

Technische Universität München  
Physik Department  
Lehrstuhl für Biophysik, E22

# **Über das Benetzungsverhalten von Phospholipidmembranen auf glatten und strukturierten Oberflächen**

Julia Nissen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Friedrich

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann  
2. Univ.-Prof. komm. Dr. W. Nitsch, em.

Die Dissertation wurde am 21.03.01 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Physik am 18.06.01 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. MOTIVATION</b>	<b>7</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Materialien</b>	<b>10</b>
3.1.1. Lipide und Fluoreszenzmarker	10
<b>3.2. Reinigungsmethoden</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Techniken</b>	<b>12</b>
3.3.1. Fluoreszenzmikroskopie, Bildaufnahme und -verarbeitung	12
3.3.2. Zwei Methoden zur Messung der Eigendiffusion von Molekülen in planaren Systemen	13
3.3.2.1. Fluoreszenzerholung nach Fotobleichen (FRAP)	14
3.3.2.2. Kontinuierliches Bleichen	15
3.3.3. Röntgenreflektometrie	18
3.3.3.1. Theorie der spekulären Röntgenreflektometrie	18
3.3.3.2. Anpassung der gemessenen Reflektivitäten und Rekonstitution des Elektronendichteprofiles	20
3.3.3.3. Meßgeometrie am Strahlrohr D4 des Hasylab/DESY	23
3.3.4. Laterale Strukturierung von Festkörperoberflächen auf Mikrometerskala	24
3.3.4.1. Fotolithographisches Verfahren	24
3.3.4.2. Die Entnetzung von Polymerfilmen als strukturbildender Prozess	25
3.3.5. Die Lipidbeschichtung von Oberflächen mit Vesikelfusion	25
3.3.6. Durchführung eines Spreitexperimentes	26
<b>4. BENETZUNG VON FESTKÖRPEROBERFLÄCHEN MIT MEMBRANEN</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Kinetik der Benetzung: Theoretische Aspekte</b>	<b>28</b>
4.1.1. Spreiten als Benetzungsphänomen	28
4.1.2. Die Membran im Wandpotential	29
4.1.2.1. Van der Waals Wechselwirkung	30
4.1.2.2. Elektrostatik	30
4.1.2.3. Repulsive Kräfte	31

4.1.2.4.	Gesamtes Wechselwirkungspotential	32
4.1.3.	Zeitabhängigkeit der Spreitkinetik, Bewegungsmodelle und Dissipationsmechanismen	32
<b>4.2.</b>	<b>Kinetik der Benetzung: Experimenteller Teil</b>	<b>36</b>
4.2.1.	Vorarbeiten	36
4.2.2.	Bestimmung der Wasserschichtdicke bei Variation der Pufferbedingungen	38
4.2.3.	Kolloidale Sonden zur Untersuchung der Membranbewegung	42
4.2.4.	Die laterale Verteilung des Fluoreszenzmarkers: Eine Visualisierung des Spannungsgradienten in der Membran	47
4.2.5.	Einfluss zweiwertiger Ionen auf die Spreitkinetik	50
4.2.6.	Der Einfluss von Defekten auf das Spreitverhalten	54
4.2.7.	Zusammenfassung	56
<b>5.</b>	<b>RAUIGKEIT DER BENETZUNGSFRONT: EIN WACHSTUMSPHÄNOMEN</b>	<b>57</b>
<b>5.1.</b>	<b>Konzepte zur theoretischen Beschreibung von Grenzflächenwachstum</b>	<b>58</b>
5.1.1.	Skalenargumente zur Charakterisierung von Grenzlinienrauigkeiten	58
5.1.2.	Die Kardar-Parisi-Zhang Gleichung	60
5.1.3.	Das MCR-Modell: ein diskretes Wachstumsmodell in 2 Dimensionen	62
<b>5.2.</b>	<b>Grenzliniendynamik der Benetzungsfront</b>	<b>64</b>
5.2.1.	Membranfluss durch ein regelmäßiges Gitter hydrophober Scheiben	64
5.2.2.	Grenzlinienmorphologien der Benetzungsfront auf zweidimensionale poröse Medien	69
<b>5.3.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>BENETZUNG FESTKÖRPERGESTÜTZTER POLYELEKTROLYTFILME MIT LIPIDMEMBRANEN</b>	<b>72</b>
<b>6.1.</b>	<b>Präparation und Charakterisierung der Polymerschichten</b>	<b>73</b>
6.1.1.	Polylysin	73
6.1.2.	Hyaluronsäure	74
6.1.3.	Charakterisierung der Polymerschichten mittels Ellipsometrie	75
<b>6.2.</b>	<b>Spreitkinetik geladener Lipidmembranen auf Polyelektrolyten</b>	<b>77</b>
<b>6.3.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>

<b>7. FESTKÖRPERGESTÜTZTE MEMBRANEN AUF KUNSTSTOFFOBERFLÄCHEN</b>	<b>85</b>
<b>7.1. Verwendete Kunststoffe und ihre Materialeigenschaften</b>	<b>85</b>
7.1.1. Optische Eigenschaften	86
7.1.2. Kontaktwinkelmessungen	88
<b>7.2. Lipidbeschichtung von Kunststoffoberflächen</b>	<b>90</b>
7.2.1. Vesikelfusion	90
7.2.2. Benetzung mit Lipiden auf Kunststoffoberflächen	93
7.2.3. AFM-Aufnahmen der Lipidschicht auf TOPAS	95
<b>7.3. Membranspreiten auf gestuften Oberflächen</b>	<b>96</b>
7.3.1. Nanoimprinting von PC und TOPAS	98
7.3.2. Benetzungsexperimente auf gestuften PC-Oberflächen	99
<b>7.4. Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>8. AUSBLICK</b>	<b>103</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>104</b>
<b>9.1. Verwendete Abkürzungen</b>	<b>104</b>
<b>9.2. Substanzen (falls nicht anders beschrieben)</b>	<b>105</b>
<b>9.3. Geräte</b>	<b>106</b>
<b>10. LITERATUR</b>	<b>28</b>

### 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Benetzungskinetik von Phospholipidmembranen auf glatten Oberflächen, Filmen festkörpergestützter Biopolymere und synthetischen Kunststoffoberflächen untersucht. Auf mikrostrukturierten Substraten wurde die zeitliche Entwicklung der Membranfront mit Theorien des lokalen Wachstums analysiert.

Lipid auf ein Substrat aufgebracht, benetzt eine Oberfläche nach Zugabe von Wasser unter der Bildung einer Lipiddoppelschicht. Die Bewegung der Membran wurde mit Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und mit Bildverarbeitung analysiert. Die Geschwindigkeiten folgen auf allen Oberflächen universell einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz. Von daher wird die beim Benetzungsprozess gewonnene freie Energie über einen Reibungsmechanismus dissipiert, der proportional zur Länge der bedeckten Fläche ist. Die innere Dynamik der Membran während des Spreitens wurde mit kolloidalen Sonden visualisiert. Es stellte sich heraus, dass die Membran über ihre Monolagen gleitet und das Substrat über einen inneren Abrollvorgang bedeckt. Die Kopplung der Membran an das Substrat ist somit stärker, als die Kopplung zwischen den Monolagen der Lipiddoppelschicht. Dies konnte die Bestimmung des Abstandes zwischen Membran und Substrat mittels Röntgenreflektometrie zu  $6 \pm 1 \text{ \AA}$  bestätigen. Die Benetzungsgeschwindigkeiten neutraler Membranen auf Glas erhöhen sich signifikant bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen Konzentration um nur einige  $\mu\text{M}$ , was durch eine Vergrößerung der Adhäsionsenergie erklärt werden kann. Die Verringerung der Membrangeschwindigkeit in Gegenwart künstlicher Defekte in der Größenordnung einiger nm hingegen, kann auf Scherfluss in der Membran zurückgeführt werden.

Zur Analyse der lokalen Grenzliniendynamik der Membranfront wurden Substrate mit künstlichen Defekten in der Größenordnung einiger  $\mu\text{m}$  verwendet. So führen regelmäßig angeordnete Scheiben, die von der Membran nicht benetzt werden, zu einer kompakten, undulierten Membranfront. Die zeitliche Entwicklung der Grenzlinienkontur kann gut mit der deterministischen Kardar-Parisi-Zhang-Gleichung beschrieben werden, die ein diffusive Relaxation und einem nicht linearen Wachstumsterm beinhaltet. Auf Oberflächen mit zufällig verteilten, von der Membran nicht benetzten Defekten wurden fraktal-ähnliche Grenzlinienmorphologien beobachtet, wohingegen auf chemisch homogenen, aber rauen Oberflächen eine kompakte Grenzlinie entsteht, deren Analyse einen statischen Rauigkeitsexponent von  $0.81 \pm 0.05$  ergibt. Dieser Übergang von kompakten zu fraktal-

ähnlichen Grenzlinienmorphologien bei Variation des Kontaktwinkels zwischen einem zweidimensionalen porösen Medium und einer eindringenden Flüssigkeit stimmt mit dem Martys-Cieplak-Robbins-Modell überein, das darüber hinaus für die kompakte Grenzlinie denselben statischen Rauigkeitsexponenten vorhersagt. In dieser Hinsicht stellen Benetzungsfronten von Lipidmembranen auf strukturierten Oberflächen ein gutes Modellsystem für Wachstum in 2 Dimensionen dar.

Das Benetzungsverhalten von Phospholipidmembranen wurde auf zwei festkörpergestützten vollhydratisierten Biopolymerfilmen untersucht: (i) kovalent gekoppelte anionische Hyaluronsäure und (ii) physisorbiertes kationisches Polylysin. Beide Oberflächen werden von entgegengesetzt geladenen Membranen benetzt, die eine geschlossene fluide Lipiddoppelschicht bilden. Äquivalent zur Kinetik auf starren Festkörperoberflächen wird für die Benetzungsgeschwindigkeit ein Gesetz  $v(t) \sim t^{-1/2}$  beobachtet. Die Verringerung der Geschwindigkeit auf beiden Polyelektrolytfilmen bei Erhöhung der Salzkonzentration lässt sich auf die Verringerung der Maschenweite durch Abschirmung der elektrostatischer Abstoßung zurückführen.

Außerdem wurden auf folgenden synthetische Polymeren sowohl Vesikelfusion als auch Benetzungsexperimente mit neutralen und kationischen Membranen durchgeführt: Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC) und ein zyklisches Olefin (TOPAS). Bis auf TOPAS werden alle Oberflächen von Membranen benetzt, wobei die Geschwindigkeiten nur auf PC reproduzierbar einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz folgen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass nur TOPAS einen Kontaktwinkel  $> 90^\circ$  hat. Durch Vesikelfusion können alle Oberflächen mit optisch homogenen Filmen kationischer und neutraler Lipide beschichtet werden, wobei die gemessenen Diffusionskonstanten deutlich kleiner sind als auf Glas. AFM-Aufnahmen zeigten, dass sich auf TOPAS in Übereinstimmung mit dem stark hydrophoben Charakter des Materials eine Lipidmonolage bildet.

PC wurde durch Heißpressen in z-Richtung mit Stufen strukturiert und als Substrat zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächentopologien auf das Benetzungsverhalten von Membranen verwendet. Befand sich die Membranfront parallel zu den Stufen, verringerte sich der kinetische Spreitkoeffizient um einen Faktor 10 im Vergleich zu glatten Oberflächen, während im Fall einer senkrecht zu den Stufen orientierten Membranfront kein Spreiten beobachtet wurde. Dieses Verhalten kann qualitativ mit einer Verringerung der Adhäsionsenergie auf Grund der Substrattopologie erklärt werden.

## 2. Motivation

Substratgestützte Membranen sind ein wichtiger Ansatz zur Biofunktionalisierung von Festkörperoberflächen, da sie als planare Modellsysteme der Zellwand eine Schnittstelle zwischen Festkörper und biologischer Materie darstellen (Sackmann, 1996). Sie finden Anwendung als flüssigkristalline Matrix für integrale Transmembranproteine, die mittels oberflächensensitiver Techniken untersucht werden können. Wie in Abbildung 2.1a) schematisch dargestellt, verhindern dünne Polymerfilme zwischen Membran und Substrat die Denaturierung solcher Proteine auf Grund des direkten Kontaktes großer substratständiger Seitengruppen mit der Festkörperoberfläche (Sackmann und Tanaka, 2000), (Rädler und Sackmann, 1997). Zur Entwicklung von Biosensoren werden planare Membrane hochohmiges Kernstück eines Schichtsystems aus Halbleitermaterialien und Polymerfilmen.

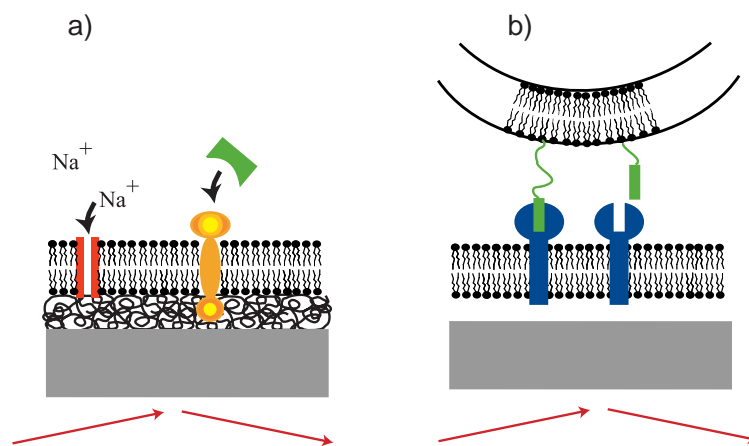


Abbildung 2.1 a) Festkörpergestützte Membranen bieten die Möglichkeit, Transmembranproteine oder Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen mit optischen und oberflächensensitiven Methoden zu untersuchen. b) Über den Einbau von Rezeptoren in eine festkörpergestützte Membran wird diese Teil eines Systems zur Untersuchung von Zelladhäsion. In beiden Fällen a) und b) ermöglicht die planare Geometrie prinzipiell die Beobachtung von Einzelereignissen.

Die laterale Strukturierung substratgestützter Membranen durch Diffusionsbarrieren schafft ganze Bibliotheken einzelner Felder auf einem Substrat, die unabhängig voneinander angesprochen werden können (Boxer, 2000). Aber auch als biokompatible Beschichtung zur Untersuchung adsorbierter, biologischer Makromoleküle, wie DNA, sind festkörpergestützte Lipiddoppelschichten geeignet (Maier und Rädler, 1999).

Weitere Anwendung finden substratgestützte Membranen in Zelladhäsionsstudien zur Untersuchung spezifischer Kräfte zwischen Rezeptoren und Liganden (Bruinsma et al., 2000), wobei der eine Bindungspartner in die planare Lipiddoppelschicht und der andere in ein Vesikel eingebaut wird (siehe Abbildung 2.1 b)).

Eine weitverbreitete Technik zur Rekonstitution planarer Membranen auf Festkörperoberflächen ist die Vesikelfusion (McConnell et al., 1986). Sie bietet den Vorteil, dass durch die Verwendung von Proteoliposomen leicht Proteine in die Membran eingebaut werden können (Salafsky et al., 1996). Es wird davon ausgegangen, dass die Entstehung einer planaren Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion hauptsächlich in drei Schritten abläuft: 1) Adhäsion des Vesikels auf Grund eines attraktiven Wandpotentials, 2) Reißen des Vesikels und 3) Spreiten der Membran bis die einzelnen Stücke zu einer homogenen Lipiddoppelschicht fusionieren. Die Adhäsion des Vesikels an der Oberfläche ist durch kolloidale Wechselwirkungen bestimmt, während das Aufreißen von verschiedenen Parametern, wie der Lipidzusammensetzung und dem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen abhängt (Lipowsky und Seifert, 1991). Für alle Anwendungen ist eine defektfreie Membran essentiell, bei deren Bildung der letzte Schritt die Schlüsselrolle spielt. Das Spreiten der Lipiddoppelschicht auf der Festkörperoberfläche stellt ein Benetzungsphänomen dar, das erstmals von Rädler untersucht wurde (Rädler et al., 1995). Hierzu wird ein trockenes Lipidreservoir auf einer Oberfläche aufgebracht, das bei Zugabe von Wasser in ein flüssigkristallines Lipidschichtsystem quillt. Existiert eine attraktive Wechselwirkung zwischen Membran und Substrat, benetzt eine einzelne Lipiddoppelschicht die Oberfläche. Die Membran befindet sich völlig in wässriger Lösung und ist vom Substrat durch einen dünnen Wasserfilm getrennt (vergleiche Abbildung 2.2).

Nicht nur die Beschichtung einer Festkörperoberfläche mit Membranen stellt ein Benetzungsphänomen dar, sondern viele praktische Prozesse erfordern das Benetzen eines Festkörpers mit einer Flüssigkeit. Die Flüssigkeit kann z.B. Farbe, Schmierflüssigkeit oder Pestizid sein, während der Festkörper im einfachsten Fall eine glatte Oberfläche ist, aber auch strukturiert sein kann. Prominentes Beispiel hierfür ist die Gewinnung von Erdöl aus porösen Stein durch die Verdrängung von Wasser.

Eine Schlüsselrolle in allen Benetzungsphänomenen spielen die freien Energien der beteiligten Grenzflächen.



## 2. Motivation

---

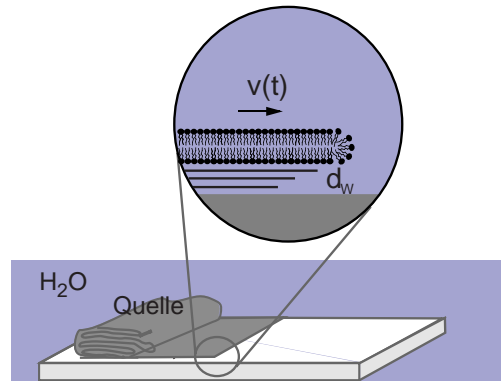


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung einer Membran, die von einem flüssigkristallinen Lipidreservoir ausgehend eine Oberfläche benetzt. Die Membran bewegt sich mit der Geschwindigkeit  $v(t)$  und ist durch eine dünne Wasserschicht vom Substrat getrennt.

So ist die treibende Kraft für einen Benetzungsprozess der Gewinn an freier Energie durch die Bedeckung der Oberfläche mit dem Flüssigkeitsfilm. Äquivalent hierzu wird das Spreiten der Membran durch die Adhäsionsenergie zwischen Lipiddoppelschicht und Substrat getrieben. Im Gegensatz zu klassischen Benetzungsphänomenen einfacher Flüssigkeiten existiert jedoch keine Dreiphasengrenzfläche fest-flüssig-gasförmig und die Membran hat eine intrinsische Dicke. Der Gewinn an freier Energie durch die Benetzung wird in Reibung dissipiert. Da für die Zeitabhängigkeit der Benetzungsgeschwindigkeit experimentell ein Gesetz der Form  $v(t) \sim t^{1/2}$  gefunden wurde (Rädler et al., 1995), kann auf einen Reibungsmechanismus proportional zur Länge  $l$  der bedeckten Fläche geschlossen werden, wie von Washburn in der Benetzung von Kapillaren gefunden wurde (Washburn, 1921).

In dieser Arbeit soll die Benetzung fluider Phospholipidmembranen auf hydrophilen Festkörperoberflächen als globales Transportphänomen verstanden werden. Von besonderem Interesse ist hierbei der Dissipationsmechanismus, der die Dynamik der Membran bestimmt. Ist der Dissipationsmechanismus bekannt, gewähren Messungen der Spreitkinetik Zugang zur Adhäsionsenergie zwischen Membran und Substrat. Die zeitliche Entwicklung deformierter Membranfronten hingegen sollen mit theoretischen Konzepten des lokalen Grenzflächenwachstums beschrieben werden. Benetzungsexperimente auf polyelektrolytbeschichteten Festkörperoberflächen sollen die Frage klären, ob diese Oberflächen überhaupt von Membranen benetzt werden und wie das Polyelektrolytkissen die Kinetik beeinflusst. Da in der Biosensorik immer mehr Kunststoffe zum Einsatz kommen, ist darüber hinaus die Lipidbeschichtung von Kunststoffen von Interesse.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Lipide und Fluoreszenzmarker

In dieser Arbeit wurden folgende Lipide verwendet, deren chemische Strukturformeln in Abbildung 3.1 dargestellt sind:

DMPC	1,2-Dimyristol-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DMTAP	1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propan
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3- Phosphocholin
DOTAP	1,2-Dioleoyl -3-Trimethylammonium-Propan
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]

Die Ketten der ersten beiden Lipide, DMPC und DMTAP, sind hierbei gesättigt und bestehen aus 14 C-Atomen. Die Kopfgruppen unterscheiden sich jedoch stark. So trägt DMTAP eine positive Ladung, während die zwitterionische Kopfgruppe des DMPC neutral ist.

Die Ketten der anderen drei Lipide bestehen aus 18 C-Atomen mit einer Doppelbindung in einer Kette. Die Kopfgruppe des DOPC ist hierbei wieder ladungsneutral, die des DOPS trägt negative Ladung und das DOTAP ist kationisch. Alle in dieser Arbeit verwendeten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) vollsynthetisch hergestellt und bezogen.

Zur Visualisierung der Lipidmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Lipide mit einem geringen Prozentsatz fluoreszenzmarkierter Lipide oder Alkylketten versetzt, die in Abbildung 3.1 im Detail abgebildet sind. Von den Farbstoffen Texas Red-DHPE, BODIPY C5-HPC und BODIPY C11 wurden jeweils 0.2 mol% und von NBD C12-HPC 1 mol% zugegeben. Je nach Art und Position des Farbstoffmoleküls können sich Eigenschaften und Verhalten des Sondenmoleküls von dem der umgebenden Lipidmatrix unterscheiden. Alle Fluoreszenzmarker wurden von MoBiTec (Göttingen, Deutschland) bezogen.

### 3. Materialien und Methoden

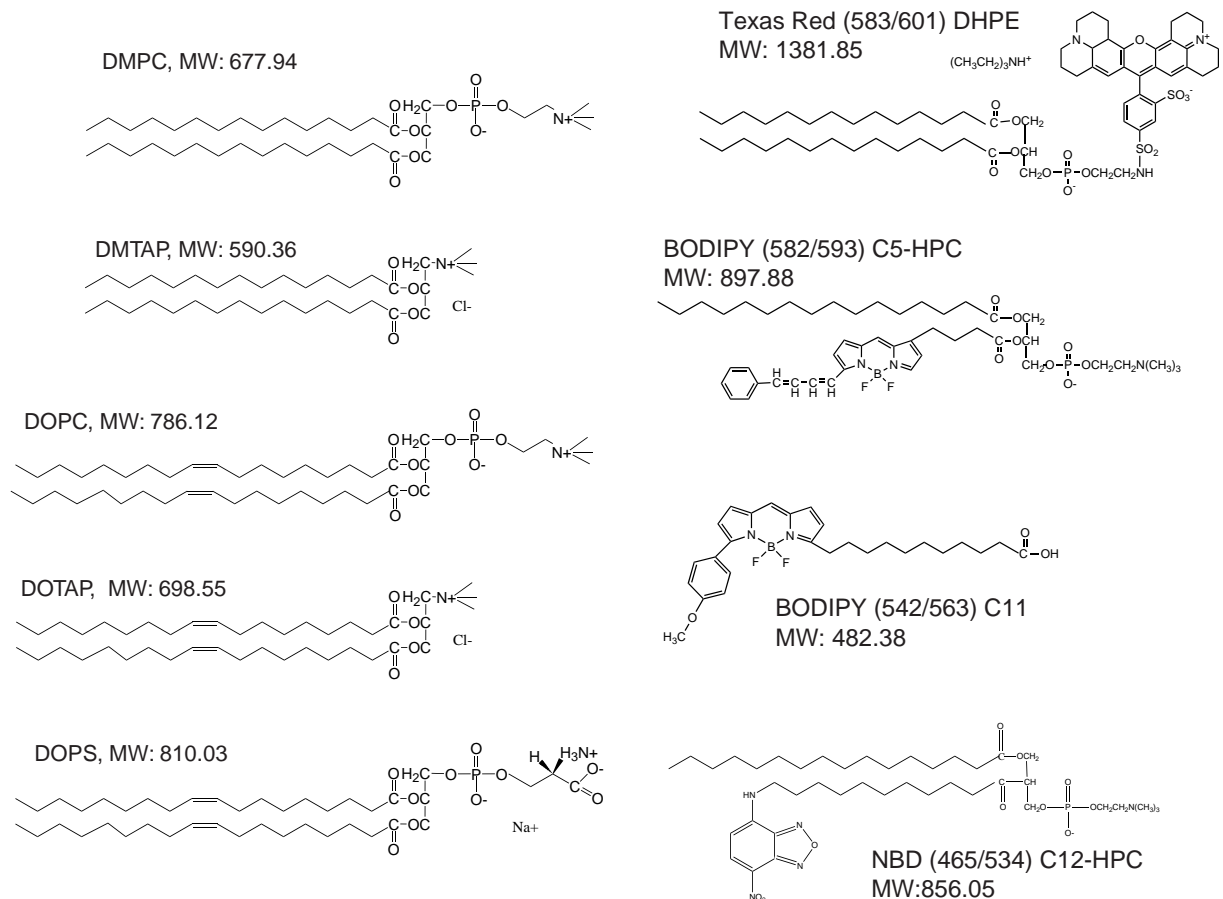


Abbildung 3.1 Links: Strukturformeln der Lipide unter Angabe des Molekulargewichtes. Rechts: Strukturformeln der verwendeten Farbstoffmoleküle. In Klammern stehen Wellenlänge von Emission und Absorption in nm.

### 3.2. Reinigungsmethoden

Substrate, Kammern und Gefäße, die direkt mit Probenmaterial in Kontakt kommen, wurden folgender Reinigungsmethode unterzogen:

- (1) je zweimal 30 Minuten ultraschallen in 2%-iger Lösung des Küvettenreinigers Hellmanex in zweifach entionisiertem Wasser der Firma Millipore (MQ) dann zehnmal spülen mit MQ.
- (2) je zweimal 30 Minuten ultraschallen mit MQ, dann zehnmal spülen mit MQ.
- (3) Trocknen in einem 70°C heißen Ofen.

### 3.3. Techniken

#### 3.3.1. Fluoreszenzmikroskopie, Bildaufnahme und -verarbeitung

Als zentrale Technik zur Abbildung der Membran wird in dieser Arbeit die Fluoreszenzmikroskopie angewendet. Hierfür werden Farbstoffmoleküle als Sonde eingesetzt, die auf Grund ihrer chemischen Struktur in der Lage sind, elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich zu absorbieren und diese Energie als rotverschobenes Licht zu emittieren. Filtert man dieses Licht aus, erhält man ein Bild der Probe, das ungestört von reflektiertem oder gestreutem Licht ist.

Alle Messungen werden mit einem invertiertem Mikroskop (Axiovert 135 TV) durchgeführt, mit einer regulierbaren Quecksilberdampfampe (HBO 300) als Lichtquelle. Das Mikroskop und alle im folgenden beschriebenen optischen Elemente werden von Zeiss (Jena, Deutschland) hergestellt. Das Mikroskop ist mit zwei verschiedenen Filtersätzen ausgestattet, wobei der eine im Wellenlängenbereich 530 - 585 nm Licht zur Anregung transmittiert und emittiertes Licht durch einen Langpassfilter ab 615 nm ausfiltert (FT 00). Der andere Filtersatz sondert anregendes Licht im Wellenlängenbereich 450 - 490 nm und emittiertes Licht im Bereich 515 - 565 nm aus (FT10). In dieser Arbeit wurden folgende Objektive verwendet: ein 10x Plan Neofluar (N.A. 0.3), ein 40x Plan Neofluar (N.A. 0.75) und ein 32x LD Achroplan (N.A. 0.4).

Bilder der Probe wurden mit dem MicroMAX Bildverarbeitungssystem der Firma Princeton Instruments (Trenton, USA) aufgenommen. Dieses System besteht aus einer digitalen CCD-Kamera (1300x1030 Pixel), deren Bilder über eine Kontrolleinheit entweder direkt an den Computer geleitet oder auf Video aufgezeichnet werden können. Das System wird über das Bildverarbeitungsprogramm IPLab von Signal Analytics Corporation (Wien, Österreich) gesteuert, das später auch zur Bildanalyse benützt werden kann.

Bilddaten auf Videoband können über eine Scionframegrabber-Karte entweder als Einzelbilder oder als Bildsequenz mit festem zeitlichen Abstand digitalisiert werden. Die Karte wird hierbei über das Bildverarbeitungsprogramm NIH-Image (NIH, Washington, USA) gesteuert.

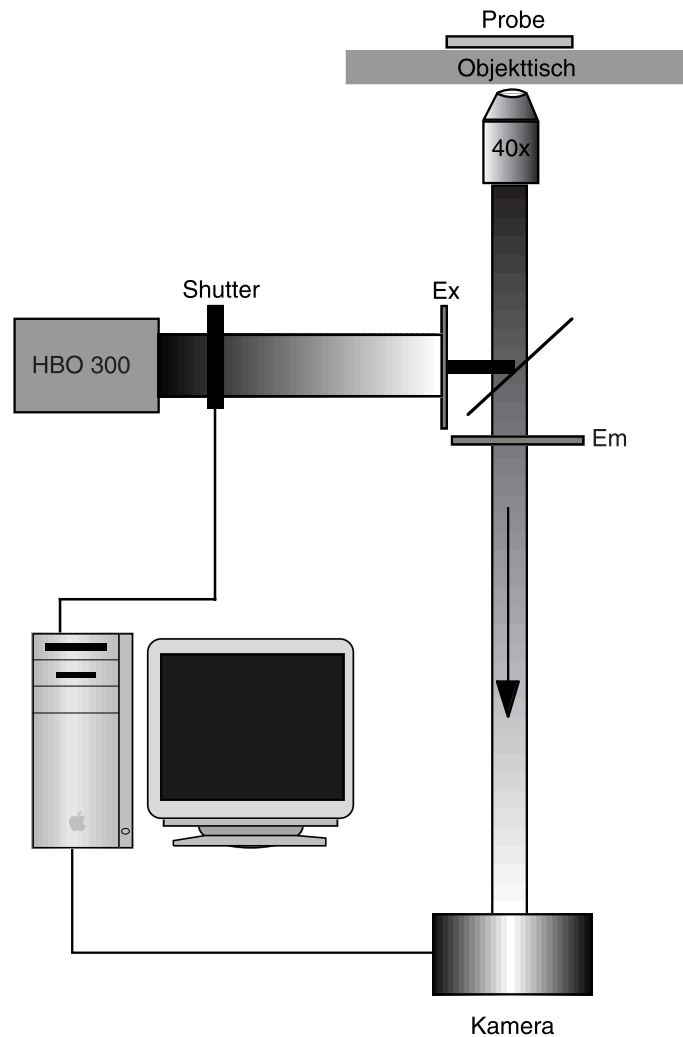


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung eines invertierten Fluoreszenzmikroskopes.

#### 3.3.2. Zwei Methoden zur Messung der Eigendiffusion von Molekülen in planaren Systemen

Die Doppellipidschicht der Zellwand bietet den Transmembranproteinen in der Natur eine flüssigkristalline Matrix, in der sie sich ungehindert bewegen und verschiedene Konformationen einnehmen können (Alberts et al., 1983). Die laterale Bewegung der Proteine innerhalb der Membran ist eine unabdingbare Voraussetzung für viele Prozesse, die an der Membran stattfinden, da nur so verschiedenen Proteine zusammen wirken können. Damit eine festkörpergestützte Membran als planares Modellsysteme der Zellwand dienen kann, muss sie unter anderem diese Eigenschaft erfüllen. Im Folgenden sollen nun zwei Techniken vorgestellt werden, die es erlauben, die laterale Eigendiffusion der Lipidmoleküle zu messen.

### 3.3.2.1. Fluoreszenzerholung nach Fotobleichen (FRAP)

Bei dieser Methode nach Axelrod (Axelrod et al., 1976) werden die fluoreszenzaktiven Moleküle innerhalb des Bereiches einer Lochblende durch einen intensiven Laserpuls mit der Anregungswellenlänge des verwendeten Farbstoffes gebleicht. Anschließend wird die mittlere Fluoreszenzerholung in diesem Bereich auf Grund der lateralen Diffusion der fluoreszenzaktiven Moleküle mit einem Fotomultiplier detektiert. Wesentlich hierbei ist, dass die Abfrageintensität des Laserstrahls um einige Größenordnungen kleiner ist, als die Bleichintensität und somit davon ausgegangen werden kann, dass Bleichen während der Beobachtung der Fluoreszenzerholung zu vernachlässigen ist. Eine genaue Beschreibung des verwendeten Aufbaus lässt sich bei M. Kühner finden (Kühner, 1992), (Kühner et al., 1994). Diffusion wird theoretisch beschrieben durch das Ficksche Gesetz:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \nabla^2 C,$$

Gln. 3.1

wobei C die Konzentration der ungebleichten Moleküle und D ihre Diffusionskonstante ist.

Mit  $R_p$  als Radius der Lochblende lässt sich die Fluoreszenzintensität  $F(t)$  schreiben als:

$$F(t) \propto \int_0^{R_p} 2\pi r \cdot C(r,t) dr.$$

Gln. 3.2

Unter folgenden Annahmen und Randbedingungen lässt sich eine analytische Lösung des Problems finden:

(1) Zum Zeitpunkt  $t = 0$  werden mit einem unendlich kurzen Laserpuls alle fluoreszenzaktiven Moleküle im Bereich der Lochblende gebleicht:

$$C(r, t = 0) = 0.$$

(2) Hierbei entsteht zum Zeitpunkt  $t = 0$  ein scharfes Rechteckprofil:

$$C(r, t = 0) = \begin{cases} C_{innen}, & r < R_p \\ C_{au\ddot{e}n}, & r > R_p \end{cases}$$

(3) Die Ausdehnung der Fläche ist unendlich und es gilt:

$$C(\infty, t) = C_0.$$

Für diesen Fall lässt sich eine analytische Lösung des Problems finden (Soumpasis, 1983):

$$F(t) = F(\infty) - [F(\infty) - F(0)] \cdot \left\{ 1 - \left[ I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) - I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right] \cdot e^{-\frac{2\tau}{t}} \right\},$$

Gln. 3.3

wobei  $I_0$  und  $I_1$  sphärische Besselfunktionen erster und zweiter Ordnung,  $F(t)$  die Fluoreszenzrate integriert über den Bleichfleck zum Zeitpunkt  $t$  und  $\tau$  die Zeitkonstante der Fluoreszenzerhöhung und sind. Die Diffusionskonstante lässt sich nach dieser Lösung schreiben als:

$$D = \frac{R_p}{4\tau}.$$

Gln. 3.4

Ein Maß für den Prozentsatz der Moleküle, die sich lateral frei bewegen können, stellt die relative Fluoreszenzerhöhung  $R_{rel}$  dar:

$$R_{rel} = \frac{F(t) - F(0)}{F(t < 0) - F(0)},$$

Gln. 3.5

wobei  $F(t < 0)$  die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen ist.

#### 3.3.2.2. Kontinuierliches Bleichen

Während für FRAP-Messungen ein spezieller Aufbau benötigt wird, soll hier eine Methode vorgestellt werden, die die Messung der Diffusionskonstante mittels eines handelsüblichen Fluoreszenzmikroskopes erlaubt (Dietrich et al., 1997). Auch bei dieser Technik wird ein definierter Bereich der Probe, wie er z.B. durch eine Schlitzblende vorgegeben wird, mit der Anregungswellenlänge der eingebauten Farbstoffmoleküle beleuchtet. Der wesentliche Unterschied zur FRAP-Technik besteht in der Intensität der Beleuchtungsquelle. Diese ist im Falle einer Quecksilberdampfampe wesentlich geringer und kann somit nicht in Bleich- und Abfragebereich geteilt werden. Deshalb ist eine theoretische Beschreibung wie in 1.2.2.1 nicht möglich. Man analysiert statt dessen das Intensitätsprofil, das sich mit der Zeit an den Rändern der Blende durch das Zusammenspiel aus Fotobleichen und diffusiver Bewegung ergibt. Solche Intensitätsprofile sind in Abbildung 3.3 b) zu sehen.

Erweitert man die Diffusionsgleichung um einen Term, der Fotobleichen beinhaltet, lässt sich das zeitliche Verhalten der Konzentration von Farbstoffmoleküle  $C(x,y)$  beschreiben mit:

$$\frac{dC(x,y)}{dt} = D \cdot \nabla^2 C(x,y) - B(x,y) \cdot C(x,y),$$

*Gln. 3.6*

wobei  $D$  die Diffusionskonstante und  $B(x,y)$  die Bleichrate des Farbstoffes ist. Im einfachsten Fall lässt sich Fotobleichen als stochastischer Zerfallsprozess mit einer einzigen Zerfallsrate  $B_0$  beschreiben. Dies ist jedoch abhängig von der Natur des verwendeten Farbstoffes und muss individuell überprüft werden. Falls z.B. chemische Prozesse zur Regeneration der Fluoreszenz führen können oder es verschiedene Möglichkeiten gibt, die zur Zerstörung der Fluoreszenzintensität führen, ist diese Annahme nicht mehr erfüllt.

