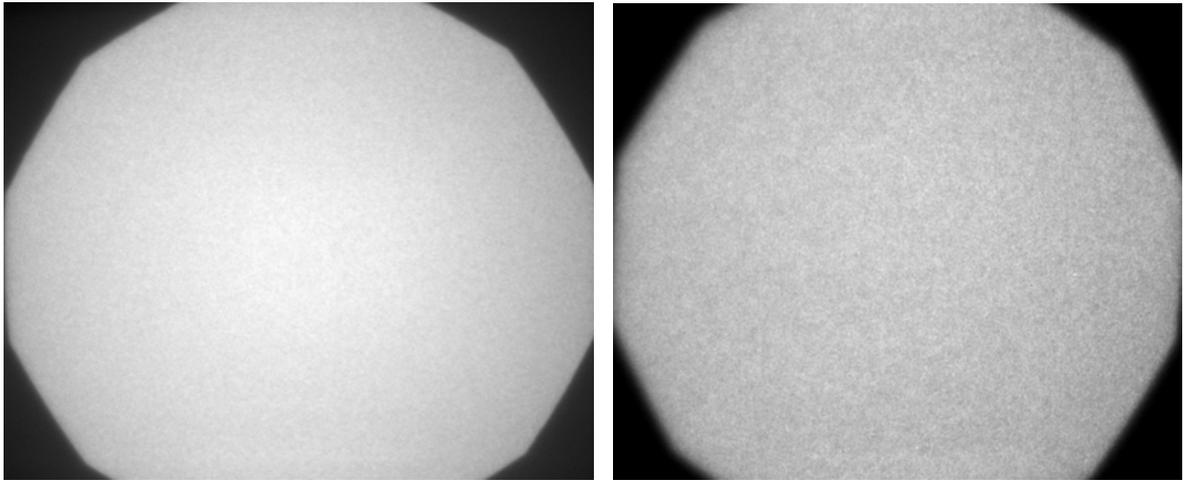


Abbildung 47: Fluoreszenzaufnahmen einer Lipid/Lipopolymer-Monolage; (links) 90 mol% SOPC, 10 mol% $2C_{18}PMO_{x_{10}}Si$, 0,2 mol% Texas Red-PE; (rechts) 90 mol% DPhPC, 9,5 mol% $PhyPMO_{x_{10}}Si$, 0,5 mol% $PhyPMO_{x_{10}}TRITC$.

In Abbildung 47 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von homogenen Lipid/Lipopolymer-Monolagen gezeigt, links mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Lipid und rechts mit einem markierten Lipopolymer. Diese Fluoreszenz ist über das gesamte Substrat homogen, sowohl für den Fall von farbstoffmarkierten Lipiden als auch bei farbstoffmarkierten Lipopolymeren. Auch bei den hohen Übertragungsgeschwindigkeiten wurde auf einen 1:1 Übertrag der Monolage von der Wasser/Luft-Grenzfläche auf das Substrat geachtet.

4.3.3 Polymerunterstützte Lipidmembran

Die Lipid/Lipopolymer-Monolagen wurden nach homogenem Übertrag auf das Substrat trocken gelagert. Für die Vesikelfusion wurden SOPC-Vesikel nach Standardmethoden in einer Pufferlösung präpariert, die dann auf die trockene

Monolage gegeben wurde. Innerhalb weniger Stunden bildet sich die zweite Lipidmonolage aus, und die Lipidmembran überzieht homogen das ganze Substrat (Abbildung 48). Die Pufferzugabe zur Lipid/Lipopolymer-Monolage bewirkt außerdem eine Quellung des Polymerteils.

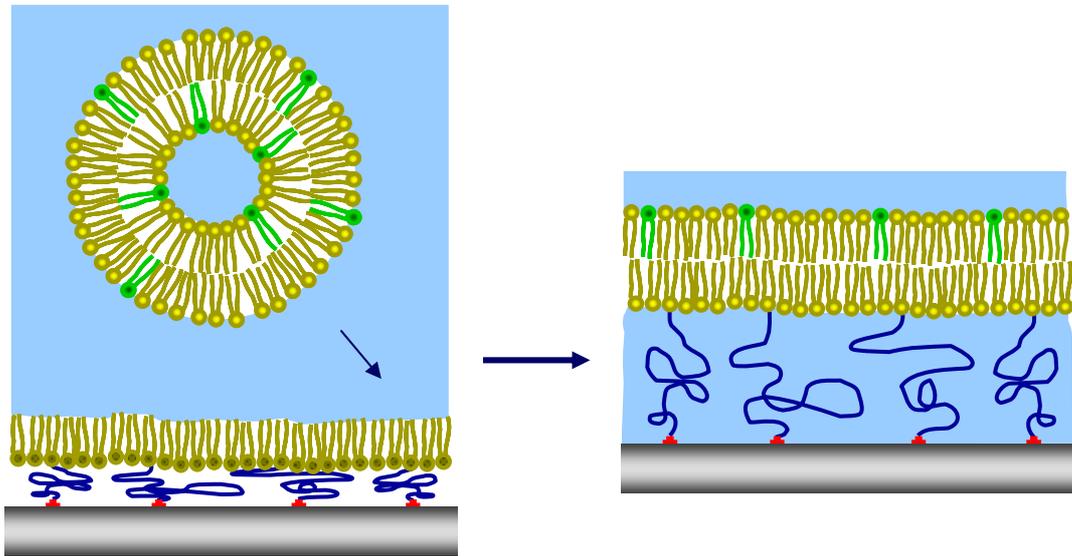


Abbildung 48: Vesikelfusion zum Aufbau der oberen Lipidschicht.

Die Kontrolle über die gebildete zweite Lipidschicht und damit über die Bildung einer Lipidmembran erfolgte mittels der Fluoreszenzmikroskopie. Wurden fluoreszenzmarkierte Lipide bei dem LB-Übertrag in das System eingebracht, so konnte die untere Membranseite getrennt von der oberen Hälfte fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Wurden die farbstoffmarkierten Lipide bei der Vesikelfusion eingesetzt, so konnte die obere Membranhälfte separat fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden.

Nach dieser Methode konnten auch gezielt die Diffusionskoeffizienten der Lipide in der oberen und der unteren Membranhälfte getrennt voneinander bestimmt werden. Eine Möglichkeit zur Messung der Diffusion innerhalb der Membran ist die Methode des kontinuierlichen Bleichens. Bei dieser Methode werden die Fluoreszenzfarbstoffe in der Membran durch eine Blende im Fluoreszenzmikroskop

betrachtet (Abbildung 49 links). Wird ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül längere Zeit angeregt, so bleicht dieses aus. Bei einer Diffusion innerhalb der Membran diffundieren Lipide mit frischen Farbstoffmolekülen in den von der Blende beleuchteten Bereich. Der Fluoreszenzfarbstoff wird angeregt und bleicht nach seiner Lebensdauer ebenfalls aus. Am Rand der Blende stellt sich nach einiger Zeit durch kontinuierliches Diffundieren von ungebleichten farbstofffunktionalisierten Lipiden ein Gleichgewicht zwischen gebleichten und ungebleichten Farbstoffen ein, und es entsteht ein Ring aus fluoreszierenden Lipiden (Abbildung 49 rechts). Aus dem Abfall der Fluoreszenzintensität vom Rand der Blende zu deren Mitte hin und der Bleichgeschwindigkeit des Farbstoffes gemessen in der Mitte der Blende, lässt sich die Diffusionskonstante berechnen.

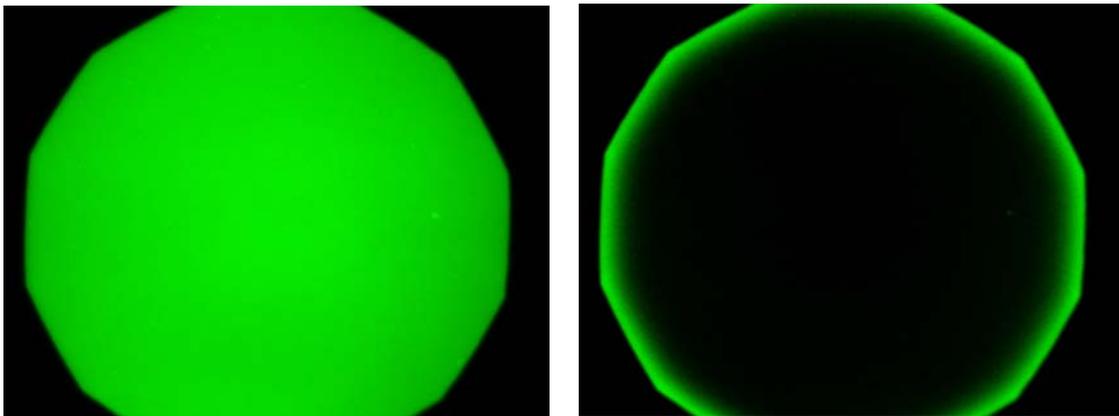


Abbildung 49: Homogene Fluoreszenz einer polymerunterstützten Lipidmembran (links); Gebleichter Bereich einer Membran, in den frische Fluoreszenzfarbstoffe nach innen diffundieren (rechts).

Nach der Methode des kontinuierlichen Bleichens konnte bei dem hier vorgestellten polymerunterstützten Lipidmembransystem ein Diffusionskoeffizient der fluoreszenzmarkierten Lipide von 2,3 bis 3,6 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ in der oberen Membranhälfte gemessen werden. Das entspricht einer nahezu freien Diffusion, wie sie auch in natürlichen Membranen oder ähnlichen Membransystemen vorkommt. In der unteren Membranhälfte wurde eine leicht gehinderte Diffusion von 0,4 bis 1,8 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ gemessen.

Eine genauere Methode zur Messung der lateralen Lipiddiffusion ist die Methode des fluorescence recovery after photobleaching (FRAP-Methode).^[129] Bei dieser Methode werden mit einem fokussierten Laserpuls ($\tau=200\text{ms}$) die Farbstoffe an einem Punkt der Membran (Durchmesser $d = 9,3 \mu\text{m}$) gebleicht. Nun wird beobachtet, in welchem Zeitraum (\Rightarrow Diffusionskoeffizient) und zu welchem Anteil der ursprünglichen Intensität (= mobiler Anteil) die Fluoreszenz durch Diffusion wieder ausgeglichen wird. Die Ergebnisse der FRAP-Messungen können nach der Methode von *Soumpasis*^[130] über den zeitlichen Verlauf der Intensität der Fluoreszenz berechnet werden und sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Diffusion in der unteren Membranhälfte gemessen nach der FRAP-Methode.