Unter der Annahme einer beleuchteten Halbebene und einer konstanten Zerfallsrate  $B_0$  lässt sich für große Zeiten eine Näherung für die Konzentration  $C_{app}(x,y)$  innerhalb des beleuchteten Bereiches angeben:

$$C_{app}(x,t) = A(t) \cdot e^{-\frac{x}{\lambda}} + e^{-B_0 \cdot t} \quad \text{mit} \quad \lambda = \sqrt{\frac{D}{B_0}}$$

*Gln. 3.7*

Es entsteht somit ein exponentiell abfallendes Profil mit Abklinglänge  $\lambda$ , wie in Abbildung 3.3 c) dargestellt. Aus dieser Länge lässt sich bei Kenntnis der Bleichrate  $B_0$  die Diffusionskonstante  $D$  bestimmen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Bleichexperimente wurden mit der Gesichtsfeldblende des Mikroskopes durchgeführt. Der durch die Gesichtsfeldblende begrenzte Bereich wurde mit maximal möglicher Intensität beleuchtet. Während des Bleichens wurden in äquidistanten Zeitabständen Fluoreszenzaufnahmen gemacht, aus denen durch Mittelung über einen horizontalen Bereich Intensitätsprofile bestimmt werden können. Durch die Anpassung eines exponentiellen Gesetzes an die Profile lässt sich die Abklinglänge  $\lambda$  bestimmen. Aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität in der Mitte der Gesichtsfeldblende kann durch Anpassen einer exponentiellen Funktion die Bleichrate  $B_0$  ermittelt werden, wie in Abbildung 3.3d) gezeigt.



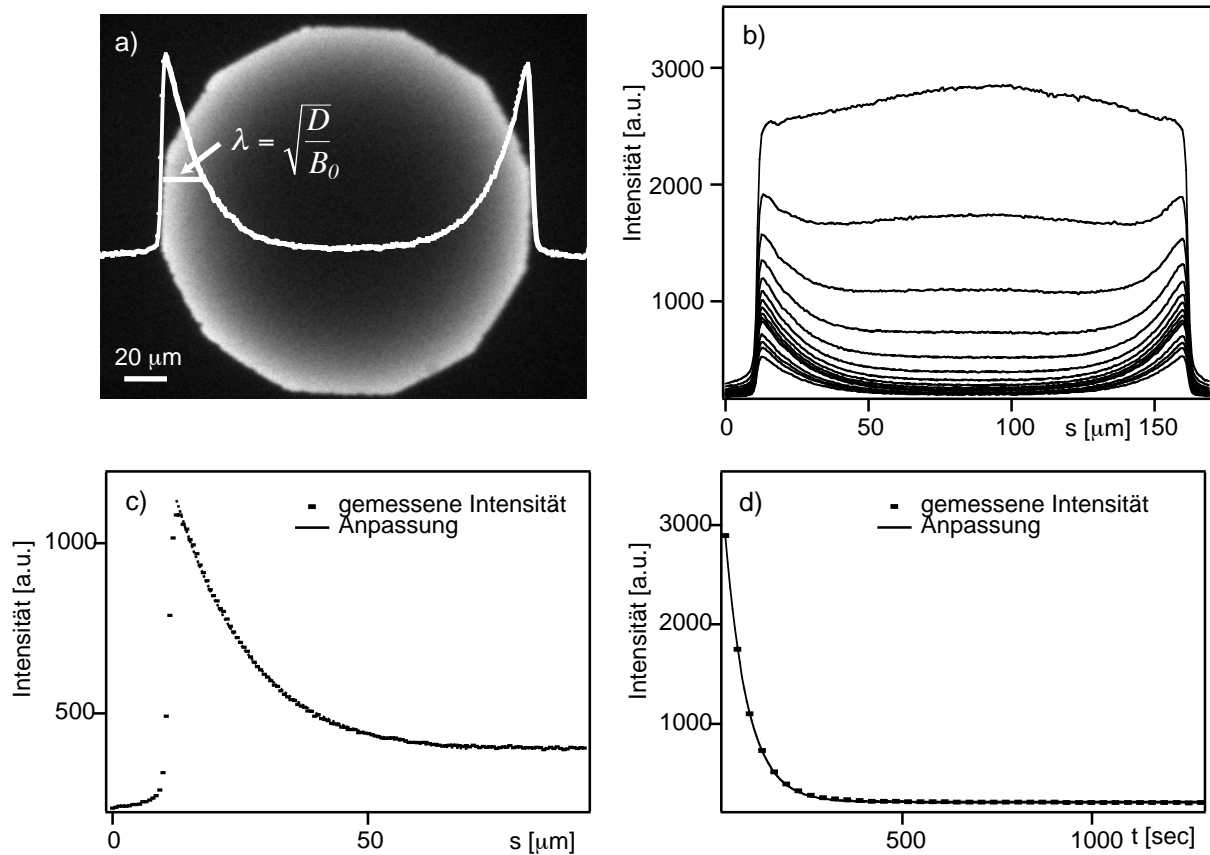


Abbildung 3.3 a) Fluoreszenzbild einer gebleichten Stelle in der Membran. Am Rand der Blende bildet sich eine koronaartige Fluoreszenzintensität aus, da ungebleichter Farbstoff nachdiffundiert. b) Zeitsequenz von Intensitätsprofilen einer beleuchteten Stelle in der fluoreszenzmarkierten Membran. c) An das Intensitätsprofil lässt sich ein exponentiellen Verlauf der Abklinglänge  $\lambda = D/B_0$  anpassen. d) Der zeitliche Verlauf der Intensität in der Blendenmitte folgt ebenfalls einem exponentiellen Gesetz, aus dem sich die Bleichrate  $B_0$  lässt.

Hierbei wird die Annahme gemacht, dass die Blendenöffnung groß genug ist, um Diffusion der Moleküle durch den gesamten beleuchteten Bereich im Verlauf der Messung ausschließen zu können. Diese Näherung ist sicher recht grob, da  $\lambda$  in der Größenordnung des beleuchteten Bereiches liegt. Hieraus resultieren zu kleine Bleichraten und damit zu große Diffusionskonstanten. Der Fehler, der sich daraus ergibt, ist systematisch und für jede Messung gleich. Damit sind Aussagen über die Abhängigkeit der Diffusionskonstanten von äußeren Parametern, wie der Pufferkonzentration weitestgehend unbeeinflusst.

### 3.3.3. Röntgenreflektometrie

Spekuläre Röntgenreflektometrie ist eine Standardmethode zur Analyse der strukturellen Eigenschaften dünner Filme (Russell, 1990), (Tolan, 1999), wie z.B. Polymerfilme oder substratgestützte Membranen. Diese Methode ist sondenfrei und erlaubt eine Rekonstruktion des Elektronendichteprofiles mit bis zu atomarer Genauigkeit. Sie wird in dieser Arbeit dazu verwendet, substratgestützte Membranen zu untersuchen, die mittels Spreiten präpariert wurden.

#### 3.3.3.1. Theorie der spekulären Röntgenreflektometrie

Einfallende Röntgenstrahlen der Wellenlänge  $\lambda$  werden an den Elektronen des Probenmaterials mit Elektronendichte  $\rho_{el}$  gestreut und gemäß dem Brechungsindex  $n$  des Materials gebrochen oder reflektiert. Mit dem klassischen Elektronenradius  $r_0$  und dem Massenabsorptionsfaktor  $\mu$  ist der Brechungsindex  $n$  gegeben durch:

$$n = 1 - \delta + i\beta \quad \text{mit} \quad \delta = \frac{\lambda^2 \rho_{el} r_0}{2\pi} \quad \text{und} \quad \beta = \frac{\mu \lambda}{4\pi},$$

Gln. 3.8

wobei  $\delta$  den Dispersions- und  $\beta$  den Absorptionsanteil darstellen. Da der Absolutwert des Brechungsindex für Röntgenstrahlen etwas kleiner als eins ist, tritt für Einfallswinkel kleiner als der kritische Winkel  $\alpha_c$  Totalreflexion auf. Im Fall vernachlässigbarer Absorption gilt die Näherung:

$$\alpha_c \approx \sqrt{2\delta}.$$

Gln. 3.9

Für größere Winkel wird ein einfallender Strahl mit Wellenvektor  $\vec{k}_i$ :

$$\vec{k}_i = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sin(\alpha_i) \cdot \vec{e}_i$$

Gln. 3.10

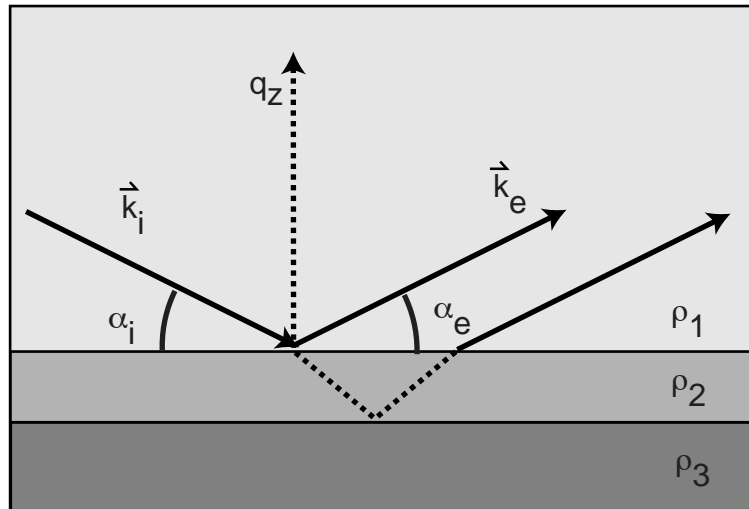


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Reflexion eines Strahles an einer ideal glatten Grenzfläche.  $\vec{k}_i$  und  $\vec{k}_e$  sind die Wellenvektoren des einfallenden und des reflektierten Strahles,  $\alpha_i$  und  $\alpha_e$  die entsprechenden Winkel.  $q_z$  ist die Komponente des Impulsübertrages senkrecht zur Oberfläche.

gemäß der geometrischen Optik ( $\alpha_i = \alpha_e$ ) reflektiert. Der Impulsübertrag  $\vec{q}$  ist als Differenz zwischen einfallendem und ausfallendem Wellenvektor definiert:

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_e.$$

Gln. 3.11

Die Fresnel-Reflektivität  $R_F$  einer ideal glatten Grenzfläche zwischen zwei Medien lässt sich aus den Maxwell-Gleichungen unter der Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen von elektrischen und magnetischen Feldern berechnen:

$$R_F(q_z) = \left[ \frac{q_z - q_z'}{q_z + q_z'} \right]^2 \quad \text{mit} \quad q_z' = \sqrt{q_z^2 - q_{z,c}^2},$$

Gln. 3.12

wobei  $q_z'$  der Impulsübertrag im Medium und  $q_{z,c}$  der Impulsübertrag am kritischen Winkel  $\alpha_c$  bezeichnet.

Auch die Reflexion an mehreren Schichten kann unter der Voraussetzung ideal glatter Grenzflächen sukzessive durch diesen optischen Formalismus gelöst und die gemessenen Reflektivitäten können aus den Elektronendichten der Medien analytisch berechnet werden.

Dieser Ansatz ist nicht mehr gültig für Proben mit kontinuierlichen Elektronendichteverteilungen  $\rho_{el}$ , wie im Fall dünner Filmen aus weicher Materie.

In kinematischer Näherung ( $\alpha_i \gg \alpha_c$ ) werden Mehrfachstreuungen vernachlässigt und die Reflektivität lässt sich bei Kenntnis der mittleren Elektronendichte im Volumen  $\rho_\infty$  berechnen nach:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot \left| \frac{1}{\rho_\infty} \int \frac{\partial \rho_{el}}{\partial z} \cdot \exp(-iq_z z) dz \right|^2$$

*Gln. 3.13*

In dieser Näherung ist das Verhältnis aus gemessener Reflektivität  $R$  zu idealer Reflektivität  $R_F$ , die quadratische Fouriertransformierte des normierten Dichtegradienten in der Probe.

Mit Hilfe dieses Ansatzes lässt sich ein Ausdruck für die Reflektivität einer rauen Oberfläche angeben. Unter der Annahme eines Gauss-förmigen Dichteprofiles an der Grenzfläche mit  $\sigma$  als Standardabweichung vom Mittelwert, gilt für die Reflektivität:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot \exp(-q_z^2 \sigma^2).$$

*Gln. 3.14*

#### **3.3.3.2. Anpassung der gemessenen Reflektivitäten und Rekonstitution des Elektronendichteprofiles**

Die gemessenen Reflektivitäten einer Einzelmembran wurden mit einem Algorithmus angepasst, der ursprünglich für orientierte Membranstapel entwickelt wurde (Salditt, 2000), (Vogel, 2000). Die Ableitung soll im Folgenden kurz dargestellt werden und ist im Detail zu finden bei Vogel (Vogel, 2000).

Sei  $d$  der Abstand zwischen Substrat und der Oberkante der Membran. Um die Elektronendichte  $\rho_0(z)$  des Wasser/Lipid/Wasser-Systems als symmetrische Funktion annehmen zu können, wird die gesamte Dicke  $d$  aufgeteilt, wie in Abbildung 3.5 dargestellt.

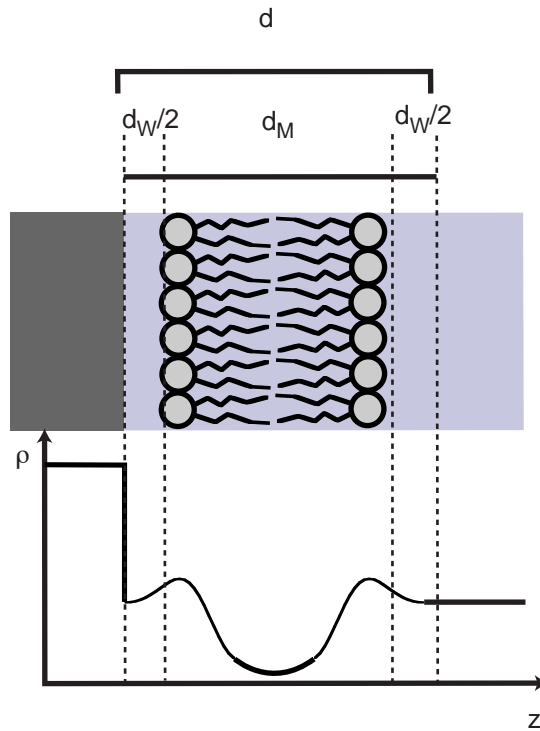


Abbildung 3.5 Elektronendichteprofil einer Membran auf einem Substrat in Kontakt mit Exzeßwasser.

Der effektive Formfaktor  $f(q_z)$  der Membran lässt sich wie folgt definieren (Sinha et al., 1988):

$$f(q_z) = \int \frac{\partial \rho_0(z)}{\partial z} \cdot \exp(-iq_z z) dz,$$

Gln. 3.15

und es folgt damit nach Gln. 3.13 für die Reflektivität:

$$R = R_F \cdot \left| \frac{1}{\rho_\infty} \right|^2 \cdot |f(q_z)|^2.$$

Gln. 3.16

Der Dichtegradienten lässt sich damit darstellen als:

$$\frac{\partial \rho_0(z)}{\partial z} = \int \sqrt{\frac{R}{R_F}} \cdot \exp(iq_z z) dq_z,$$

Gln. 3.17

und durch Integration nach  $z$  erhält man hieraus  $\rho_0(z)$ .

Setzt man  $\sqrt{R/R_F} = \sqrt{f_n}$ ,  $q_z = 2n\pi/d$  und stellt das Integral als Reihe reeller Terme dar, so folgt:

$$\rho_{mem}(z) = \sum_{n=1}^M \frac{d}{2n\pi} \sqrt{f_n} v_n \cos\left(\frac{2n\pi}{d} z\right),$$

*Gln. 3.18*

wobei  $v_n$  die Phase des Formfaktors und  $M$  die Anzahl der Maxima der gemessenen Kurve bezeichnet. Da die Elektronendichte eine symmetrische Funktion ist, muss die Phase des Formfaktors reell sein und es gilt:  $v_n = \pm 1$ .

Die gemessenen Reflektivitäten wurden mit folgendem Ausdruck angepasst (Salditt, 2000):

$$R(q_z) = (1 - x) \cdot R_{sub}(q_z) + x \cdot R_{mem}(q_z)$$

mit

$$R_{sub}(q_z) = R_{F,sub} \cdot \left| \rho_{sub} \cdot e^{-\frac{1}{2}\sigma_{sub}^2 q_z^2} \right|^2$$

und

$$R_{mem}(q_z) = R_{F,mem} \cdot \left| \left( \rho_{H_2O} - \rho_{sub} \right) \cdot e^{-\frac{1}{2}\sigma_{sub}^2 q_z^2} + \left( \rho_{mem} - \rho_{H_2O} \right) \cdot e^{iq_z d_w} + \Delta\rho_{mem} \cdot f(q_z) \cdot e^{iq_z d_w} \right|^2$$

*Gln. 3.19*

wobei die einzelnen Parameter wie folgt definiert sind:

$R_{sub}$ :	Beitrag des Substrates zur Reflektivität
$R_{mem}$ :	Beitrag der Membran zur Reflektivität
$R_{F,sub}$ :	Fresnelreflektivität des Substrates
$R_{F,mem}$ :	Fresnelreflektivität der Membran
$f(q_z)$ :	Formfaktor der Membran
$x$ :	Anteil der bedeckten Fläche
$\rho_{sub}$ :	mittlere Elektronendichte des Substrates
$\rho_{H_2O}$ :	mittlere Elektronendichte des Wassers
$\rho_{mem}$ :	mittlere Elektronendichte des Lipids
$\Delta\rho_{mem}$ :	Amplitude der Elektronendichte des Lipids

$\sigma_{\text{sub}}$ :	mittlere Rauigkeit des Substrates
$d_w$ :	Dicke der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat

Die Probe wird hierbei als ein Wasser/Lipid/Wasser-System mit kontinuierlicher Elektronendichte auf einem "halbunendlichen" Siliziumsubstrat betrachtet. Dies bedeutet, dass das Signal von der Unterseite des Siliziumsubstrates vernachlässigt werden kann. Da das Substrat darüber hinaus völlig andere Materialeigenschaften hat, wird es als separater Beitrag behandelt.

Da nicht gewährleistet ist, dass die ganze Oberfläche mit Lipid bedeckt ist, wird in einen bedeckten Anteil  $x$  und einen unbedeckten Anteil  $(1-x)$  unterschieden und die Reflektivität in zwei entsprechend gewichtete Teile aufgeteilt.  $R_{\text{sub}}$  enthält hierbei die Intensität, die direkt von unbedeckten Teilen der Oberfläche reflektiert wird, wobei die Rauigkeit der Oberfläche nach Gln. 3.14 durch einen exponentiellen Faktor berücksichtigt wird und  $\sigma_{\text{sub}}$  die mittlere Rauigkeit des Substrates bezeichnet. Der Anteil  $x$  der Probe, die mit Membran bedeckt ist in drei Terme aufgeteilt, deren Summe als  $R_{\text{mem}}$  bezeichnet wird. Der erste Term beschreibt die Grenzfläche Wasser-Substrat, die durch einen konstanten Sprung in der Elektronendichte  $\rho_{\text{Sub}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}$  gekennzeichnet ist, wobei wiederum die Rauigkeit des Substrates nach Gln. 3.14 durch einen exponentiellen Faktor berücksichtigt wird. Der zweite Term stellt den Phasenfaktor für den Weg zwischen Substrat und Membran dar, wobei die Grenzfläche durch die Differenz der mittleren Elektronendichten  $\rho_{\text{mem}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}$  gekennzeichnet ist. Der letzte Term schließlich gibt den Beitrag des Schichtsystems Wasser/Lipid/Wasser wieder, das durch eine kontinuierliche Elektronendichte modelliert wird, die in den Formfaktor  $f(q_z)$  eingeht. Der Formfaktor kann in eine Fourierreihe zerlegt werden, deren Koeffizienten in der Anpassung bestimmt werden. Daraus kann dann das Elektronendichteprofil nach Gln. 3.18 rekonstruiert werden.

#### **3.3.3.3. Meßgeometrie am Strahlrohr D4 des Hasylab/DESY**

Für die Messungen am Strahlrohr D4 des Hasylab/DESY wird eine wasserdichte Probenkammer mit Strahlfenstern aus Kapton verwendet. Zuleitungsstutzen erlauben es, den Puffer in der Probenumgebung in situ zu verändern. Die Temperatur der Probe kann durch eine Temperierkammer, die die Probenkammer umschließt, geregelt werden. Proben- und Temperierkammer sind im Detail beschrieben bei Vogel (Vogel, 2000)

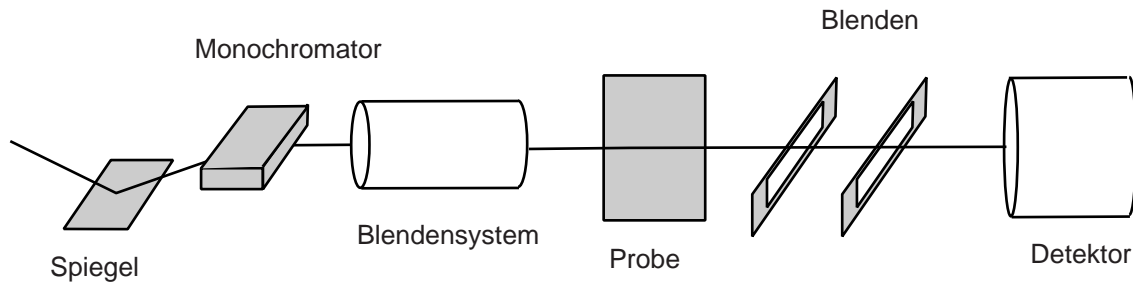


Abbildung 3.6 Messplatz D4 am Hasylab / DESY

In Abbildung 3.6 ist die Geometrie am Ablenkmagnet-Messplatz D4 dargestellt. Der Röntgenstrahl wird durch einen Goldspiegel auf einen Si<111> Kristall geleitet, der den Strahl monochromatisiert. In diesem Fall wird mit einer Strahlenergie von 20 keV gemessen, was einer Wellenlänge von  $\lambda = 0.62 \text{ \AA}$  entspricht. Der durch ein Blendensystem gebündelte Strahl trifft anschliessend auf die vertikal ausgerichtete Probe und passiert dann Gesichtsfeldblende und Detektorblende, bevor er in den NaI Szintillationszähler (Punkt-detektor) gelangt. Bei einer Strahlhöhe von  $100 \mu\text{m}$  ergibt sich die Auflösung zu  $\Delta q_z = 2.9 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}$ .

#### 3.3.4. Laterale Strukturierung von Festkörperoberflächen auf Mikrometerskala

##### 3.3.4.1. Fotolithographisches Verfahren

Gitteranordnungen kreisförmiger Aluminiumscheiben mit einem mittleren Durchmesser von  $7 \mu\text{m}$  deren Abstand  $90 \mu\text{m}$  in vertikaler und  $25 \mu\text{m}$  in horizontaler Richtung betragen wurden über ein fotolithographisches Verfahren in folgenden Schritten auf Deckgläser aufgebracht:

- (1) Mit einer Lackschleuder wird durch Drehen mit 4000 U/min während 40 sec eine Schicht Fotolack aufgetragen.
- (2) 30 min Aushärten des Lackes bei  $90^\circ\text{C}$ .
- (3) 30 sec Belichten der Probe durch eine Kronglasmaske mit der gewünschten Struktur.
- (4) 30 sec Entwickeln
- (5) Spülen der Probe mit Millipore um Entwicklerreste zu entfernen.



Auf dem Substrat befindet sich jetzt das inverse Abbild des gewünschten Musters aus Fotolack. Die Probe kann nun durch Widerstandsverdampfen in einer Vakuumanlage mit einer 10 nm dicken Aluminiumschicht versehen werden. An Luft bildet sich Aluminiumoxid. Die Fotolackstrukturen unter dem Aluminiumoxid können durch Spülen mit Azeton entfernt werden und das Glassubstrat kommt an diesen Stellen zum Vorschein (lift-off Verfahren). In Anschluss werden die Substrate in Azeton und Millipore gespült und 20 min mit UV-Licht bestrahlt.

#### **3.3.4.2. Die Entnetzung von Polymerfilmen als strukturbildender Prozess**

Die Strukturierung von Substraten mit stochastisch verteilten Aluminiumscheiben wird mit Hilfe eines entnetzenden Polymerfilmes nach Jacobs (Jacobs et al., 1998) realisiert. Hierbei wird Polystyrol aus einer Toluollösung mit einer Lackschleuder auf ein silanisiertes Substrat aufgetragen. Der entstandene Polymerfilm ist bei Zimmertemperatur homogen in der Glasphase und entnetzt bei Heizen über die Glastemperatur, wodurch sich Löcher ausbilden. Die Dichte der Löcher kann über äußere Parameter wie Dauer und Temperatur des Heizvorganges gesteuert werden, während der Durchmesser der Löcher konstant bei 8.4  $\mu\text{m}$  liegt. Auf einen solchen Polymerfilm kann nun Aluminium aufgedampft werden, das die Löcher füllt. Die gewünschte Struktur entsteht, wenn der Polymerfilm mit Toluol entfernt wird. Vor Durchführung des Experimentes wird das Substrat in Toluol und Millipore gespült und 20 min mit UV-Licht bestrahlt.

#### **3.3.5. Die Lipidbeschichtung von Oberflächen mit Vesikelfusion**

Eine weit verbreitete Methode zur Präparation einer Lipiddoppelschicht ist die Vesikelfusion (Kalb et al., 1992). Hierbei werden kleine einschalige Vesikel in wässriger Lösung verwendet, die auf Grund von kolloidalen Wechselwirkungen auf der Oberfläche adhäreren und aufplatzen. Im letzten Schritt spreiten die Lipidflecken auf der Oberfläche und heilen zu einer geschlossenen Schicht aus (Rädler et al., 1995).

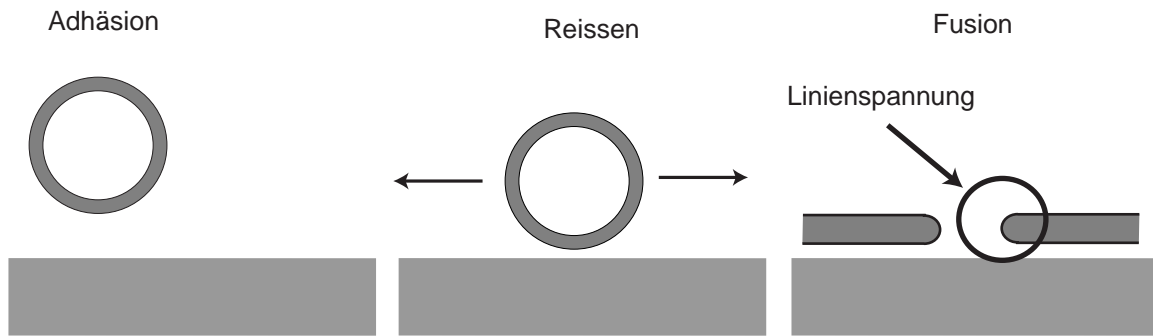


Abbildung 3.7 Die Vesikelfusion läuft in drei fundamentalen Schritten ab: Links: Annäherung und Adhäsion der Vesikel auf der Oberfläche auf Grund kolloidaler Wechselwirkungen. Mitte: Reißen der gespannten Vesikel. Rechts: Fusion der Vesikelflecken zu einer homogenen Lipiddoppelschicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Vesikel wurden wie folgt präpariert:

- (1) die benötigte Menge Lipid wird mit einer Glasspritze aus einer Stammlösung in Chloroform ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ ) in ein Glasfläschchen abgemessen und mit Stickstoff trockengeblasen. Reste des Lösungsmittels werden durch Lagerung über mindestens vier Stunden in Vakuum entfernt.
- (2) das trockene Lipid wird mit dem jeweiligen Puffer zu einer Lösung der Konzentration  $1 \text{ mg/ml}$  angesetzt und mindestens vier Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  gequollen.
- (3) die Lipidlösung wird einige Minuten beschallt, bis sie klar erscheint.

Eine frisch beschallte Vesikellösung wird nun auf das Substrat gegeben, so dass sich  $100 \mu\text{g}$  Lipid in der Lösung befinden, aber die Oberfläche ganz mit Flüssigkeit bedeckt ist. Die Probe wird über Nacht inkubiert und dann stark gespült. Dies erfordert die Verwendung einer Kammer, in der das Substrat weder durch Verdunstung noch beim Spülen trocken werden kann.

#### 3.3.6. Durchführung eines Spreitexperimentes

Prinzipiell wird ein Spreitexperiment durchgeführt, indem trockenes Lipid als Materialquelle auf ein Substrat aufgebracht und dann Wasser hinzugegeben wird. Das Lipid in der Quelle quillt unter Wasser in multilamellare Schichtstrukturen, deren untere Doppellage im Falle von Umgebungstemperaturen oberhalb des Phasenüberganges kristallin-flüssig die Festkörperoberfläche benetzt. In dieser Arbeit wurde von Anfang an entsprechend temperiertes Wasser hinzugegeben. Falls nicht anders angegeben handelte es sich hierbei um

MQ. Somit wird durch den Zeitpunkt der Wasserzugabe der Startpunkt des Experimentes festgelegt.

An das Reservoir werden zwei Bedingungen gestellt. Zum einen sollte es eine gerade Kante haben, da dann die Benetzungsfront eine gerade Linie mit konstanter Länge während des gesamten Experimentes ist. Dies ist eine wesentliche Annahme der Auswertung (siehe Kapitel 4.1.3). Außerdem muß es genügend Material enthalten, um ein Stoppen des Benetzungsvorganges aus Materialmangel zu vermeiden. Ein solches Reservoir wird durch eine Art Stempeltechnik erzielt. Als Stempel dient ein Teflonquader auf dessen Kante Lipid aus einer Chloroformlösung ( $c = 2 \text{ mg/ml}$ ) eingetrocknet wird. Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, trocknet der Stempel mindestens vier Stunden in Vakuum. Von der Teflonkante lässt sich das trockene Lipid in einer geraden Linie auf das Substrat übertragen. Da die Kinetik des Benetzungsvorganges temperaturabhängig ist, wurden die Messungen in einer Kammer mit Temperaturkontrolle durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden Spreitexperimente durchgeführt, um das Benetzungsphänomen zu untersuchen. Es kann aber auch als Methode zur Präparation einer festkörpergestützten Membran verwendet werden.

## 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

### 4.1. Kinetik der Benetzung: Theoretische Aspekte

#### 4.1.1. Spreiten als Benetzungsphänomen

Benetzungsphänomene sind vielfach untersucht worden, wie z.B. in den Arbeiten von de Gennes (de Gennes, 1985) oder Leger und Joanny (Leger und Joanny, 1992). Im einfachsten Fall wird eine Flüssigkeit betrachtet, die sich auf einer glatten Oberfläche befindet. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, lassen sich zwei Fälle des Kontaktwinkels  $\Theta$  unterscheiden:

$\Theta=0$ : Im Falle der *vollständige Benetzung* bildet sich ein Film endlicher Dicke, die durch molekulare Wechselwirkungen bestimmt ist.

$\Theta>0$ : es bildet sich ein Tropfen mit einem endlichen Kontaktwinkel und man spricht von *teilweiser Benetzung*.

Die Größe des Kontaktwinkels ist im Gleichgewichtsfall durch die *Young-Gleichung* gegeben:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV} \cdot \cos\Theta_e = 0$$

Gln. 4.1

wobei  $\gamma_{ij}$  die freien Energien pro Einheitsfläche an den Grenzen Festkörper-Gas (SV), Festkörper-Flüssigkeit (SL) und Flüssigkeit-Gas (LV) darstellen.

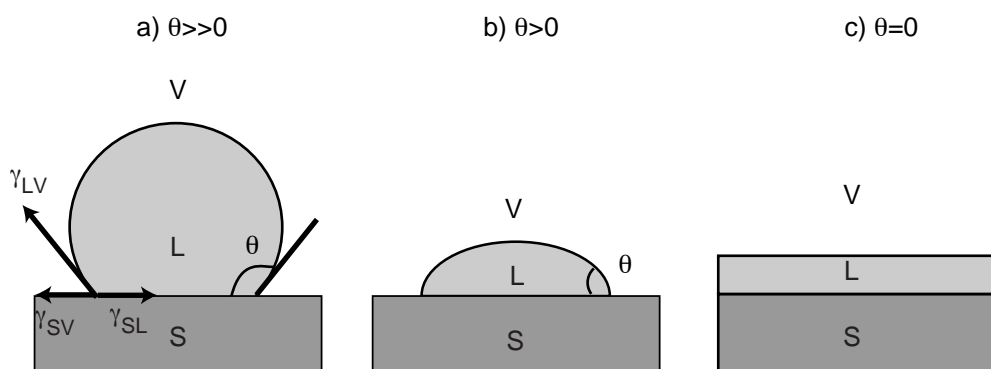


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung eines Tropfens im Gleichgewicht auf einer Festkörperoberfläche. Der Kontaktwinkel  $\Theta$  ist durch die Young-Gleichung mit den freien Energien der Grenzflächen  $\gamma_{ij}$  verbunden. a) und b) zeigen partielle Benetzung, wobei im Fall b) die Tendenz zur Benetzung stärker ist. c) stellt den Fall vollständiger Benetzung dar.

Im Spezialfall der kompletten Benetzung ist der Energiegewinn pro Fläche bei der Ausbildung des Filmes die Differenz:

$$S = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV}$$

Gln. 4.2

die den sogenannten *Spreitparameter*  $S$  definiert.

Die Terminologie eines klassischen Benetzungsexperimentes kann auf eine spreitende Membran nur teilweise angewendet werden. So existiert keine definierte Kontaktlinie zwischen den Phasen flüssig, gasförmig und fest, sondern die Membran ist zu jeder Zeit von Wasser umgeben. Außerdem hat die Membran eine intrinsische Dicke  $d_M$ , und es gibt keinen Kontaktwinkel  $\Theta$  im obigen Sinne. Es kann also nur experimentell unterschieden werden, ob eine Membran eine bestimmte Oberfläche benetzt, oder nicht. Im Falle einer Benetzung ist der Gewinn an freier Energie pro Einheitsfläche durch folgende Differenz gegeben:

$$S = F_{MS} - F_{MM},$$

Gln. 4.3

wobei  $F_{MS}$  die freien Energie zwischen einer Einzelmembran und dem Festkörper und  $F_{MM}$  die freie Energie der Membran im Lipidreservoir ist.

#### 4.1.2. Die Membran im Wandpotential

In den meisten Fällen kann der Spreitparameter  $S$  mit der Adhäsionsenergie zwischen Membran und Substrat gleichgesetzt werden. Als Adhäsionsenergie  $W_A$  bezeichnet man den Energiegewinn pro Flächeneinheit, der sich bei Annäherung der Membran aus dem Unendlichen bis zum Gleichgewichtsabstand  $d_W$  von der Oberfläche ergibt:

$$S \approx W_A(d_w) = \int_{\infty}^{d_w} f_{vdW}(z) + f_{el}(z) + f_{rep}(z) dz$$

Gln. 4.4

Im allgemeinen tragen die Van der Waals Kraft  $f_{vdW}$ , die elektrostatische Wechselwirkung  $f_{el}$  und eine repulsive Wechselwirkung  $f_{rep}$  zu  $W_A$  bei. Diese kolloidalen Wechselwirkungen sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Detaillierte Ableitungen finden sich in einschlägigen Fachbüchern (Israelachvili, 1991), (Adamson, 1976).

#### 4.1.2.1. Van der Waals Wechselwirkung

Van der Waals (VdW) Kräfte sind intermolekulare Kräfte, die auf induzierte oder permanente Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Einzelne Atome lassen sich näherungsweise als Punktdipole beschreiben. Um jedoch die Wechselwirkung zwischen makroskopischen Körpern zu berechnen, müssen die einzelnen molekularen Kräfte nach Hamaker summiert werden. Für den planaren Fall einer Membran mit der Dicke  $d_M$  im Abstand  $z$  vom Substrat, erhält man als Kraft pro Flächeneinheit:

$$f_{vdW}(z) = -\frac{A_H}{6\pi} \left( \frac{1}{z^3} - \frac{1}{(z + d_M)^3} \right).$$

Gln. 4.5

Die Hamakerkonstante  $A_H$  kann aus den dielektrischen Materialparametern der beteiligten Medien berechnet werden (Mahanty und Ninham, 1976) und liegt in der Größenordnung von  $1 \cdot 10^{-20}$  J für eine Membran auf einer Glasoberfläche.