Anteil Lipopolymer in %	Polymer	Diffusionskoeffizient in $\mu\text{m}^2/\text{s}$	Mobiler Anteil in %
0	-	$1,4 \pm 0,2$	98 ± 3
5	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{14}\text{Sil}$	$1,6 \pm 0,3$	98 ± 4
10	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{14}\text{Sil}$	$0,9 \pm 0,4$	86 ± 12
20	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{14}\text{Sil}$	$1,3 \pm 0,4$	96 ± 2
50	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{14}\text{Sil}$	$0,4 \pm 0,3$	10 ± 1
5	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{33}\text{Sil}$	$1,4 \pm 0,1$	98 ± 2
5	$2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{104}\text{Sil}$	$1,4 \pm 0,1$	97 ± 3

Im oberen Teil der Tabelle 11 sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen an polymerunterstützten Lipidmembranen mit unterschiedlichen Lipopolymeranteilen gezeigt. Der Lipopolymeranteil scheint zwischen 0% und 20 % den Diffusionskoeffizienten ($D = 0,9 - 1,6 \mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) nicht zu beeinflussen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen, die aus den Langmuir-Isothermen gewonnen werden konnten. Erst ab einem Lipopolymeranteil von 50% nehmen Diffusionskoeffizient und mobiler Anteil stark ab. Bei dieser Konzentration wurde die Diffusion entweder durch eine höhere Viskosität durch Polymerwechselwirkungen in der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat beeinträchtigt, oder der höhere Anteil an

verankerten Lipiden in der Membran behindert die freie Beweglichkeit der Lipide. Dies äußert sich nicht nur in einem niedrigeren Diffusionskoeffizienten ($D = 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$), sondern auch in einem deutlich niedrigeren Anteil mobiler Lipide (10%).

Als nächster Schritt wurde der Einfluss der Polymerkettenlänge der Lipopolymeren hinsichtlich der Diffusion in der Membran näher betrachtet. Lipid/Lipopolymer Monoschichten aus SOPC mit jeweils 5% $2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{18}\text{Sil}$ und $2\text{C}_{18}\text{PMOx}_{33}\text{Sil}$ wurden mit $400 \mu\text{m}/\text{s}$ übertragen. Die Membran wurde mittels der Vesikelfusion komplettiert und die Diffusionskoeffizient sowie der mobile Lipidanteil mit FRAP gemessen (Tabelle 11 unten). Ein Diffusionskoeffizient von $1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und ein mobiler Anteil von über 97% zeigen, dass eine Erhöhung des Polymerisationsgrades keine Erniedrigung der Diffusionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Diese Ergebnisse deuten keine Steigerung der Viskosität der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat durch den größeren sterischen Anspruch der längeren Polymerketten an, wie auch aus den Langmuir-Isothermen abgeleitet wurde.

Langzeitdiffusionsexperimente zeigten eine innerhalb der experimentellen Fehler unveränderte Fluidität und Homogenität der Membran über einen Zeitraum von zwei Wochen. Dies zeigt die sehr gute thermodynamische und mechanische Stabilität der präparierten polymerunterstützten Modellmembranen.

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung des Lipopolymer/Membransystems war die Dicke des Wasserreservoirs zwischen der Membran und dem Substrat. Diese Dicke sollte durch den Einsatz geeigneter Lipopolymeren eingestellt werden. Auf diesem Weg sollte eine homogene Inkorporation von Membranproteinen mit größeren intra- bzw. extrazellulären Bereichen ermöglicht werden, d.h. ohne Adsorption der Proteine an der Oberfläche und folgende Denaturierung. Der Abstand der Membran zum Substrat konnte mit der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie (FLIC)^[131] bestimmt werden. Fluoreszenzfarbstoffmarkierte

Lipide in der unteren Membranhälfte wurden dabei angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Die Membran wurde dafür auf einem besonderen Si-Substrat aufgebaut, welches SiO_2 -Stufen definierter Dicken besitzt (Abbildung 50 b).

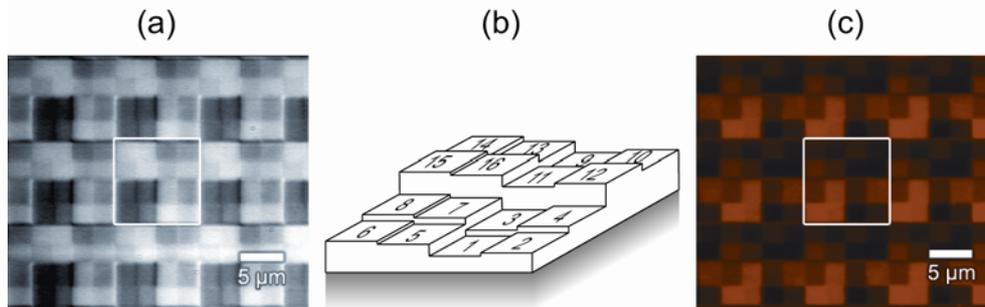


Abbildung 50: a) Hellfeldaufnahme eines gestuften FLIC Substrates mit 16 unterschiedlich dicken SiO_2 -Schichten. b) Skizze der SiO_2 -Stufen. c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines FLIC-Substrates mit den 16 Stufen innerhalb des weißen Rahmens.^[132]

Die Anregung erfolgt über eine stehende Welle des eingestrahlt Lichts, welche in definiertem Abstand von der Oberfläche eine definierte Intensität zur Folge hat (vgl. Abbildung 51).

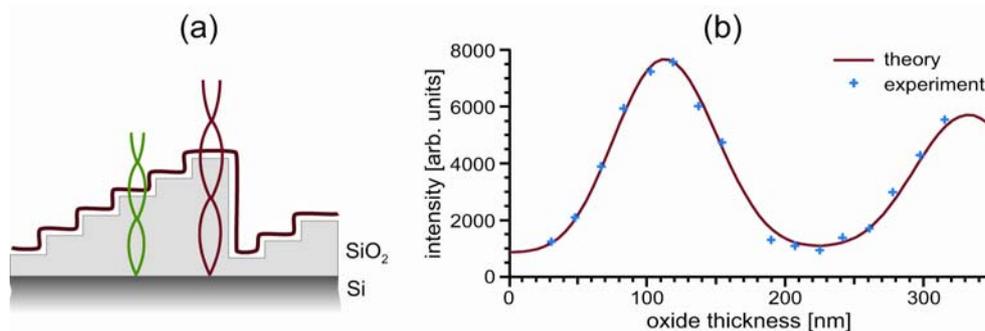


Abbildung 51: a) Schematische Abbildung der FLIC-Messung mit stehender Lichtwelle, dem gestuften Substrat und der Membran. b) Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Oxidschichtdicke (Punkte) und die daran mittels der FLIC-Theorie gefittete Intensität der Fluoreszenz (Linie).

Bei einem Vergleich der Fluoreszenzintensität der unterschiedlichen Stufen des

Substrats mit der Intensität der stehenden Lichtwelle kann der Abstand der Membran zum Substrat bestimmt werden.^[133] Für ein eingesetztes Polymer mit dem Polymerisationsgrad 14 ergab sich ein Abstand von $2,3 \pm 1,3$ nm, bei einem Polymerisationsgrad von 33 entsprechend 5,2 nm.

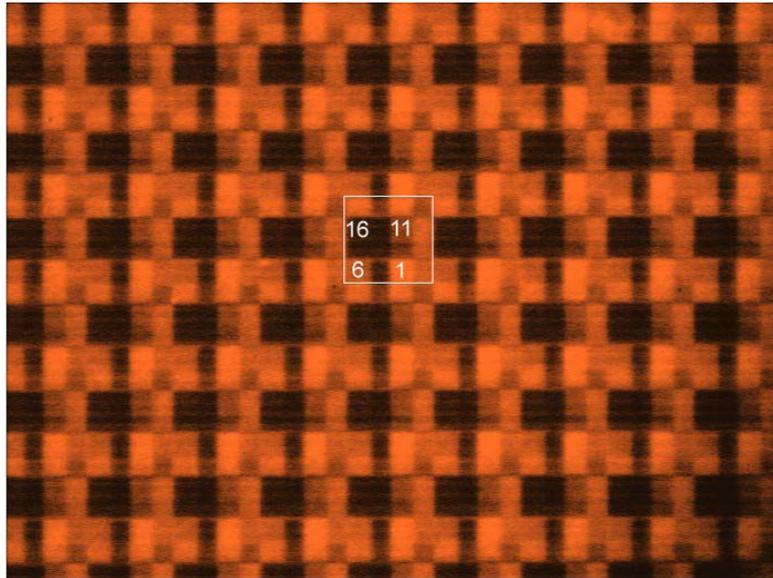


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer polymerunterstützten Lipidmembran

Abbildung 52 zeigt die Fluoreszenzaufnahme einer polymerunterstützten ($2C_{18}PMO_{x33}Sil$) Lipidmembran auf einem 16-stufigen FLIC-Substrat. Es ist zu erkennen, dass die Membran sehr genau der Substratmorphologie folgt. Interessant ist, dass auf diesem Substrat keine Inhomogenitäten oder Defekte in der Membran zu erkennen sind.

Die Idee, dass bei Variation der Polymerkettenlänge des Lipopolymerankers auch die Inkorporation von Transmembranproteinen mit großen intra- und extrazellulären Bereichen in eine Modellmembran ermöglicht wird, sollte mit Integrinen überprüft werden. Dafür wurden auf die unterschiedlichen Lipid/Lipopolymer-Monolagen Vesikel mit inkorporierten fluoreszenz-

farbstoffmarkierten $\alpha_{11b}\beta_3$ Integrinen gegeben. Analog zur Vesikelfusion wurde dadurch die Membran komplettiert und gleichzeitig die Proteine in die Membran inkorporiert (Abbildung 53).

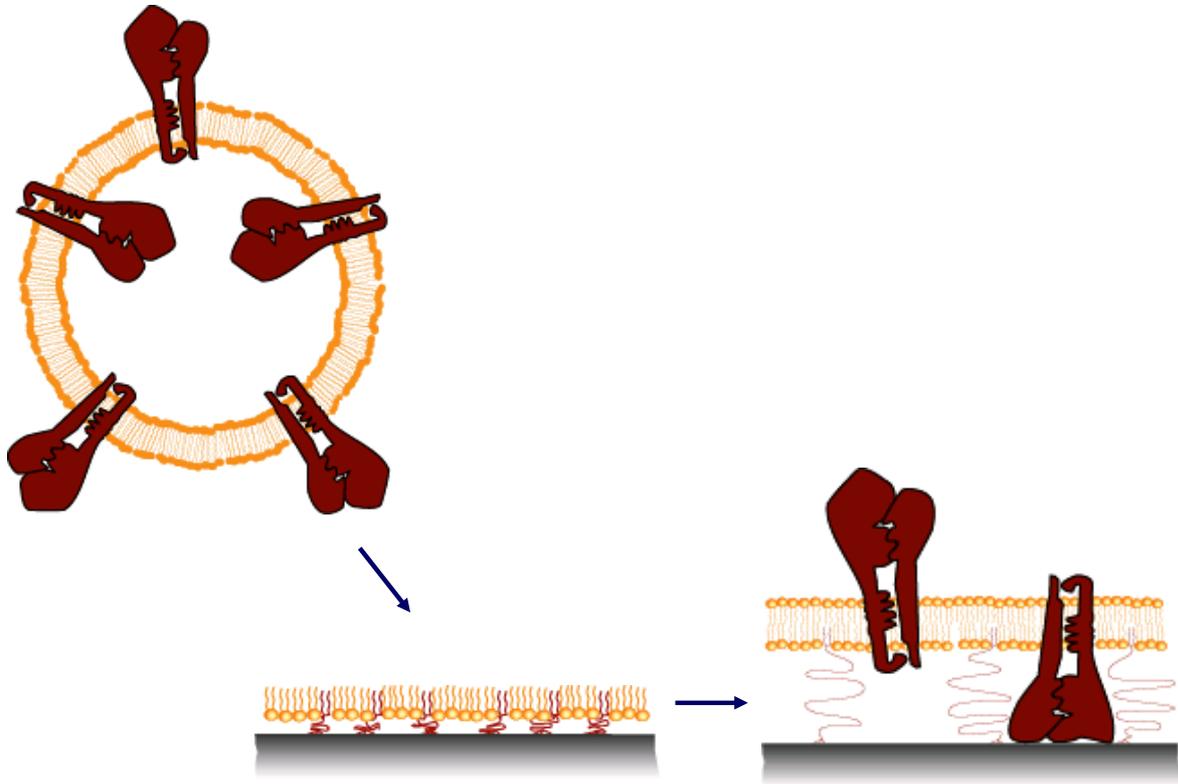


Abbildung 53: Vesikelfusion mit Proteoliposomen zur Inkorporation von $\alpha_{11b}\beta_3$ Integrinen in die Lipiddoppelschicht.

Abbildung 54 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der dabei entstandenen Membranen. In Abbildung 54a wurde zur Präparation ein reines Glassubstrat verwendet. Bei den weiteren Aufnahmen handelt es sich um Membranen, die auf Substraten mit Lipid/Lipopolymer-Monoschichten mit 5% des $2C_{18}PMO_{x14}Sil$ (b), $2C_{18}PMO_{x18}Sil$ (c) bzw. $2C_{18}PMO_{x33}Sil$ (d) und jeweils 95% SOPC aufgebaut wurden.

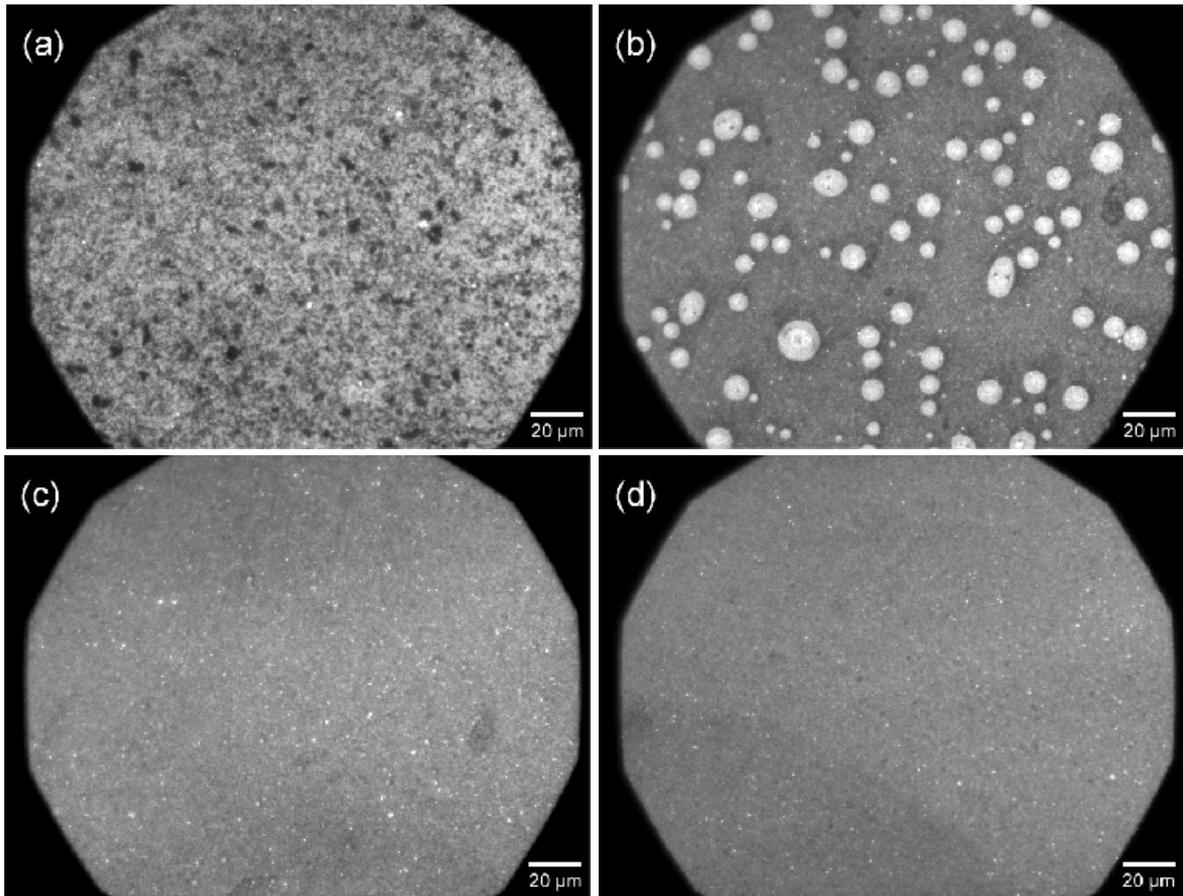


Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmembranen mit inkorporierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrinen auf a) einem reinen Glassubstrat, b) einer Monolage mit 5% $2C_{18}PMO_{x14}Sil$, c) einer Monolage mit 5% $2C_{18}PMO_{x18}Sil$ und d) einer Monolage mit 5% $2C_{18}PMO_{x33}Sil$.

In Abbildung 54a ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Glasoberfläche nach der Vesikelfusion gezeigt. Die heterogene Verteilung der fluoreszenzmarkierten Integrine ist klar zu erkennen. Bei einer analog durchgeführten Vesikelfusion auf eine Lipid/Lipopolymer-Monolage mit unterschiedlichen Polymerkettenlängen (Abbildungen 54b-d) zeigt sich eine klare Abhängigkeit der Integrinverteilung vom Polymerisationsgrad. In Abbildung 54b sind große helle Punkte zu erkennen, die auf eine Zusammenlagerung der Integrine schließen lässt. In Abbildung 54c) und d) (Polymerisationsgrad 18 und 33) kann man aber immer noch einzelne Inhomogenitäten erkennen, die auf lokal aggregierte Integrine zurückzuführen sind. Die Oberfläche ist aber einheitlich mit

einer integrinfunktionalisierten Membran beschichtet. Die Lipopolymerkettenlänge und somit der Membran-Substrat-Abstand ist offensichtlich ein entscheidender Parameter für eine erfolgreiche Inkorporation der Integrine. FRAP-Experimente an den Membranen mit homogen verteilten Integrinen zeigen einen Diffusionskoeffizienten der Integrine von $D = 0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei einem mobilen Proteinanteil von 20%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intra/extramembrane Orientierung der Integrine nicht beeinflusst werden kann und viele der Proteine mit der größeren extrazellulären Seite zum Substrat hin ausgerichtet sind (Abbildung 53 rechts). Nachdem der extrazelluläre Bereich deutlich weiter aus der Membran herausragt, sind diese Integrine offensichtlich nicht mehr mobil, sondern an der Substratoberfläche adsorbiert.

Bei dem hier vorgestellten biomimetischen Membransystem, das die Lipidmembran über funktionalisierte Lipopolymere an einem Substrat stabilisiert und gleichzeitig ein Wasserkissen zwischen Membran und Substrat in der Dicke kontrolliert, konnte neben einer guten lateralen Diffusion auch die homogene Inkorporation von großen transmembranen Rezeptoren gezeigt werden. Das System zeigt eine sehr gute mechanische, chemische und physikalische Stabilität und hat aufgrund seiner Variabilität ein sehr großes Potential für weitere Lipidmembrananwendungen.

5 Zusammenfassung

Lipidmembranen mit den darin inkorporierten Proteinen sind für viele Erkennungs- und Transportprozesse in lebenden Zellen zuständig. Ziel dieser Arbeit war es, Grundlagen zu schaffen, um diese Prozesse biomimetisch nachbauen und näher analysieren zu können. Dafür sollte ein Polymersystem entwickelt werden, welches Lipiddoppelschichten auf planaren Substraten stabilisieren kann ohne dabei die Funktion der Proteine zu beeinträchtigen. Es sollte ein System gefunden werden, welches wie ein weiches Wasserkissen zwischen fluider Membran und hartem Untergrund liegt und einen definierten Abstand zwischen Membran und Substrat einstellt. Dieser Abstand sollte es ermöglichen, auch größere Transmembranproteine zu inkorporieren, und verhindern, dass diese Proteine an dem hydrophilen Untergrund adsorbieren und denaturieren. Zweite Aufgabe dieses Polymerkissens ist eine Stabilisierung der künstlichen Membran. Erst eine gute Langzeitstabilität ermöglicht einen unproblematischen Einsatz der Membran als Biosensor. Dies sollte durch einen Einbau von Lipidengruppen in das Polymer

erreicht werden. Diese sollten in die Membran inkorporiert werden und somit eine höhere mechanische, thermische und chemische Stabilität der Membran gewährleisten.