#### 4.1.2.2. Elektrostatik

Zwischen zwei Ebenen mit unterschiedliche Ladungsdichten  $\sigma_1$  und  $\sigma_2$ , die durch eine neutrale Salzlösung mit  $i$  verschiedenen Ionenarten getrennt sind, wirkt nach Parsegian und Gingell (Parsegian und Gingell, 1972) folgende elektrostatische Kraft pro Einheitsfläche:

$$f_{el}(z) = \frac{1}{\epsilon\epsilon_0} \cdot \frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_1\sigma_2(e^{\kappa_D z} + e^{-\kappa_D z})}{(e^{\kappa_D z} - e^{-\kappa_D z})^2} \quad \text{mit} \quad \kappa_D = \left[ \sum_i \frac{c_i z_i^2 e_0^2}{\epsilon\epsilon_0 kT} \right]^{1/2},$$

Gln. 4.6

wobei die Debyesche Abschirmlänge  $\kappa_D^{-1}$  von der Ionenkonzentration  $c_i$  und der Valenz  $z_i$  der  $i$  Ionenarten abhängt. Dieser Ansatz berücksichtigt nicht nur die reine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ladungen der Platten, sondern enthält auch einen repulsiven Anteil, der auf entropische Kräfte zurückzuführen ist. So können sich z.B. entgegengesetzt geladene Oberflächen abstoßen, wenn die Gegenionen der gesamte Ladung  $\sigma_1 + \sigma_2$  in einen zu kleinen Bereich zwischen die nicht permeablen Platten gesperrt werden.

Im Grenzfall  $\sigma_1 \approx \sigma_2$  reduziert sich Gln. 4.6 zu:

$$f_{el}(z) \approx \frac{1}{\epsilon\epsilon_0} \cdot \sigma_1 \sigma_2 \cdot e^{-\kappa_D z}$$

Gln. 4.7

während für  $\sigma_1 \ll \sigma_2$  gilt:

$$f_{el}(z) \approx \frac{1}{\epsilon\epsilon_0} \cdot \sigma_2^2 \cdot e^{-\kappa_D z}$$

Gln. 4.8

Das Oberflächenpotential  $\Psi$  ist über die Graham-Gleichung mit den Oberflächenladungen verbunden:

$$\sigma = \sqrt{8\epsilon_0 \epsilon c k T} \cdot \sinh\left(\frac{e\Psi}{2kT}\right).$$

Gln. 4.9

#### 4.1.2.3. Repulsive Kräfte

Repulsive Kräfte auf zwischenatomarer Skala entstehen durch den Überlapp von Elektronenwolken. Sie werden im allgemeinen als *hard core Abstoßung* oder *Bornsche Abstoßung* bezeichnet. Für Ionen in wässrigen Lösungen tritt analog Abstoßung auf, wenn die Wolken ihrer Gegenionen überlappen. Diese Kräfte sind im allgemeinen kurzreichweitig und können z.B. mit einem exponentiellen Abfall oder einem Rechteckpotential empirisch beschrieben werden (Israelachvili, 1991).

In Flüssigkeiten führt eine Ordnung der Flüssigkeitsmoleküle, die durch eine bestimmte Molekülgeometrie hervorgerufen wird, zu Abstoßung. Insbesondere Festkörperoberflächen können Ordnung in angrenzenden Flüssigkeitsschichten induzieren. Im Spezialfall einer wässrigen Lösung werden diese Kräfte Hydratationskräfte genannt. Diese abstandsabhängigen Kräften sind bis heute theoretisch nur teilweise verstanden (Besseling, 1997). Im Falle einer Glasoberfläche ist es denkbar, dass funktionelle Gruppen auf der Oberfläche Wasserstoffbrückenbindungen mit den angrenzenden Wassermolekülen eingehen und so die Wasserstruktur im Vergleich zum Volumen modifizieren (Israelachvili und Wennerström, 1996). Empirisch wurde ein exponentielles Gesetz für die Abstandsabhängigkeit der Hydratationskraft an hydrophilen Grenzflächen gefunden:

$$f_{hyd}(z) = f_0 e^{-z/\xi},$$

Gln. 4.10

wobei  $f_{hyd}$  die Kraft pro Fläche ist. Parsegian et al. bestimmten die Werte  $\xi$  und  $f_0$  experimentell zu  $\xi = 0.26 \text{ nm}$  und  $f_0 = 7.0 \cdot 10^8 \text{ N/m}^2$  (Parsegian et al., 1979).

#### 4.1.2.4. Gesamtes Wechselwirkungspotential

In Abbildung 4.2 ist das Wechselwirkungspotential einer neutralen Membran mit einer Festkörperoberfläche dargestellt, das aus einem repulsiven Anteil mit exponentiellem Verlauf (Gln. 4.10) und einem attraktiven Van der Waals Potential (Gln. 4.5) besteht. Mit den hier verwendeten Parametern  $A_H = 9.8 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ ,  $d_M = 43 \text{ \AA}$ ,  $\xi = 10 \text{ \AA}$  und  $f_0 = 7.0 \cdot 10^8 \text{ N/m}^2$ , liegt das Minimum des Potentials bei  $S = 5 \cdot 10^{-4} \text{ J/m}^2$  und  $d_W = 5.5 \text{ \AA}$ .

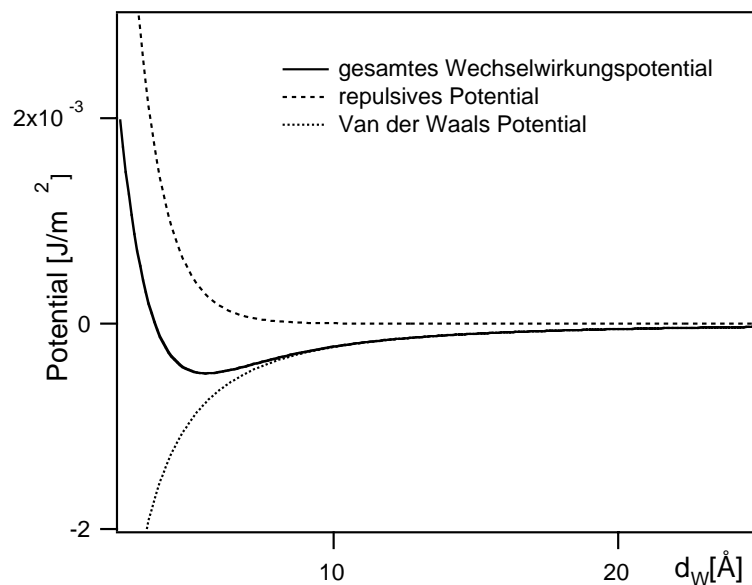


Abbildung 4.2 Das Wandpotential in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Membran und Substrat berechnet nach Gln. 4.5 und Gln. 4.10 mit  $A_H = 9.8 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ ,  $d_M = 43 \text{ \AA}$ ,  $\xi = 0.1 \text{ nm}$  und  $f_0 = 7.0 \cdot 10^8 \text{ N/m}^2$ .

#### 4.1.3. Zeitabhängigkeit der Spreitkinetik, Bewegungsmodelle und Dissipationsmechanismen

Die Ausbreitung einer Membran von einer Lipidquelle mit gerader Kante kann als eindimensionales Problem behandelt werden. Im Folgenden sei  $L(t)$  der Abstand zwischen



Reservoir und Spreitfront und  $x$  die Koordinate parallel zur Ausbreitungsrichtung (siehe Abbildung 4.3).

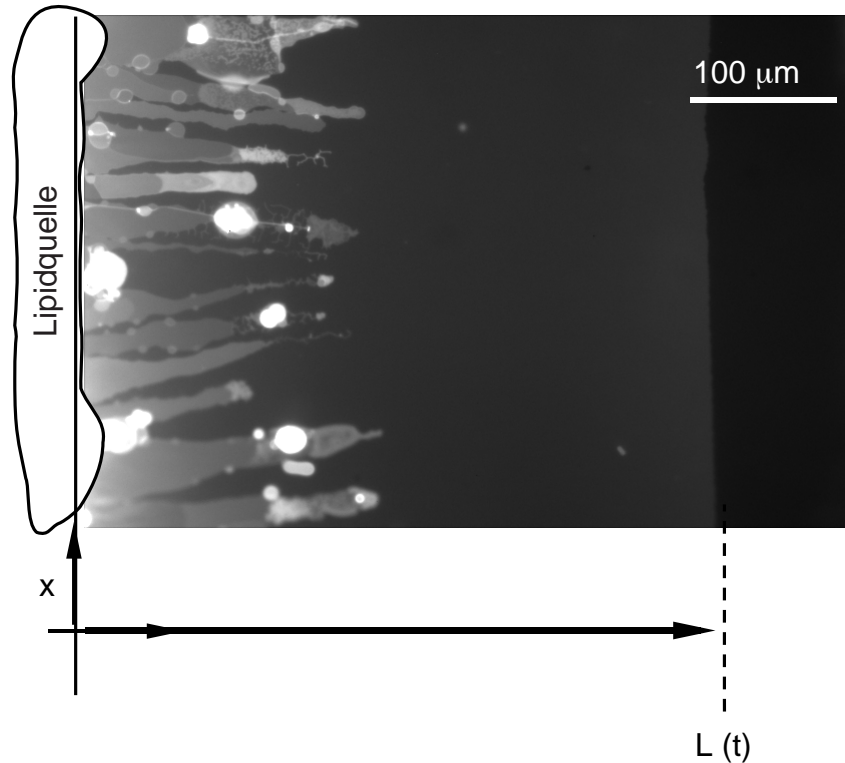


Abbildung 4.3 Fluoreszenzbild einer spreitenden Lipidmembran. Die Membran erscheint als einheitlich helle Fläche mit gerader Grenzlinie auf dem dunklen Substrat. Im linken Teil des Bildes sieht man zusätzliche Lipidschläuche, die aus dem Reservoir hervorquellen.

Unter der Annahme, dass die treibende Kraft  $S$  isotrop und homogen über die ganze Länge  $L(t)$  in einer Reibungskraft pro Flächeneinheit  $f_{\text{fric}} = \gamma \cdot dL(t)/dt = \gamma \cdot v(t)$  dissipiert wird, gilt:

$$S = \gamma \cdot L(t) \cdot v(t),$$

Gln. 4.11

wobei  $\gamma$  der Reibungskoeffizient und  $v(t) = d/dt L(t)$  die Geschwindigkeit der Benetzungsfrent ist. Integration der Gleichung ergibt die Spreitgeschwindigkeit  $v(t)$  in Abhängigkeit der Zeit:

$$v(t) = \sqrt{\frac{\beta}{t}} \quad \text{mit} \quad \beta = \frac{S}{2\gamma}$$

Gln. 4.12

mit  $\beta$  als *kinetischen Spreitkoeffizienten*.

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Es soll nun auf drei mögliche Dissipationsmechanismen näher eingegangen werden. Diese sind in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt: (a) hydrodynamische Reibung (b) Reibung zwischen den Ketten der Monolagen und (c) lateraler Scherfluß durch Defekten.

Im ersten Fall kann die Lipiddoppelschicht als feste Platte angesehen werden, die über eine Wasserschicht der Dicke  $d_w$  mit der Geschwindigkeit  $v_h$  gleitet. Der Reibungskoeffizient  $\gamma_h$  ist dann gegeben durch den hydrodynamischen Scherfluß in der Wasserschicht mit Viskosität  $\eta$ :

$$\gamma_h = \frac{\eta}{d_w}$$

Gln. 4.13

Im Fall (b) gleitet die obere Lipidmonolage über die untere Monolage und bedeckt so das Substrat.

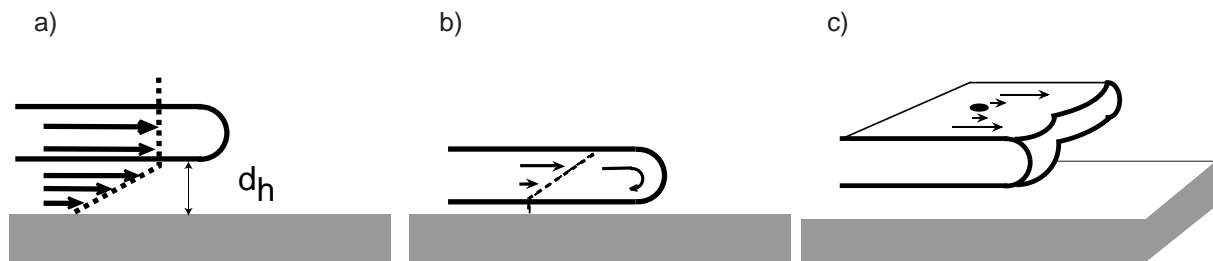


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung der drei diskutierten Dissipationsmechanismen. a) die Membran gleitet auf einem dünnen Wasserfilm und Energie wird in hydrodynamische Reibung dissipiert. b) die Lipidmonolagen rollen übereinander und Energie wird durch Reibung zwischen den Alkylketten der Monolagen dissipiert. c) Über Scherfluß innerhalb der Lipiddoppellage induziert durch Hindernisse auf der Oberfläche kann zusätzlich Energie dissipiert werden.

Die Dissipation findet in der Membran statt und kann durch einen viskosen Reibungskoeffizienten  $b = \Sigma/v^\pm$  beschrieben werden (Evans und Yeung, 1994), wobei  $\Sigma$  der angelegter Scherfluß und  $v^\pm$  der Geschwindigkeitsunterschied zwischen oberer und unterer Monolage ist. Der Reibungskoeffizient  $\gamma_b$  ist dann gegeben durch:

$$\gamma_b = 2b \quad \text{mit} \quad b = \frac{\Sigma}{v^\pm}$$

Gln. 4.14

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

---

Die Prozesse (a) und (b) stellen Grenzfälle dar, die sich überlagern können. Bei konstantem Scherfluß addieren sich die beiden Geschwindigkeiten  $v(t) = v_a + v_b$  und der gesamte Reibungskoeffizient  $\gamma_s$  ist gegeben durch die Relation:

$$\gamma_s^{-1} = \gamma_h^{-1} + \gamma_b^{-1}.$$

*Gln. 4.15*

Bei den Prozessen (a) und (b) handelt es sich um linearen Membranfluss. Oberflächenrauigkeiten oder Defekte auf der Substratoberfläche können jedoch Scherfluss innerhalb der Membran verursachen, wie schematisch dargestellt in Abbildung 4.4 c). Solche Defekte können als Zylinder mit Durchmesser  $a_A$  angesehen werden, die durch die Membran gezogen werden. Nach Saffmann und Delbrück (Saffmann und Delbrück, 1975) gilt für ein solches Teilchen :

$$\gamma_p \approx \frac{k_B T}{D_L} \cdot c \cdot \ln\left(\frac{a_A}{a_L}\right).$$

*Gln. 4.16*

$D_L$  bezeichnet hier die Eigendiffusion und  $a_L$  den Kopfgruppendurchmesser der Lipide ist. Die Reibungskraft auf Grund von Scherfluss in der Membran addiert sich zu der Reibungskraft im konstanten Flussfeld und es gilt für den gesamten Reibungskoeffizienten:

$$\gamma_{ges} = \gamma_s + \gamma_p$$

*Gln. 4.17*

## 4.2. Kinetik der Benetzung: Experimenteller Teil

### 4.2.1. Vorarbeiten

Die Geschwindigkeit einer Membran, die eine Oberfläche benetzt, wird bestimmt, indem die Position der Membranfront zu verschiedenen Zeitpunkten festgehalten wird. In Abbildung 4.5 sind typische Fluoreszenzaufnahmen einer neutralen Membran in MQ auf einer Siliziumoberfläche im Abstand einiger min zu sehen. In diesem Zeitraum legt die Membran ca. 50  $\mu\text{m}$  zurück.

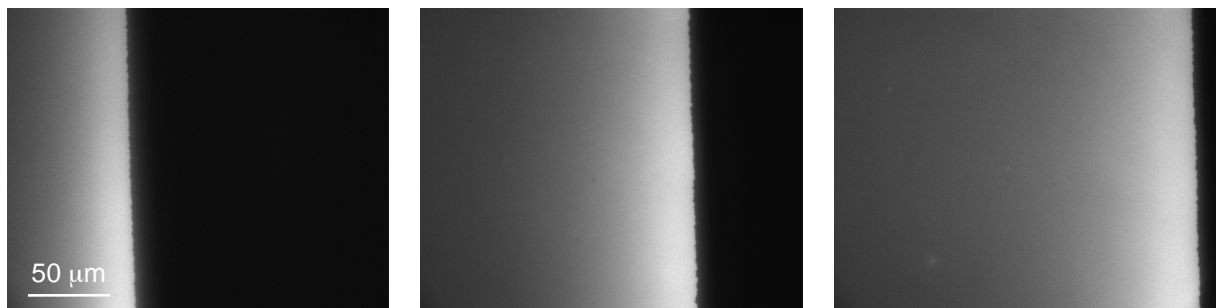


Abbildung 4.5 Bilder einer fluoreszenzmarkierten DMPC-Membran in MQ (hell) auf einer Siliziumoberfläche (dunkel) jeweils im zeitlichen Abstand einiger Minuten.

Die Spreitkinetik fluider Phospholipidmembranen wurde auf unterschiedlichen Oberflächen gemessen. In Abbildung 4.5 sind die Geschwindigkeiten einer DMPC-Membran auf Glas, Silizium, regenerierter Cellulose und Dextran als Funktion der Zeit logarithmisch dargestellt. Unabhängig von der Oberfläche folgen die Geschwindigkeiten  $v(t)$  Gesetzen der Form:

$$v(t) = \sqrt{\frac{\beta}{t}},$$

Gln. 4.18

deren Anpassung an die gemessenen Daten die durchgezogenen Linien darstellen. Aus Messungen der Spreitgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Temperatur und Lipidzusammensetzung wurden die kinetischen Spreitkoeffizienten bestimmt (Nissen, 1998). Es zeigt sich, dass die Zeitabhängigkeit der Benetzungsgeschwindigkeit mit Gln. 4.18 beschrieben werden kann. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Reibungskraft pro Fläche

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

proportional zur bedeckten Fläche ist (Gln. 4.11). Der genaue Dissipationsmechanismus lässt sich aus dieser Beobachtung jedoch nicht bestimmen.

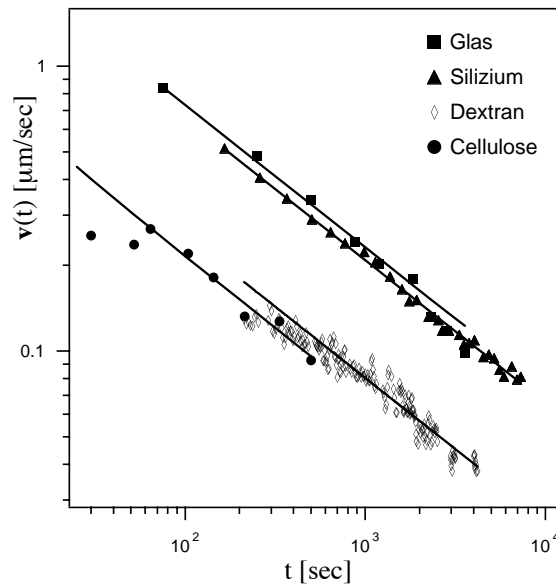


Abbildung 4.6 Spreitgeschwindigkeit einer DMPC Membran auf unterschiedlichen hydrophilen Substraten. Die aus dem angepassten  $t^{-1/2}$ -Gesetz bestimmten kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta$  sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Die Dissipationsprozesse (a) und (b) (vergleiche Abbildung 4.4) stellen Grenzfälle dar und unterscheiden sich vor allem durch die Dicke der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat. Im ersten Fall muss die Wasserschicht dick genug sein, um von hydrodynamischen Scherfluss in dieser Schicht ausgehen zu können.

	$\beta$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]
<b>Glas</b>	$26 \pm 3$
<b>Silizium</b>	$37 \pm 3$
<b>Dextran</b>	$5.2 \pm 0.5$
<b>Cellulose</b>	$6.5 \pm 0.5$

Tabelle 4.1 Die Werte des kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta$  bestimmt aus den Daten in Abbildung 4.1

Gleichzeitig hat ein großer Abstand zwischen Membran und Substrat eine Verringerung der Adhäsionsenergie zur Folge. Beträgt der Abstand zwischen Membran und Substrat nur einige

Lagen aus Wassermolekülen, ist es nicht mehr gerechtfertigt von hydrodynamischen Scherfluss auszugehen und die Adhäsionsenergie steigt an. Die stärkere Kopplung der Membran an das Substrat macht in diesem Fall eine Rollbewegung der Lipidmonolagen wahrscheinlicher. Im Folgenden soll der Dissipationsmechanismus aufgeklärt werden und der Benetzungsprozess als globales Transportphänomen untersucht und verstanden werden.

### 4.2.2. Bestimmung der Wasserschichtdicke bei Variation der Pufferbedingungen

Ein wichtiger Parameter zur Aufklärung des Dissipationsmechanismus ist die Dicke der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat. Dieser wurde mit spekulärer Röntgenreflektometrie in Zusammenarbeit mit der Gruppe Salditt (LMU, München) ermittelt. Gleichzeitig konnte so gezeigt werden, dass durch den Benetzungsprozess wirklich eine Einzelmembran entsteht und kein Multischichtsystem.

Die Lipidmembran wurde mittels Spreiten auf einem Siliziumsubstrat präpariert, das geringere Rauigkeit besitzt als Glas und somit für die Reflektometrie besser geeignet ist. Zur optischen Überprüfung der Membran auf Homogenität wurde Silizium mit einer Oxidschicht von 150 nm verwendet, da sonst die Fluoreszenz unterdrückt wird (Lambacher und Fromherz, 1996). Es wurden Membranen mit zwei verschiedene Lipidzusammensetzungen, reines DMPC und DMPC mit 2 mol% DMTAP in Millipore präpariert, die jeweils mit 1 mol% fluoreszenzmarkierten Lipid (NBD C12-HPC) versetzt waren. Die Pufferbedingungen wurden nach jeder Messung in situ durch Spülen geändert, und zwar in aufsteigenden Konzentrationen:

0.1 mM HEPES, 0.1 mM NaCl (pH7)

1 mM HEPES, 1 mM NaCl (pH7)

10 mM HEPES, 10 mM NaCl (pH7)

100 mM HEPES, 100 mM NaCl (pH7)

In Abbildung 4.7 sind die gemessenen Reflektivitäten der beiden Proben dargestellt. Die durchgezogenen Kurve sind die Anpassungen der Daten nach Gln. 3.19 mit vier Fourierkoeffizienten  $f_n$ . In Abbildung 4.8 ist exemplarisch das Elektronendichteprofil einer DMPC-Membran in MQ abgebildet, das nach Gln. 3.18 aus der angepassten Kurve ermittelt wurde. Es gibt eine erhöhte Elektronendichte im Kettenbereich wieder, die in unmarkierten Lipidmembranen nicht beobachtet werden (Vogel, 2000). Dies kann auf Farbstoffmoleküle

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

zurückgeführt werden, die zur Überprüfung der Probe mit Fluoreszenzmikroskopie zu geringen Anteilen in der Membran enthalten sind und im Allgemeinen durch eine hohe Elektronendichte gekennzeichnet sind. So ist das hier verwendete Sondenmolekül NBD C12-HPC mit einem Molekulargewicht von 856.05 deutlich schwerer als die Lipidmoleküle der umgebende Matrix ( $MW_{\text{DMPC}} = 677.94$ ).

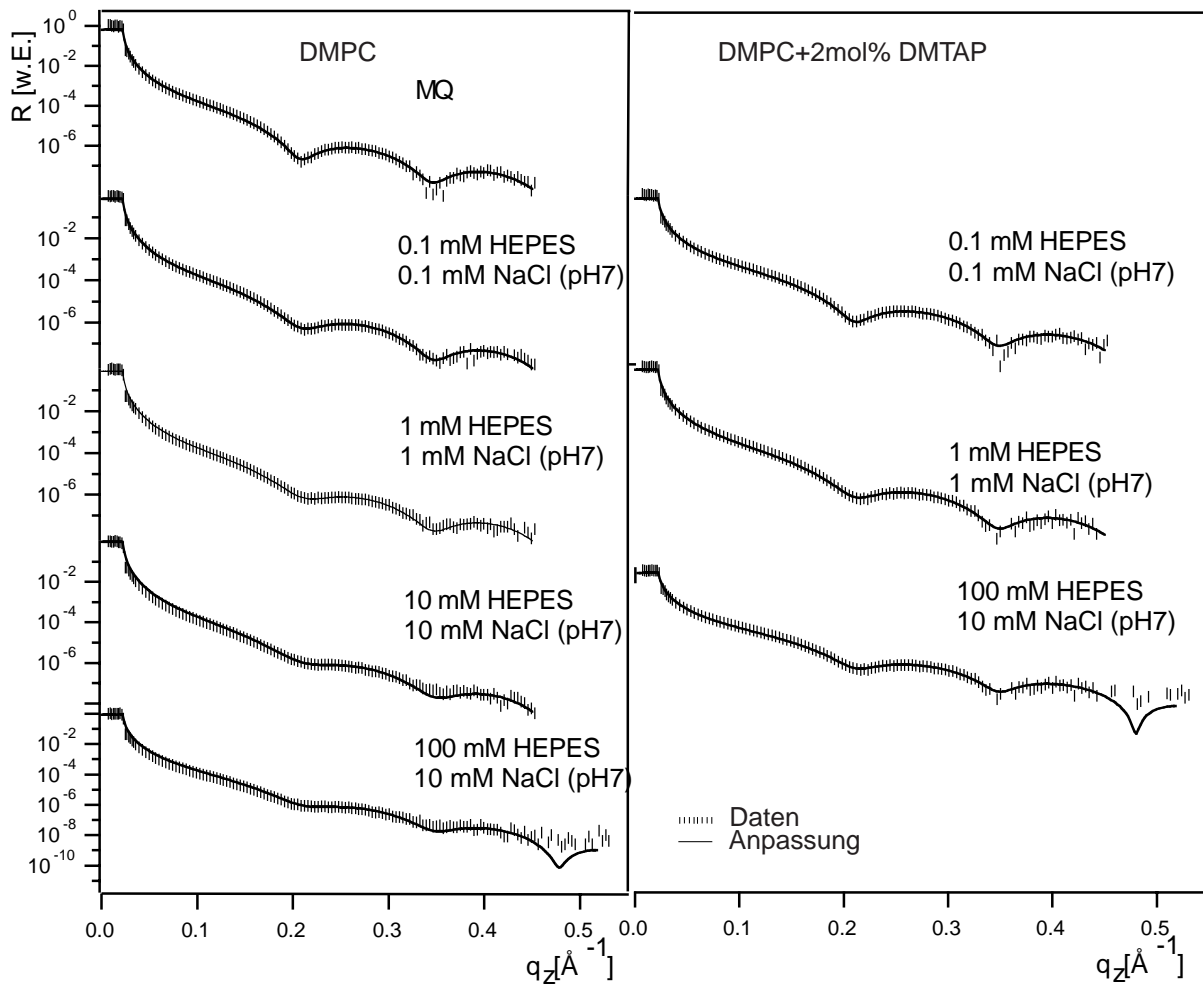


Abbildung 4.7 Die gemessenen Reflektivitäten der beiden Proben bei verschiedenen Pufferbedingungen. Die durchgezogenen Linien stellen die angepassten Kurven dar.

Die gemessenen Reflektivitäten für die zwei verschiedenen Lipidzusammensetzungen unterscheiden sich nicht wesentlich. Aus der Anpassung der gemessenen Kurven erhält man für die Dicke des Wasserfilms zwischen Membran und Substrat den Wert  $d_w = 6 \pm 1 \text{ \AA}$ , unabhängig von Puffer- oder Lipidzusammensetzung. Dieser Wert konnte mit einer Genauigkeit  $\leq 1 \text{ \AA}$  bestimmt werden, da die nicht auf  $R_F$  normierten Intensitäten über eine neun

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Größenordnungen abfallen und es möglich war drei Maxima in den gemessenen Reflektivitäten zu beobachten. Der erhaltene Wert für die Wasserschichtdicke ist in Übereinstimmung mit Literaturwerten. So bestimmten andere Gruppen die Wasserschichtdicke zwischen Membranen mit zwitterionischen Phosphatidylcholin-Kopfgruppen und einer Siliziumdioxidoberfläche zwischen 6 Å und 12 Å (Charitat et al., 1999), (Koenig et al., 1996).

Der einzige Parameter, der sich bei beiden Lipidzusammensetzungen beim Austausch der Pufferlösung in situ ändert, ist der Anteil der bedeckten Fläche  $x$ , der ebenfalls aus der Anpassung der Reflektivitäten bestimmt werden kann.

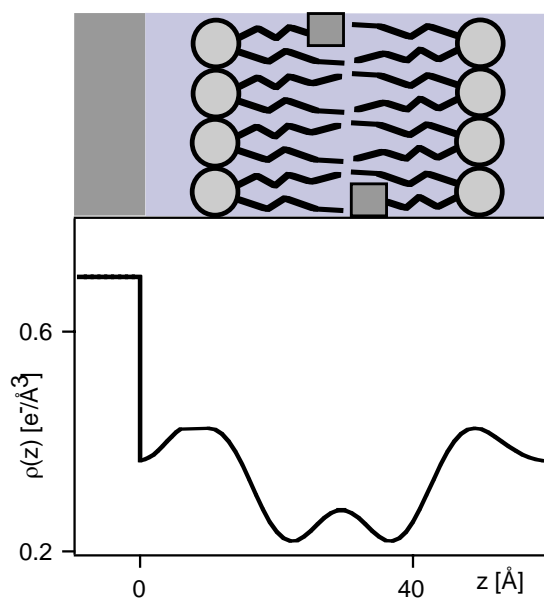


Abbildung 4.8 Das aus der Anpassung der gemessenen Reflektivität berechnete Elektronendichteprofil einer DMPC-Membran in MQ. Die erhöhte Elektronendichte im Kettenbereich der Lipiddoppelschicht korreliert mit dem fluoreszenzaktiven Teil der Farbstoffmoleküle.

Wie in Abbildung 4.9 a) und d) dargestellt, wird dieser bei Erhöhung der Salzstärke immer kleiner, was auf Lochbildung in der Membran hinweist.

Äquivalent zu den Reflektivitätsmessungen wurden Messungen der Diffusionskonstante mit kontinuierlichem Bleichen durchgeführt. In Abbildung 4.9 b) und e) ist jeweils die Abhängigkeit der Diffusionskonstante  $D$  von der Pufferkonzentration aufgetragen. Die Präparation der Proben erfolgte wie für die Reflektivitätsmessungen mittels Spreiten, wobei als Pufferlösung MQ verwendet wurde. Die Salzstärke wurde dann vor jeder Messung der



#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Diffusionskonstanten durch Spülen mit dem entsprechenden Puffer erhöht. Es zeigt sich, dass die Diffusionskonstante  $D$  das selbe Verhalten aufweist, wie die Bedeckung  $x$ .

Die Fluoreszenzaufnahme der neutralen DMPC Membran bei 100 mM HEPES, 100 mM NaCl (pH7) (Abbildung 4.9 c)) weist keinerlei Defekte oder Inhomogenitäten auf. Die bei Erhöhung der Salzkonzentration in der Membran entstehenden Defekte müssen also kleiner als das optische Auflösungsvermögen (ca.  $0.5 \mu\text{m}$ ) des Mikroskopes sein.

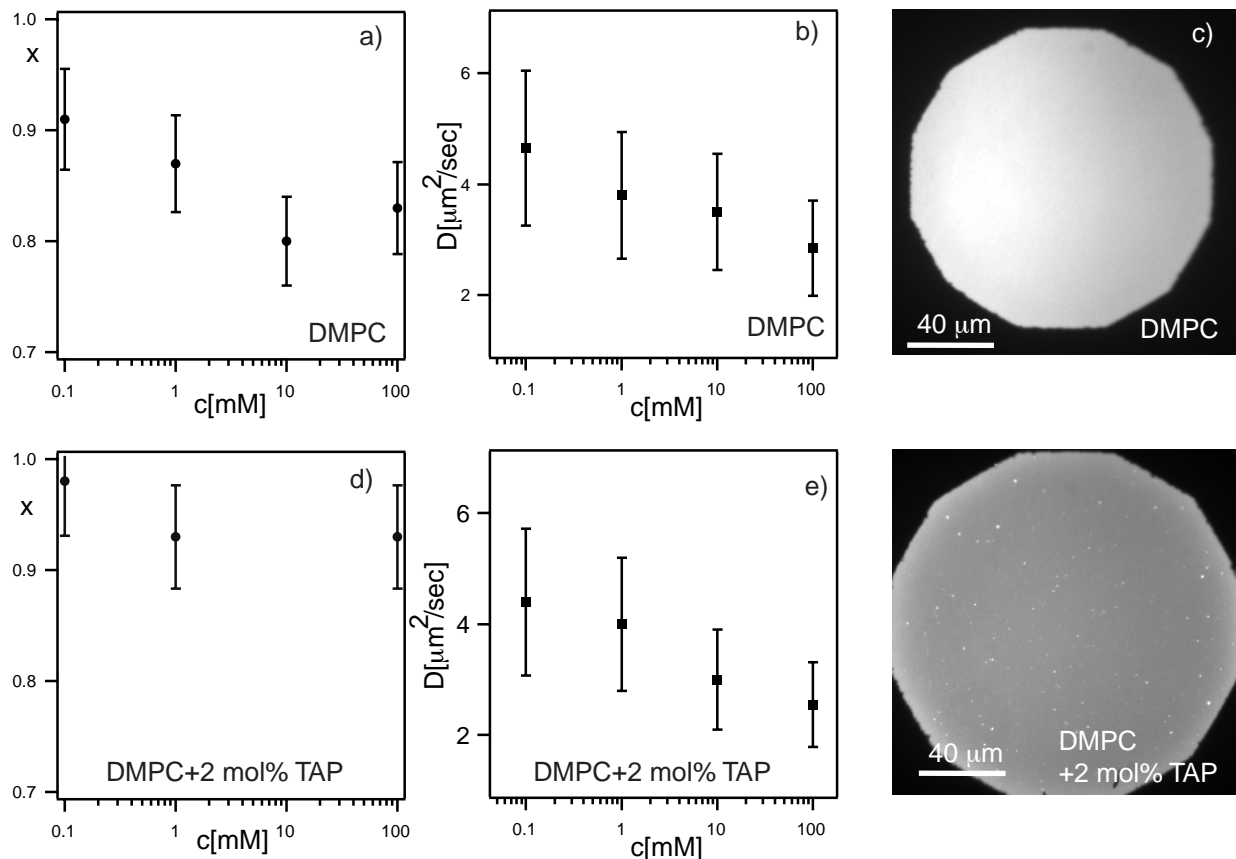


Abbildung 4.9 a) und d) Anteil des mit einer DMPC-Membran (bzw. DMPC + 2% DM TAP) bedeckten Substrates  $x$  in Abhängigkeit der Salzkonzentration  $c$ . b) und e) Die Diffusionskonstante einer DMPC (bzw. DMPC + 2% DM TAP) Membran zeigt das selbe Verhalten bei in situ Änderung der Pufferbedingungen. c) und f) Die Fluoreszenzaufnahme einer DMPC (bzw. DMPC + 2% DM TAP) Membran bei 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH7 weist keine sichtbaren Defekte auf.

Die in Abbildung 4.9 f) gezeigte Fluoreszenzaufnahme der binären Membran mit 2 mol% kationischem Anteil bei 100 mM HEPES, 100 mM NaCl (pH7) weist kleine helle Punkte auf, an denen Lipid akkumuliert wird. Diese befinden sich jedoch schon direkt in Anschluß an die Präparation der Membran in Millipore auf der Membran und entstehen nicht durch eine

Änderung der Salzstärke. Optisch sichtbare Löcher oder Defekte können ebenfalls nicht beobachtet werden.

Als Grund für die Defektbildung bei Erhöhung der Salzstärke ist ein verringerter Platzbedarf der polaren Lipidkopfgruppen durch Abschirmung der Wechselwirkungen denkbar. Bei gleichbleibender Anzahl von Molekülen in der gesamten Probe würde dies zu Löchern in der Membran führen.

### 4.2.3. Kolloidale Sonden zur Untersuchung der Membranbewegung

In diesem Kapitel soll die Frage geklärt werden, ob sich die Membran als feste Platte über das Substrat bewegt, oder ob eine Bewegung der beiden Monolagen relativ zueinander stattfindet, und die Membran das Substrat durch einen Abrollprozeß benetzt. Wie in Kapitel 4.1.3 bereits diskutiert, können sich die beiden Prozesse auch überlagern, wobei dann die Größe der Anteile von Interesse ist.

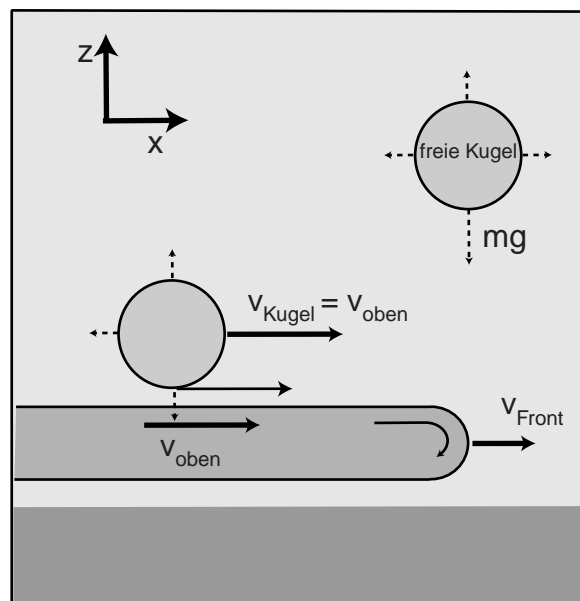


Abbildung 4.10 Schematische Darstellung des Impulsübertrages der Membran auf eine Kugel. Findet eine Bewegung der beiden Monolagen der Membran relativ zueinander statt, verringert sich der Abstand zwischen Benetzungsfront und Kugel während des Benetzungsprozesses.