Für die präparative Realisierung eines solchen Systems wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, die alle auf der lebend kationisch ringöffnenden Polymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolinen aufbauen. Dieses Polymerisationssystem erlaubt den kontrollierten Aufbau strukturell definierter Polymere mit enger Molmassenverteilung. In Abbildung 55 sind die unterschiedlichen Ansätze zum Aufbau von polymerunterstützten Lipidmembranen zusammengefasst.

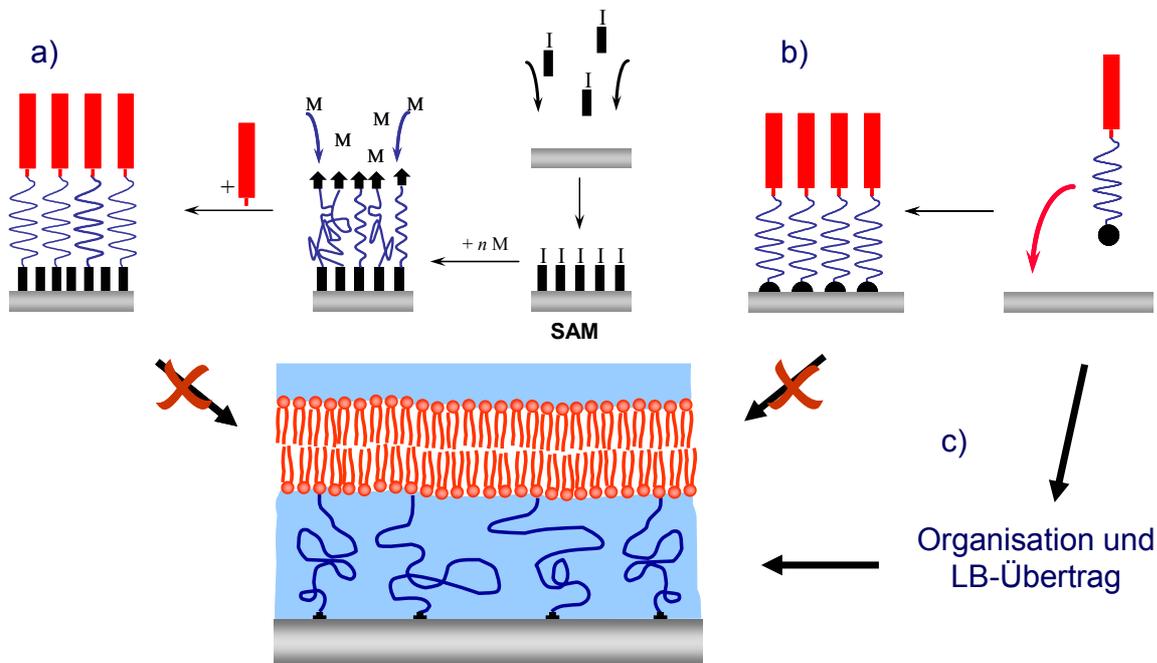


Abbildung 55: Methoden zum Aufbau von polymerunterstützten Lipidmembranen mittels a) „grafting from“-Polymerisation auf einem SAM, b) „grafting onto“-Prozess von funktionalisierten Lipopolymeren oder c) einer Organisation einer Lipopolymer/Lipid-Monolage an der Wasser/Luft-Grenzfläche mit anschließendem LB-Übertrag. Die zweite Lipidschicht wurde mittels Vesikelfusion aufgebracht.

In einem ersten Ansatz (Abbildung 55a) zu solchen ultradünnen Polymer-schichten wurde auf einem Glasobjektträger eine polykristalline Goldschicht aufgedampft, die wiederum als Grundlage für eine selbstorganisierte monomolekulare Schicht (SAM) auf Thiolbasis dienen sollte. Der SAM wurde in das entsprechende Triflat umgewandelt, welches als Initiator für die Polymerisation diente. Der lebende Mechanismus der Polymerisation sollte einen kontinuierlichen Anstieg der Schichtdicke mit der Polymerisationszeit gewährleisten. Aufgrund von geringsten Spuren von Verunreinigungen konnte die oberflächeninitiierte Polymerisation jedoch nicht im gewünschten Rahmen kontrolliert werden.

Der zweite Ansatz (Abbildung 55b) beruht auf der Synthese eines funktionalisierten Lipopolymers, das nach der vollständigen Synthese und Charakterisierung kovalent auf eine Substratoberfläche gebunden werden kann. Das gewählte Polymerisationssystem ermöglichte es, die Polymere für die Anwendung in polymerunterstützten Lipidmembranen anzupassen und zu optimieren. In erster Linie wurden der Polymerisationsgrad und die Lipidgruppen entsprechend verändert. Die zum Teil selbst synthetisierten Etherlipide wurden triflatisiert und starteten somit die Polymerisation. Das Polymer sollte in dem System als hydrophile Zwischenschicht mit optimierter Kettenlänge den Abstand zwischen Membran und Substrat einstellen. Eine Kopplungsgruppe (Trimethoxysilan) am Ende der Polymerkette sollte zur kovalenten Anbindung an SiO₂-Oberflächen durch die Endfunktionalisierung über eine kontrollierte Abbruchreaktion eingeführt werden. Ein „grafting onto“-Prozess zum Aufbau von Monolagen konnte realisiert werden. Der Aufbau einer Lipiddoppelschicht auf eine so hergestellte Lipopolymer-monolage wurde mit unterschiedlichen Methoden nicht erreicht. Dies ist vermutlich auf eine unzureichende Vororganisation einer Lipidschicht bzw. auf eine zu geringe Lipidkonzentration an der Oberfläche zurückzuführen.

Eine Orientierung der Lipopolymere vor dem Übertrag auf die Oberfläche wurde mittels der Langmuir-Blodgett-Technik (Abbildung 55c) realisiert. Hierbei wurde eine Mischung aus Lipiden und Lipopolymeren auf der Wasser/Luft-

Grenzfläche gespreitet. Der hydrophile Poly(2-methyl-2-oxazolin)teil taucht dabei in die Wasserphase, die hydrophoben Lipidreste hingegen richten sich zur Luft hin aus. Beim Komprimieren der Monolage an der Grenzfläche wurde dabei eine selbstorganisierte dichte Lipid/Lipopolymerschicht gebildet. Beim Übertrag dieser Schicht bei niedrigeren Übertragungsgeschwindigkeiten konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie eine Phasenseparation („Streifenmuster“ parallel zur Übertragsrichtung) beobachtet werden. Der Abstand der Streifen (mehrere μm) verringerte sich mit einer Erhöhung der Übertragungsgeschwindigkeit, bis sie bei sehr großen Übertragungsgeschwindigkeiten verschwanden. Bei den so gebildeten homogenen Lipidschichten gelang es über eine Vesikelfusion, fluide Lipiddoppelschichten aufzubauen. Anhand dieser stabilen polymerunterstützten Membranen konnte mittels FLIC-Spektroskopie eine direkte Abhängigkeit zwischen Polymerisationsgrad und Dicke der gequollenen hydrophilen Polymerschicht nachgewiesen werden ($n = 14 \rightarrow d \approx 1,3 \text{ nm}$; $n = 33 \rightarrow d \approx 5,2 \text{ nm}$). Darüber hinaus zeigen diese Membranen eine nahezu ungehinderte laterale Diffusion der Lipide in der äußeren Lipidschicht. Die Diffusion der inneren Schicht hingegen kann durch einen hohen Polymeranteil sehr stark behindert werden (50 mol% Lipopolymer ($n=14$) $\rightarrow D = 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Bei einem Anteil von 5 mol% Polymer ($n=14$) zeigt sich aber nur eine minimale Störung des Systems ($D = 1,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Bei dem Einsatz von Lipopolymeren mit verschiedenen Lipidgruppen konnte kein Unterschied in den Membraneigenschaften festgestellt werden. Die Polymerkettenlänge zeigte im Gegensatz dazu am Beispiel des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Integrins einen starken Einfluss auf die Inkorporation von Membranproteinen. Ab einem Polymerisationsgrad von 33 werden diese Proteine homogen in die Membran eingebaut.

Somit zeigte die Synthese von funktionalisierten Lipopolymeren und der Übertrag der vororientierten Polymere ein großes Potential zum Aufbau von polymerunterstützten Lipidmembranen mit ungehinderter lateraler Diffusion und sehr guter chemischer und physikalischer Langzeitstabilität. Gerade die demonstrierte Inkorporation von großen Transmembranproteinen zeigte das Potential dieses biomimetischen Membransystems. Dies ermöglicht einen späteren

Einsatz der Membranen für biosensorische Zwecke. Die Einsatzmöglichkeiten könnten durch die Verwendung von Lipopolymeren mit membranspannenden Lipiden und deren Funktionalisierung an der Membranaußenseite noch deutlich erweitert werden. Erste Versuche zur Extraktion solcher Lipide wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt.

6 Experimentalteil

6.1 Material

6.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Digital Instruments Multimode Nanoscope IIIa

Scanner: AS-130NM („J“)

mit Extender™ Electronics Module

Ausgerüstet für ‚full contact mode‘, PhaseImaging™ und ‚tapping mode‘

Bedampfungsanlage

Fa. Edwards, Typ: Auto 306 Turbo mit Schwingquartzmonitor und Substratheizung

Ellipsometrie

Fa. Plasmos, Typ: SD 2302

He-Ne-Laser (Wellenlänge: 632,8 nm)

Laser- und Detektorwinkel: 70°

Programm: Plasmos SD Version 4.46

NMR-Spektroskopie

Bruker ARX 300

Messtemperatur 300K

Messung in CDCl₃

¹H-NMR-Spektren: 300,13 MHz

¹³C-NMR-Spektren: 75,47 MHz

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Pumpe: Fa. Waters, Mod. 510

RI-Detektor: Waters 410

Eluent: CHCl₃ mit Polystyrolstandards

Eluent: DMAc mit Polymethylmethacrylatstandards

Fluss: 1 mL/min

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Bruker Biflex III

Kontaktwinkelmessung

DSA 10

Krüss GmbH

DSAI Software

6.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anderweitig beschrieben wurden alle Chemikalien von Aldrich, Fluka, ABCR, Bachem, Chempur oder Avanti Polar Lipids bezogen und ohne weitere Reinigung umgesetzt. Deuterierte Lösemittel für die NMR-Spektroskopie wurden von der Firma Deutero GmbH bezogen. Die Lösemittel für chemische Umsetzungen wurden vor Gebrauch destilliert, im Bedarfsfall nach Standardmethoden absolutiert und unter Schutzgas (N₂) gelagert.