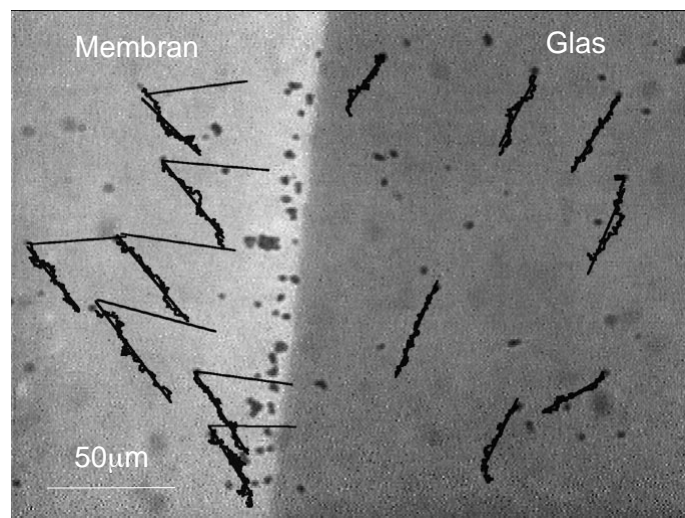
Eine Relativbewegung der beiden Monolagen zueinander kann durch die Bewegung einer Kugel auf der oberen Lipidlage der Membran im Vergleich zur Bewegung der Benetzungsfront sichtbar gemacht werden. Bei den Kugeln handelte es sich um carboxilierte Polystyrolpartikel mit Eisenkern und einem Durchmesser von  $1.78 \mu\text{m}$ , die sich beim Start

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

---

des Experimentes im Wasser befinden. Für diese Experimente wurden DMPC-Membranen in Millipore als Standardmembranen verwendet. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Kugeln war ihr hohes Gewicht. Es gewährleistet, dass die Kugeln schnell nach unten fallen und sich auch nicht wieder durch diffusive Bewegung in z-Richtung ablösen.

Wie in Abbildung 4.10 schematisch dargestellt, erfährt eine Kugel, die sich auf der Membran befindet, einen Impulsübertrag in Richtung der Membranbewegung. Findet eine Rollbewegung der Membran statt, bewegt sich die Kugel im Mittel schneller als die Membranfront.



*Abbildung 4.11 Überlagerung des Fluoreszenzbildes der DMPC-Membran mit dem Durchlichtbild der Kugeln. Deutlich sichtbar ist die Anreicherung von Kugeln an der Benetzungsfront durch das Abrollen der Membran einerseits und das Aufsammeln von der Glasoberfläche andererseits. Die schwarzen Spuren stellen die Bewegung der jeweiligen Kugel da, die mit einer Geraden angepaßt werden können. Aus der Kugelbewegung über der reinen Glasoberfläche lässt sich ein Korrekturvektor bestimmen, der von den Geschwindigkeitsvektoren der Kugeln über der Membran abgezogen wird.*

Die Geschwindigkeit der Front wurde durch Fluoreszenzaufnahmen ermittelt, während die Kugelbewegung im Durchlicht abgebildet und auf Video aufgenommen wurde. In Abbildung 4.11 ist eine Überlagerung des Fluoreszenzbildes der Membran und der Durchlichtaufnahme der Kugeln zu sehen. Der mit der Zeit zurückgelegte Weg der Kugeln ist schwarz eingezeichnet. Man kann sehen, dass die getriebene Bewegung der Kugeln auf kurzen Zeiten durch Brownsche Molekularbewegung in der Ebene überlagert ist (Lee et al., 1991).

Brownsche Molekularbewegung eines Teilchens der Masse  $m$  wird theoretisch beschrieben durch die Langevin-Gleichung:

$$\frac{d^2x(t)}{dt^2} = -\frac{\gamma}{m} \cdot \frac{dx(t)}{dt} + \frac{1}{m} \cdot F(t),$$

*Gln. 4.19*

wobei  $x$  die Ortskoordinate,  $\gamma$  der Reibungskoeffizient mit dem umgebenden Medium und  $F(t)$  die stochastische Kraft ist, die das Teilchen auf Grund von Stößen des umgebenden Mediums erfährt. Unter der Annahme, dass  $F(t)$  die Bedingungen für weißes Rauschen erfüllt, lässt sich das mittlere Verschiebungsquadrat der Ortskoordinate  $\langle \Delta x(t) \rangle_T$  berechnen zu:

$$\langle \Delta x(t) \rangle_T = D \cdot t \quad \text{mit} \quad D = \frac{2kT}{\gamma}.$$

*Gln. 4.20*

Der zeitliche Verlauf des mittleren Verschiebungsquadrates ist proportional zur Diffusionskonstante des betrachteten Teilchens. Besitzt das Teilchen darüber hinaus noch eine konstante Driftgeschwindigkeit  $v$ , kommt ein quadratischer Term hinzu:

$$\langle \Delta x(t) \rangle_T = D \cdot t + v \cdot t^2.$$

*Gln. 4.21*

Die Geschwindigkeiten der Kugeln wurden auf zwei verschiedenen Weisen bestimmt:

(1) Zu einem festen Zeitpunkt wird ein Standbild der Durchlichtaufnahme der Kugeln gemacht. Davon ausgehend wird die Bewegung einer bestimmten Kugel auf Video verfolgt und nach einer gewissen Zeit (ca. 2 min.) wieder ein Standbild gemacht. Die in  $x$ -Richtung zurückgelegte Wegstrecke kann dann aus den beiden Bildern bestimmt und die Geschwindigkeit der betrachteten Kugel berechnet werden.

(2) Die Position der Kugel wurde mit Hilfe eines Algorithmus zur Teilchenverfolgung (Ziemann, 1997), (Dichtl, 1997), (Schilling, 1999) in äquidistanten Zeitabständen von 100 ms, aufgezeichnet und daraus das mittlere Verschiebungsquadrat in  $x$ -Richtung berechnet. Durch Anpassung einer quadratischen Funktion an den zeitlichen Verlauf von  $\langle \Delta x(t) \rangle_T$  kann dann der Betrag der Geschwindigkeit in  $x$ -Richtung bestimmt werden.

Bei der Durchführung der Experimente stellte sich heraus, dass immer Drift im Wasservolumen über der Membran herrschte. Dies ist deutlich an den Spuren der Kugeln über der reinen Glasoberfläche (Abbildung 4.11) zu sehen, die im idealen Fall eine rein diffusive Bewegung ausführen sollten. Grund hierfür kann z.B. Konvektion in der Probenkammer sein. Zur Korrektur der Daten wurden die Geschwindigkeiten der Kugeln über der Glasoberfläche

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

in x-Richtung mit der jeweiligen Auswertemethode bestimmt und von der Geschwindigkeit der Kugeln über der Membran je nach Driftrichtung abgezogen oder hinzugezählt. In beiden Fällen wurden von einem festen Zeitpunkt ausgehend je mindestens sieben willkürlich gewählte Kugeln auf der Membran und zur Korrektur auf Glas verfolgt. Man erhält dann je eine Geschwindigkeitsverteilung, deren Mittelwerte in Abbildung 4.12 dargestellt sind. Die angegebenen Fehler ergeben sich aus den Standardabweichungen.

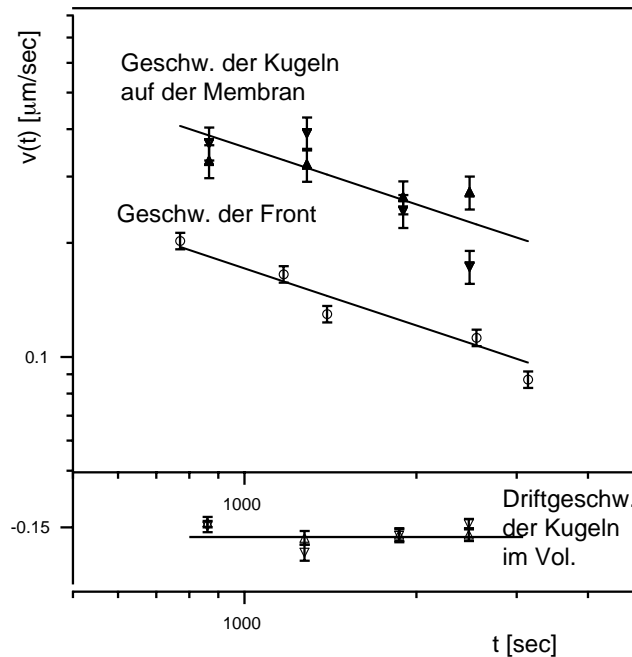


Abbildung 4.12 Die Kugelgeschwindigkeiten auf der Membran (gefüllte Dreiecke) sind deutlich größer, als die Geschwindigkeit der Spreitfront (offene Kreise). An die zeitlichen Verläufe beider Geschwindigkeiten lässt sich ein  $t^{-1/2}$ -Gesetz anpassen.

Methode (1) ist prinzipiell mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet, da Zeiten und Ortskoordinaten per Hand bestimmt werden. Methode (2) ist auf Grund der Drift für große Zeiten mit Ungenauigkeiten behaftet, da sich langsame Kugeln fast nicht mehr bewegen. Eine solche Kugel scheint eine rein diffusive Bewegung auszuführen und der zeitliche Verlauf des Verschiebungsquadrates ist linear. Aus der Anpassung einer quadratischen Abhängigkeit kann somit keine Geschwindigkeit mehr bestimmt werden. Dies führt zur Bevorzugung schneller Kugeln.

Ein weiteres Problem stellt die Ansammlung von Kugeln an der Benetzungsfront dar, die es schwierig macht, die Kugeln mittels Bildverarbeitung fehlerfrei verfolgen zu können. Die

Kugeln werden zum einen durch den Abrollprozeß an die Front transportiert und zum anderen von der Glasoberfläche aufgesammelt und mitgezogen.

Deshalb wurden die Experimente gemäß beiden Methoden ausgewertet und die Ergebnisse in Abbildung 4.12 dargestellt. Im unteren Teil des Graphen sind die jeweiligen Driftgeschwindigkeiten dargestellt, die zu Korrektur verwendet wurden (offene Dreiecke). Man sieht, dass die Driftbewegung zeitlich konstant ist. Im oberen Teil des Graphen sind die korrigierten Geschwindigkeiten der Kugeln (gefüllte Dreiecke) und der Benetzungsfrent (offene Kreise) zu sehen. Es wurden mehrere Experimente durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten das Verhältnis aus Membrangeschwindigkeit  $v_{mem}$  zu Kugelgeschwindigkeit  $v_{Kugel}$  berechnet. Der Mittelwert aus  $v_{mem}/v_{Kugel}$  ergibt sich hieraus zu  $0.53 \pm 0.1$ . Die obere Lage der Membran bewegt sich somit doppelt so schnell wie die Benetzungsfrent.

Dies führt zu dem Schluß, dass die Membran das Substrat im wesentlichen über einen inneren Abrollvorgang benetzt, bei dem die obere Lage über die untere gleitet. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist es jedoch nicht auszuschließen, dass eine geringe Vorwärtsbewegung der unteren Monolage stattfindet. Mit Hilfe des in Kapitel 4.2.2 bestimmten Abstandes zwischen Membran und Substrat von  $6 \text{ \AA}$  lässt sich mit Gln. 4.5 die Van der Waals Kraft zwischen Lipiddoppelschicht und Glasoberfläche zu  $6 \cdot 10^{-4} \text{ J/m}^2$  berechnen ( $A_H = 9.8 \cdot 10^{-21} \text{ J}$  und  $d_M = 43 \text{ \AA}$ ). Der Reibungskoeffizient zwischen zwei Lagen aus Alkylketten beträgt in etwa  $b = 1 \cdot 10^7 \text{ Nsec/m}^3$  (Merkel et al., 1989), (Pfeiffer et al., 1993), (Raphael und Waugh, 1996), womit nach Gln. 4.12 für den kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta = S/2\gamma \approx 15 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{sec}$  folgt. Dies stimmt gut mit den gemessenen Werten überein (vergleiche Tabelle 4.1). Die Kopplung zwischen den beiden Monolagen der Membran ist somit nicht stark genug, um die Kopplung an das Substrat induziert durch ein attraktives Wandpotential aufzuheben.

Das Ergebnis wird auch durch Messungen der Eigendiffusion in den einzelnen Monolagen einer festkörpergestützten Membran mittels NMR (Hetzter et al., 1998) gestützt. Hier wurde gezeigt, dass die Mobilität der Lipidmoleküle in der dem Substrat zugewandten Seite nur halb so groß ist, wie in der abgewandten.

### 4.2.4. Die laterale Verteilung des Fluoreszenzmarkers: Eine Visualisierung des Spannungsgradienten in der Membran

In allen Experimenten unabhängig von Lipidzusammensetzung oder Substrat wurde bei der Verwendung des Texas-Red markierten Lipids als Fluoreszenzsonde eine erhöhte Intensität an der Vorderkante der Membran beobachtet. Das Intensitätsprofil kann gut mit einem einfach exponentiellen Gesetz der Form:

$$I(x,t) \cong I_0 \exp(-x / \lambda(t)) + const.$$

Gln. 4.22

angepasst werden. Der additive konstante Term ist die Hintergrundintensität des Bildes, zurückzuführen auf elektronisches Rauschen der Kamera. Die Amplitude  $I_0$  ist von Ausleuchtung, Belichtungszeit und Mikroskopeinstellungen abhängig.

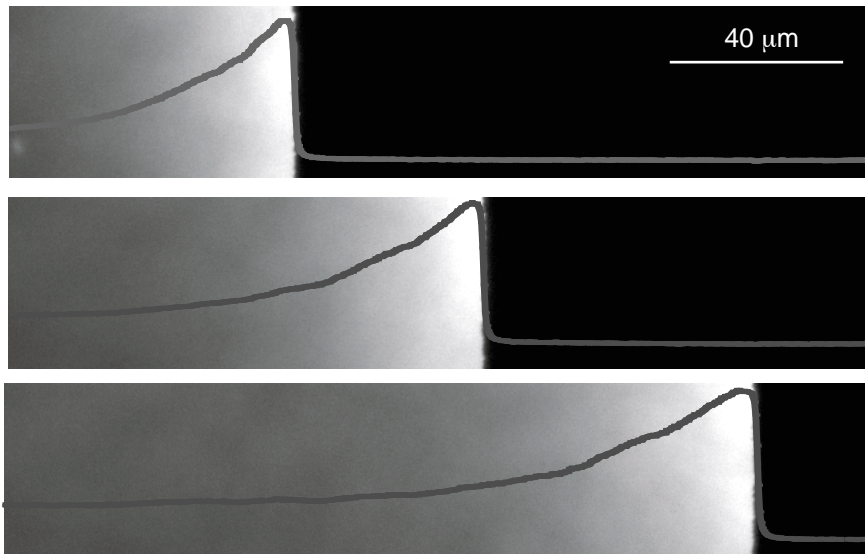


Abbildung 4.13) Die Fluoreszenzbilder einer mit Texas-Red DHPE markierten Membran weisen eine erhöhte Fluoreszenzintensität an der Membranfront auf. Das Intensitätsprofil kann gut mit einem exponentiellen Verlauf angepaßt werden.

Wird die Membran mit einem anderen Sondenmolekül sichtbar gemacht, ändert sich die Verteilung der Fluoreszenzintensität. So weisen Membranfronten, die mit dem kettenmarkierten Phosphocholin BODIPY C5-HPC versetzt sind, deutlich größere

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Abklinglängen auf, während die Intensitätsverteilung der markierten Alkylkette BODIPY C11 in der Membran sogar invertiert ist (Abbildung 4.14).

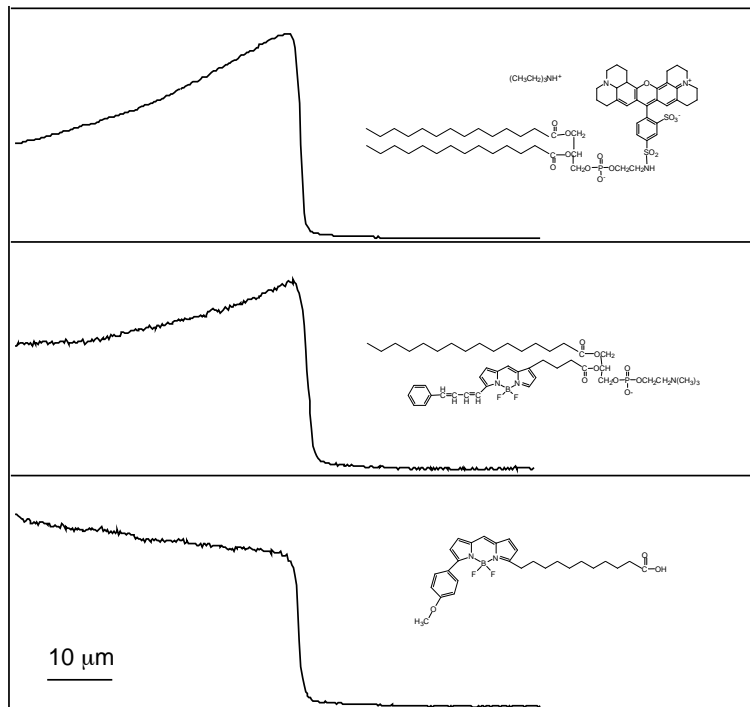


Abbildung 4.14 Die Intensitätsprofile für drei verschiedene Fluoreszenzsonden von oben nach unten: Texas-Red DHPE, kettenmarkiertes Phosphocholin und eine kettenmarkierte Alkylkette. Die Farbstoffe zeichnen sich durch ein unterschiedliches Volumenverhältnis von Kopfgruppe zu Kette aus, das zu den verschiedenen Formen des Intensitätsprofils führt.

Aus dieser experimentellen Beobachtung lässt sich schließen, dass die Texas-Red markierten Sondenmoleküle nicht durch die Rollbewegung der Membran an der Front angereichert werden, sondern durch ein ortsabhängiges Wechselwirkungspotential zwischen Sondenmolekül und Lipidmatrix eine bestimmte laterale Farbstoffverteilung induziert wird. Wie im Folgenden dargestellt, kann dieses Wechselwirkungspotential auf einen Dichtegradienten in der Membran zurückgeführt werden und ist stark von der chemischen Struktur der Sondenmoleküle abhängig. Die Existenz eines solchen Dichtegradienten kann durch eine elastische Spannung  $\sigma$  in der oberen Lipidmonolage der Membran zustande kommen, da durch das attraktive Wandpotential  $S$  eine Kraft an der Membranfront angreift, die die Membran über das Substrat zieht.



#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

In diesem Fall steigt die Spannung linear von der Quelle zur Benetzungsfrent an:

$$\sigma(x, t) = S \frac{x}{L(t)} \quad \text{für} \quad 0 < x < L.$$

Gln. 4.23

Die Spannung in der Membran verursacht eine Änderung in der Flächenbedeckung  $dA/A = \sigma/\kappa$  auf Grund der lateralen Kompressibilität der fluiden Lipiddoppelschicht  $\kappa$ . Im Fall des Texas-Red Fluoreszenzmoleküls rechtfertigt die große Kopfgruppe die Annahme, dass die Fluoreszenzsonde einen Energiegewinn  $\Phi = \varepsilon \cdot dA/A$  durch den Aufenthalt in Gebieten mit geringerer Lipiddichte gewinnt. Damit ist das elastische Potential gegeben durch:

$$\Phi(x, t) = \varepsilon \frac{\sigma}{\kappa} = \frac{\varepsilon \cdot S}{\kappa \cdot L(t)} \cdot x,$$

Gln. 4.24

wobei  $\varepsilon$  die Kopplungskonstante ist. In einem stationären Zustand werden sich die Lipidmoleküle in einem stabilen Profil anordnen und die Fluoreszenzverteilung folgt dem Boltzmanngesetz:

$$I(x, t) = I_0 \cdot \exp\left(\frac{-\Phi(x, t)}{kT}\right) = I_0 \cdot \exp\left(\frac{-x}{\lambda(t)}\right) \quad \text{mit:} \quad \lambda(t) = \frac{\kappa \cdot kT \cdot (\beta t)^{1/2}}{\varepsilon S}.$$

Gln. 4.25

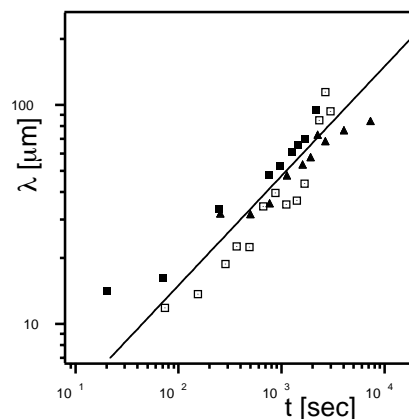


Abbildung 4.15 Die aus der Anpassung eines exponentiellen Gesetzes an die Intensitätsprofile der Texas-Red markierten Membran erhaltenen Abklinglängen  $\lambda$  als Funktion der Zeit. Dieser Verlauf folgt einem  $t^{1/2}$ -Gesetz, wie die durchgezogene Linie zeigt.

In Abbildung 4.15 sind die aus der Anpassung eines exponentiellen Gesetzes erhaltenen Abklinglängen für Texas-Red markierte Membranen als Funktion der Zeit dargestellt. An diese Kurve kann ein  $t^{-1/2}$ -Gesetz angepasst und die vorausgesagte Zeitabhängigkeit somit bestätigt werden.

### 4.2.5. Einfluss zweiwertiger Ionen auf die Spreitkinetik

Die Bindung zweiwertiger Ionen, insbesondere von Kalziumionen, an Phospholipide wurde intensiv untersucht (Tatulian, 1993). Es ist bekannt, dass Kalziumionen hohe Bindungsaffinitäten an die zwitterionischen Kopfgruppen von Phosphocholinen aufweisen. Diese Bindungskonstanten wurden überwiegend aus Messungen der Beweglichkeiten von Vesikeln im elektrischen Feld oder mittels NMR bestimmt (McLaughlin et al., 1978), (Lau et al., 1980). Theoretisch kann die Adsorption von Ionen an Membranen mit einer verallgemeinerten Stern-Theorie beschrieben werden (Cohen und Cohen, 1981).

In diesem Kapitel soll der Einfluß von Kalziumionen auf die Spreitkinetik untersucht werden. Hintergrund ist die Tatsache, dass sowohl in zweifach entionisiertem Wasser (MQ), als auch auf jeder Glasoberfläche immer geringe Spuren von Kalziumionen vorhanden sind. Somit finden nicht nur Benetzungsexperimente mit Phospholipidmembranen auf Glas, sondern auch Präparationen festkörpergestützter Lipiddoppelschichten über Vesikelfusion immer in Gegenwart einer gewissen Kalziumionenkonzentration  $c_0$  statt. Es stellt sich die Frage, in wie weit diese Kalziumionen die Benetzungskinetik beeinflussen und für die erfolgreiche Präparation festkörpergestützter Membranen von Belang sind.

In dieser Arbeit wurde die Spreitkinetik des zwitterionischen Lipids DMPC in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration gemessen. Alle Messungen fanden in 5 mM HEPES Puffer (pH 7) auf gereinigten Deckgläsern statt. Um die vorhandenen Kalziumionen ( $c_0$ ) in der Lösung zu neutralisieren, wurde der Komplexbildner EDTA in einer Konzentration von 0.5 mM verwendet. Der kinetische Spreitkoeffizient in Abhängigkeit der Kalziumionenkonzentration ist in Abbildung 4.16 zu sehen. Schon die Erhöhung der Kalziumionenkonzentration um  $0.15 \mu\text{M}$  führt zu einer signifikanten Vergrößerung des kinetischen Spreitkoeffizienten. Bei einer Erhöhung der Ionenkonzentration um mehr als 0.15 mM befindet sich das System bereits in Sättigung. Dieses Verhalten gibt Grund zur Annahme, dass die Größenordnung der Kalziumionenkonzentration  $c_0$  in den Experimenten kleiner als  $0.1 \mu\text{M}$  ist. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass bei einer EDTA Konzentration von 0.5 mM alle

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

vorhandenen Kalziumionen komplexiert sind. Der Wert des kinetischen Spreitkoeffizienten ist in diesem Fall gegenüber der Kalziumionenkonzentration  $c_0$  um 30% reduziert. Die in Abbildung 4.16 dargestellten Werte wurden aus Messungen ermittelt, bei denen sich die entsprechende Kalziumionen von Anfang an in der Pufferlösung befanden. Es sollen nun Experimente beschrieben werden, bei denen die Kalziumionenkonzentration während des Verlaufes der Messung geändert wurde. In Abbildung 4.17 a) ist der zeitliche Verlauf der Geschwindigkeit einer DMPC Membran bei Variation der Kalziumionenkonzentration abgebildet.

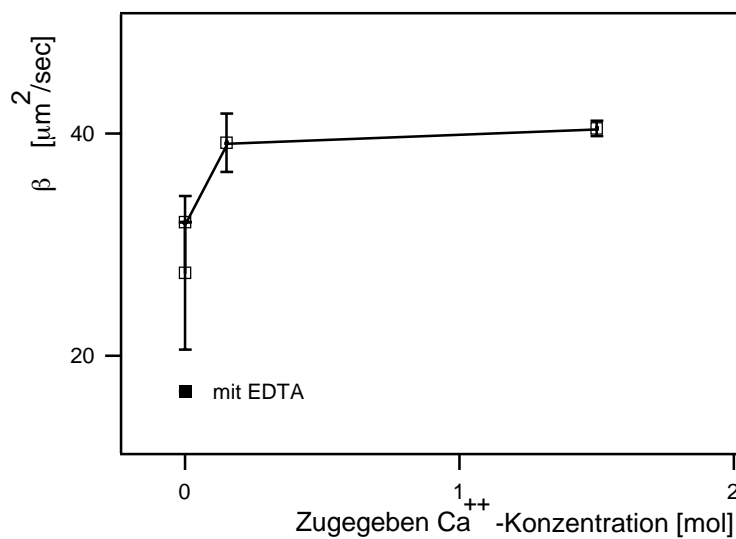


Abbildung 4.16 Abhängigkeit des kinetischen Spreitkoeffizienten einer DMPC Membran in 5 mM HEPES Puffer (pH 7) von der Kalziumionenkonzentration (offene Quadrate). Gefülltes Quadrat: alle  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen sind mit EDTA komplexiert.

Gestartet wurde das Experiment mit 5 mM HEPES Puffer (pH7) ohne zusätzliches Kalzium (gefüllte Quadrate), dann wurde EDTA hinzugegeben, so dass sich EDTA in einer Konzentration von 0,5 mM EDTA in der Probe befand (offene Dreiecke). Nach ca. 20 min wurde die Kalziumionenkonzentration auf 0,5 mM erhöht (gefüllte Kreise), so dass sich der zugehörige kinetische Spreitkoeffizient im Sättigungsbereich befand. Zum Vergleich ist der Zeitverlauf der Spreitgeschwindigkeit einer DMPC-Membran bei einer durchgehenden Kalziumionenkonzentration von 1,5 mM abgebildet (offene Kreise). Die beiden Endgeschwindigkeiten stimmen überein und es zeigt sich, dass die Reduktion der Spreitgeschwindigkeit reversibel ist. In Abbildung 4.17 b) ist eine Referenzmessung abgebildet, bei der anstelle von zweiwertigen Kalziumionen einwertige Natriumionen

hinzugegeben wurden. Dies hatte keinen Effekt auf die Kinetik der Membran. Die beobachteten Geschwindigkeitsänderungen sind also auf Konzentrationsänderungen zweiwertiger Ionen zurückzuführen.

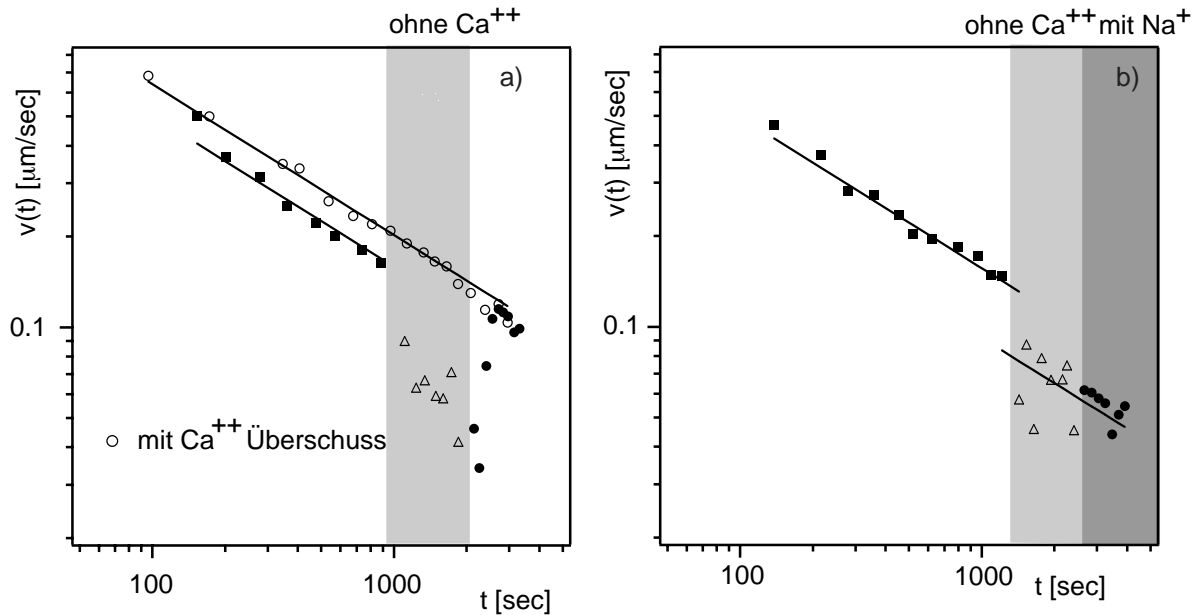


Abbildung 4.17 a): Zeitlicher Verlauf der Spreitgeschwindigkeit einer DMPC-Membran bei Variation der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration. Gefüllte Quadrate: ohne zusätzliches Kalzium. Offene Dreiecke: mit EDTA. Gefüllte Kreise: Erneute Zugabe von Kalziumionen. Offene Kreise: Zeitlicher Verlauf der Spreitgeschwindigkeit bei einer durchgehenden konstanten Kalziumkonzentration von 1.5 mM. Die durchgezogenen Linien sind jeweils Anpassungen des  $t^{1/2}$ -Gesetzes. b) : Die Referenzmessung zeigt, dass die Zugabe von einwertigen  $\text{Na}^+$ -Ionen nach der Komplexbildung der  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen keine Erhöhung der Spreitgeschwindigkeit hervorruft.

Bei Variation der Kalziumionenkonzentration konnte noch ein anderes Phänomen beobachtet werden und zwar eine Änderung der Rauigkeit der Benetzungsfront. Es ist bekannt, dass die Grenzlinie einer spreitenden Membran auf Grund von Substratinhomogenitäten mit der Zeit aufraut (Rädler et al., 1995), (Nissen, 1998). Die Rauigkeit der Grenzlinie kann durch die Bestimmung der Grenzlinienweite  $w$  quantifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die mittlere Abweichung der Grenzlinie  $s(x,t)$  von ihrem Mittelwert (vergleiche Kapitel 5.1.1):

$$w(t) = \sqrt{\langle s^2(x,t) \rangle_x - \langle s(x,t) \rangle_x^2}$$

Gln. 4.26

In Abbildung 4.18 ist im oberen Teil der zeitliche Verlauf der Grenzlinienweite  $w$  bei Änderung der Pufferzusammensetzung abgebildet.

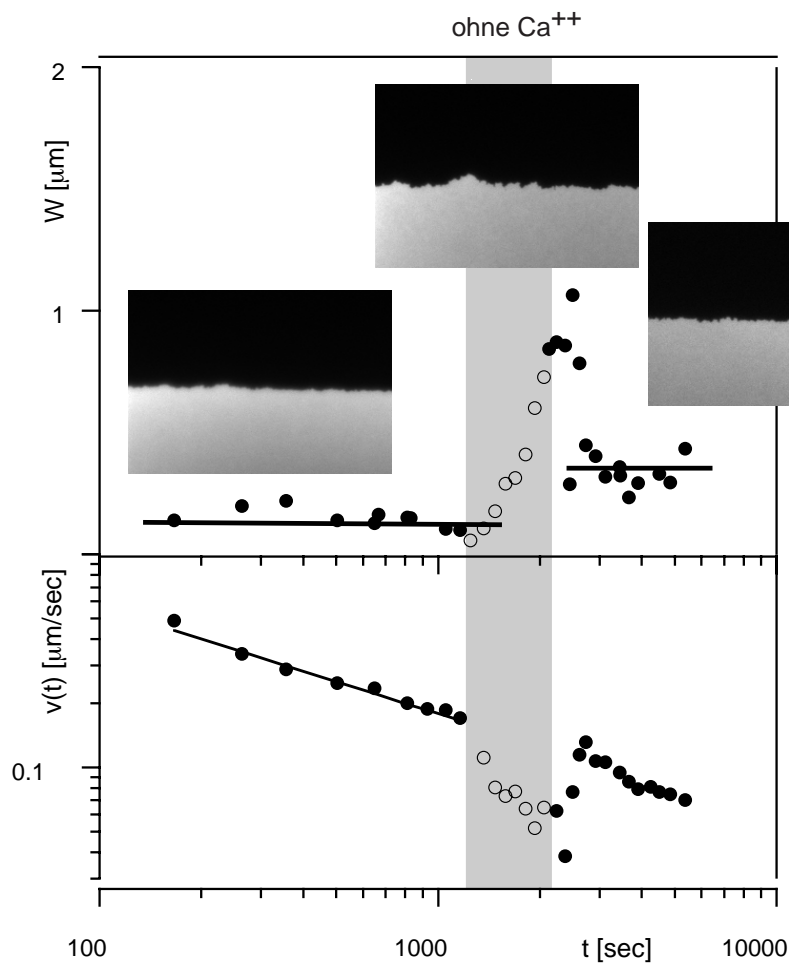


Abbildung 4.18 Oben: Zeitlicher Verlauf der Grenzlinienweite  $w$  bei Änderung der Kalziumkonzentration im Puffer. Die Fluoreszenzbilder (Breite:  $85 \mu\text{m}$ ) zeigen eine deutlich rauere Grenzfläche bei Komplexierung der Kalziumionen durch EDTA. Unten: Zeitlicher Verlauf der Geschwindigkeit.

Diese nimmt bei Komplexierung der Kalziumionen mit EDTA stark zu und bei anschließender Zugabe von Kalziumionen wieder ab. Zum Vergleich ist im unteren Teil der zeitliche Verlauf der Geschwindigkeit aufgetragen.

Die Resultate dieses Kapitels können sich folgendermaßen interpretieren lassen. Die zweiwertigen Kalziumionen binden an die Membran und schaffen so Ionenbrücken zwischen Membran und Glassubstrat. So entsteht ein gewisser Abstand zwischen Membran und Substrat, der in Kapitel 4.2.1 zu  $6 \text{ \AA}$  bestimmt wurde. Kalziumionen mit einem Hydratationsradius von  $4 \text{ \AA}$  und zusammen mit den Chlorionen als Gegenionen mit einem Hydratationsradius von  $0.3 \text{ \AA}$  (Israelachvili, 1991), passen also ziemlich genau zwischen

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Festkörper und Lipidfilm. Da sich der kinetische Spreitkoeffizient bei der Zugabe von Kalzium erhöht, sind bei einer Konzentration  $c_0$  jedoch nicht alle Bindungsstellen der Membran gesättigt. Zusätzliches Kalzium kann diese Stellen besetzen und es wird so ein erhöhtes Wechselwirkungspotential geschaffen. Werden die Kalziumionen mit EDTA komplexiert, verringert sich die Wasserschicht zwischen Membran und Substrat, so dass die Membran mehr Substratinhomogenitäten sieht. Deshalb raut die Grenzlinie auf und die Spreitgeschwindigkeit verringert sich auf Grund eines erhöhten Reibungskoeffizienten  $\gamma_{\text{ges}}$ .

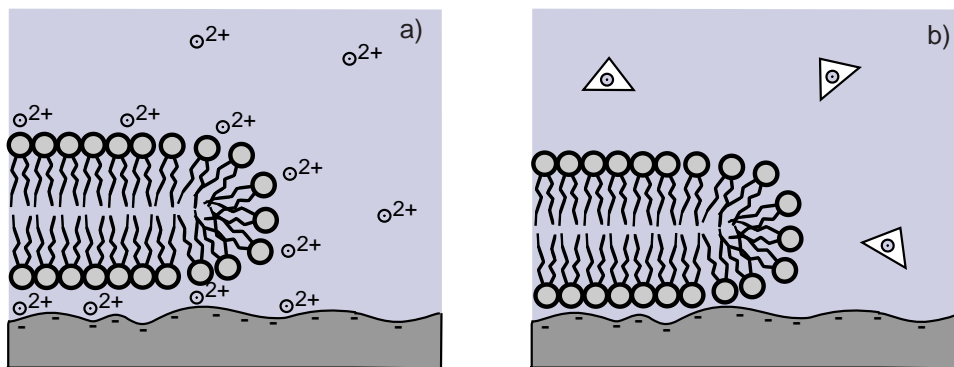


Abbildung 4.19 a) Benetzt die Membran eine raue Glasoberfläche in Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen, können diese an die Membran binden und Ionenbrücken zum Substrat ausbilden. generiert eine zusätzliche Wechselwirkung. b) Sind die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen mit EDTA komplexiert, kann sich der Abstand zwischen Membran und Substrat verringern. In diesem Fall sieht die Membran mehr Substratinhomogenitäten, ihre Geschwindigkeit verringert sich und die Grenzlinie raut auf.