6.2 Oberflächeninitiierte Polymerisation

6.2.1 Präparation der Goldsubtrate

Die Objektträger werden mit Aceton von Fettrückständen gereinigt und anschließend für 30 min in destilliertem Ethanol bei 40 °C mit Ultraschall behandelt. Nach dem Entfernen des Ethanols im Stickstoffstrom werden die Objektträger 15 min im Sauerstoffplasma bei einem O₂-Druck von 10⁻¹ mbar gereinigt und schnellstmöglich in die Bedampfungsapparatur überführt. Dort

werden die Objektträger bei 10^{-7} mbar für 24 h bei 300 °C getempert. Vor der Bedampfung wird das Gold 5 min bei Rotglut von Verunreinigungen befreit und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 0,2–0,3 nm/s bis zu einer Schichtdicke von 150 nm auf die Substrate aufgedampft. Im Anschluss daran wird die Goldschicht bei 300 °C weitere 24 h getempert. Die Apparatur wird mit Stickstoff befüllt und die Objektträger entweder sofort in die Thiollösung zur SAM-Präparation oder in einen Excikator mit inerter Atmosphäre überführt.

6.2.2 Präparation der SAM

Die frischen Goldoberflächen werden aus der Bedampfungsanlage sofort in eine Thiollösung (HUT in THF, $c = 10\mu\text{mol/L}$) überführt, die von einem leichten Stickstoffstrom durchmischt wird. Die Bildung der Monolage ist nach 16 h bei Raumtemperatur unter Stickstoff beendet. Der Objektträger wird dann aus der Thiollösung entfernt, mit reinem Lösemittel mehrmals abgespült und anschließend im N_2 -Strom getrocknet. Die Qualität des SAM wird unverzüglich durch Schichtdickenmessung mittels Ellipsometrie festgestellt.

6.2.3 Oberflächeninitiierte Polymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolin

Die 11-Hydroxyundecanthiol-Monolagen werden in einen Glasreaktor gestellt, dieser wird druckdicht verschlossen, und die Luftatmosphäre durch eine trockene Stickstoffatmosphäre ersetzt. Einige Tropfen Trifluormethansulfonsäureanhydrid werden zugegeben, wobei der direkte Kontakt der Flüssigkeit mit dem Substrat vermieden wird. Der Reaktor wird verschlossen und die Reaktion in der Gasphase über Nacht vervollständigt. Mehrmaliges Evakuieren und Spülen mit trockenem N_2

entfernt das überschüssige Trifluormethansulfonsäureanhydrid sowie die entstandene freie Säure. Anschließend werden 3 mL (2,946 g; 29,7 mmol) 2-Ethyl-2-oxazolin bzw. 3 mL (3,015 g; 35,4 mmol) 2-Methyl-2-oxazolin und 75 mL absolutes Acetonitril zugegeben und der Reaktor in ein auf 80 °C temperiertes Ölbad überführt. Nach den jeweiligen Polymerisationszeiten bei 80 °C wird die Reaktionslösung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von 2 mL (20,2 mmol) Piperidin abgebrochen. Eine quantitative Endfunktionalisierung erreicht man durch Rühren der Lösung bei Raumtemperatur über Nacht. Die Substrate werden einige Minuten in reinem Aceton gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend erfolgt die Schichtdickenmessung mittels Ellipsometrie.

6.3 Lipidsynthesen

6.3.1 Phytanol (3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-1-ol)

Raney-Nickel (15 g) wird drei Mal mit jeweils 100 mL Methanol gewaschen und anschließend in weiteren 150 mL Methanol suspendiert. Der Suspension werden 21,30 g (71,8 mmol) 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (Phytol) zugegeben und bei Raumtemperatur für 72 Stunden mit Wasserstoffgas reduziert. Der Katalysator wird mittels eines PTFE-Filters abfiltriert und das Methanol unter vermindertem Druck abdestilliert. Mit quantitativer Ausbeute erhält man 21,43 g (71,8 mmol) Phytanol als farbloses Öl, das ohne weitere Aufreinigung in den folgenden Reaktionen eingesetzt wird.

$^1\text{H NMR}$ (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, $-\text{CH}_3$, 15 H); δ 1,0-1,6 (b, $-(\text{CH}_{1,2})_{14}$, 24 H); δ 3,5-3,7 (b, $-\text{CH}_2\text{-OH}$, 2 H).

6.3.2 Methansulfonsäurephytanylester (Methansulfonsäure-3,7,11,15-tetramethylhexadecylester)

In einem 50 mL Kolben werden unter Schutzgas (N₂) 4,50 g (15 mmol) Phytanol in 15 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur werden langsam 2,59 g (22,6 mmol) Methansulfonsäurechlorid zugetropft und anschließend für 2 Stunden intensiv gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung in 100 mL Wasser überführt und drei Mal mit jeweils 50 mL Essigester ausgeschüttelt. Das Lösemittel wird im Membranpumpenvakuum entfernt. Dabei erhält man bei einer Ausbeute von 92% 5,21 g (13,83 mmol) Methansulfonsäurephytanylester als gelbes Öl.

¹H NMR (in CDCl₃) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, -CH₃, 15 H); δ 1,0-1,8 (b, -(CH_{1,2})₁₄-, 24 H); δ 3,0 (s, -SO₂-CH₃, 3 H); δ 4,1-4,4 (b, -CH₂-O-, 2 H).

6.3.3 1-Benzyl-2,3-O-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol

In 3 mL DMSO werden 252 mg (10,50 mmol) NaH suspendiert. Dieser Suspension wird eine Lösung aus 580 mg (3,18 mmol) 1-Benzylglycerol und wiederum 3 mL DMSO langsam zugetropft. Nach einer Stunde wird der Reaktionslösung eine Mischung aus 2,46 g (6,52 mmol) Methansulfonsäurephytanylester und 7 mL DMSO zugegeben. Die Lösung wird für weitere 6 Tage bei 45 °C gerührt. Es werden 30 mL gesättigte NH₄Cl-Lösung zugegeben und mehrmals mit EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, das Salz wird abfiltriert und das Lösemittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird über Kieselgel mit einem Lösemittelgemisch (Hexan:Essigester = 50:1) säulenchromatographisch getrennt.

Dabei erhält man mit einer Ausbeute von 70% 1,66 g (2,23 mmol) 1-Benzyl-2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol als farbloses Öl.

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, $-\text{CH}_3$, 30 H); δ 1,0-1,8 (b, $-(\text{CH}_{1,2})_{14}$, 48 H); δ 3,5-3,7 (b, $-\text{CH}_{1,2}-\text{O}$, 9 H); δ 4,6 (s, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); δ 7,2-7,4 (b, arom., 5 H).

6.3.4 2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol (Archaeol)

In 20 mL EtOAc werden 1,41 g (1,89 mmol) 1-Benzyl-2,3-*O*-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol gelöst und 1,5 g Pd/C (10%) zugegeben. In dem Glaskolben und der Lösung wird die Luft durch mehrmaliges kurzes Erzeugen von Unterdruck und anschließendes Begasen durch Wasserstoff ersetzt. Die Benzylschutzgruppe wird für 4 Tage bei 40 °C unter einer Wasserstoffatmosphäre abgespalten. Der Katalysator wird mittels eines PTFE-Filters abfiltriert. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Eine säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel mit dem Laufmittel Hexan:Essigester (20:1) ergibt 1,053 g (1,61 mmol) 2,3-*O*-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 85%.

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, $-\text{CH}_3$, 30 H); δ 1,0-1,8 (b, $-(\text{CH}_{1,2})_{14}$, 48 H); δ 3,5-3,7 (b, $-\text{CH}_{1,2}-\text{O}$, 9 H).

6.3.5 Extraktion von Caldarchaeol aus dem *Methanobacterium Thermoautotrophicum delta H*

Eine abzentrifugierte Biomasse des Archaeobakteriums *Methanobacterium Thermoautotrophicum delta H* (190,9 g) wird in einem Glaskolben mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei ca. $2,6 \cdot 10^{-1}$ mbar gefriergetrocknet. Nach einer Trockenzeit von 20 h erhält man 46,3 g trockene Bakterienmasse. Mit einem Mixer werden 21,6 g der getrockneten Bakterien in 250 mL Wasser suspendiert und im Anschluss daran mit einer *French Press* bei 1500 bar zerkleinert. Nach einer Ultraschallbehandlung und nochmaligem Mixen der wässrigen Zellmasse wird diese erneut mit der *French Press* bei 1500 bar behandelt. Die Geräte werden nachgespült, sodass man ein Gesamtvolumen von 500 mL Suspension erhält. Die aufgebrochenen Zellen werden mit 200 mL MeOH und 100 mL CHCl₃ versetzt, für 3 Minuten mit Ultraschall behandelt und weitere 100 mL CHCl₃ werden hinzugegeben. Die Suspension wird nochmals für 90 s beschallt. Nach einer Zugabe von 60 mL Wasser und 100 mL Chloroform wird die Suspension in einen Schütteltrichter überführt. Nach der Phasentrennung über Nacht wird die organische Phase entfernt und die Wasserphase drei Mal mit je 150 mL Chloroform ausgeschüttelt. Die restliche Zellmasse wird abzentrifugiert und die lipophilen Bestandteile in einer Soxhlett-Apparatur mit einem Gemisch aus 200 mL Methanol und 200 mL Chloroform für 3 Tage extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, und das Lösemittel wird im Unterdruck entfernt. Der entstehende gelbe Feststoff (950 g) wird mit Hexan gewaschen, wobei unlöslicher Rückstand (580 mg) bleibt. Dieser Rückstand wird mit 30 mL 32%iger Salzsäure und 130 mL Methanol für 6 h gerührt und im Anschluss daran drei Mal mit Chloroform und zwei Mal mit Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und im Membranpumpenvakuum entfernt. Die dabei erhaltenen Lipide (270 mg) werden säulenchromatographisch über Kieselgel mit dem Laufmittel Hexan:Essigester (4:1) getrennt. Dies ergibt 9 mg Caldarchaeol.

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,7-0,9 (b, 48 H); δ 1,0-1,7 (b, 104 H); δ 2,2 (b, 2 H); δ 3,3-3,7 (b, 18 H).

6.4 Lipopolymersynthesen

6.4.1 Initiatoren

6.4.1.1 Trifluormethansulfonsäurephytanylester (*Trifluormethansulfonsäure-3,7,11,15-tetramethylhexadecylester*)

Einer auf 0 °C gekühlten Mischung, aus 1,83 g (13,24 mmol) getrocknetem Kaliumcarbonat und 0,99 g (3,32 mmol) Phythanol in 40 mL Dichlormethan wird langsam 1,40 g (4,97 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 30 mL Dichlormethan zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt, in dieser Zeit wird die Temperatur von 0°C auf Raumtemperatur erhöht. Der Feststoff wird mit einem Spritzenfilter (PTFE-Filter $\Phi=0,45\ \mu\text{m}$, Sartorius) aus der Lösung abfiltriert. Das Lösemittel wird unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser (Luftfeuchtigkeit) im Feinvakuum abdestilliert. Letzte Verunreinigungen werden durch eine Gefriertrocknung mit 10 mL Benzol entfernt. 1,43 g (3,32 mmol) Trifluormethansulfonsäurephytanylester werden quantitativ als braunes Öl erhalten.

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, 15 H); δ 1,0-1,6 (b, 24 H); δ 4,5-4,7 (b, 2 H).

6.4.1.2 Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerylester

Die Synthese des Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerylester wird analog zu 6.4.1.1 durchgeführt. Es werden 300 mg (0,459 mmol) 2,3-O-Di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol mit 254 mg (1,836 mmol) Kaliumcarbonat in 10 mL DCM suspendiert. Bei 0°C werden 195 mg (0,689 mmol) Triflatanhydrid in 5 mL DCM zugetropft und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung verfärbt sich in den ersten Stunden von farblos über rot in ein dunkles Braun und ist zum Ende der Reaktion leicht gelb. Nach der Filtration, dem Entfernen des Lösemittels und dem Gefriertrocknen mit Benzol erhält man 356 mg (0,453 mmol) des gewünschten Triflates als farbloses Öl.

$^1\text{H NMR}$ (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8-0,9 (b, $-\text{CH}_3$, 30 H); δ 1,0-1,8 (b, $-(\text{CH}_{1,2})_{14}$, 48 H); δ 3,5-3,7 (b, $-\text{CH}_{1,2}-\text{O}$, 7 H); δ 4,4-4,6 (b, CH_2-OTf , 2 H).

Ausbeute:

99%

6.4.1.3 Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester

Analog zu den anderen Lipidinitiatoren werden 500 mg (0,84 mmol) 1,2-O-Dioctadecyl-*sn*-glycerol und 460 mg (3,36 mmol) Kaliumcarbonat in 20 mL DCM mit 350 mg (1,26 mmol) Triflatanhydrid in 10 mL DCM umgesetzt. Dies ergibt nach Filtration und Gefriertrocknen aus 5 mL Benzol in quantitativer Ausbeute 610 mg (0,84 mmol) farbloses Pulver.

$^1\text{H NMR}$ (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,8 (b, CH_3-CH_2 , 6 H); δ 1,1-1,4 (b, $-(\text{CH}_2)_{15}$, 60H); δ 1,4-1,6 (b, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$, 4H); δ 3,3-3,7 (b, CH_2-O , $\text{CH}-\text{O}$, 7H); δ 4,4-4,6 (b, CH_2-OTf , 2H).

6.4.2 Polymerisation

6.4.2.1 Allgemeine Polymerisationsvorschrift

Der Initiator wird im Lösemittel gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der kalten Lösung wird 2-Methyl-2-oxazolin zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird druckdicht verschlossen und aus dem Eisbad direkt in das vorgeheizte Ölbad überführt. Am Ende der Reaktionszeit wird die Lösung schnell in ein Eisbad überführt und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird 3-Aminopropyltrimethoxysilan zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Ölpumpenvakuum entfernt, bis eine ölige Flüssigkeit entsteht. Aus dieser Lösung wird das Polymer in 250 mL kaltem und trockenem Diethylether gefällt und über Nacht im Kühlschrank nachgefällt. Das Polymer wird mit einer Druckfiltration (PTFE-Filter $\Phi=0,45\ \mu\text{m}$, Sartorius) mit 5 bar Stickstoff abfiltriert, in 10 mL CHCl_3 gelöst und über Nacht mit ca. 1 g Kaliumcarbonat gerührt. Das Carbonat wird abfiltriert und das Polymer nochmals in kaltem, trockenem Diethylether ausgefällt. Eine weitere Druckfiltration ergibt das Polymer, welches in 5 mL Benzol gefriergetrocknet wird. Nach der Gefriertrocknung erhält man das Polymer als farbloses Pulver.

6.4.2.2 *MePMOx₁₃Sil*

Trifluormethansulfonsäuremethylester:	142 mg (0,87 mmol)
2-Methyl-2-oxazolin:	1,179 g (13,85 mmol)
3-Aminopropyltrimethoxysilan:	775 mg (3,80 mmol)
Lösemittel:	Chloroform
Reaktionszeit und –temperatur:	28 h bei 60°C

Ausbeute: 98%

$^1\text{H NMR}$ (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$); δ 1,2 (b, (CH_2)); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,7-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,0 (b, $\text{CH}_3\text{-N}$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N(CO-CH}_3\text{)-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=777$; $\overline{M}_w=958$; PDI=1,23

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=1372$; $\overline{M}_w=1488$; PDI=1,08

6.4.2.3 *MePMOx₂₂Sil*

Trifluormethansulfonsäuremethylester: 352 mg (2,15 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 4,391 g (51,62 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,93 g (10,76 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und –temperatur: 35 h bei 60°C

Ausbeute: 75%

$^1\text{H NMR}$ (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$); δ 1,2 (b, (CH_2)); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,7-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,0 (b, $\text{CH}_3\text{-N}$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N(CO-CH}_3\text{)-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=1279$; $\overline{M}_w=1523$; PDI=1,18

6.4.2.4 *PhyPMOx₁₂Sil*

Trifluormethansulfonsäurephytanylester: 604 mg (1,40 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 1,194 g (14,02 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,89 g (10,53 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und –temperatur: 24 h bei 60°C

Ausbeute: 54%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,6 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=1407$; $\overline{M}_w=1582$; PDI=1,12

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=1667$; $\overline{M}_w=1775$; PDI=1,06

6.4.2.5 *PhyPMOx₁₂Pip*

Trifluormethansulfonsäurephytanylester: 302 mg (0,70 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 597 mg (7,01 mmol)

Piperidin: 537 mg (6,31 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 24 h bei 60°C

Ausbeute: 54%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,6 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=1337$; $\overline{M}_w=1562$; PDI=1,17

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=1595$; $\overline{M}_w=1692$; PDI=1,06

6.4.2.6 *PhyPMOx₂₁Sil*

Trifluormethansulfonsäurephytanylester: 1,025 g (2,38 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 4,146 g (47,61 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 4,27 g (23,80 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 40 h bei 60°C

Ausbeute: 78%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,6 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=2111$; $\overline{M}_w=2440$; PDI=1,16

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=2086$; $\overline{M}_w=2272$; PDI=1,09

6.4.2.7 *PhyPMOx₃₂Sil*

Trifluormethansulfonsäurephytanylester: 340 mg (0,79 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 2,044 g (23,69 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 0,708 g (3,95 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und –temperatur: 48 h bei 60°C

Ausbeute: 76%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,6 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=2348$; $\overline{M}_w=2681$; PDI=1,14

6.4.2.8 *Phy₂PMOx₁₁Sil*

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-diphytanylglycerylester: 116 mg (0,22 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 181 mg (2,12 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,22 g (6,80 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und –temperatur: 30 h bei 60°C

Ausbeute: 92%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,7 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (DMAc): $\overline{M}_n=1777$; $\overline{M}_w=1853$; PDI=1,04

6.4.2.9 *Phy₂PMOx₂₁Sil*

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-diphytanylglycerylester: 340 mg (0,43 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 737 mg (8,66 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,22 g (6,80 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 40 h bei 60°C

Ausbeute: 89%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si}(\text{OMe})_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,7 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CO-CH}_3)\text{-CH}_2$).

GPC (CHCl_3): $\overline{M}_n=1564$; $\overline{M}_w=1681$; PDI=1,07

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=2351$; $\overline{M}_w=2484$; PDI=1,06

6.4.2.10 *Phy₂PMOx₄₃Sil*

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-diphytanylglycerylester: 151 mg (0,19 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 655 mg (7,69 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 610 mg (3,40 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 50 h bei 60°C

Ausbeute: 84%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,7 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N(CO-CH}_3\text{)-CH}_2$).

GPC (DMAc): $\overline{M}_n=4580$; $\overline{M}_w=5305$; PDI=1,16

6.4.2.11 *Phy₂PMOx₇₅Sil*

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-diphytanylglycerylester: 186 mg (0,24 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 1,613 g (18,95 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 610 mg (3,40 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 12 Tage bei 55°C

Ausbeute: 87%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,0-1,7 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N(CO-CH}_3\text{)-CH}_2$).

GPC (DMAc): $\overline{M}_n=8635$; $\overline{M}_w=11789$; PDI=1,37

6.4.2.12 *2C₁₈PMOx₁₂Sil*

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester: 354 mg (0,49 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 413 mg (4,90 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,22 g (6,80 mmol)

Lösemittel: Acetonitril

Reaktionszeit und -temperatur: 11 h bei 80°C

Ausbeute: 63%

^1H NMR (in CDCl_3) δ (ppm): δ 0,6 (b, $\text{CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$); δ 0,8-0,9 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,1-1,4 (b, $(\text{CH}_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, $\text{CH}_3\text{-CO-N}$); δ 2,6-2,8 (b, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$); δ 3,3-3,6 (b, $\text{CH}_2\text{-N(CO-CH}_3\text{)-CH}_2$).