#### 4.2.6. Der Einfluss von Defekten auf das Spreitverhalten

Jede reale Oberfläche besitzt Substratinhomogenitäten, die chemischer oder topologischer Natur sein können. In Kapitel 4.1.3 wurde ein Ausdruck für den zusätzlichen Reibungskoeffizienten  $\gamma_p$  aufgestellt:

$$\gamma_p \approx \frac{k_B T}{D_L} \cdot c \cdot \ln\left(\frac{a_A}{a_L}\right),$$

Gln. 4.27

wobei  $D_L$  die Eigendiffusion der Lipidmoleküle,  $c$  die Konzentration der Hindernisse auf der Oberfläche,  $a_A$  ihr Durchmesser und  $a_L$  die Kopfgruppengröße der Lipide ist. In diesem Kapitel soll die Gültigkeit dieses Ausdruckes untersucht werden. Hierzu wurde die Benetzungsgeschwindigkeit von DMPC-Membranen in Millipore auf strukturierten

#### 4. Benetzung von Festkörperoberflächen mit Membranen

Glasoberflächen gemessen. Auf der einen Hälfte des Substrates befand sich ein hexagonales Gitter aus Goldpunkten des Durchmessers 9 nm und Gitterkonstante 90 nm, die andere Hälfte war reine Glasoberfläche. Die Strukturierung wurde von der Gruppe M. Möller in Ulm durchgeführt, wie beschrieben bei Spatz (Spatz et al., 1999).

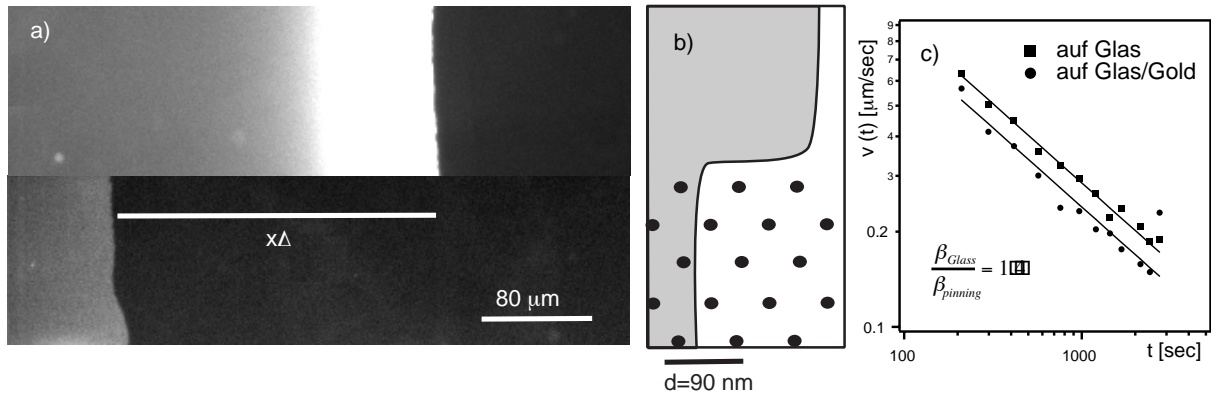


Abbildung 4.20 a) Oben ist das Fluoreszenzbild der Benetzungsfrent auf der reinen Glasoberfläche zu sehen. Unten die Benetzungsfrent auf der mit Goldpunkten strukturierten Oberfläche zum selben Zeitpunkt und auf derselben Probe. Die Membran hat auf der reinen Glasoberfläche einen um  $\Delta x$  längeren Weg zurückgelegt. b) Schematische Darstellung der Spreitfrent auf einem Substrat, das zur Hälfte mit einem hexagonalen Gitter aus Goldpunkten des Durchmessers 9 nm bedeckt ist. c) Zeitlicher Verlauf der Geschwindigkeiten auf den beiden unterschiedlichen Oberflächen. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen des  $t^{-1/2}$ -Gesetzes mit dem die kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta_{Glas}$  und  $\beta_p$  bestimmt wurden.

In Abbildung 4.20 ist der zeitliche Verlauf der Spreitgeschwindigkeit auf den beiden Seiten des Substrates im Vergleich zu sehen. Das Verhältnis der kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta_{Glas}/\beta_p$  wurde zu  $1.4 \pm 0.2$  bestimmt. Mit Gln. 4.12, Gln. 4.16 und Gln. 4.17 gilt:

$$\frac{\beta_{Glas}}{\beta_p} = \frac{\gamma_p + \gamma_s}{\gamma_s}$$

Gln. 4.28

Nach Kapitel 4.2.3 beträgt der Reibungskoeffizient  $\gamma_s \approx 1 \cdot 10^7 \text{Ns/m}^3$ . Mit  $c = 3 \cdot 10^{14} \text{m}^{-2}$ ,  $D_L = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $a_A = 9 \text{nm}$  und  $a_L = 10 \text{\AA}$  folgt  $\gamma_{pinning} = 2.4 \cdot 10^6 \text{Ns/m}^2$ . Hieraus ergibt sich für Verhältnis  $(\gamma_p + \gamma_s)/\gamma_s$  zu 1.24. Die durch Hindernisse induzierte Reibung lässt sich demnach mit einem Saffmann-Delbrück Ausdruck beschreiben.

### 4.2.7. Zusammenfassung

Die Kinetik der Benetzung neutraler Lipidmembranen auf hydrophilen Oberflächen wurde exemplarisch an DMPC-Membranen auf Glas untersucht. Mittels Röntgenreflektometrie wurde die Wasserschichtdicke zwischen einer solchen Membran und einer Siliziumdioxidoberfläche zu  $6 \text{ \AA}$  bestimmt. Mit Hilfe kolloidaler Sonden konnte festgestellt werden, dass die Membran über ihre Monolagen gleitet und das Substrat über einen inneren Abrollvorgang benetzt. Die Benetzungsgeschwindigkeit einer neutralen Membran vergrößert sich schon bei kleinen Zugaben von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen. Untersuchungen auf Substraten mit künstlichen Defekten zeigen, dass diese die Benetzungsgeschwindigkeit verringern. Diese Beobachtung kann durch die Induktion von Scherfluß in der Membran erklärt werden, der einen zusätzlichen Dissipationsmechanismus darstellt. Mit einem Saffmann-Delbrück Ausdruck lässt sich diese Beobachtung quantifizieren.

Die Intensitätsverteilung verschiedener Fluoreszenzsonden in der Membran stützen ein elastisches Modell, das auf der Tatsache beruht, dass die Membran nicht von der Quelle weggedrückt wird, sondern auf Grund der attraktiven Wechselwirkung mit dem Substrat gezogen wird.



## 5. Rauigkeit der Benetzungsfront: Ein Wachstumsphänomen

Der Einfluss von Defekten auf das Benetzungsverhalten von Lipidmembranen wurde bis jetzt nur hinsichtlich der Kinetik untersucht (Kapitel 4). Substratinhomogenitäten verringern aber nicht nur die Benetzungsgeschwindigkeit, sondern führen auch zu einem Aufrauen der Membranfront, wie in Abbildung 5.1 zu sehen. Da Substratinhomogenitäten die Bildung einer defektfreien Membran verhindern können, ist das Benetzungsverhalten von Lipidmembranen auf Festkörperoberflächen mit künstlichen Defekten von praktischem Interesse. Der Fluss einer Lipidmembran auf strukturierten Oberflächen stellt aber auch ein Modellsystem für Grenzflächendynamik in zwei Dimensionen dar.

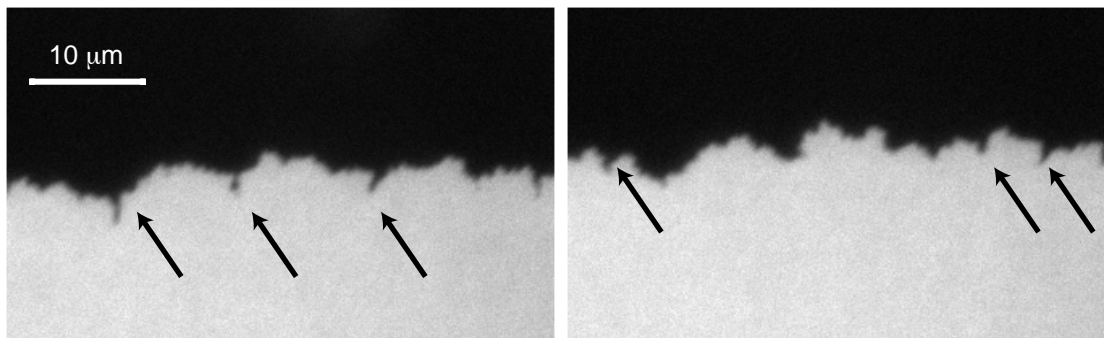


Abbildung 5.1 Die Benetzungsfront einer Membran auf einer Glasoberfläche im Abstand einiger weniger Minuten. Die schwarzen Pfeile indizieren Defekte in der Membran auf Grund von Substratinhomogenitäten, die von der Membran umflossen werden.

Gut untersucht sind Deformationen der Kontaktlinie einer einfachen Flüssigkeit an einzelnen Defekten (de Gennes, 1985), Kontaktwinkelhysterese (Joanny und Robbins, 1990), (Joanny und de Gennes, 1984) oder Pinningphänomene.

Benetzungsfronten auf Oberflächen mit vielen zufällig verteilten Defekten können mit Konzepten des lokalen Grenzflächenwachstums beschrieben werden. Einen guten Einblick in dieses Themengebiet geben z.B. Barabasi und Stanley (Barabasi und Stanley, 1995). Experimentell wurden solche Phänomene vielfach untersucht, wie z.B. an Hele-Shaw Zellen (He et al., 1992) oder dem spontanen Eindringen von Flüssigkeit in Papier (Buldyrev et al., 1992). Eine Möglichkeit zur Analyse der jeweiligen Grenzfläche ist die Anwendung von Skalenargumenten (Family, 1990).

Um Einblicke in Gesetzmäßigkeiten individueller Wachstumsprozesse zu bekommen, wurden diskrete Modelle entwickelt. Diese beruhen jedoch immer auf konkreten Annahmen und sind deshalb auf einzelne Klassen von Experimenten beschränkt. Als Beispiele seien hier das Eden-Modell zur Beschreibung von Zellkulturwachstum und die Ballistische Deposition gegeben.

Stochastische Differentialgleichungen schließlich, wie die Edward-Wilkinson Gleichung oder die Kardar-Parisis-Zhang Gleichung (Kardar et al., 1986) sind Ansätze zur analytischen Beschreibung von lokalem Grenzflächenwachstum.

## 5.1. Konzepte zur theoretischen Beschreibung von Grenzflächenwachstum

### 5.1.1. Skalenargumente zur Charakterisierung von Grenzlinienrauigkeiten

Eine Grenzfläche, die stochastischen Fluktuationen unterliegt, kann analog zu *selbst-ähnlichen* fraktalen Geometrien unter Gesichtspunkten von Skalenargumenten betrachtet werden. Im Gegensatz zu selbstähnlichen Objekten kann eine wachsende Grenzflächen jedoch nicht einer einzigen Skalenrelation genügen, da die Achsen senkrecht und parallel zur Grenzlinie durch die Wachstumsrichtung ausgezeichnet sind. Reskaliert man die Grenzfläche  $h(x,t)$  in horizontaler Richtung um einen Faktor  $a$ , muss diese in vertikaler Richtung um einen Faktor  $a^\alpha$  skaliert werden, um die Grenzfläche ähnlich auf die ursprüngliche abzubilden.

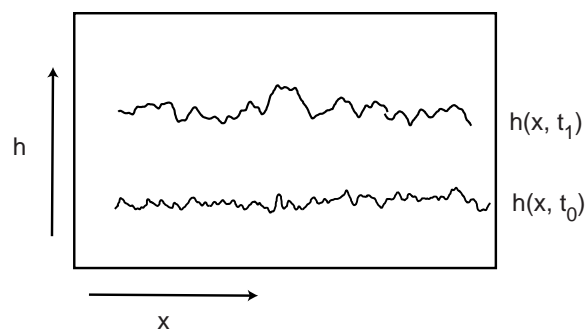


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung einer Grenzlinie die mit der Zeit aufraut.

Solche Objekte  $h(x,t)$  heißen *selbst-affin* und bleiben unter folgender Transformation gleich:

$$h(x,t) = a^\alpha h(ax, a^z t),$$

Gln. 5.1

wobei  $\alpha$  *statischer* und  $z$  *dynamischer Rauigkeitsexponent* genannt wird.

Sei nun  $L$  ein Bereich einer anfangs glatten Grenzfläche, der während eines Wachstumsprozess durch statistische Fluktuationen mit der Zeit aufraut. Bis das System nach einer charakteristischen Zeit  $\tau$  einen stationären Zustand erreicht hat, wächst die laterale Länge, über die die räumlichen Fluktuationen der Grenzfläche korreliert sind.

Im stationären Zustand ist sowohl die tangentielle Korrelationslänge  $\xi_{par}$ , als auch die mittleren quadratische Abweichungen der Höhenfluktuationen  $w^2$  konstant:

$$w^2(L,t) = \langle h^2(x,t) \rangle_x - \langle h(x,t) \rangle_x^2.$$

Gln. 5.2

Um Skalenansätze zu studieren eignet sich die Höhendifferenzkorrelationsfunktion  $G(x,t)$ :

$$G(x,t) = \langle |h(x',t) - h(x,t)|^2 \rangle_{x'},$$

Gln. 5.3

die zu zwei Potenzgesetzen für  $G(x,t)$  führt:

$$1) \quad G(x,t) \propto x^{2\alpha} \quad |x| \ll \xi_{par}$$

$$G(x,t) \propto const \quad |x| \gg \xi_{par}$$

und

$$2) \quad G(x,t) \propto t^{2\alpha/z} \quad t \ll \tau$$

$$G(x,t) \propto const \quad t \gg \tau.$$

Gln. 5.4

Hier ist  $\xi_{par}$  die Länge über die Korrelationen in  $x$ -Richtung zerfallen und  $\tau$  die für das System charakteristische Zeit, in der es einen stationären Zustand erreicht. Für  $x > \xi_{par}$  geht die Korrelationsfunktionen in den konstanten Wert  $2w^2$  über. Aus den Potenzgesetzen für  $G(x,t)$  erwartet man einen Verlauf der Höhenkorrelationsfunktion, wie in Abbildung 5.3 dargestellt.

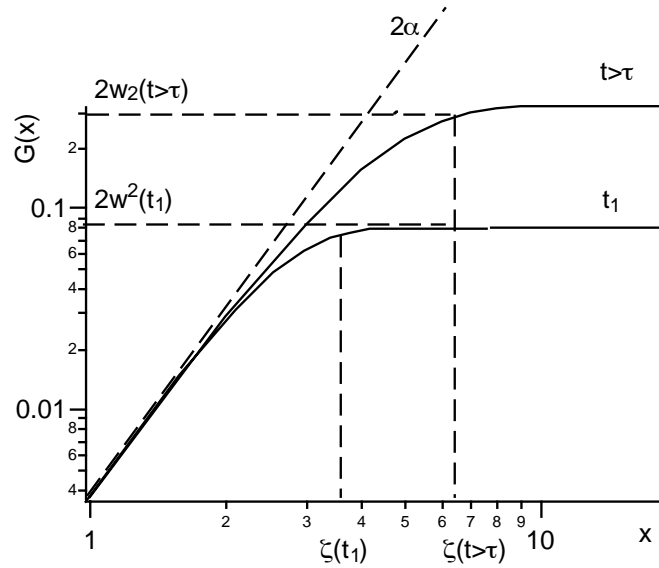


Abbildung 5.3 Verlauf der Höhenkorrelationsfunktion nach den Skalengesetzen. Bis das System zum Zeitpunkt  $\tau$  einen stationären Zustand erreicht hat, wächst die Grenzlinienweite  $w$  und die Korrelationslänge  $\zeta$  an. Die Steigung der Höhenkorrelationsfunktion  $G(x)$  für  $x < \zeta$  entspricht dem zweifachen Wert des statischen Rauigkeitsexponenten  $\alpha$ .

### 5.1.2. Die Kardar-Parisi-Zhang Gleichung

Nach **K**ardar, **P**arisi und **Z**hang (Kardar et al., 1986) lässt sich die zeitliche Entwicklung einer wachsenden Grenzlinie  $h(x,t)$  mit einer stochastischen Differentialgleichung der Form:

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = v \cdot \nabla^2 h(x,t) + \frac{\lambda}{2} (\nabla h(x,t))^2 + \eta(x,t)$$

Gln. 5.5

analytisch beschreiben, die auch *KPZ-Gleichung* genannt wird. Die Entwicklung einer Anfangskontur gemäß der einzelnen Terme ist in Abbildung 5.4 zu sehen. Der erste Term auf der rechten Seite ist ein Relaxationsterm, der Glätten der Grenzlinie auf Grund diffusiver Prozesse beinhaltet (Abbildung 5.4a)). Der Parameter  $v$  wird hierbei auch *Relaxationskoeffizient* genannt.

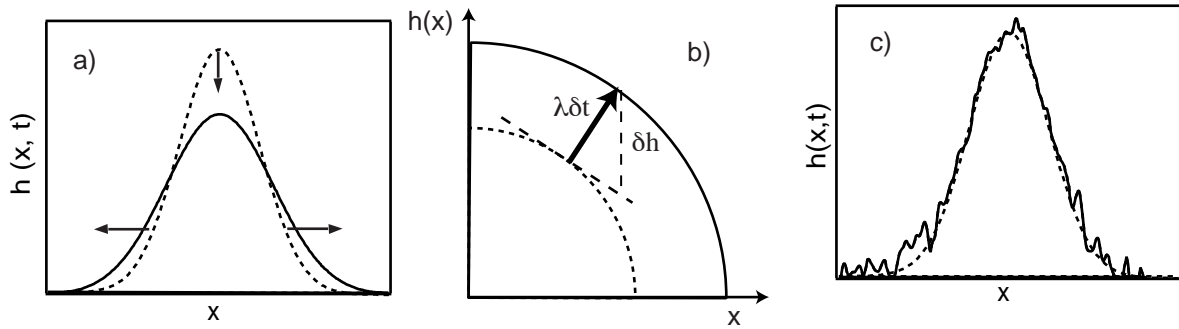


Abbildung 5.4 Die zeitliche Entwicklung einer Grenzlinie  $h(x,t)$  gemäß der einzelnen Terme der KPZ-Gleichung, wobei die gestrichelte Linie als Ausgangskontur diene. a) Relaxation der Grenzlinie b) Wachstum normal zur Grenzlinie mit einer Rate  $\lambda$ . c) Aufrauen auf Grund stochastischer Fluktuationen.

Der zweite, nichtlineare Term beschreibt Wachstum normal zur Grenzfläche mit einer konstanten *Wachstumsrate*  $\lambda$ , wie sich folgendermaßen verstehen lässt. Wachstum senkrecht zur Grenzfläche mit einer Geschwindigkeit  $\lambda$  verursacht eine Wegänderung  $\delta h$  entlang der  $h$ -Achse und nach Pythagoras gilt (vergleiche Abbildung 5.4b):

$$\delta h = \sqrt{(\lambda \delta t)^2 + (\lambda \delta t \nabla h)^2} = \lambda \delta t \cdot \sqrt{1 + (\nabla h)^2}$$

Gln. 5.6

Bei kleinen Änderungen  $|\nabla h| \ll 1$  kann dieser Ausdruck entwickelt werden:

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \lambda + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \dots$$

Gln. 5.7

Der Parameter  $\lambda$  ist somit die mittlere Geschwindigkeit  $v(t)$  der Benetzungsfront. Im trivialen Fall einer geraden Grenzlinie sind alle Ortsableitungen von  $h(x,t)$  gleich Null und die Grenzlinie wird nur verschoben gemäß einer lateralen Translation  $h \rightarrow h + \lambda \cdot t$ . Mit Hilfe einer solchen Translation lässt sich im Allgemeinen eine Gesamtbewegung der Grenzlinie mit mittlerer Geschwindigkeit  $\lambda$  einführen.

Der stochastische Beitrag  $\eta(x,t)$  beinhaltet den Einfluß *stochastischer Fluktuationen* und führt zum Aufrauen der Grenzfläche (vergleiche Abbildung 5.4c)). Hierbei ist im Allgemeinen thermisches Rauschen gemeint, das unkorreliert in Zeit und Raum ist.

Sollen stochastische Fluktuationen der Grenzlinie auf Grund von Substratinhomogenitäten beschrieben werden, so sind diese nicht variabel in der Zeit, sondern nur vom Ort abhängig.

Man spricht in diesem Fall auch von *eingefrorener Unordnung* und der stochastische Term hat die Form  $\eta(x, h(x))$ .

Es existiert keine geschlossene analytische Lösung der stochastischen KPZ-Gleichung. Für den speziellen Fall einer eindimensionalen Grenzlinie, die gemäß thermischen Rauschens aufräut, können die Skalenexponenten mit Methoden der Renormierungsgruppentheorie exakt zu  $\alpha = \frac{1}{2}$  und  $z = \frac{3}{2}$  bestimmt werden. Um Skalenexponenten für höhere Dimensionen und andere Arten des Rauschens, wie z.B. eingefrorene Unordnung zu bestimmen, besteht die Möglichkeit die KPZ-Gleichung numerisch zu integrieren (Moser et al., 1991). Aus vielen numerischen Studien und experimentellen Arbeiten ist bekannt, dass eingefrorene Unordnung zu größeren Skalenexponenten führt, als von der KPZ-Gleichung vorhergesagt. Zum besseren Verständnis der physikalischen Prozesse, die zur Entstehung dieser "anormalen Rauigkeit" führen, wurden verschiedene diskrete Wachstumsmodelle aufgestellt.

In Abwesenheit stochastischer Fluktuationen  $\eta = 0$  kann die *deterministische* Form der *KPZ-Gleichung* jedoch für jede Anfangskontur  $h(x, 0) = h_0(x)$  in jeder beliebigen Dimension  $d$  exakt gelöst werden:

$$h(x, t) = \frac{2\nu}{\lambda} \ln \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^d x'}{(4\pi\nu t)^{d/2}} \exp \left[ -\frac{(x-x')^2}{4\nu t} + \frac{\lambda}{2\nu} h_0(x') \right] \right\}$$

Gln. 5.8

Auch in diesem Fall kann eine Gesamtbewegung der Grenzfläche mit einer lateralen Translation der Form  $h \rightarrow h + \lambda \cdot t$  berücksichtigt werden.

### 5.1.3. Das MCR-Modell: ein diskretes Wachstumsmodell in 2 Dimensionen

Ein für diese Arbeit relevantes Wachstumsmodell wurde von **Martys**, **Cieplak** und **Robbins** eingeführt, das auch *MCR-Modell* genannt wird (Martys et al., 1991), (Cieplak und Robbins, 1990).

Ein zweidimensionales poröses Medium wird hier durch Scheiben mit zufälliger Radiusverteilung modelliert, die auf einem Gitter plaziert sind. Durch dieses 2D Medium wird eine Flüssigkeit mit einem äußeren Druck  $P$  getrieben, die durch ihre Oberflächenspannung  $\gamma$  und den Kontaktwinkel mit den Scheiben  $\Theta$  charakterisiert ist. Die Grenzlinie besteht somit aus einzelnen Bögen, die verschiedene Scheiben verbinden. Stabile Bögen haben eine Radius  $R_0 = \gamma/P$  und durchschneiden die Scheiben mit dem Kontaktwinkel  $\Theta$ .

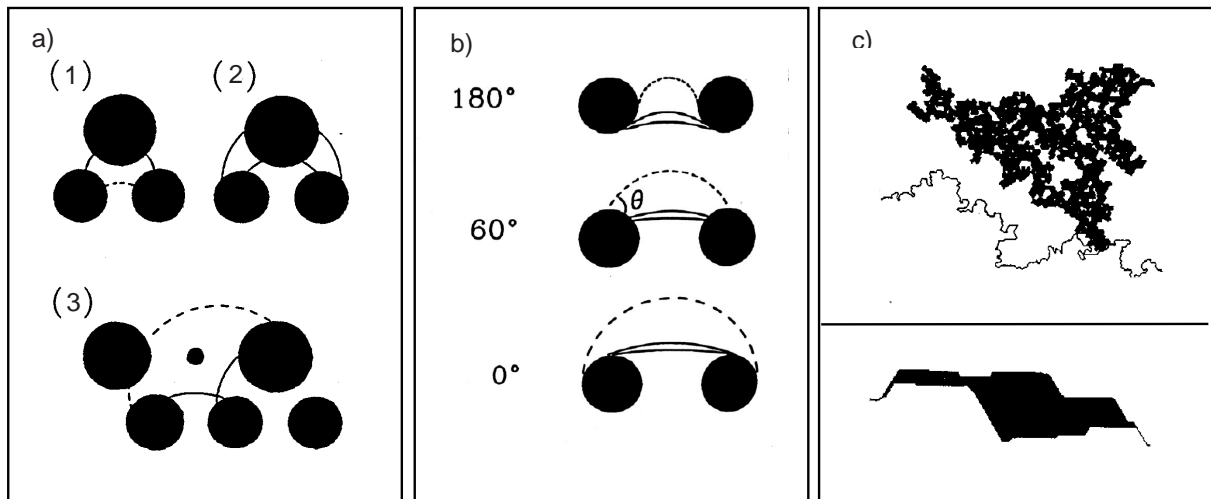


Abbildung 5.5 a) Wachstum der Grenzlinie erfolgt, wenn instabile Bögen existieren. Das MCR-Modell kennt drei verschiedene Instabilitäten: (1)  $R \neq \gamma/P$  und Schnittwinkel  $\neq \Theta$ . (2) ein Bogen, der zwei Scheiben verbindet, schneidet eine dritte. (3) die Bögen aufeinanderfolgender Scheibenpaare überschneiden sich. Der untere Bogen ist jeweils instabil und das Wachstum erfolgt nach oben (nach M. Cieplak et al., 1990). b) bei kleinen Kontaktwinkel ist die Entstehung von sich schneidenden Bögen Wachstumsprozess (3) bevorzugt. c) Im Grenzfall einer benetzenden Flüssigkeit bildet sich eine kompakte, selbst-affine Grenzlinie aus (unten), wohingegen im nicht benetzenden Fall eine fraktale, selbst-ähnliche Struktur entsteht (oben) (nach N. Martys et al., 1991).

Es gibt drei instabile Konformationen (siehe Abbildung 5.5 a)), die jeweils Wachstum der Grenzlinie zur Folge haben:

- (1) der Radius des Bogens entspricht nicht dem Gleichgewichtswert  $R_0 = \gamma/P$  und der Schnittwinkel nicht dem Kontaktwinkel  $\Theta$ .
- (2) ein Bogen, der zwei Scheiben verbindet, schneidet dabei eine dritte.
- (3) die Bögen aufeinanderfolgender Scheibenpaare überschneiden sich.

Die Instabilitäten (1) und (2) sind lokale Wachstumsmechanismen, wohingegen (3) zu kooperativen Wachstum führt. Zur Modellierung unterschiedlicher Benetzungseigenschaften der Flüssigkeit wurde der Kontaktwinkel von  $180^\circ - 0^\circ$  variiert. In Abbildung 5.5 b) ist zu sehen, dass sich im nicht benetzenden Grenzfall  $\Theta = 180^\circ$  alle Bögen zwischen den Scheiben befinden, wohingegen im benetzenden Grenzfall  $\Theta = 0^\circ$  die Flüssigkeit um die Scheiben herum fließt. Letzteres macht (3) zum dominierenden Wachstumsprozess bei kleinen Kontaktwinkeln und führt zu einer kompakten, selbst-affinen Grenzlinie mit einer makroskopischen Linienspannung, die durch einen statischen Rauigkeitsexponenten  $\alpha = 0.81$

gekennzeichnet ist. Bei großen Kontaktwinkeln hingegen sind die Wachstumsprozesse (1) und (2) bevorzugt, die zu fraktalen Grenzlinienmorphologien führen.

### 5.2. Grenzliniendynamik der Benetzungsfront

#### 5.2.1. Membranfluss durch ein regelmäßiges Gitter hydrophober Scheiben

Zur Untersuchung der Grenzliniendynamik einer periodisch deformierten Membranfront, wurden Glasoberflächen mit einem regelmäßigen Gitter aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Scheiben versehen, die Barrieren für Phospholipidmembranen darstellen und nicht benetzt werden (Groves et al., 1997).

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen, bestand das Gitter aus Linien einzelner Punkte in einem Abstand von  $90 \mu\text{m}$ , wobei die Punkte innerhalb der Linien einen Durchmesser von  $7 \mu\text{m}$  und einen Abstand von  $25 \mu\text{m}$  hatten. Alle Experimente in Kapitel 5.2.1 und Kapitel 5.2.2 wurden mit neutralen DMPC-Membranen in MQ durchgeführt.

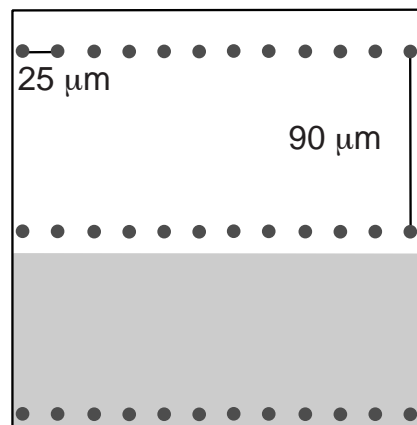


Abbildung 5.6 Schematische Darstellung einer Membran, die auf einer Glasoberfläche durch aufeinanderfolgende Reihen aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Scheiben mit einem Durchmesser von  $7 \mu\text{m}$  und einem Abstand  $25 \mu\text{m}$  spreitet. Die Abstände der jeweiligen Reihen betragen  $90 \mu\text{m}$ .

In Abbildung 5.7 ist eine Sequenz von Fluoreszenzbildern zu sehen, die den Membranfluss durch eine Linie von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Punkten zeigt. Die Membran füllt die Zwischenräume zwischen den Punkten aus und spreitet dann isotrop von den Öffnungen ausgehend, so dass sich Kreise bilden. Diese werden immer größer, bis sie sich berühren und zusammenfließen. Ab diesem Zeitpunkt bildet die Benetzungsfront eine geschlossene gewellte Grenzlinie, die sich zu einer geraden Linie entwickelt.



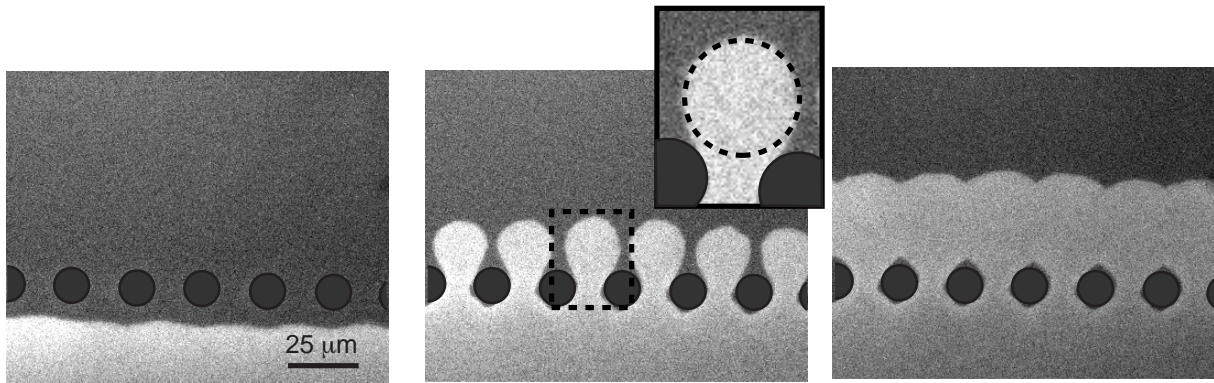


Abbildung 5.7 Zeitfolge des Membranflusses durch eine Defektlinie bestehend aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$  -- Scheiben, deren Positionen durch Kreise markiert sind. Die Membran fließt zwischen den Punkten der Linie hindurch und bildet nach den Barrieren Kreise aus (Mitte). Die Kreise fusionieren im weiteren Verlauf des Experimentes und bilden eine geschlossene deformierte Grenzlinie (Rechts).

Zwischen den einzelnen Defektlinien eines Substrates war ausreichend Platz zur Relaxation der Grenzlinie, so dass die Membranfront in einem Experiment mehrere Deformations- und Relaxationsschritte durchlaufen konnte.

Zur quantitativen Analyse wurden die Koordinaten der Grenzlinie mit einem Spuranalysealgorithmus bestimmt. Diese werden ausgehend von einem vorgegebenen Punkt sukzessive in einzelnen Schritten ermittelt (Strey, 1993). Hierbei werden die Punkte standardmäßig in einem Abstand von etwa 1.5 Pixel berechnet, was  $0.45 \mu\text{m}$  entspricht. Da die induzierten Deformationen um einen Faktor  $10^2$  größer sind, kann im Folgenden davon ausgegangen werden, dass Artefakte auf Grund der begrenzten Auflösung des Spursuchers keine Rolle spielen. Um exakt äquidistante x-Werte zu erhalten, wurden die erhaltenen Spuren mit kubischen Splines interpoliert.

Typische Konturen eines Deformations- und Relaxationsvorganges der Benetzungsfront sind in Abbildung 5.8 zu sehen. Die zeitliche Entwicklung der gestörten Membranfront ist durch zwei Charakteristika ausgezeichnet: (i) Die Bildung von Kreisen hinter der Defektlinie indiziert Wachstum normal zur Grenzfläche und (ii) die Relaxation zu einer geraden Linie.

Das einfachste Wachstumsmodell, das diese beiden Charakteristika beinhaltet, ist die deterministische KPZ-Gleichung. Der Rauschterm wurde vernachlässigt, da Rauigkeiten der Grenzlinie auf Grund von Substratinhomogenitäten wesentlich kleiner sind, als die hier induzierten Deformationen.

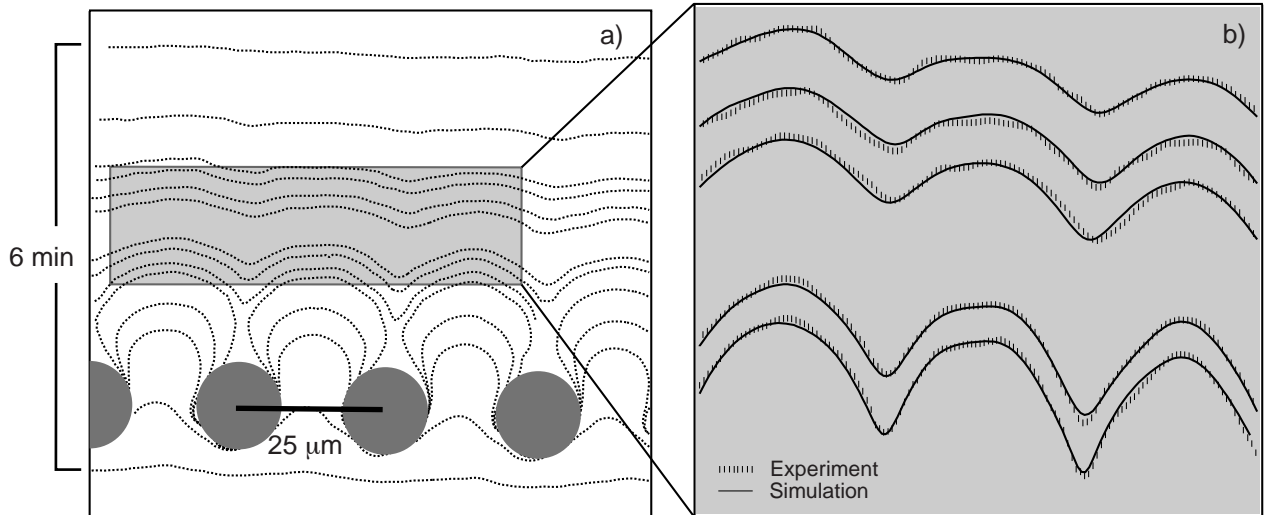


Abbildung 5.8 (a) Die Konturen der Membranfront zu verschiedenen Zeiten über eine Dauer von 6 min. (b) Vergrößerung des grauen Bereiches. Die simulierten Kurven (durchgezogene Linie) sind zusammen mit den experimentellen Daten (gestrichelt) abgebildet.