GPC (CHCl₃): $\overline{M}_n=1364$; $\overline{M}_w=2104$; PDI=1,54

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=1968$; $\overline{M}_w=2072$; PDI=1,05

6.4.2.13 $2C_{18}PMOx_{14}Sil$

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester: 525 mg (0,72 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 613 mg (7,20 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,00 g (5,57 mmol)

Lösemittel: Chloroform

Reaktionszeit und -temperatur: 20 h bei 60°C

Ausbeute: 52%

¹H NMR (in CDCl₃) δ (ppm): δ 0,6 (b, CH₂-Si(OMe)₃); δ 0,8-0,9 (t, CH₃-CH₂); δ 1,1-1,4 (b, (CH₂)_n); δ 2,0-2,2 (b, CH₃-CO-N); δ 2,6-2,8 (b, CH₂-NH-CH₂); δ 3,3-3,6 (b, CH₂-N(CO-CH₃)-CH₂).

GPC (CHCl₃): $\overline{M}_n=855$; $\overline{M}_w=933$; PDI=1,09

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=1469$; $\overline{M}_w=1607$; PDI=1,09

6.4.2.14 $2C_{18}PMOx_{17}Sil$

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester: 193 mg (0,26 mmol)

2-Methyl-2-oxazolin: 338 mg (3,97 mmol)

3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,22 g (6,80 mmol)

Lösemittel: Acetonitril

Reaktionszeit und -temperatur: 20 h bei 80°C

Ausbeute: 71%

¹H NMR (in CDCl₃) δ (ppm): δ 0,6 (b, CH₂-Si(OMe)₃); δ 0,8-0,9 (t, CH₃-CH₂-); δ 1,1-1,4 (b, (CH₂)_n); δ 2,0-2,2 (b, CH₃-CO-N); δ 2,6-2,8 (b, CH₂-NH-CH₂); δ 3,3-3,6 (b, CH₂-N(CO-CH₃)-CH₂).

GPC (CHCl₃): $\overline{M}_n=2453$; $\overline{M}_w=2858$; PDI=1,17

6.4.2.15 $2C_{18}PMOx_{18}Sil$

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester: 615 mg (0,84 mmol)
2-Methyl-2-oxazolin: 1,436 g (16,87 mmol)
3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,512 g (8,43 mmol)
Lösemittel: Chloroform
Reaktionszeit und -temperatur: 40 h bei 60°C
Ausbeute: 86%

¹H NMR (in CDCl₃) δ (ppm): δ 0,6 (b, CH₂-Si(OMe)₃); δ 0,8-0,9 (t, CH₃-CH₂-); δ 1,1-1,4 (b, (CH₂)_n); δ 2,0-2,2 (b, CH₃-CO-N); δ 2,6-2,8 (b, CH₂-NH-CH₂); δ 3,3-3,6 (b, CH₂-N(CO-CH₃)-CH₂).

GPC (CHCl₃): $\overline{M}_n=1191$; $\overline{M}_w=1582$; PDI=1,33

MALDI-TOF-MS: $\overline{M}_n=2055$; $\overline{M}_w=2288$; PDI=1,01

6.4.2.16 $2C_{18}PMOx_{33}Sil$

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester: 484 mg (0,66 mmol)
2-Methyl-2-oxazolin: 2,260 g (16,87 mmol)
3-Aminopropyltrimethoxysilan: 1,19 g (6,64 mmol)
Lösemittel: Chloroform
Reaktionszeit und -temperatur: 50 h bei 60°C
Ausbeute: 75%

¹H NMR (in CDCl₃) δ (ppm): δ 0,6 (b, CH₂-Si(OMe)₃); δ 0,8-0,9 (t, CH₃-CH₂-); δ 1,1-1,4 (b, (CH₂)_n); δ 2,0-2,2 (b, CH₃-CO-N); δ 2,6-2,8 (b, CH₂-NH-CH₂); δ 3,3-3,6 (b, CH₂-N(CO-CH₃)-CH₂).

GPC (CHCl₃): $\overline{M}_n=1496$; $\overline{M}_w=1950$; PDI=1,30

6.4.2.17 $2C_{18}PMOx_{104}SiI$

Trifluormethansulfonsäure-2,3-O-dioctadecylglycerylester:	210 mg (0,29 mmol)
2-Methyl-2-oxazolin:	2,45 g (28,80 mmol)
3-Aminopropyltrimethoxysilan:	516 mg (2,88 mmol)
Lösemittel:	Chloroform
Reaktionszeit und -temperatur:	15 Tage bei 55°C
Ausbeute:	87%
1H NMR (in $CDCl_3$) δ (ppm): δ 0,6 (b, $CH_2-Si(OMe)_3$); δ 0,8-0,9 (t, CH_3-CH_2-); δ 1,1-1,4 (b, $(CH_2)_n$); δ 2,0-2,2 (b, CH_3-CO-N); δ 2,6-2,8 (b, $CH_2-NH-CH_2$); δ 3,3-3,6 (b, $CH_2-N(CO-CH_3)-CH_2$).	
GPC (DMAc): $\overline{M}_n=9369$; $\overline{M}_w=12186$; PDI=1,30	

6.5 *Herstellung der Lipopolymermonolagen*6.5.1 **RCA-Reinigung der SiO_2 -Substrate**

Die Substrate werden intensiv mit Ethanol und Aceton mit einem weichen Tuch abgewischt, anschließend mehrmals mit Wasser gespült und in die erste Reinigungslösung [50 mL H_2O , 10 mL NH_3 (33%), 10 mL H_2O_2 (33%)] überführt. Nach einer zweiminütigen Behandlung mit Ultraschall wird die Lösung langsam auf 80 °C erhitzt und weitere 10 min bei dieser Temperatur gehalten. Die Lösung wird bis zur Neutralität mit Wasser verdünnt und mehrmals mit Wasser gespült. Die zweite Reinigungslösung, bestehend aus 60 mL H_2O , 10 mL HCl (37%) und 10 mL H_2O_2 , wird auf 80 °C erwärmt. Das Substrat wird in die zweite Reaktionslösung transferiert und für 15 Minuten darin bei 80 °C aufbewahrt. Nach beendeter

Reinigung wird das Substrat intensiv mit Wasser gespült, bevor es direkt für den Pflropfungsschritt verwendet wird.

6.5.2 Silanisierung von SiO₂

Nach der Reinigung des Substrats mit der RCA-Methode wird es schrittweise in trockenes Acetonitril überführt und darin für 5 Minuten äquilibriert. Anschließend folgen 15 Minuten Ultraschallbehandlung, bevor 15 mL der Polymerlösung mit einer Konzentration von 10^{-3} mol/L Polymer in Acetonitril zugegeben werden. Die Lösung wird auf 80 °C erwärmt und für eine Stunde im Ultraschallbad bei dieser Temperatur unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gehalten. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Substrat 5-mal mit Aceton gespült. Nach dem letzten Spülschritt werden die entstehenden kleinen Tropfen mit einem Stickstoffstrahl von der Oberfläche entfernt und das Substrat trocken aufbewahrt.

7 Literatur

- [1] I. Rubinstein, S. Steinberg, Y. Tor, A. Shanzer, J. Sagiv, *Nature* **1988**, 332, 426.
- [2] H. Schönherr, H. Ringsdorf, *Langmuir* **1996**, 12, 3891.
- [3] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533.
- [4] J. Rühle, G. Blackmann, V. J. Novotny, T. Clarke, G. B. Street, S. Kuan, *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, 53, 825.
- [5] A. Homala, M. Mate, G. B. Street, *MRS. Bull.* **1990**, 15, 45.
- [6] J. S. Singer, G. I. Nicolson, *Science* **1972**, 175, 723.
- [7] C. R. Lowe, *Biosensors* **1985**, 1, 3.
- [8] R. C. F. Scheller, F. Schubert, F. Renneberg, H. G. Müller, M. Jänchen, H. Weise, *Biosensors* **1985**, 1, 135.
- [9] M. P. Byfield, R. A. Abuknesha, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 373.

-
- [10] P. Rolfe, *Med. Biol. Eng. Comput.* **1990**, 28, B34.
- [11] M. E. Collison, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 425A.
- [12] H. Eibel, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 247.
- [13] R. Y. Morita, *Bacteriol. Rev.* **1975**, 39, 144.
- [14] E. Blöchl, R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, K. O. Stetter, *Extremophiles* **1997**, 1, 14.
- [15] C. Schleper, G. Pühler, I. Holz, A. Gambacorta, D. Janekovic, U. Santarius, H.-P. Klenk, W. Zillig, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 7050.
- [16] K. J. A. Hauben, D. H. Barlett, C. C. F. Soontjens, K. Cornelis, E. Y. Wuytack, C. W. Michiels, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 945.
- [17] R. H. Vreeland, *Crit. Rev. Microbiol.* **1987**, 14, 311.
- [18] R. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* **1925**, 41, 439.
- [19] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1.
- [20] T. C. Thomas, M. G. McNamee, *Meth. Enzymol.* **1990**, 182, 499.
- [21] T. D. Madden, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 40, 207.
- [22] D. Chapman, *Biomembrane – Structure and Function*, VCH Weinheim **1984**, 1.
- [23] N. Unwin, *Nature* **1995**, 373, 37.
- [24] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen- und Kolloidchemie*, Wiley-VCH Verlag, **1994**, 316.
- [25] W. Thompson, G. MacDonald, *Eur. J. Biochem* **1976**, 65, 107.
- [26] W. Thompson, G. MacDonald, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 6779.
- [27] R. Wood, R. D. Harlow, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, 135, 272.
- [28] J. Browse, N. Warwick, C. R. Somerville, C. R. Slack, *Biochem. J.* **1986**, 235, 25.
- [29] T. Inoue, T. Tasaka, R. Shimosawa, *Chem. Phys. Lipids* **1992**, 63, 203.
- [30] Y. Nibu, T. Inoue, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 76, 159.

- [31] T. Inoue, Y. Nibu, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 76, 171.
- [32] T. Inoue, Y. Nibu, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 76, 181.
- [33] R. Koynova, M. Caffrey, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 115, 107.
- [34] P. Läuger, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 939.
- [35] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Westcott, *Nature* **1962**, 194, 979.
- [36] K. A. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 1007.
- [37] I. Langmuir, V. I. Schäfer, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 1351.
- [38] E. Kalb, S. Frey, L. K. Tamm, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1103, 307.
- [39] A. L. Plant, *Langmuir* **1993**, 9, 2764.
- [40] S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1991**, 59, 289.
- [41] B. W. Koenig, S. Krueger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, K. Gawrisch, *Langmuir* **1996**, 12, 1343.
- [42] P. Fromherz, V. Kiessling, K. Kottig, G. Zeck, *Appl. Phys. A* **1999**, 69, 571.
- [43] V. Kiessling, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2003**, 84, 408.
- [44] O. Purrucker, H. Hillebrandt, K. Adlkofer, M. Tanaka, *Electrochim. Acta* **2001**, 47, 791.
- [45] H. M. McConnell, T. H. Watts, R. M. Weis, A. A. Brain, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 864, 95.
- [46] R. Merkel, E. Sackmann, E. Evans, *J. Phys. (France)* **1989**, 50, 1535.
- [47] C. Duschl, W. Knoll, *J. Chem. Phys.* **1988**, 88, 4062.
- [48] C. Naumann, T. Brumm, T. M. Bayerl, *Biophys. J.* **1992**, 63, 1314.
- [49] J. Rädler, T. Feder, H. Strey, E. Sackmann, *Phys. Rev. E.* **1995**, 51, 4526.[50]
E. Sackmann, *Science* **1996**, 271, 43.
- [51] L. Häußling, W. Knoll, H. Ringsdorf, F.-J. Schmitt, J. Yang, *Macromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, 46, 145.
- [52] E. Sackmann, M. Tanaka, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 58.

-
- [53] H. Hillebrandt, G. Wiegand, M. Tanaka, E. Sackmann, *Langmuir* **1999**, *15*, 8451.
- [54] S. Gönnerwein, M. Tanaka, B. Hu, L. Moroder, E. Sackmann, *Biophys. J.* **2003**, *48*, 646.
- [55] M. Seitz, E. Ter-Ovanesyan, M. Hausch, C. K. Park, J. A. Zasadzinski, R. Zentel, J. N. Israelachvili, *Langmuir* **2000**, *16*, 6067.
- [56] P. Théato, R. Zentel, *Langmuir* **2000**, *16*, 1801.
- [57] C. A. Naumann, O. Prucker, T. Lehmann, J. Rühle, W. Knoll, C. W. Frank, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 27.
- [58] W. Knoll, C. W. Frank, C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhäusser, J. Rühle, E. K. Schmidt, W. W. Shen, A. Sinner, *Rev. Mol. Biotech.* **2000**, *74*, 137.
- [59] B. Raguse, V. Braach-Baksvytis, B. A. Cornell, Lionel G. King, P. D. J. Osman, R. J. Pace, L. Wiczorek, *Langmuir* **1998**, *14*, 648.
- [60] S. M. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, W. Knoll, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 219.
- [61] M. L. Wagner, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1400.
- [62] N. Bunjes, E. K. Schmidt, A. Jonczyk, F. Rippmann, D. Beyer, H. Ringsdorf, P. Graber, W. Knoll, R. Naumann, *Langmuir* **1997**, *13*, 6188.
- [63] T. Lehmann, J. Rühle, *Macromol. Symp.* **1999**, *142*, 1.
- [64] A. Förtig, R. Jordan, O. Purrucker, M. Tanaka, *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **2003**, *44*, 850.
- [65] G. F. Belder, G. ten Brinke, G. Hadziioannou, *Langmuir* **1997**, *13*, 4102.
- [66] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*; Academic Press, San Diego, **1991**.
- [67] A. N. Parikh, D. L. Allara, I. Ben Azouz, F. Rondelez, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7577.
- [68] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481.

- [69] A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1994**, *10*, 1498.
- [70] S. D. Evans, K. E. Goppert-Berarducci, E. Urankar, L. J. Gerenser, A. Ulman, R. G. Snyder, *Langmuir* **1991**, *7*, 2700.
- [71] B. Liedberg, P. Tengvall, *Langmuir* **1995**, *11*, 3821.
- [72] M. R. Linford, C. E. D. Chindsey, P. Fenter, P. M. Eisenberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3145.
- [73] P. E. Laibinis, J. J. Hickman, G. M. Whitesides, *Science* **1989**, *245*, 845.
- [74] N. E. Schlotter, M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132*, 93.
- [75] L. H. Dubois, B. R. Zegarski, R. G. Nuzzo, *Langmuir* **1986**, *2*, 412.
- [76] E. B. Troughton, C. D. Bain, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, D. L. Allara, M. D. Porter, *Langmuir* **1988**, *4*, 365.
- [77] G. Mao, Y. Tsao, M. Tirell, H.T. Davis, V. Hessel, H. Ringsdorf, *Langmuir* **1995**, *11*, 942.
- [78] C. D. Bain, *Adv. Mater.* **1992**, *4*, 591.
- [79] K. Adlkofer, M. Tanaka, *Langmuir* **2001**, *17*, 4267.
- [80] M. Pomerantz, A. Segmüller, L. Netzer, J. Sagiv, *Thin Solid Films* **1985**, *132*, 153.
- [81] M. Swarc, *Nature* **1956**, *178*, 1169.
- [82] M. Swarc, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2656.
- [83] P. Guionot, L. Bryant, T. Y. Chow, T. Saegusa, *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 1.
- [84] S. Kobayashi, H. Uyama, N. Higuchi, T. Saegusa, *Macromolecules* **1990**, *23*, 54.
- [85] W. Seeliger, *DE 1206585 19651209(Chemische Werke Huels A.-G., 1965): Chem. Abstr.* **1965**, *64*, 36357.
- [86] A. J. Levy, M. H. Litt, *J. Polym. Sci.* **1967**, *5*, 881.

-
- [87] W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thier, H. Hellman, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 913.
- [88] T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui, *Polym. Lett.* **1966**, 4, 441.
- [89] D. A. Tomalia, P. D. Sheetz *J. Polym. Sci. Part A-1: Polym. Chem.* **1966**, 4, 2253.
- [90] T. G. Bassiri, A. Levy, M. Litt, *Polym. Lett.* **1967**, B43, 871.
- [91] S. Penczek, P. Kubisa, K. Matyjaszewski, *Adv. Polym. Sci.* **1985**, 68, 209.
- [92] S. Kobayashi, *Prog. Polym. Sci.* **1990**, 15, 763.
- [93] A. Groß, *Dissertation*, **1994**, Universität Bayreuth.
- [94] P. Darude, *Wied. Ann.* **1891**, 43, 126.
- [95] Bedienungsanleitung zum Ellipsometer Fa. Plasmos, Typ: SD 2302.
- [96] G. Binnig, C. F. Qate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
- [97] G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, *Langmuir* **1990**, 6, 87.
- [98] R. Jordan, A. Ulman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 243
- [99] R. Jordan, N. West, A. Ulman, Y.- M. Chou, O. Nuyken, *Macromolecules* **2001**, 34, 1606.
- [100] J. F. Kang, S. Liao, R. Jordan, A. Ulman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9662.
- [101] A. Ulman, S. D. Evans, Y. Shnidman, R. Sharma, J. E. Eilers, J. C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1499.
- [102] D. A. Tomalia, G. R. Killat, in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, H. F. Mark, N. Bikales, C. G. Overberger, G. Menges, J. I. Kroschwitz, **1985**, 1, 680.
- [103] R. Jordan, K. Martin, H. J. Räder, K. K. Unger, *Macromolecules* **2001**, 34, 8858.
- [104] K. Aoi, M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **1996**, 21, 151.
- [105] P. Kuhn, *Dissertation* **1997**, Technische Universität München.

- [106] A. Bendavid, C. J. Burns, L. D. Field, K. Hashimoto, D. D. Ridley, K. R. A. S. Sandanayake, L. Wiectorek, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3709.
- [107] E. G. Blight, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911.
- [108] C. D. Poulter, T. Aoki, L. Daniels, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2620.
- [109] M. B. Foreman, J. P. Coffmann, M. J. Murcia, S. Cesana, R. Jordan, G. S. Smith, C. A. Naumann, *Langmuir* **2003**, *19*, 326.
- [110] G. Cai, M. Litt, *J. Polym. Chem. Ed.* **1992**, *30*, 649.
- [111] M. Litt, A. Levy, J. Herz, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1975**, *A9*, 703.
- [112] P. Persigehl, R. Jordan, O. Nuyken, *Macromolecules* **2000**, *33*, 6977.
- [113] R. Jordan, *Dissertation* **1996**, Universität Mainz.
- [114] W. Kren, D. A. Poutinen, *RCA Review*, **1970**, *31*, 187.
- [115] O. Purruicker, A. Förtig, R. Jordan, M. Tanaka, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 327.
- [116] R. Jordan, K. Graf, H. Riegler, K. K. Unger, *Chem. Commun.* **1996**, 1025.
- [117] A. Förtig, R. Jordan, K. Graf, G. Schiavon, O. Purruicker, M. Tanaka, *Macromol. Symp.* **2004**, *210*, 329.
- [118] T. R. Baekmark, T. Wiesenthal, P. Kuhn, T. M. Bayerl, O. Nuyken, R. Merkel, *Langmuir* **1997**, *13*, 5521.
- [119] T. R. Baekmark, T. Wiesenthal, P. Kuhn, A. Albersdörfer, O. Nuyken, R. Merkel, *Langmuir* **1999**, *15*, 3616.
- [120] T. Bonné, K. Lüdtke, R. Jordan, P. Štěpánek, C. M. Papadakis, *Colloid Polym. Sci.* **2004**, *282*, 833.
- [121] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*, 1848.
- [122] K. A. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1007.
- [123] O. Purruicker, A. Förtig, K. Lüdtke, R. Jordan, M. Tanaka, *eingereicht*.
- [124] K. Spratte, L. F. Chi, H. Riegler, *Europhys. Lett.* **1994**, *25*, 211.
- [125] V. Yaminski, T. Nylander, B. Ninham, *Langmuir* **1997**, *13*, 1746.

-
- [126] V. I. Kovalchuk, M. P. Bondarenko, E. K. Zholkovskiy, D. Vollhardt, *J. Phys. Chem.* **2003**, *107*, 3486.
- [127] P. Moraille, A. Badia, *Langmuir* **2002**, *11*, 4414.
- [128] K. Lüdtkke, *Diplomarbeit* **2002**, Technische Universität München.
- [129] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessiger, E. Elson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1976**, *16*, 1055.
- [130] D. M. Soumpasis, *Biophys. J.* **1983**, *41*, 95.
- [131] A. Lambacher, P. Fromherz, *Appl. Phys. A.* **1996**, *63*, 207.
- [132] O. Purrucker, *Dissertation* **2004**, Technische Universität München, in Vorbereitung.
- [133] V. Kiessling, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 408.