Zur Analyse der Grenzlinie wurde die Entwicklung einer Anfangskontur  $h_0(x)$  gemäß der Lösung der deterministischen KPZ-Gleichung (Gln. 5.5) mit einem Translationsterm  $+\lambda \cdot t$ :

$$h(x,t) = \lambda \cdot t + \frac{2\nu}{\lambda} \ln \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^d x'}{(4\pi\nu t)^{d/2}} \exp \left[ -\frac{(x-x')^2}{4\nu t} + \frac{\lambda}{2\nu} h_0(x') \right] \right]$$

Gln. 5.9

numerisch berechnet. Der Translationsterm berücksichtigt die Gesamtbewegung der Membranfront in Relation zum Reservoir. Als Anfangskontur  $h_0(x)$  diente die erste zusammenhängende Grenzlinie hinter der Defektlinie. Die mittlere Geschwindigkeit der Front  $\lambda$  zum betrachteten Zeitpunkt kann separat aus der Messung bestimmt und als Startparameter für die Simulation verwendet werden.

Die Wachstumsrate  $\lambda$  und der Relaxationskoeffizient  $\nu$  wurden bestimmt, indem die Abstandsquadrate zwischen simulierter Kurve und einer vorgegeben gemessenen Endkontur minimiert wurden (vergleiche Abbildung 5.8 b)).  $\lambda$  und  $\nu$  wurden so für fünf aufeinanderfolgende Endkonturen eines Relaxationsvorganges bestimmt und der Mittelwert gebildet. Um numerische Artefakte auszuschließen, wurde die zeitliche Entwicklung der Konturen ebenfalls mit Hilfe eines Euler-Algorithmus berechnet, der die deterministische KPZ-Gleichung direkt löst. Hierzu werden die Ableitungen auf der rechten Seite der KPZ-

Gleichung mit Hilfe eines Gitters der Gitterkonstante  $\Delta x$  diskretisiert ("standard forward-backward differences") und für einen Punkt  $h(x_n, t)$  gilt nach der Zeit  $\Delta t$ :

$$h(x_n, t + \Delta t) = h(x_n, t) + \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \cdot \left\{ \nu \cdot [h(x_{n+1}, t) - 2h(x_n, t) - h(x_{n-1}, t)] + \frac{\lambda}{8} \cdot [h(x_{n+1}, t) - h(x_{n-1}, t)]^2 \right\}.$$

Gln. 5.10

$n$  indiziert hierbei die Punkte des Gitters. Es wurden stabile Lösungen in Übereinstimmung mit Gln. 5.9 gefunden.

Die Wachstumsrate  $\lambda$  und der Relaxationskoeffizient  $\nu$  sind in der KPZ-Gleichung als konstante Parameter vorausgesetzt. Wie in Kapitel 4.1.3 diskutiert, sinkt die mittlere Geschwindigkeit  $\lambda$  jedoch im Laufe eines Benetzungsexperimentes mit  $t^{-1/2}$ , da der Transport der Lipidmoleküle an die Benetzungsfrent mit einer Reibungskraft verbunden ist, die linear zur bedeckten Fläche ansteigt. Transportmechanismen, sowie Materialerhaltung werden jedoch von einer lokalen Wachstumstheorie, wie der KPZ-Gleichung nicht berücksichtigt.

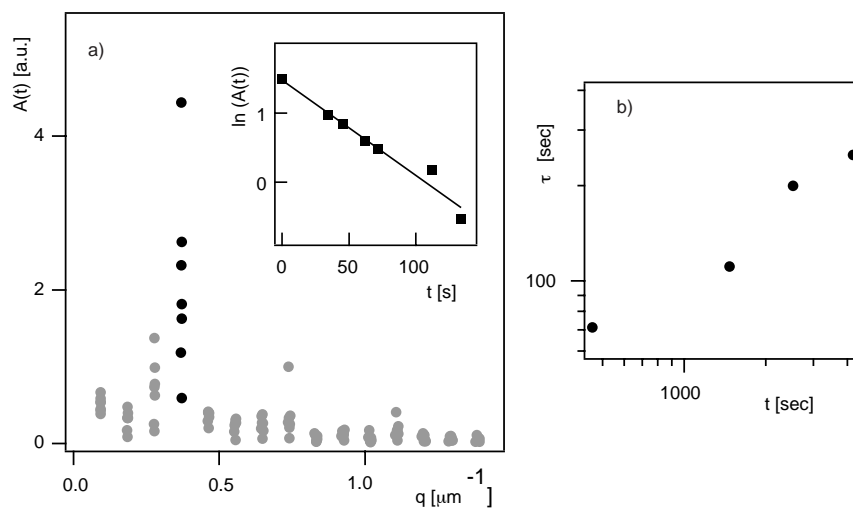


Abbildung 5.9 a) *Fourierspektrum eines Relaxationsprozesses. Die Amplituden der ersten harmonischen Schwingung zu verschiedenen Zeiten sind durch schwarze Kreise gekennzeichnet. Der Logarithmus dieser Amplituden ist oben rechts in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Daraus lässt sich durch die Anpassung eines exponentiellen Gesetzes die Relaxationszeit  $\tau_{rel}$  bestimmen (Insert). b) *Doppellogarithmische Darstellung der Relaxationszeit für vier aufeinanderfolgende Relaxationsprozesse.**

Die für einen Relaxationsvorganges charakteristische Zeit  $\tau_{rel}$  wurde zu verschiedene Zeitpunkte aus der Fourieranalyse der jeweiligen Konturen bestimmt. In Abbildung 5.9 a) ist ein typisches Fourierpektrum eines einzelnen Relaxationsvorganges abgebildet. Die

## 5. Rauigkeit der Benetzungsfront: Ein Wachstumsphänomen

schwarzen Kreise sind die Amplituden der ersten harmonischen Schwingung zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten eines Relaxationsvorganges, während die grauen Kreise Amplituden höherer Moden sind. Trägt man die Amplituden  $A(t)$  der ersten harmonischen Schwingung gegen die Zeit auf (Insert Abbildung 5.9 a)), lässt sich durch Anpassen eines exponentiellen Gesetzes (durchgezogene Linie) die Relaxationszeit  $\tau_{rel}$  bestimmen.

In Abbildung 5.9 b) sind die Werte von  $\tau_{rel}$  für vier aufeinanderfolgende Relaxationsprozesse dargestellt, die sich wie erwartet vergrößern. Die quadratischen Werte für  $\lambda$  und  $\nu$  in Abhängigkeit von  $t^{-1}$  zeigt Abbildung 5.10. An diesen Verlauf lassen sich Gerade anpassen und es gilt somit:  $\lambda, \nu \propto t^{-1/2}$ .

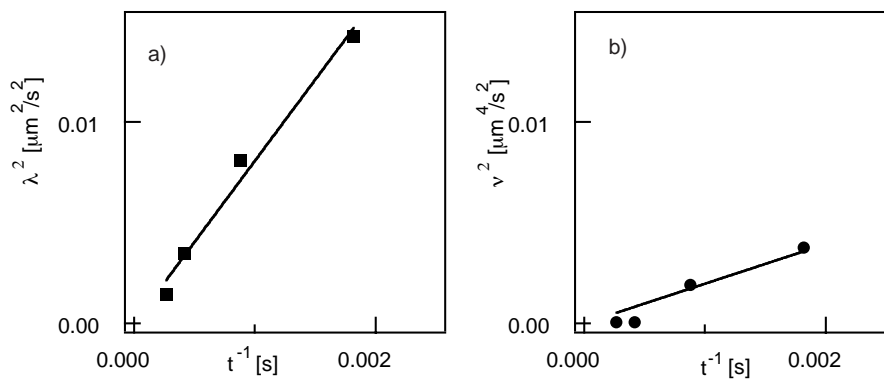


Abbildung 5.10 Verlangsamung der Wachstumsrate  $\lambda$  und des Relaxationskoeffizienten  $\nu$  beim Passieren mehrerer Defektlinien.

Der Relaxationskoeffizient  $\nu$  ist auf eine effektive Linienspannung  $\tau_{line}$  zurückzuführen. Bei Deformation der Membranfront entsteht eine rücktreibende elastische Kraft  $f_{elastic} = \tau_{line} \cdot \partial^2 h / \partial^2 x$  pro Einheitslänge, die durch lokale Reibung  $f_{fric} = \gamma_s \cdot h(t) \cdot dh/dt$  (vergleiche Kapitel 4.1.3) dissipiert wird :

$$\gamma_s \cdot h(t) \cdot \frac{dh}{dt} = \tau_{line} \cdot \frac{\partial^2 h}{\partial^2 x}.$$

*Gln. 5.11*

Der Vergleich mit der KPZ-Gleichung ergibt:

$$\tau = \gamma_s h(t) \cdot v(t),$$

Gln. 5.12

und mit  $h(t) = \sqrt{2S/\gamma_s} \cdot t^{1/2}$  folgt für die Zeitabhängigkeit des Relaxationskoeffizienten  $v$ :

$$v(t) = \tau_{line} \cdot \sqrt{\frac{1}{2S\gamma_s}} \cdot t^{-1/2}.$$

Gln. 5.13

Die Größe der Linienspannung  $\tau_{line}$  lässt sich aus dieser Beziehung mit  $\gamma_s = 1 \cdot 10^7 \text{ Ns/m}^2$ ,  $S = 10^{-4} \text{ J/m}^2$  und den gemessenen Werten für  $v$  zu  $\tau_{line} \approx 3 \cdot 10^{-11} \text{ N}$  abschätzen. Ähnliche Werte für die Linienspannung wurden bereits in früheren Experimenten gefunden (Sandré et al., 1999), (Zhelev und Needham, 1993).

Der Ursprung für die Linienspannung in der Benetzungsfrent liegt in der mizellaren Form der Membrankante (vergleiche Abbildung 2.2) in der sich die Lipidmoleküle krümmen müssen. Dies ist auf Grund der erforderlichen Krümmungsenergie energetisch ungünstiger als eine planare Doppellipidschicht. Die Linienspannung manifestiert sich auch in der Bildung einer homogenen Lipiddoppelschicht aus Membranflecken bei der Vesikelfusion (vergleiche Abbildung 3.7).

### 5.2.2. Grenzlinienmorphologien der Benetzungsfrent auf zweidimensionale poröse Medien

Die Grenzlinienmorphologien neutraler Lipidmembranen wurden in Anknüpfung an die Experimente aus Kapitel 5.2.1 zum einen auf Glasoberflächen untersucht, die mit zufällig verteilten  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Scheiben strukturiert waren. Zum anderen wurde eine chemisch homogene, aber raue Oberfläche durch Aufdampfen einer  $5 \text{ \AA}$  dicken Siliziummonoxidschicht auf Glas erzeugt.

In Abbildung 5.11 sind die auf den verschiedenen Oberflächen entstehenden Morphologien der Grenzlinie abgebildet. Auf einer rauen Glasoberfläche (Abbildung 5.11 a)) bildet sich eine kompakte und selbstaffine, aber raue Grenzlinie. Diese Konturen wurden zu mehreren Zeitpunkten digitalisiert (vergleiche Kapitel 5.2.1) und sind in Abbildung 5.11 b) dargestellt. Aus den Koordinaten der Konturen wurden die jeweiligen Höhenkorrelationsfunktionen  $G(x)$

berechnet, die in Abbildung 5.11 c) doppellogarithmisch dargestellt sind. Aus der Steigung von  $G(x)$  für kleine Abstände lässt sich der Wert des statischen Rauigkeitsexponenten zu  $\alpha = 0.81 \pm 0.05$  bestimmen. Als Fehler ist die Standardabweichung des Mittelwertes verschiedener Experimente angegeben.

Auf Oberflächen mit nicht benetzenden Hindernissen hingegen bilden sich fraktal-artige Grenzlinienmorphologien aus. Diese sind in Abbildung 5.11 für die Defektdichten,  $c = 10^{-1} \mu\text{m}^{-2}$  (d)  $c = 10^{-2} \mu\text{m}^{-2}$  (e) und  $c = 10^{-3} \mu\text{m}^{-2}$  (f) zu sehen.

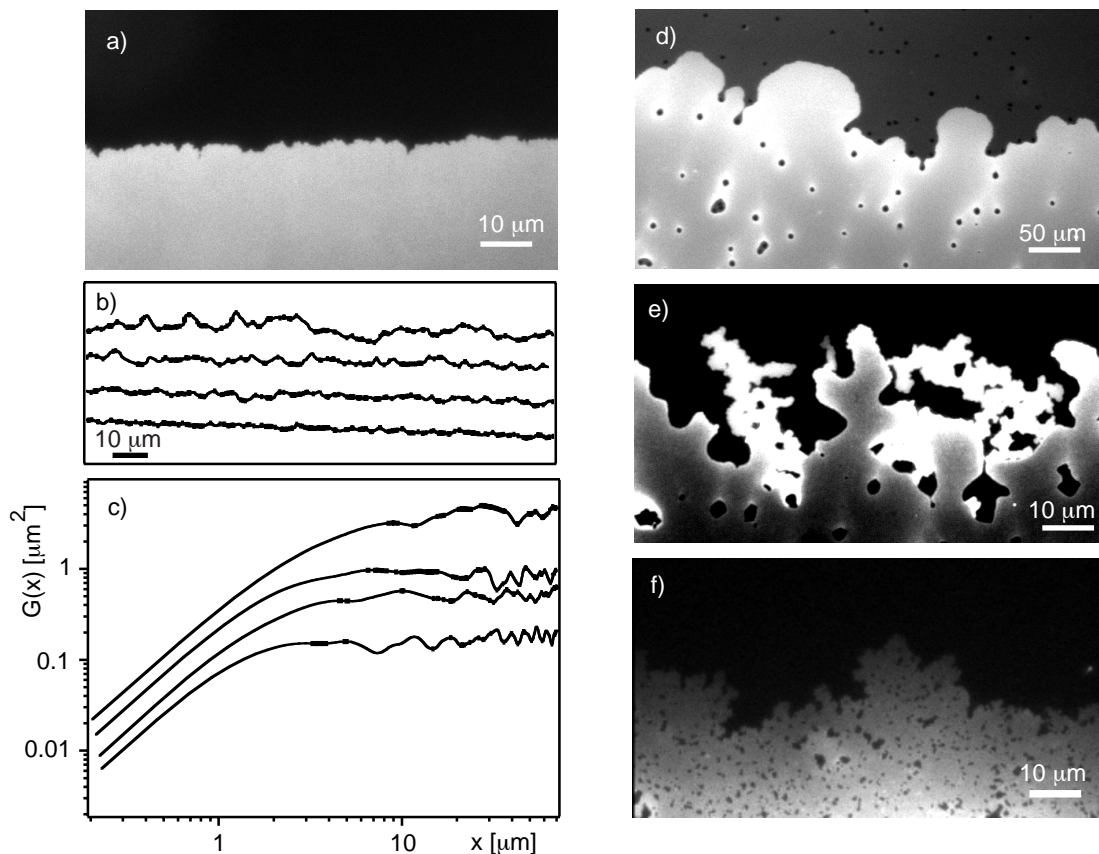


Abbildung 5.11 Grenzlinienmorphologien der Membranfront auf verschiedenen Oberflächen mit statistisch verteilten Defekten. Links: a) auf einer chemisch homogenen, rauhen Glasoberfläche bildet sich eine kompakte Grenzlinie b) Konturen der Front auf einer rauhen Glasoberfläche zu verschiedenen Zeiten. c) Die Höhenkorrelationsfunktionen der Konturen aus b). Rechts: Fluoreszenzbilder der Membranfront auf Glasoberflächen mit unterschiedlichen Dichten  $c$  von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Punkten, die von der Membran nicht benetzt werden. d)  $c = 10^{-1} \mu\text{m}^{-2}$ . e)  $c = 10^{-2} \mu\text{m}^{-2}$  und f)  $c = 10^{-3} \mu\text{m}^{-2}$ .

Bei einer Defektdichte von  $c = 10^{-2} \mu\text{m}^{-2}$  sind Instabilitäten der Grenzlinie zu sehen, die schnell und plötzlich zwischen den Hindernissen hindurch fließen und so zu einer fraktal-artigen Morphologie der Benetzungsfront führen. Diese Bereiche sind durch eine hohe

Fluoreszenzintensität gekennzeichnet, während die dunkleren Bereiche hingegen über längere Zeit stagnieren.

Das hier beobachtete Verhalten ist in Übereinstimmung mit den Grenzlinienmorphologien des MCR-Modell, das für den Fall kleiner Kontaktwinkel kompakte, selbstähnliche Grenzlinien mit statischem Rauigkeitsexponenten  $\alpha = 0.81 \pm 0.05$  vorhersagt. Im Fall von Hindernissen, die nicht benetzt werden, ergibt das MCR-Modell fraktale Grenzkonturen.

### 5.3. Zusammenfassung

Es wurde das Benetzungsverhalten neutraler Membranen auf strukturierten Festkörperoberflächen untersucht. Die Dynamik einer durch Hindernisse regelmäßig deformierten Membranfront kann auf kurzen Zeitskalen gut mit der deterministischen KPZ-Gleichung beschrieben werden. Auf langen Zeitskalen kann diese lokale Wachstumstheorie jedoch nicht die Verringerung der Wachstumsrate  $\lambda$  und des Relaxationskoeffizienten  $\nu$  erklären. Die beobachtete  $t^{-1/2}$  Abhängigkeit der beiden Koeffizienten ist typisch für nicht lokale Grenzliniendynamik, die Materialtransport und -erhaltung berücksichtigt (Dubé et al., 1999). Die von Dubé vorgeschlagene Feldtheorie erklärt jedoch nicht den statischen Rauigkeitsexponenten, der auf chemisch homogenen, aber rauen Glasoberflächen gefunden wurde. Dieser stimmt ebenso wie die beobachteten Grenzlinienmorphologien auf Substraten mit zufällig verteilten Hindernissen gut mit den Vorhersagen des MCR-Modells überein. Insbesondere bestätigen diese Experimente den Übergang von kompakten zu fraktal-artigen Grenzlinienmorphologien bei Variation der Benetzbarkeit der künstlichen Defekte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Benetzungsfronten von Lipidmembranen auf strukturierten Oberflächen ein gutes Modellsystem für Wachstum in 2 Dimensionen darstellt.

## **6 . Benetzung festkörpergestützter Polyelektrolytfilme mit Lipidmembranen**

Ein Ansatz zur Herstellung defektfreier Membranen ist die Trennung der substratgestützten Membran von der Festkörperoberfläche durch ein weiches Polymerkissen (Sackmann, 1996), (Rädler und Sackmann, 1997), (Sackmann und Tanaka, 2000). Darüber hinaus bietet ein Polymerfilm eine physiologische Umgebung für Seitengruppen integraler Proteine, die zum Substrat zeigen, und verhindert so deren Denaturierung auf Grund von direktem Kontakt mit der Festkörperoberfläche.

Es gibt viele verschiedene Ansätze zur Realisierung eines solchen Polymer-Lipid Schichtsystems. Die Polymerschicht kann je nach verwendeten Materialien von der Wasser-Luft-Grenzfläche übertragen (Sigl et al., 1997), (Hillebrandt et al., 1999), aus Lösung physisorbiert (Majewski et al., 1998) oder kovalent an das Substrat gekoppelt werden (Elender et al., 1996). Die Membran kann dann in Anschluss entweder durch Langmuir-Blodgett / Langmuir-Schäfer Technik übertragen oder mittels Vesikelfusion präpariert werden. Letzteres kann jedoch insbesondere auf sehr flexiblen, dicken Polymerkissen problematisch sein, da das Platzen der Vesikel durch entropische Repulsion der Polymerketten verhindert werden kann. Die Lipidlage kann durch die Verwendung entsprechend modifizierter Moleküle auch chemisch an das Polymerkissen gebunden werden (Beyer et al., 1996), (Wagner und Tamm, 2000), (Theato und Zentel, 2000).

Auf Grund des großen Interesses an Polymer-Lipid Verbundsystemen soll das Benetzungsverhalten von Lipidmembranen exemplarisch auf zwei Polyelektrolyten untersucht werden: (i) auf elektrostatisch adsorbiertem kationischen Polylysin (PL) und (ii) auf kovalent gekoppelter, anionischer Hyaluronsäure (HS). Es stellt sich die Frage, ob Lipiddoppelschichten diese Oberflächen überhaupt benetzen und wie das Polymerkissen die Kinetik beeinflusst.

Polylysin wird aber auch zur Kondensation von DNA verwendet, wobei durch die Präparationsbedingungen eine positive Überschlußladung der entstehenden Aggregate erzielt werden kann. Die Beschichtung solcher kationischer DNA/PL-Partikel mit anionischen Membranen bietet über den Einbau von Rezeptoren die Möglichkeit einen künstlichen Virus zu konstruieren, der in der Medizin Anwendung finden kann (Lee und Huang, 1996), (Erbacher et al., 1996). Die Realisierung eines solchen Gentransportsystems stellte in dieser



Arbeit eine weitere wichtige Motivation zur Durchführung von Benetzungsexperimenten mit Phospholipiden auf PL-beschichteten Oberflächen dar.

### 6.1. Präparation und Charakterisierung der Polymerschichten

#### 6.1.1. Polylysin

Lysin ( $M_w = 146 \text{ g / mol}$ ) ist eine wasserlösliche Aminosäure, die unter physiologischen Bedingungen einfach positiv geladen ist (vergleiche Abbildung 6.1). Für diese Arbeit wurde Poly-Lysin (PL) mit einem Molekulargewicht zwischen 30.000 und 70.000 verwendet, dessen Monomere über Peptidbindungen zwischen den einzelnen  $C_\alpha$ -Atomen zu einer kammartigen Struktur verbunden sind (Herstellerangaben). Unter der Annahme einer Peptidbindungslänge von maximal  $4.3 \text{ \AA}$  ergibt sich für das Polymer eine Maximallänge von ca.  $0.2 \text{ \mu m}$ .

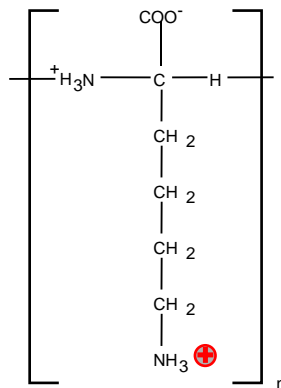


Abbildung 6.1 Chemische Strukturformel des Poly-Lysins. Die Monomere sind über Peptidbindungen an den primären C-Atomen zu einer kammartigen Struktur verbunden und tragen unter physiologischen Bedingungen je ein positive Ladung.

PL wurde in MQ zu verschiedenen Konzentrationen gelöst:  $0.5 \text{ mg/ml}$ ,  $0.25 \text{ mg/ml}$  und  $0.125 \text{ mg/ml}$ . Zur Beschichtung der Deckgläser wurde von diesen Lösungen jeweils  $0.5 \text{ ml}$  auf ein gereinigtes Deckglas gegeben, das negative Ladungen an der Oberfläche trägt. Somit adsorbieren positiv geladenen Moleküle hierauf über elektrostatische Wechselwirkungen. Nach einer Inkubationszeit von  $2 \text{ h}$  wurde der PL-Überschuss im Volumen durch Spülen mit MQ entfernt.

Für die Durchführung eines Benetzungsexperimentes werden jedoch trockene Substrate benötigt (vergleiche Kapitel 3.3.6). Zwei verschiedene Methoden zum Trocknen des polymerbeschichteten Deckglases wurden versucht: (i) Gefriertrocknen und (ii) Trocknen im

Vakuum. Benetzungsfrenten von Membranen auf diesen Oberflächen wiesen jedoch große Defekte im Bereich mehrerer  $\mu\text{m}$  auf, unabhängig vom Trocknungsprozess.

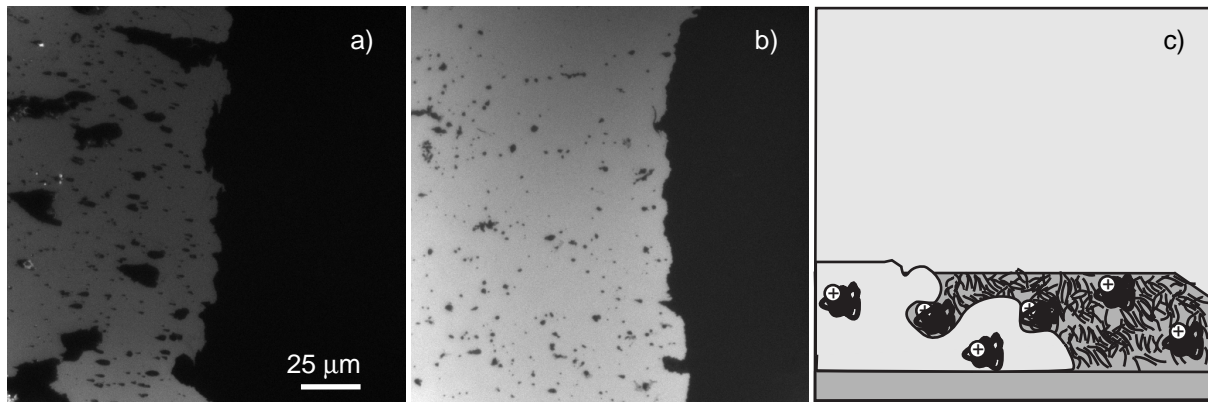


Abbildung 6.2 Fluoreszenzbilder einer anionischen Membran auf gefriergetrockneten PL-Filmen, die vorher aus Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen adsorbiert wurden. a)  $c=0.5$  mg/ml b)  $c=0.125$  mg/ml c) schematische Darstellung einer Membran, die um stark positiv geladene PL-Cluster in einem homogenen PL-Film herum fließt.

In Abbildung 6.2 sind die Fluoreszenzbilder von Benetzungsfrenten auf PL-Filmen zu sehen, die aus Lösungen mit  $c=0.5$  mg/ml (a) und  $c=0.125$  mg/ml (b) adsorbiert und anschliessend gefriergetrocknet wurden. Die Membran weist für beide Fälle deutliche Defekte auf, die sich mit abnehmender PL-Konzentration verkleinern, aber nicht vollständig verschwinden. Nach einiger Zeit (ca. 1 h) akkumuliert sich an den Defekten Lipid. Dies weist auf die Entstehung von PL-Clustern während des Trocknungsprozesses hin, die durch eine erhöhte Ladungsdichte im Vergleich zum homogenen PL-Film auf dem Rest des Substrates ausgezeichnet sind (vergleiche Abbildung 6.2 c)).

Eine Tauchmethode erzielte homogene, trockene PL-Filme. Ein Deckglas wurde hierzu für 2 h vertikal in PL-Lösung ( $c = 0.125$  mg/ml) getaucht und dann langsam mit einer Geschwindigkeit von  $50 \mu\text{m}/\text{sec}$  herausgezogen. Das Substrat erscheint danach trocken. Zur Entfernung eventueller Wasserrückstände lagerte es noch 2 h in Vakuum. Die laterale Homogenität eines solchen Filmes wurde mittels abbildender Ellipsometrie (Albersdörfer et al., 1998) überprüft und es konnten keine Defekte mehr gefunden werden.

### 6.1.2. Hyaluronsäure

Polysaccharidketten, zu denen auch die Hyaluronsäure (HS) gehört, sind stark hydrophil und nehmen im Vergleich zu anderen biologischen Makromolekülen ein großes Volumen ein.

Dies hat zur Folge, dass sie auch schon bei niedrigen Konzentrationen Gele bilden. So ist Hyaluronsäure ein wichtiger Bestandteil der Gelenkflüssigkeit und wirkt dort als Schmiermittel. Darüber hinaus spielt HS eine wichtige Rolle in der Zellmigration.

HS ist ein wasserlösliches Makromolekül, das aus bis zu  $10^4$  Zuckereinheiten (vergleiche Abbildung 6.1) aufgebaut ist. Eine Untereinheit besteht aus zwei verschiedenen Zuckern und ist unter physiologischen Bedingungen einfach negativ geladen. Die Länge des gestreckten Moleküls beträgt in etwa  $10\ \mu\text{m}$ . Dünne HS-Filme wurden kovalent an  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen gekoppelt, wie ausführlich bei Albersdörfer (Albersdörfer und Sackmann, 1999), (Albersdörfer, 1999) beschrieben.

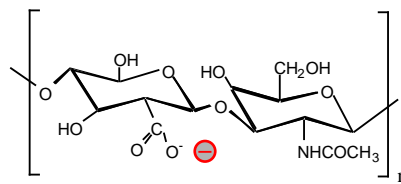


Abbildung 6.3 HS ist eine lange lineare Kette aus sich wiederholenden Monomereinheiten von Disacchariden. Eine Untereinheit ist unter physiologischen Bedingungen einfach negativ geladen.

Prinzipiell wurde in einem ersten Schritt eine dünne Schicht der negativ geladene Hyaluronsäure auf einer positiv geladenen, aminosilanisierten Oberfläche aus einer 10 mM HEPES Lösung (pH7) adsorbiert. Im nächsten Schritt wurden die HS-Ketten an zufällig verteilten Stellen kovalent über Esterbrücken an das Substrat gekoppelt und die Konformation der physisorbierten Polyelektrolytketten teilweise eingefroren.

### 6.1.3. Charakterisierung der Polymerschichten mittels Ellipsometrie

Zur Charakterisierung der beiden Polymerfilme wurde ihre Dicke mit einem Standardellipsometer als Funktion des relativen Wassergehaltes der umgebenden Luft gemessen. Die absolute Werte der Dicke  $d$  und des Brechungsindex  $n$  der Polymerschichten können durch Messungen der ellipsometrischen Winkel  $\Delta$  und  $\Psi$  bestimmt werden. Diese sind nach der Fresnel-Theorie über die komplexen Reflektionskoeffizienten von parallel und senkrecht zur Einfallsebene polarisiertem Licht mit der Dicke und dem Brechungsindex verbunden (Elender und Sackmann, 1994), (Elender, 1996).

Die relative Feuchtigkeit in der Probenumgebung kann mit Hilfe einer abgeschlossenen Klimakammer im Bereich zwischen 0.5% und 98% eingestellt werden. Dies wird durch

Mischen eines konstanten Flusses trockener Luft mit einem Strom Wasser gesättigter Luft im Inneren der Kammer bewerkstelligt. Die relative Feuchtigkeit ist hierbei der jeweilige Wassergehalt in der Kammer, normiert auf den Sättigungswert des Wassergehaltes im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Feuchtechamber und das verwendete Hygrometer sind ausführlich bei Elender (Elender und Sackmann, 1994), (Elender, 1996) beschrieben.

Die Wassermolekülen im Innern der Feuchtechamber üben einen externen Druck  $\Pi_{ext}$  auf den Polymerfilm aus, der im thermodynamischen Gleichgewicht durch den Spaltdruck  $\Pi_{disj}$  ausgeglichen wird:

$$\Pi_{ext} = \frac{\Delta\mu}{v_{H_2O}} = -\Pi_{disj},$$

Gln. 6.1

wobei  $\Delta\mu$  das chemische Potential und  $v_{H_2O}$  das molare Volumen der Wassermoleküle ist (vergleiche Abbildung 6.4 b)).

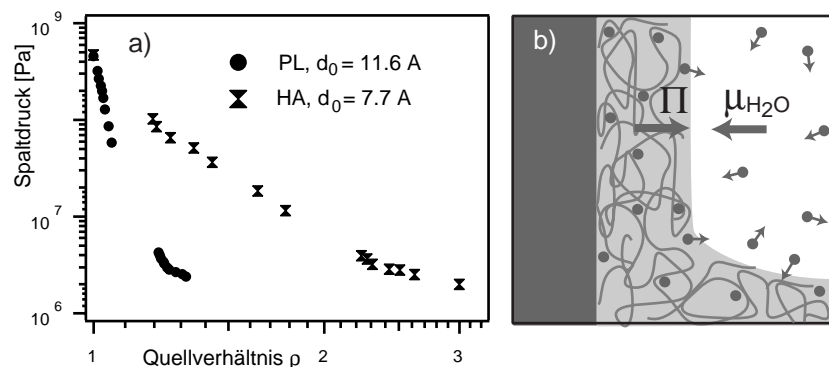


Abbildung 6.4 a) Der gemessene Spaltdruck als Funktion des Quellverhältnisses  $\rho$  für PL und HS-Filme (HS nach (Albersdörfer, 1999)), wobei der absolute Wert der Filmdicke auf die trockene Dicke  $d_0$  normiert wurde. b) Schematische Darstellung des substratgestützten Polymerfilmes in der Feuchtechamber: das chemische Potential  $\mu_{H_2O}$  der Wassermoleküle in der Kammer ist gleich dem Spaltdruck des Filmes  $\Pi$ .

In Abbildung 6.4 a) ist für beide Polymerfilme der Spaltdruck gegen die Filmdicke normiert auf die trockene Dicke (dem Quellverhältnis  $\rho$ ) aufgetragen. Bei gleichem Spaltdruck zeigt die HS ein signifikant größeres Quellverhältnis als der PL-Film. Außerdem ist die Steigung des Spaltdruckes als Funktion des Quellverhältnisses bei PL-Filmen steiler, als für Hyaluronsäure. Dieses Ergebnis kann auf die unterschiedlichen molekularen Strukturen der jeweiligen Monomereinheiten zurückgeführt werden. So hat Lysin auf Grund seiner

Alkylkette einen nicht zu vernachlässigen hydrophoben Charakter, während HS aus rein hydrophilen Zuckern besteht. Deshalb ist es für den HS-Film energetisch günstiger, Wasser einzulagern, als für den PL-Film.

### 6.2. Spreitkinetik geladener Lipidmembranen auf Polyelektrolyten

Die Benetzungsexperimente auf den polyelektrolytbeschichteten Oberflächen wurden mit binären, entgegengesetzt geladenen Lipidmischungen bei verschiedenen Pufferbedingungen (siehe Tabelle 6.1) durchgeführt. Auf kationischen PL-Filmen wurde DOPC mit 10 mol% anionischem DOPS und auf anionischen HS-Filmen entsprechend DOPC mit 10 mol% kationischem DOTAP verwendet.

In einem ersten Versuch zur Visualisierung der Membran auf PL mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde Texas-Red DHPE eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes auf PL fast vollständig unterdrückt wird.

Die Kopfgruppe des Texas-Red DHPE ist im Vergleich zu den unmarkierten Phospholipiden der umgebenden Matrix sehr voluminös und trägt eine negative Ladung, da hier der Farbstoff an das Molekül gekoppelt wurde. Es ist denkbar, dass der direkte Kontakt des fluoreszenzaktiven Teil des Moleküls mit dem PL-Film zu der beobachteten Fluoreszenzunterdrückung führt. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass der im Folgenden verwendete kettenmarkierte Farbstoff NBD C12-HPC normale Intensität aufweist.

In Abbildung 6.5 ist exemplarisch eine Serie von Fluoreszenzbildern zu sehen, die die Benetzungsfrent auf beiden Polyelektrolyten zeigt. Die weißen Pfeile markieren Defekte, die später von der Membran geschlossen werden. Auf beiden Oberflächen bildet sich somit eine geschlossene Lipiddoppelschicht. Die Diffusionskonstante der anionischen Membran auf PL wurde mit kontinuierlichem Bleichen (vergleiche Kapitel 3.3.2.2) für alle Pufferbedingungen zu  $\sim 5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  bestimmt. Die Diffusionskonstante einer Lipidmonolage auf einem vollhydratisierten HS-Kissen wurde von Albersdörfer zu  $\sim 9 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  bestimmt (Albersdörfer, 1999).

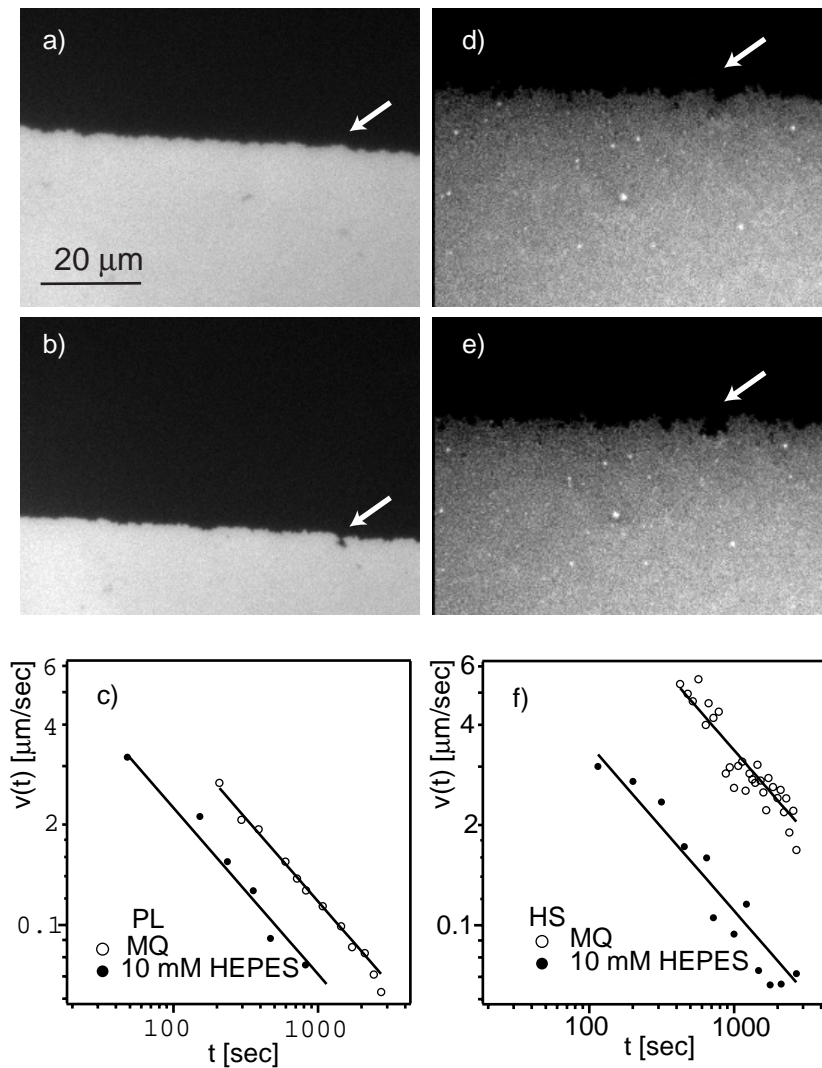


Abbildung 6.5 a) und b) typische Fluoreszenzbilder einer anionischen Membran im Abstand einiger Minuten, die auf einem physisorbierten PL-Film spreitet. c) Der zeitliche Verlauf der Benetzungsgeschwindigkeit anionischer Membranen auf PL folgt einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz bei unterschiedlichen Pufferbedingungen. d) und e) Fluoreszenzbilder kationischer Membranen auf HS. f) auch auf HS folgt die Geschwindigkeit einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz.

In Abbildung 6.5 c) und f) ist die Geschwindigkeit der Membran auf den beiden Polymerfilmen als Funktion der Zeit doppellogarithmisch aufgetragen. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen des  $t^{-1/2}$ -Gesetztes, aus denen die Werte des kinetische Spreitkoeffizienten ermittelt wurden. Diese sind für geladenen Membranen in Tabelle 6.1 auf Glas, PL und HS bei verschiedene Pufferkonzentrationen aufgeführt. Als Referenz wurden auch Messungen mit neutralen DOPC-Membranen in MQ durchgeführt.

	$\beta$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf $\text{SiO}_2$	$\beta_{\text{pol}}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf PL	$\beta_{\text{pol}}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf HA
<b>Millipore</b>	$16 \pm 1$	$13 \pm 1$	$113 \pm 5$
<b>10 mM HEPES, pH7</b>	$12 \pm 1$	$5 \pm 0.5$	$12 \pm 1$
<b>10 mM HEPES, pH7 10 mM NaCl</b>	$7 \pm 0.5$	$5 \pm 0.5$	
<b>10 mM HEPES, pH7 150 mM NaCl</b>	$10 \pm 0.5$	$9 \pm 1$	0
<b>Lipid Zusammensetzung</b>	<b>DOPC/10%DOPS</b>	<b>DOPC/10%DOPS</b>	<b>DOPC/10%DOTAP</b>

	$\beta$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf $\text{SiO}_2$	$\beta$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf PL	$\beta$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] auf HA
<b>Millipore</b>	$40 \pm 2$	$23 \pm 2$	0
<b>Lipid Zusammensetzung</b>	<b>DOPC</b>	<b>DOPC</b>	<b>DOPC</b>

Tabelle 6.1 Der kinetische Spreitkoeffizient  $\beta_{\text{pol}}$  auf Glas, PL und HS bei verschiedenen Salzstärken und Lipidzusammensetzungen.

Die Benetzungskinetik auf HS ändert sich stark bei Variation von Puffer und Lipid. So wird auf HS in MQ keine Benetzung von neutralem Lipid beobachtet. Eine zweikomponentige Membran mit 10 mol% kationischem Lipid führt jedoch zu einem um einen Faktor drei größeren kinetischen Spreitkoeffizienten, im Vergleich zu einer neutralen Membran auf einer reinen Glasoberfläche. Bei Verwendung von Pufferlösungen mit höherem Salzgehalt sinkt der kinetische Spreitkoeffizient einer kationischen Membran auf HS plötzlich um den Faktor 10. Im Gegensatz zu HS-beschichteten Oberflächen werden PL-Filme auch von neutralem Lipid in MQ benetzt. Die Werte des kinetischen Spreitkoeffizienten von zweikomponentigen anionischen Membranen auf PL-Filmen sinken mit zunehmender Salzkonzentration. Die Benetzungskinetik anionischer Membranen auf reinen Glasoberflächen zeigt ähnliches Verhalten, wie auf PL-beschichteten Oberflächen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gemessenen Benetzungskinetiken auf den beiden polyelektrolytbeschichteten Oberflächen deutlich unterschiedlich sind, was im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll.

Spreitet die Membran auf einem weichen vollhydratisierten Polymerkissen der Dicke  $d$  wird Scherfluss in dem Kissen induziert, der sich mit Hilfe der Brinkmann-Gleichung (Sahimi,

## 6. Benetzung festkörpergestützter Polyelektrolytfilme mit Lipidmembranen

1995) stark vereinfacht als Fluss durch ein poröses Medium mit Maschenweite  $\xi$  beschreiben lässt:

$$\eta_w \cdot \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} - \frac{\eta_w}{\xi^2} \cdot v = 0,$$

Gln. 6.2

wobei  $\eta_w$  die Wasserviskosität ist.

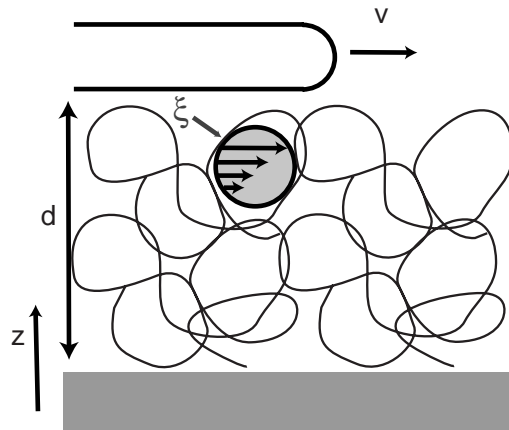


Abbildung 6.6 Schematische Darstellung einer spreitenden Membran auf einem Polymerkissen mit der Maschenweite  $\xi$  und Dicke  $d$ .

Die exakte Lösung der Brinkmann-Gleichung ergibt ein nicht lineares Geschwindigkeitsprofil  $v(z)$  normal zur Grenzfläche:

$$v(z) = 2 \cdot v_0 \cdot \sinh\left[\frac{z}{d}\right] \quad \text{mit} \quad v_{0,eff} = v(d) \cdot \sinh^{-1}\left[\frac{d}{\xi}\right].$$

Gln. 6.3

Aus diesem Geschwindigkeitsprofil lässt sich durch Ableiten die Reibungskraft an der Grenzfläche Membran / Polymer berechnen:

$$F_{fric} = \frac{dv}{dz}\Big|_d.$$

Gln. 6.4



und es folgt für die Reibungskraft pro Fläche  $f_{\text{fric}}$

$$f_{\text{fric}} = v(d) \cdot \frac{\eta_w}{\xi} \cdot \tanh^{-1} \left[ \frac{d}{\xi} \right].$$

Gln. 6.5

Hieraus erhält man die Benetzungsgeschwindigkeit analog zu Kapitel 4.1.3:

$$v(t) = \sqrt{\frac{\beta_{\text{pol}}}{t}} \quad \text{mit} \quad \beta_{\text{pol}} = \frac{S}{2 \cdot \gamma_{\text{pol}}} \quad \text{und} \quad \gamma_{\text{pol}} = \frac{\xi}{\eta_w} \cdot \tanh^{-1} \left[ \frac{\xi}{d} \right]$$

Gln. 6.6

Das Polymerkissen ändert somit nicht die Zeitabhängigkeit der Benetzungskinetik, beeinflusst aber den kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta_{\text{pol}}$  durch die Maschenweite  $\xi$ .

Im Grenzfall großer Maschenweite  $\xi = d$  reduziert sich Gln. 6.6 zu:

$$\beta_{\text{pol}} = \frac{S \cdot d}{2\eta_w}.$$

Gln. 6.7

Dies ist der Fall hydrodynamischer Reibung, der bereits im Rahmen der Spreitkinetik auf starren Festkörperoberflächen in Kapitel 4.1.3 vorgestellt wurde. Hierbei wird der Gewinn an freier Energie  $S$  durch hydrodynamischen Scherfluss in der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat dissipiert.

Im Grenzfall kleiner Maschenweite  $\xi \ll d$ , gilt  $\tanh[d/\xi] = 1$  und von daher:

$$\beta_{\text{pol}} = \frac{S \cdot \xi}{2\eta_w}.$$

Gln. 6.8

Befindet sich ein Polymerkissen zwischen Membran und Substrat, dessen Maschenweite klein ist gegen die gesamte Dicke des Kissens, wird der Gewinn an freier Energie durch linearen Scherfluss in den einzelnen Maschen des Polymerkissen dissipiert. Makroskopisch kann der Einfluss somit auch durch eine effektive Viskosität  $\eta_{\text{eff}} = \eta_w / \xi$  ausgedrückt werden, die über die Maschenweite variabel eingestellt werden kann.

Darüber hinaus schafft der Polymerfilm einen definierten Abstand zwischen Membran und Festkörperoberfläche, während Brechungsindex  $n$  und Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  einer vollhydratisierten Polymerschicht sich nicht wesentlich von den Werten einer reinen Wasserschicht unterscheiden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Polymerfilm

keinen zusätzlichen Beitrag zur Van der Waals Wechselwirkung liefert. Diese fällt jedoch stark mit dem Abstand ab und ein Film mit ausreichender Dicke (ca. 60 Å, vergleiche Abbildung 4.2) entfernt die Membran so weit vom Substrat, dass die Van der Waals Kraft zwischen Lipiddoppelschicht und Festkörperoberfläche vernachlässigt werden kann. Ein weiterer Unterschied zwischen der Wechselwirkung einer Membran mit einer starren Festkörperoberfläche und einer Membran mit einer polymerbeschichteten Oberfläche ist eine zusätzliche langreichweitige Abstoßung, die entropischen Ursprungs ist (Klein et al., 1994).

Die HS-Filme wurden mit Hilfe kolloidaler Sonden intensiv untersucht (Albersdörfer und Sackmann, 1999). Bei einer Salzstärke von 20 mM NaCl betrug die Maschenweite hierbei 3 nm und die Dicke des gesamten Filmes 100 nm. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das HS-Kissen dick genug ist, um die Wechselwirkung zwischen Membran und Glas völlig abzuschirmen und die Spreitkinetik anionischer Membranen elektrostatisch dominiert ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass neutrales Lipid die HS-Oberfläche nicht benetzt.

Im Fall des kovalent gekoppelten HS-Kissens können nur die freien Teile der Polymerketten zwischen den Kopplungspunkten ihre Konformation ändern. In reinem MQ werden sich die Polymerketten in Bürsten strecken, da die Salzstärken geringer ist, als unter Präparationsbedingungen (10 mM HEPES, pH7) und es kann in grober Näherung angenommen werden, dass die Filmdicke gleich der Maschenweite ist. Zusammen mit minimaler Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Membran und HS-Film kann dies nach Gln. 6.7 den hohen Wert des kinetischen Spreitkoeffizienten einer positiv geladenen Membran auf HS in MQ erklären. Die drastisch kleineren kinetischen Spreitkoeffizienten kationischer Membranen auf HS-Filmen bei größeren Salzstärken lassen sich wie folgt verstehen. Höheren Salzstärken führen zur Abschirmung aller elektrostatischen Wechselwirkungen in dem System und somit zum einen zu einer Verringerung der Maschenweite des Polyelektrolytnetzwerkes und zum anderen zu einer kleineren Wechselwirkung zwischen Membran und Polymerfilm.

Auf PL-Filmen ist die Benetzungskinetik binärer Lipidmischungen ähnlich zu denen auf Glas. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass im Gegensatz zu einem HS-Kissen, ein vollhydratisierter PL-Film nicht dick genug ist, um die Wechselwirkung zwischen Membran und Substrat abzuschirmen und diese somit die Benetzungskinetik dominiert.

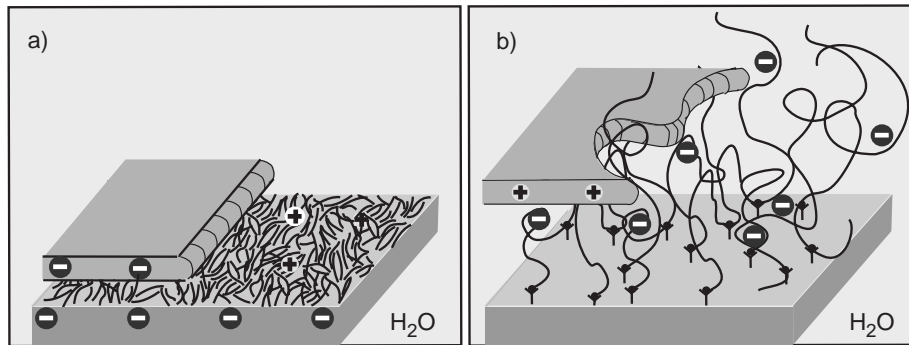


Abbildung 6.7 Schematische Darstellung a) einer anionischen Membran, die einen dünnen physisorbierten PL-Film benetzt. b) Im Gegensatz hierzu bildet kovalent gekoppelte HS ein dickes Polymerkissen, das elektrostatisch mit der kationischen Membran wechselwirkt.

Aus den Quellkurven (Abbildung 6.4) der beiden Polyelektrolytfilme kann geschlossen werden, dass der PL-Film auch unter Wasser viel dünner ist, als das HS-Kissen. Da das kationische PL aus Lösung in MQ elektrostatisch auf der Glasoberfläche adsorbiert wurde, wird sich die Maschenweite des PL-Films weiter verkleinern, in Übereinstimmung mit den gemessenen kinetischen Spreitkoeffizienten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Polymerfilm Einfluss auf die Benetzungskinetik von Membranen hat, der stark von den Eigenschaften des Films abhängt. Insbesondere können die sowohl die Präparationsbedingungen des Filmes, als auch die äußeren Parameter unter denen das anschließende Benetzungsexperiment stattfindet die experimentellen Ergebnisse empfindlich beeinflussen. Dies kann auch bei erfolgreichen Rekonstitution von Membranen auf festkörpergestützten Polymer- und Polyelektrolytfilmen von entscheidender Bedeutung sein.

### 6.3. Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass jeweils entgegengesetzt geladene Phospholipidmembrane kationische PL- und anionische HS-Oberflächen benetzten und eine geschlossene, fluide Membran bilden. In praktischen Anwendungen stellt die Benetzung mit Lipiden somit eine Alternative zur Vesikelfusion dar, um festkörpergestützte Polymerfilme mit Membranen zu beschichten.

Der zeitliche Verlauf der Benetzungsgeschwindigkeit folgt auf beiden Polyelektrolytfilmen einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz, äquivalent zur Kinetik auf starren Festkörperoberflächen. Es wurde ein einfaches theoretisches Modell entwickelt, das die Zeitabhängigkeit der Kinetik erklärt und darüber hinaus den kinetischen Spreitkoeffizienten als Funktion der Maschenweite des

Polymerkissens liefert. Dies führt die starke Verringerung des kinetischen Spreitkoeffizienten auf HS bei Zugabe von Salz auf die Verringerung der Maschenweite zurück, die Folge der Abschirmung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Polyelektrolytketten ist.

PL-Filme beeinflussen die Benetzungskinetik deutlich weniger als HS-Filme. Grund hierfür kann sein, dass adsorbierte PL-Filme auf Grund der molekularen Struktur der Monomereinheiten weniger Tendenz zur Einlagerung von Wasser zeigen und somit im vollhydratisierten Zustand deutlich dünner sind als HS-Filme. Die gemessenen kinetischen Spreitkoeffizienten auf PL werden äquivalent zu HS bei Erhöhung der Salzstärke kleiner. Da PL-Filme von Phospholipiden benetzt werden, sollte es möglich sein, DNA/PL Aggregate mit Membranen zu beschichten und so schrittweise ein Gentransfersystem aufzubauen.

## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

Klassische Mikrosysteme in der Biosensorik und Mikrofluidik werden aus Glas oder Silizium hergestellt, da Methoden aus der Mikroelektronik zur Strukturierung angewandt werden können. Diese Materialien haben jedoch einige Nachteile. So muss zur Strukturierung jedes einzelne Stück aufwendige Schritte, wie Fotolithographie oder Ätzen durchlaufen, und die Rohmaterialien sind relativ teuer. Aus diesen Gründen finden in der Fertigung von Mikrosystemen der Biotechnologie immer häufiger Kunststoffe Anwendung, die von einem Master durch Techniken wie Heißpressen oder Spritzguss abgeformt werden können (Becker und Gärtner, 2000), (Weber und Ehrfeld, 1998). Sowohl Serienherstellung, als auch Prototyping sind mit diesen neuen Werkstoffen einfach durchzuführen. Darüber hinaus sollte es möglich sein, durch chemische Modifizierung der synthetischen Polymerketten die Kunststoffoberflächen äquivalent zu Glas oder Silizium zu funktionalisieren.

Zur Entwicklung von Mikrosystemen aus Plastik, die Anwendung bei der Analyse biologischer Materialien finden sollen, stellt die Beschichtung mit Lipiden eine wichtige Biofunktionalisierung dar, die im Folgenden auf verschiedenen Kunststoffen untersucht werden soll. Da die Lipidschichten überwiegend mit optischen Methoden charakterisiert werden, sind insbesondere die optischen Eigenschaften der Kunststoffe von Interesse. Außerdem eröffnen imprinting Methoden die Möglichkeit Kunststoffoberflächen auf Nanometerskala topologisch zu strukturieren, die für Benetzungsexperimente mit Lipiden verwendet werden können.

### 7.1. Verwendete Kunststoffe und ihre Materialeigenschaften

Kunststoffe sind synthetische Polymere, die aus langen Ketten identischer Monomereinheiten bestehen. Sie liegen bei niedrigen Temperaturen als glasartige Festkörper vor, da die Bewegung der Moleküle stark eingeschränkt ist. Oberhalb einer bestimmten Temperatur  $T_G$  verhält sich das Polymer elastisch-viskos. Diese Glasübergangstemperatur ist ein entscheidendes Charakteristikum für polymere Substanzen und insbesondere wichtig für die Formgebung von Kunststoffen. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Kunststoffe untersucht: Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC) und ein Zyklisches Olefin der Firma Ticona, das im Folgenden mit dem Handelsnamen TOPAS bezeichnet wird. Die ersten drei Kunststoffe sind häufig verwendete Standardsubstanzen,

## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

wohingegen TOPAS ein neuartiger Kunststoff ist, der hinsichtlich optisch hochwertiger Qualität entwickelt wurde.

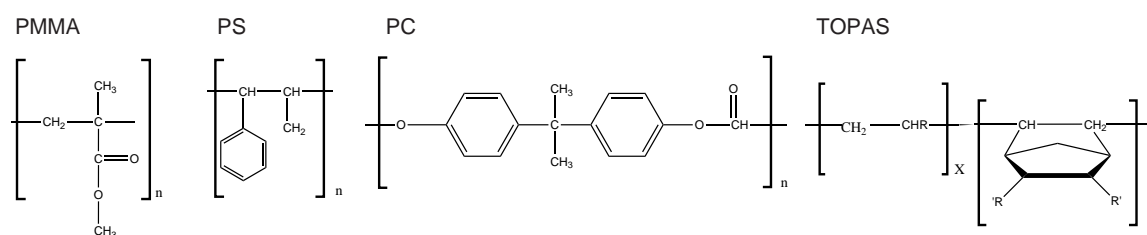


Abbildung 7.1 Chemische Strukturformeln der verwendeten synthetischen Polymere.

Er ist laut Herstellerangaben nicht doppelbrechend und besitzt nur geringe Autofluoreszenz. Die Strukturformeln aller synthetischen Polymere sind in Abbildung 7.1 dargestellt. Falls nicht anders beschrieben wurden industriell hergestellte Folien verwendet.

Wichtige Materialparameter dieser synthetischen Polymere, wie Glasübergangstemperatur  $T_G$ , Brechungsindex  $n$  und Abbesche Zahl  $v$  sind in Tabelle 7.1 im Vergleich zu Kronglas aufgeführt.

	$T_G$ [°C]	$n$	$v$
<b>PMMA</b>	105	1.49	58
<b>PS</b>	100	1.59	31
<b>PC</b>	141	1.59	30
<b>TOPAS (*)</b>	140	1.53	58
<b>Krongläser</b>	500	1.46-1.6	57-64

Tabelle 7.1 Glasübergangstemperatur  $T_G$ , Brechungsindex  $n$  und Abbesche Zahl  $v$  der verwendeten Kunststoffe im Vergleich zu Krongläser. Alle Werte nach Lohmeyer (Lohmeyer, 1984) und (\*) laut Herstellerangaben.

### 7.1.1. Optische Eigenschaften

Da die Kunststofffolien als Substrate in der Fluoreszenzmikroskopie benutzt werden, sind ihre optischen Eigenschaften von besonderem Interesse. So sollte ihre Dicke in etwa der von

Deckgläsern entsprechen (170  $\mu\text{m}$ ), da diese auf handelsübliche Objektive abgestimmt ist. Dies war bei den hier verwendeten Folien der Fall.

Außerdem verringert vor allem Autofluoreszenz den Kontrast durch hohe Hintergrundintensitäten und kann so die Bildqualität erheblich beeinträchtigen. Autofluoreszenz entsteht auf Grund der Molekülstruktur, wobei insbesondere  $\pi$ -Elektronensysteme von Doppelbindungen UV-Licht absorbieren können, das dann mit größeren Wellenlängen wieder emittiert wird. Da die emittierte Intensität mit der Intensität des eingestrahlteten Lichtes steigt, wird die Autofluoreszenz mit großen Öffnungswinkeln des Objektivs immer störender. Für alle Fluoreszenzaufnahmen in diesem Kapitel wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 0.75 verwendet.

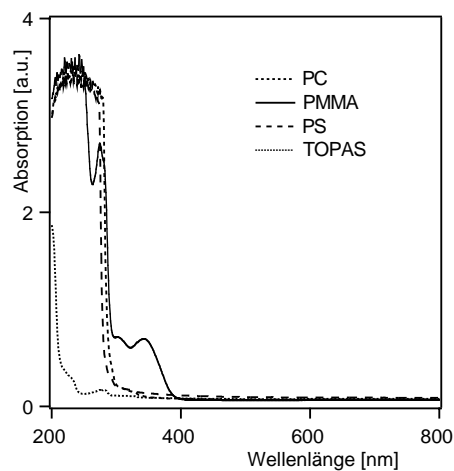


Abbildung 7.2 Absorptionsspektren der Kunststofffolien.

In Abbildung 7.2 ist die Absorption der vier Folien zu sehen, die mit Hilfe eines Spektralfotometers gemessen wurden. TOPAS ist hier der einzige Kunststoff, der auch bei Wellenlängen kleiner 300 nm durchlässig ist. Übereinstimmend damit ist er laut Herstellerangaben nur in sehr geringem Maße autofluoreszent.

Abbildung 7.3 zeigt Aufnahmen der Folien im Vergleich zu Glas, die mit einer Wellenlänge von 450 nm bis 490 nm angeregt wurden. Detektiert wurde eine Wellenlänge im Bereich von 515 nm bis 565 nm. PMMA und PC weisen in diesem Wellenlängenbereich eine homogene Autofluoreszenz auf. Die PS-Folie ist durch helle Einschlüsse gekennzeichnet, die höchstwahrscheinlich beim Herstellungsprozess entstehen. TOPAS hingegen besitzt keine Autofluoreszenz vergleichbar zu Glas.

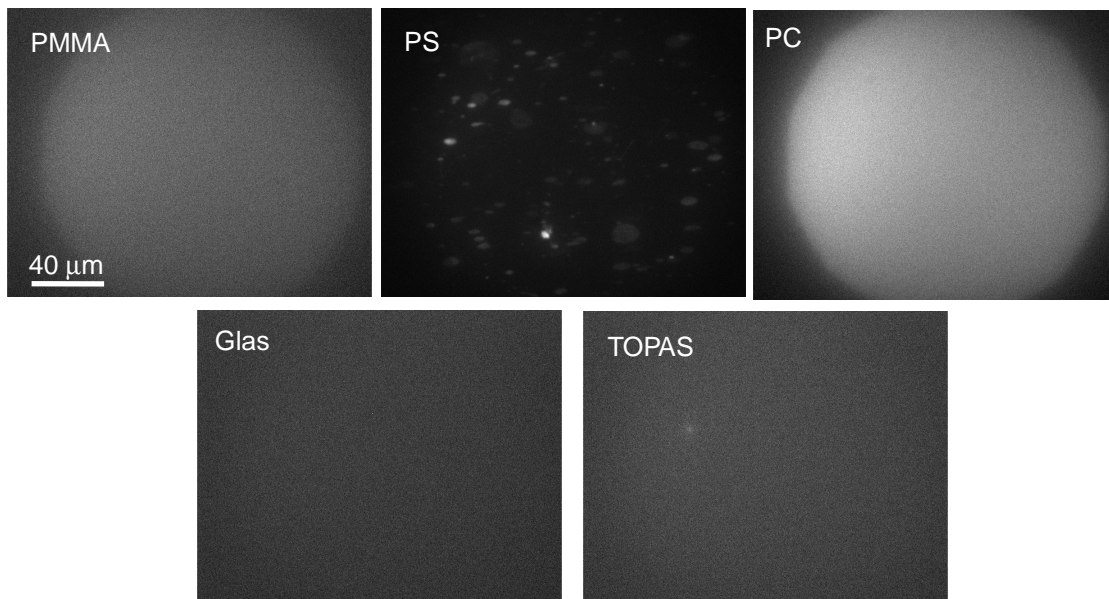


Abbildung 7.3 Kunststoffoberflächen angeregt mit einer Wellenlänge im Bereich von 450 nm bis 490 nm und detektiert im Bereich von 515 - 565 nm.

### 7.1.2. Kontaktwinkelmessungen

Kunststoffe haben hydrophoben Charakter, der je nach Molekülstruktur mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Zur Quantifizierung dieser Tatsache wurde der statische Kontaktwinkel von Wasser auf den verwendeten Kunststoffoberflächen gemessen, wie z. B. beschrieben bei Adamson (Adamson, 1976).

Es wurden sowohl die industriell gefertigten Folien untersucht, als auch das jeweilige Polymer als chemisch reine Substanz aus einer Toluollösung (5 mg/ml) auf ein Deckglas bei 4000 U/min aufgeschleudert. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten lagerten die Substrate mindestens 4 h in Vakuum. Da TOPAS nicht als chemisch reine Substanz bezogen werden kann, wurde Spritzgussgranulat verwendet. Die aufgeschleuderten Polymerschichten haben den Vorteil, dass sie chemisch gut definiert, sehr glatt und frei von Zusätze, wie Weich- oder Blaumacher sind, wie sie in allen handelsüblichen Kunststofffolien zu geringen Anteilen enthalten sind. Da solche Zusätze sich nicht notwendigerweise homogen in der Folie verteilen, sondern sich unter Umständen durch diffusive Prozesse an der Oberfläche akkumulieren, können sie die Oberflächeneigenschaften der Folie und damit den Kontaktwinkel stark beeinflussen.



## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

Die Folien wurden für die erste Messung mit MQ gespült und dann in Anschluss mit Isopropanol, um einen eventuellen Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Kontaktwinkel zu erfassen.

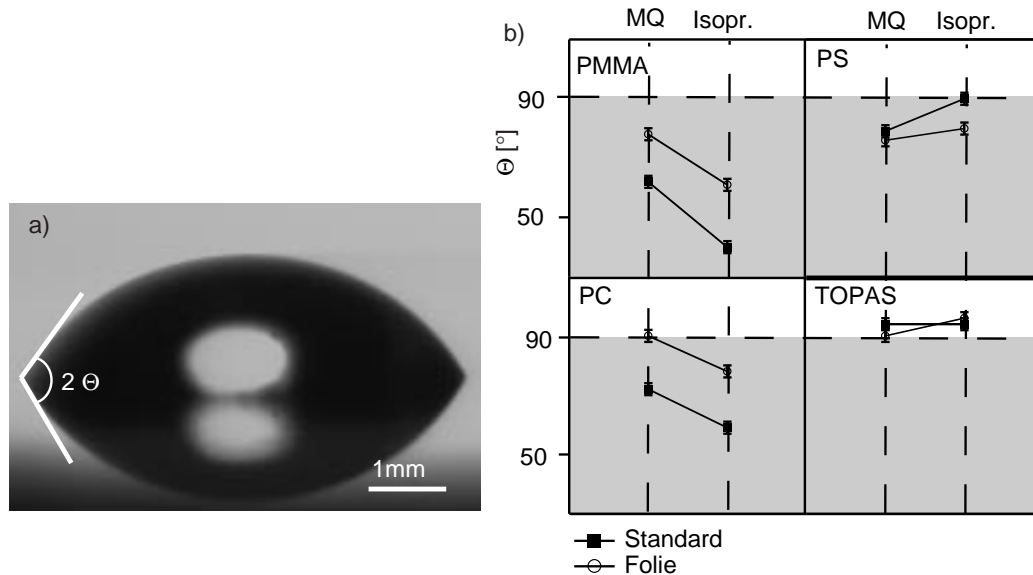


Abbildung 7.4 a) Aus der Aufnahme eines Wassertropfens lässt sich der statische Kontaktwinkel abmessen. Da die hier gezeigte PC-Oberfläche stark spiegelt, ist es günstig, den doppelten Kontaktwinkel zu bestimmen. b) Statischer Kontaktwinkel der verschiedenen Kunststoffoberflächen nach Spülen mit MQ (1) und Isopropanol (2). Die grauen Flächen markieren Bereiche für Kontaktwinkel  $< 90^\circ$ .

In Abbildung 7.4 b) sind die gemessenen Kontaktwinkel zu sehen. Auf PMMA und auf PC wird dieser nach Spülen mit Isopropanol signifikant kleiner. Da PMMA nicht resistent gegen Isopropanol ist, wird diese Oberfläche beim Kontakt mit dem Lösungsmittel angelöst. PC hingegen sollte laut Herstellerangaben nicht in Isopropanol löslich sein.

In diesen beiden Fällen ist der Kontaktwinkel auf den industriell hergestellten Folien deutlich größer, als auf den aufgeschleuderten Filmen. Man kann also davon ausgehen, dass die Oberflächeneigenschaften dieser beiden Folien stark von Zusätzen bestimmt werden. Im Gegensatz hierzu sind die Kontaktwinkel auf den beiden PS-Oberflächen nach dem Spülen mit MQ identisch und unterscheiden sich erst nach Spülen mit Isopropanol. Beide PS-Oberflächen werden durch Spülen mit Isopropanol hydrophober. TOPAS ist die einzige Kunststoffoberfläche, auf der sich der Kontaktwinkel beim Spülen mit Isopropanol nicht ändert und auch kein Unterschied zwischen der aufgeschleuderten Polymerschicht und der

Folie besteht. TOPAS ist mit einem Kontaktwinkel  $> 90^\circ$  das Material mit dem stärksten hydrophoben Charakter.

### 7.2. Lipidbeschichtung von Kunststoffoberflächen

Auf hydrophilen Oberflächen, wie Glas oder Glimmer bilden sich bei Vesikelfusion Lipiddoppelschichten, wohingegen auf stark hydrophoben Oberflächen, wie selbstassemblierten Monolagen von Thiolalkanen, die Bildung von Lipidmonolagen beobachtet (Plant, 1999), (Lingler et al., 1997). Falls sich die Kunststoffoberflächen mit Lipiden beschichten lassen, stellt sich die Frage, ob sich Lipidmono-oder Doppellagen bilden. Insbesondere auf TOPAS ist auf Grund des großen Kontaktwinkels die Bildung einer Monolage nahe liegend.

#### 7.2.1. Vesikelfusion

Zur Beschichtung von Kunststoffoberflächen mit fluiden Lipidschichten wurde Vesikelfusion mit neutralem DOPC und einer kationischen Lipidmischung aus DOPC mit 10 mol% DOTAP in MQ durchgeführt. Zur anschließenden Charakterisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde 1 mol% NBD C12-HPC zugesetzt. In Abbildung 7.5 sind charakteristische Bilder der lipidbeschichteten Oberflächen dargestellt, wobei die beobachteten Intensitäten in jedem Fall wesentlich größer sind als die Hintergrundintensitäten auf Grund von Autofluoreszenz.

PMMA besitzt schlechte optische Eigenschaften und der Lipidfilm erscheint inhomogen. Es fällt auf, dass im Falle von DOPC auf PS das Bild große helle Cluster aufweist, im Fall der kationischen Mischung jedoch nicht. Ein Vergleich mit Abbildung 7.3 legt nahe, dass die Cluster durch Einschlüsse in der Folie sind und der Lipidfilm selber homogen ist. Da der Teil der Folie, der mit der kationischen Mischung beschichtet wurde optisch homogen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Qualität der Folie je nach Herstellung stark schwankt. Auf PC bildet sich in beiden Fällen eine homogen leuchtende Schicht aus. Die Blende ist jedoch leicht überstrahlt auf Grund der Eigenfluoreszenz der PC-Folie. Auf TOPAS bilden beide Lipidmischungen einen optisch homogenen Film und die Bildqualität ist vergleichbar zu Glas.

Auf PC, PS und TOPAS wurde mit Hilfe der FRAP-Technik die Diffusionskonstante und die relative Fluoreszenzerhöhung der Lipidfilme bestimmt, die in Tabelle 7.2 zusammengefasst sind. Auf PMMA wurden auf Grund der qualitativ schlechten Fluoreszenzbilder keine Diffusionsmessungen durchgeführt.

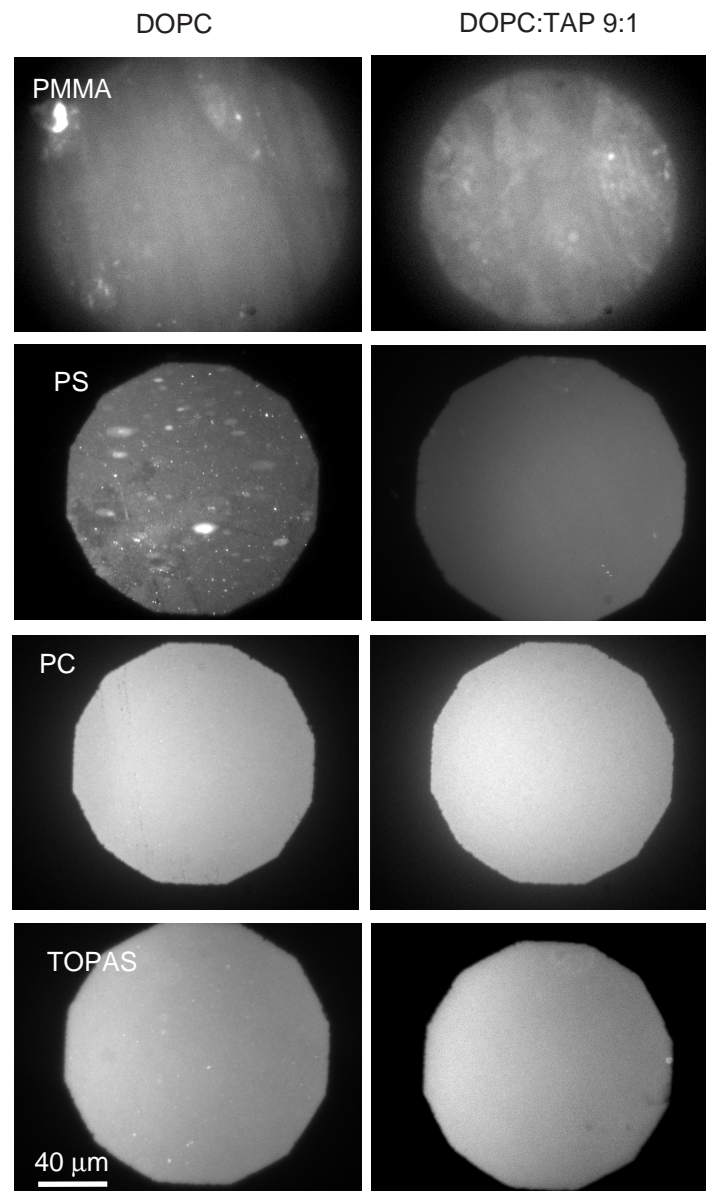


Abbildung 7.5 Fluoreszenzaufnahmen der Lipid-beschichteten Kunststofffolien.

Die gemessenen Diffusionskonstanten der Lipidmoleküle waren auf allen Folien unabhängig von der Lipidmischung. Dies steht im Gegensatz zu Diffusionskonstanten kationischer Membranen auf negativ geladenen Glasoberflächen, die vor allem bei geringen Salzstärken auf Grund der elektrostatischen Anziehung wesentlich geringer sind als für neutrale Lipide (Zantl, 1997). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung zwischen Lipid und Kunststoffoberfläche im Gegensatz zu Glasoberflächen keine elektrostatischen Anteile enthält.

## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

Allgemein sind die gemessenen Diffusionskonstanten auf Kunststoffen wesentlich kleiner als die von Lipiddoppelschichten auf Glas oder polymerbeschichteten Oberflächen, die sich je nach Substrat, Lipid, Puffer und Temperatur im Bereich von 1 - 10  $\mu\text{m}^2/\text{sec}$  befinden (Kühner et al., 1994), (Hetzter et al., 1998), (Merkel et al., 1989). Sie würden jedoch im Größenordnungsbereich von Diffusionskonstanten liegen, die an Lipidmonolagen gemessen wurden (Sigl et al., 1997), (Merkel et al., 1989). Die auf PC und PS gemessenen Diffusionskonstanten sind nur halb so groß, wie die Diffusionskonstante auf TOPAS und zugleich sind die Lipidmoleküle nur auf TOPAS vollständig beweglich, wohingegen auf PC und PS nicht zu vernachlässigende immobile Fraktionen beobachtet werden.

	PS		PC		TOPAS	
	D [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	R [a.u.]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	R [a.u.]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	R [a.u.]
<b>DOPC</b>	0.25	0.76	0.24	0.79	0.45	0.99
<b>DOPC:TA P 9:1</b>	0.27	0.94	0.25	0.72	0.4	0.98

Tabelle 7.2 Werte der Diffusionskonstante  $D$  und der relativen Fluoreszenzerhöhung  $R$  auf PC, PS und TOPAS für DOPC und DOPC:TAP 9:1 in MQ bei  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Falls die Zählraten auf Grund der Autofluoreszenz der Kunststoffoberfläche in derselben Größenordnung liegen, wie die der Fluoreszenzsonde im Lipidfilm (ca. 50.000), wären die gemessenen Werte der relativen Fluoreszenzerhöhung mit Artefakten behaftet. Um dies zu prüfen, wurden die Zählraten der reinen PS und PC-Folie in Anschluss an das jeweilige Experiment vor und nach einem Bleichpuls des Lasers gemessen. In Abbildung 7.6 sind diese Kurven zu sehen. Vor dem Bleichen liegen beide Zählraten um einen Faktor 100 unter denen des Lipidfilmes. Man sieht aber auch deutlich, dass beide Folien Autofluoreszenz aufweisen, die mit dem Laser zerstört werden kann. In Übereinstimmung mit Abbildung 7.3 ist PC stärker autofluoreszent als PS.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch Vesikelfusion im makroskopischen Bereich optisch homogene Lipidfilme auf PC, PS und TOPAS bilden, wobei allerdings unklar bleibt, ob es sich hierbei um Monolagen oder Doppellagen handelt.

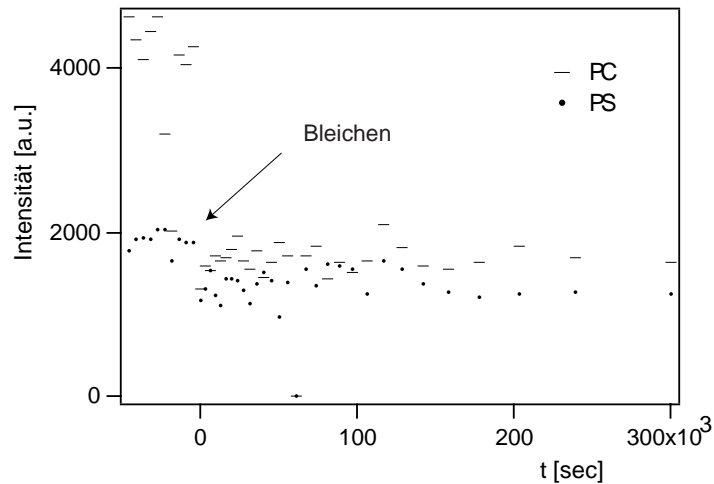


Abbildung 7.6 Zählraten auf Grund der Autofluoreszenz der PC- und PS-Folie vor und nach dem Bleichen. Zum Vergleich: Die Zählraten der Lipidfilme lagen ca. bei 50.000 [a. u.].

Die Bildung von Mehrschichten ist schwer vorstellbar, da solche Schichtstrukturen Stufen auf großen Längenskalen (einige 10-100  $\mu\text{m}$ ) bilden würden, die nicht beobachtet wurden.

### 7.2.2. Benetzung mit Lipiden auf Kunststoffoberflächen

Äquivalent zu 7.2.1 wurde auf PMMA, PS, PC und TOPAS mit neutralem Lipid (DOPC) und einer binären, kationischen Mischung (DOPC + 10 mol% DOTAP) Benetzungsexperimente in MQ durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass bis auf TOPAS alle Oberflächen benetzt werden. Im Fall von PMMA und PS sind die Geschwindigkeiten jedoch nicht reproduzierbar, was unter Umständen auch auf die schlechten optischen Eigenschaften der beiden Folien zurückzuführen sein kann. In Abbildung 7.7 sind die Benetzungsfronten auf diesen drei Folien zu sehen. Die Membran auf PMMA hat wahrscheinlich auf Grund von Oberflächenrauigkeiten der Folie deutliche Defekte. Die Fluoreszenzaufnahmen der Membran auf PS zeigt wie in Abbildung 7.5 und Abbildung 7.3 helle Cluster, die wahrscheinlich Einschlüsse in der Folie sind. Die Membran auf PC ist frei von Störstellen und der Kontrast ausreichend, um die Membran abzubilden.

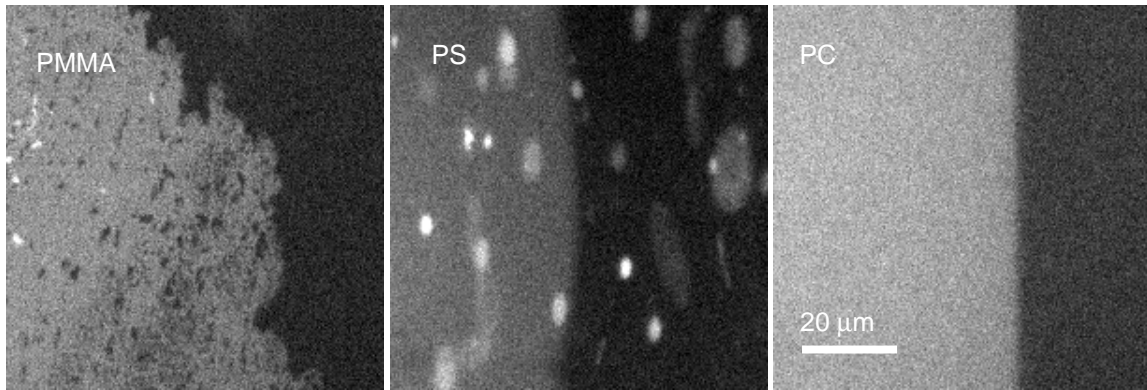


Abbildung 7.7 Fluoreszenzbilder der Membranfront auf PMMA, PS und PC. Auf TOPAS wurde kein Spreiten beobachtet.

In Abbildung 7.8 ist der zeitliche Verlauf der Benetzungsgeschwindigkeit auf PC-Folie dargestellt und es zeigt sich, dass dieser dem  $t^{-1/2}$ -Gesetz folgt, wie auf vielen anderen Oberflächen (vergleiche Kapitel 4). Der kinetische Spreitkoeffizient beträgt für neutrales DOPC  $20 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  und für DOPC + 10 mol% DOTAP  $17 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ . Die Benetzungskinetik

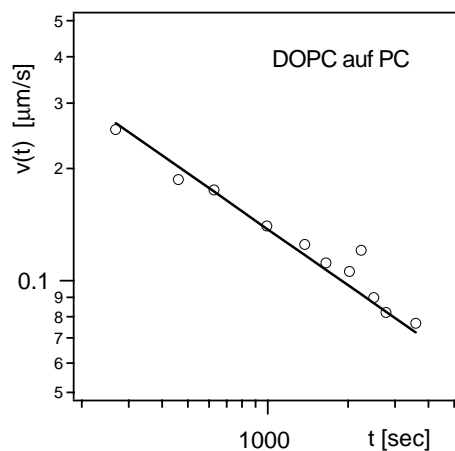


Abbildung 7.8 Die Geschwindigkeit einer DOPC-Membran auf PC folgt einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz (durchgezogene Linie) und es lässt sich der kinetische Spreitkoeffizient bestimmen.

unterscheidet sich somit nicht signifikant für geladene und ungeladene Membranen. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu gemessenen Benetzungsgeschwindigkeiten auf Glas, die sich hier schon bei Zugabe kleiner Mengen kationischer Lipide halbieren (Nissen, 1998) und könnte auf das Fehlen von Ladungen an der Kunststoffoberfläche zurückzuführen sein. Die Benetzungskinetik verhält sich somit konsistent mit der Diffusionskonstante (vergleiche

Kapitel 7.2.1). Da Lipide PC, PS, und PMMA benetzen, kann davon ausgegangen werden, dass sich auf diesen Oberflächen eine Lipiddoppellage ausbildet. Die Tatsache, dass TOPAS nicht benetzt wird, weist auf die Bildung einer Monolage hin.

### 7.2.3. AFM-Aufnahmen der Lipidschicht auf TOPAS

Zur Bestätigung der Annahme, dass sich bei Vesikelfusion auf TOPAS eine Lipidmonolage ausbildet, wurden in Zusammenarbeit mit N. Persike AFM-Aufnahmen von Lipidflecken auf TOPAS-Oberflächen gemacht. Methode und hier verwendeter Aufbau lassen sich in Detail bei Weiss (Weiss, 1997) oder Kacher (Kacher, 2000) finden.

Abbildungen der gekauften Folien zeigten tiefe Rillen und Kratzer in der Oberfläche und sind somit nicht als Substrat geeignet, um Höhenunterschiede von einigen nm zu detektieren. Eine geeignete, glatte TOPAS Oberfläche wurde durch Aufschleudern eines ca. 0.5  $\mu\text{m}$  dicken Filmes auf frisch gespaltenen Glimmer erhalten. Höhen- und Deflektionsbild einer solchen Oberfläche ist exemplarisch in Abbildung 7.9 zu sehen, wobei die mittlere Rauigkeit der Schicht 0.5 nm und die Standardabweichung der Höhe 0.8 nm beträgt. Da sich selbst im Kontaktmodus bei sehr hoher Kraft nur etwa 10 nm tief in die Polymerschicht kratzen lässt, kann davon ausgegangen werden, dass Abbilden im Tapping-Modus die aufgeschleuderte Kunststoffschicht nicht zerstört.

Für die Höhenmessung der Lipidschicht mit dem AFM ist es von Vorteil, wenn die Lipidlage nicht geschlossen ist, sondern sich nur einzelne Lipidflecken auf der Oberfläche gebildet haben. Hierzu wurde Vesikellösung aus DOPC in MQ für nur 1/2 Stunde auf der TOPAS Oberfläche inkubiert und anschliessend mit MQ gespült. Die so entstehenden Lipidflecken konnten nur im Tapping-Modus abgebildet werden, da sie durch ständigen direkten Kontakt mit der Spitze verschoben werden. Gleichzeitig bestand so keine Gefahr, dass die Polymerschicht angekratzt und Artefakte produziert werden. Ein Höhenbild der Lipidflecken sind in Abbildung 7.9 zusammen mit den entsprechenden Höhenprofilen dargestellt.

Die Höhe der Flecken beträgt 2 - 3 nm und es bildet sich auf TOPAS wie vermutet eine Lipidmonolage.

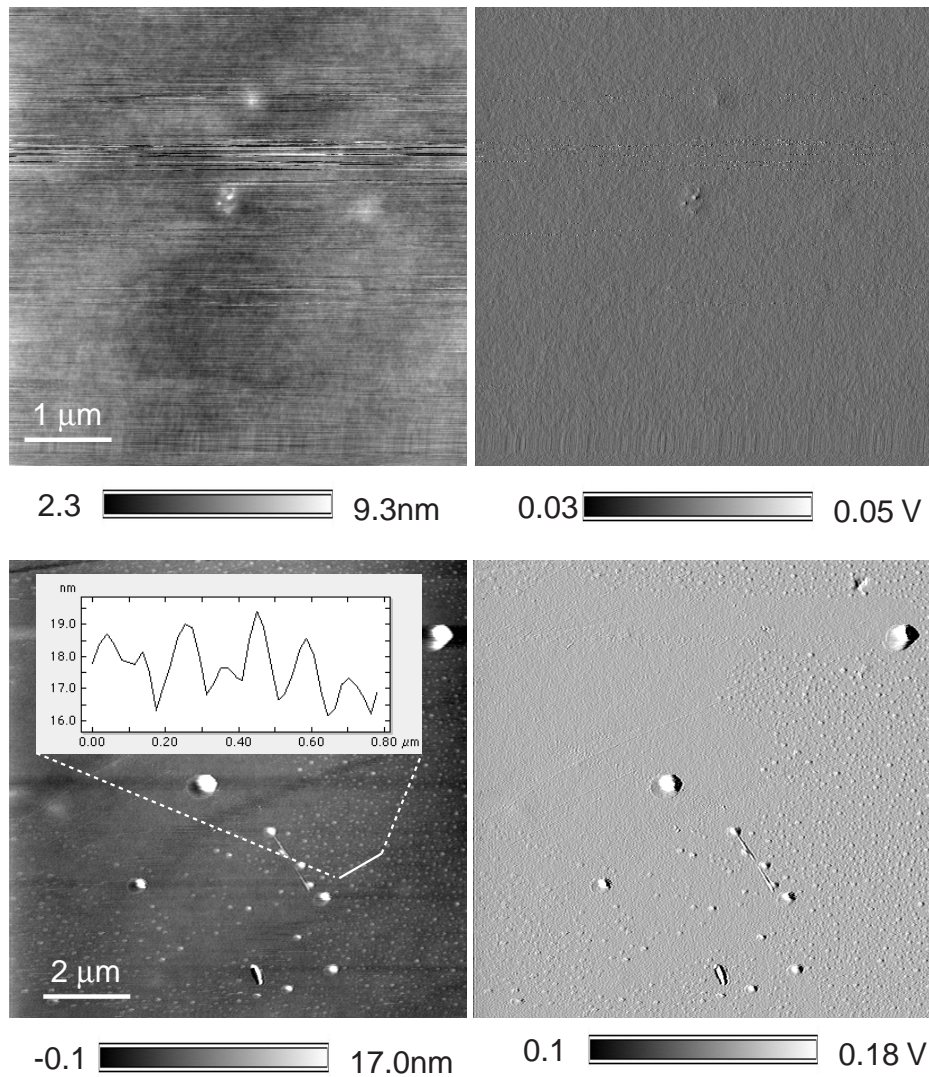


Abbildung 7.9 Oben: Höhen- und Deflektionsbild einer TOPAS-Schicht der Dicke  $0.5 \mu\text{m}$ , die auf frisch gespaltenen Glimmer aufgeschleudert wurde. Die mittlere Rauigkeit der Oberfläche beträgt  $0.5 \text{ nm}$  und die Standardabweichung von der Höhe  $0.8 \text{ nm}$ . Unten: Höhen- und Deflektionsbild der Lipidflecken auf TOPAS. Das Höhenprofil entlang der weißen Linie zeigt, dass die Höhe der Lipidflecken  $2 - 3 \text{ nm}$  beträgt, was der Dicke einer Lipidmonolage entspricht.

### 7.3. Membranspreiten auf gestuften Oberflächen

Die Anwendung einer festkörpergestützten Membran als flüssigkristalline Matrix für Transmembranproteine in der Biosensorik, wirft oft das Problem auf, dass substratständige Seitengruppen der Proteine im direkten Kontakt mit der Festkörperoberfläche denaturieren oder die Membran auf Grund ihrer Größe deformieren. Zur Lösung dieses Problems kann entweder eine Polymerschicht zwischen Membran und Substrat eingeführt werden (vergleiche Kapitel 6) oder das Substrat kann mit Gräben und Taschen im Nanometerbereich versehen



## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

werden, in denen das Protein Platz findet. In diesem Zusammenhang ist das Benetzungsverhalten von Lipidmembranen auf topologisch strukturierten Oberflächen von Interesse, deren Größe im Bereich 10-100 nm liegen.

Als Modellstruktur sollten regelmäßige Stufen dienen, deren Periodizität im Bereich zwischen 50-200 nm liegen. Strukturen dieser Größenordnung können nicht mehr fotolithographisch hergestellt werden, sondern werden in der Halbleitertechnologie standardmäßig mit Elektronenstrahl-Lithographie erzeugt. Da dies für die hier benötigten makroskopischen Bereiche sehr aufwändig ist, wurde eine andere Strategie verfolgt. Si- und  $\text{SrTiO}_3$  Oberflächen können mit Stufen in dem gewünschten Größenbereich strukturiert werden, indem der jeweilige Einkristall entlang einer bestimmten Kristallebene geschnitten und dann bei hohen Temperaturen ausgeheilt wird (Sheiko et al., 1994), (Rehse et al., 2001).

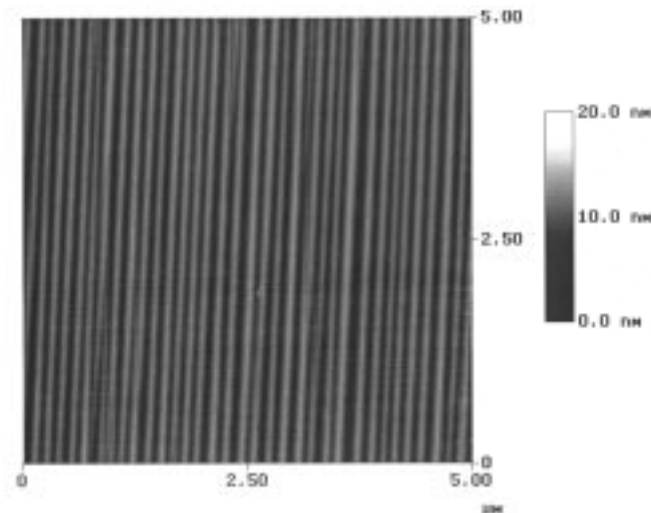


Abbildung 7.10 AFM-Aufnahme eines Siliziumsubstrates mit Stufen im Abstand von 150 nm und einer Tiefe von ca. 15 nm (nach N. Rehse).

Der Si-Kristall muss hierbei im Ultrahochvakuum ausgeheilt werden, da sich sonst sofort eine Oxidschicht auf der Oberfläche bildet und die Stufenbildung verhindert. Siliziumsubstrate können jedoch für die Fluoreszenzmikroskopie nur verwendet werden, wenn sie mit einer Oxidschicht von 100-150 nm versehen sind, da sonst die Fluoreszenzintensität farbstoffmarkierter Moleküle durch Reflexionen ausgelöscht wird (Lambacher und Fromherz, 1996). Die gestuften Siliziumoberflächen lassen sich jedoch nicht oxidieren ohne die Stufen wieder zu zerstören. Als Alternative wurden transparente  $\text{SrTiO}_3$ -Substrate der Gruppe Möller

(Uni Ulm) mit Stufen im Abstand von 40 nm verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese von Phospholipiden nicht benetzt werden.

Von daher wurde dazu übergegangen, die vorhandenen gestuften Einkristalloberflächen in Kunststoff abzuformen. Für Spreitexperimente bot sich PC an, da diese Oberfläche von Lipiden reproduzierbar benetzt wird, wie die Vorarbeiten zeigen. Außerdem wurde TOPAS abgeformt, da es optische Eigenschaften vergleichbar zu Glas besitzt. Darüber hinaus bildet sich hierauf eine fluide und defektfreie Lipidmonolage, auf der adsorbierte Makromoleküle, wie z. B. DNA mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden können.

### 7.3.1. Nanoimprinting von PC und TOPAS

Gestufte Siliziumoberflächen (Abbildung 7.10) der Gruppe Krausch (Uni Bayreuth) wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe Johannsmann (MPI für Polymerforschung in Mainz) durch Heißpressen in PC und TOPAS abgeformt, wie auch beschrieben bei Hamdorf (Hamdorf und Johannsmann, 2000).

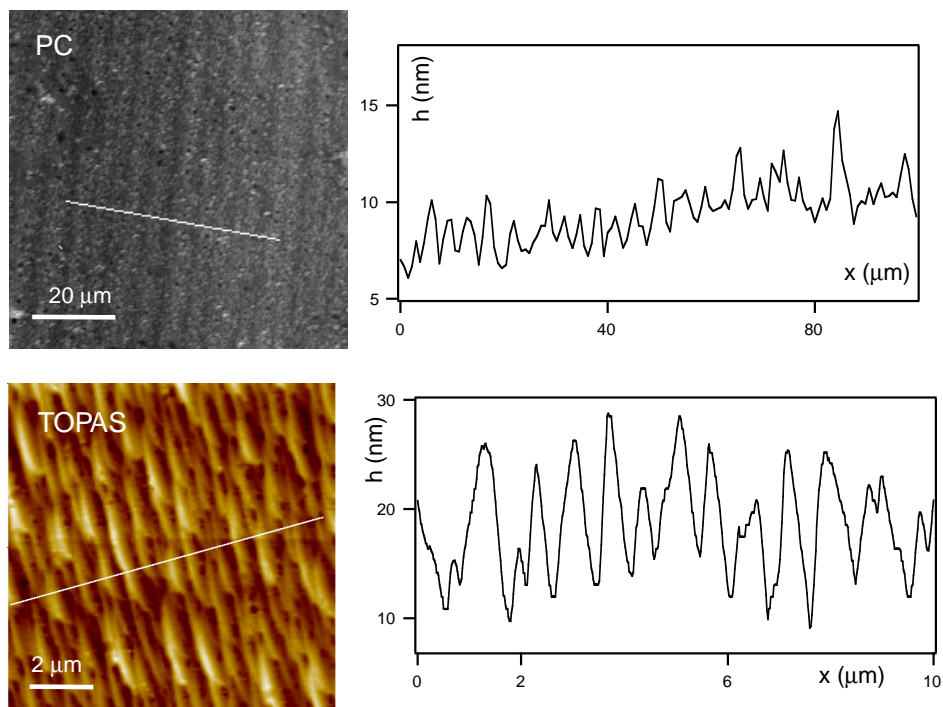


Abbildung 7.11 AFM-Aufnahmen der heißgepressten PC- und TOPAS-Substrate. Nebenstehend ist jeweils das Höhenprofil entlang der gestrichelten Linie abgebildet.

Im Fall von PC wurde die Folie strukturiert, während TOPAS durch Aufschleudern aus einer Toluollösung mit  $c = 100 \text{ mg/ml}$  bei  $1000 \text{ U/min}$  (10 sec) als ca.  $0.5 \text{ μm}$  dicken Film auf ein

Deckglas aufgebracht wurde. Die Substrate wurden auf einen heizbaren Kupferblock gelegt und der Siliziummaster auf einen ebenfalls heizbaren Kupferhalter geklebt, der mit einem Hebel definiert von oben auf das Substrat gedrückt werden kann. Zum Abformen wurden Substrat und Master in Kontakt für 2 h über die Glastemperatur des jeweiligen Kunststoffes geheizt. Für PC erwies sich eine Temperatur von 160°C und für TOPAS 180°C als geeignet. In Abbildung 7.11 sind AFM-Aufnahmen der geprägten Folien zu sehen.

### 7.3.2. Benetzungsexperimente auf gestuften PC-Oberflächen

Auf den gestuften PC-Oberflächen wurden Benetzungsexperimente mit neutralem DOPC in MQ parallel und senkrecht zu den Stufen durchgeführt, wie in Abbildung 7.12 schematisch dargestellt. Es zeigte sich, dass eine senkrecht zu den Stufen orientierte Membran, die Oberfläche nicht benetzt und es gilt  $\beta_{\perp} = 0$ .

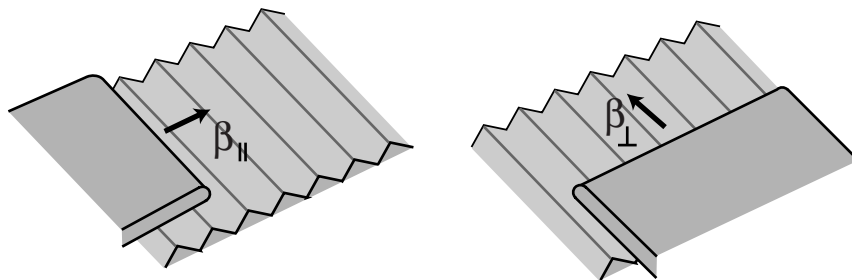


Abbildung 7.12  $\beta_{\parallel}$  bezeichnet den kinetischen Spreitkoeffizienten einer Membran, deren Front parallel zu den Stufen orientiert ist, während  $\beta_{\perp}$  der kinetische Spreitkoeffizient einer Membran ist, deren Front senkrecht zu den Stufen ausgerichtet ist.

Im Fall einer zu den Stufen parallel angeordneten Membranfront wurde Spreiten beobachtet. Wie in Abbildung 7.13 dargestellt, folgt die Zeitabhängigkeit der Benetzungsgeschwindigkeit einem  $t^{1/2}$ -Gesetz und der kinetische Spreitkoeffizient konnte zu  $\beta_{\parallel} = 2.8 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  bestimmt werden. Dieser Wert ist um einen Faktor 10 kleiner als der Wert auf glatten PC-Oberflächen  $\beta_{PC}$  (vergleiche Kapitel 7.2.2).

Der Einfluss der Substratstruktur auf die Adhäsionsenergie zwischen Membran und Substrat wurde von Swain und Andelman für verschiedene Topologien (Swain und Andelman, 1999) theoretisch untersucht. Im Fall einer strukturierten Oberfläche tritt die Biegesteifigkeit der Membran mit der attraktiven Van der Waals-Wechselwirkung der Wand in Konkurrenz.

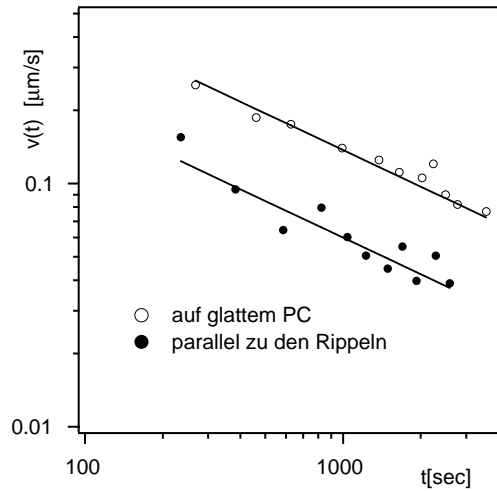


Abbildung 7.13 Zeitlicher Verlauf der Benetzungsgeschwindigkeit einer DOPC-Membranfront auf der gestuften PC-Oberfläche, die parallel zu den Stufen orientiert ist. Zum Vergleich ist die Kinetik der Membran auf einer glatten PC-Oberfläche abgebildet.

Das anziehenden Wandpotential favorisiert Substrat-Membran Abstände, die die Membran dazu zwingen, sich der Form der Oberfläche anzupassen. Dem entgegen steht die Biegesteifigkeit, die die Membran glättet und diese somit weiter von der Wand entfernt. Aus diesem Wechselspiel resultiert ein repulsiver Beitrag  $\Delta S$  zur Adhäsionsenergie. Unter der Annahme, dass der Wert des Reibungskoeffizienten unverändert bleibt, lässt sich aus dem gemessenen Spreitkoeffizienten  $\beta_{\parallel}$  dieser negative Beitrag zu  $\Delta S \approx -0.9 \cdot S$  abschätzen, wobei S die Adhäsionsenergie im Fall der glatten Oberfläche ist.

$\beta_{PC}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	$20 \pm 1$
$\beta_{\parallel}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	$2.8 \pm 0.5$
$\beta_{\perp}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	0

Tabelle 7.3 Werte des kinetischen Spreitkoeffizienten  $\beta$  parallel und senkrecht zu den Stufen und auf unstrukturiertem PC.

Da die Ergebnisse von Swain und Andelman auf kleine Änderungen der Adhäsionsenergie  $|\Delta S| \ll S$  beschränkt sind, lassen sie sich nicht quantitativ auf die hier gemessenen kinetischen Spreitkoeffizient anwenden. Der physikalische Grund für die Verringerung des kinetischen Spreitkoeffizienten ist jedoch sicherlich die Biegesteifigkeit der Membran, die die Benetzung einer gestuften Oberfläche energetisch ungünstiger macht.

Eine Verringerung der Adhäsionsenergie auf gestuften Oberflächen erklärt jedoch nicht die Tatsache, dass keine Benetzung senkrecht zu den Stufen beobachtet werden konnte. Ein möglicher Grund hierfür könnte die nötige Verformung des mizellaren Randes der Membran auf sehr kleiner Skala sein, die zusätzlich Energie erfordert. So liegen die beobachteten Radien von Poren in Experimenten zur Bestimmung der Linienspannung in der Größenordnung einiger  $\mu\text{m}$  (Zhelev und Needham, 1993), (Sandré et al., 1999).

### 7.4. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der Kunststoffe PMMA, PS, PC und TOPAS erwiesen sich PMMA und PS als ungeeignet für die Fluoreszenzmikroskopie. Die PC-Folie wies zwar eine homogene Hintergrundfluoreszenz auf, konnte aber trotzdem als Substrat verwendet werden. Die optische Qualität von TOPAS ist im sichtbaren Bereich vergleichbar zu Glassubstraten. Durch Vesikelfusion konnten optisch homogene Lipidfilme auf PC, PS und TOPAS aufgebracht werden, wobei die Beweglichkeiten der Lipidmoleküle deutlich kleiner sind als auf Glas. Im Gegensatz zu TOPAS sind auf PC und PS nicht zu vernachlässigende immobile Fraktionen in den Filmen neutraler und kationischer Lipide vorhanden.

PMMA, PS und PC-Folien werden von neutralen und kationischen Membranen benetzt, wobei die Benetzungsgeschwindigkeiten allerdings nur auf PC reproduzierbar einem  $t^{-1/2}$ -Gesetz folgen. Auf TOPAS hingegen wurde für keine der verwendeten Lipide Membranspreiten beobachtet. Wie Messungen des Kontaktwinkels  $\Theta$  zeigten, ist TOPAS das einzige Material mit  $\Theta > 90^\circ$  und AFM-Aufnahmen von Lipidflecken auf dieser Oberfläche zeigten die Entstehung einer Lipidmonolage in Übereinstimmung mit dem stark hydrophoben Charakter des Materials.

Von einem Siliziummaster konnten erfolgreich Stufen der Periodizität 150 nm in die Kunststoffe TOPAS und PC geprägt werden. Mit den gestuften PC-Folien standen somit Substrate zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächentopologien auf das Benetzungsverhalten zur Verfügung. Befand sich die Membranfront parallel zu den Stufen, verringerte sich der kinetische Spreitkoeffizient um einen Faktor 10 im Vergleich zu glatten PC-Oberflächen, während im Falle einer senkrecht zu den Stufen orientierten Membranfront kein Spreiten beobachtet wurde. Dieses Verhalten kann qualitativ mit einer Verringerung der Adhäsionsenergie auf Grund der Substrattopologie erklärt werden.

## 7. Festkörpergestützte Membranen auf Kunststoffoberflächen

---

Mit TOPAS liegt somit ein Kunststoff vor, der zum einen optische Qualitäten, wie Glas besitzt und zum anderen mit einer fluiden und homogenen Lipidmonolage funktionalisiert werden kann. Darüber hinaus lässt er sich durch Heißpressen strukturieren. Dies eröffnet interessante Anwendungen für die optische Untersuchung biologischer Makromoleküle, die auf der Lipidmonolage adsorbiert werden können.

## 8. Ausblick

Mit der Kunststoffoberfläche TOPAS liegt ein optisch hochwertiger Kunststoff vor, der sich mit einer fluiden homogenen Lipidmonolage funktionalisieren lässt und darüber hinaus durch Heißpressen auf Nanometerskala strukturiert werden kann. Dies eröffnet zum einen interessante praktische Anwendungen als Bestandteil eines Biosensor, aber auch Zugang zu wissenschaftlichen Fragestellungen, wie z. B. die Untersuchung biologischer Makromoleküle in zwei Dimensionen unter einer Vorzugsrichtung.

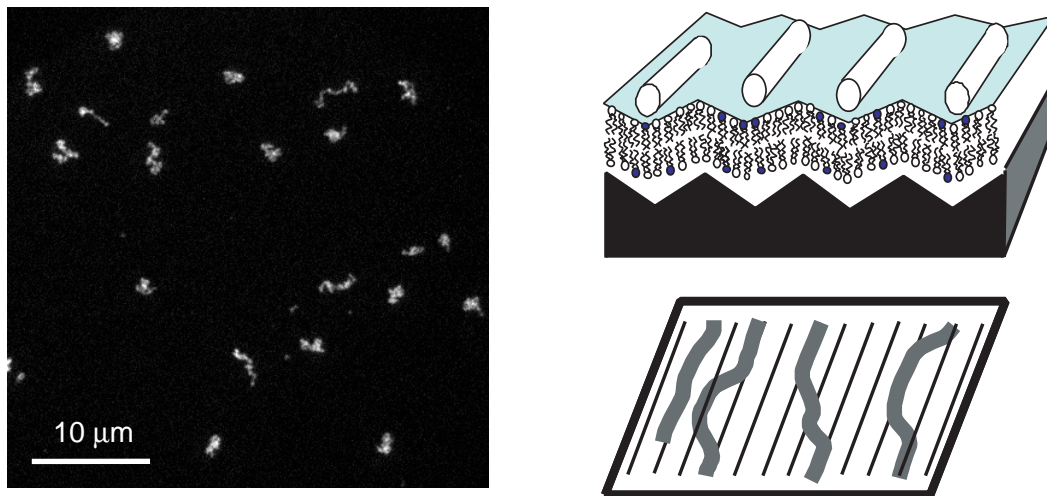


Abbildung 8.1 Links: Fluoreszenzaufnahme von DNA Moleküle adsorbiert auf einer kationischen Lipidmonolage auf TOPAS. Rechts: Ordnen sich die Moleküle gemäß der unterliegenden Substrattopologie, können die entstehenden DNA-Konformationen analog zu Flusslinien in Supraleitern mit der stochastischen KPZ-Gleichung beschrieben werden.

So ist in Abbildung 8.1 eine Fluoreszenzaufnahme von DNA Molekülen auf einer TOPAS-Oberfläche, funktionalisiert mit einer kationischen Lipidmonolage zu sehen. Strecken sich die Polymere auf Grund der Substrattopologie in eine Richtung, sollten die entstehenden Konturen mit der KPZ-Gleichung beschrieben werden können (Kardar und Zhang, 1987). Dies könnte ein interessantes zweidimensionales System sein, auf das die stochastische Version dieser Differentialgleichung angewendet werden kann.

## 9. Anhang

### 9.1. Verwendete Abkürzungen

DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3- Phosphocholin
DOTAP	1,2-Dioleoyl -3-Trimethylammonium-Propan
DMTAP	1,2-Dimyristoyl -3-Trimethylammonium-Propan
DMPC	1,2-Dimyristol-sn-Glycero-3-Phosphocholin
Texas Red® DHPE	Texas Red® 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt
BODIPY®C5-HPC	2-(4,4-difluoro-5-(4-phenyl- 1,3-butadienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl) -1-hexadecanoyl-sn-glycero- 3-phosphocholine
BODIPY®C11	4,4-difluoro-5-(4-methoxyphenyl) -4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene- 3-undecanoic acid
NBD C12-HPC	2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl- 1-hexadecanoyl-sn-glycero- 3-phosphocholine
MQ	Millipore: zweifach entionisiertes Wasser
FRAP	Fluoreszenzerholung nach Fotobleichen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PC	Polycarbonat
AFM	Kraftmikroskop
DNA	Desoxyribonukleinsäure



**9.2. Substanzen (falls nicht anders beschrieben)**

Chemikalien	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Küvettenreiniger (Hellmanex)	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Deckgläser	Zefa, München, Deutschland
Siliziumscheiben mit 150 nm Oxid	kostenlos zur Verfügung gestellt von Wacker, Burghausen, Deutschland
carboxilierte Polystyrolkugeln	Merck eurolab, Frankreich
Fotolack (Microposit S1818)	Shipley, Coventry, Großbritannien
Entwickler (AZ 423 K)	Höchst, Frankfurt am Main, Deutschland
Aluminiumdraht	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polylysin	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Hyaluronsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polymethylmethacrylat (MW: 120.000)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polystyrol (MW: 500.000)	Fluka, Buchs, Schweiz
Polycarbonat (MW nicht spezifiziert)	kostenlos zur Verfügung gestellt : von Dow Deutschland Inc., Schwalbach, Deutschland,

TOPAS (5013 Granulat)	TICONA GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Polymethylmethacrylat-Folie (selber gepresst zu $d = 150 \mu\text{m}$ )	Gummi+Kunststoffe, München, Deutschland
Polystyrol-Folie (Norflex, $d = 150 \mu\text{m}$ )	Norddeutsche Seekabelwerke, Nordenham, Deutschland
Polycarbonat-Folie (Makrofol DE1-1 SC, $d = 175 \mu\text{m}$ )	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
TOPAS-Folie: (5013 $d = 170 \mu\text{m}$ )	TICONA GmbH Frankfurt am Main, Deutschland

### 9.3. Geräte

Lackschleuder (Delta 10 BM)	B.L.E. Laboratory Equipment, Radolfzell, Deutschland
Maskenjustieranlage (KSM MJB3)	Karl Süß KG, Garching, Deutschland
UV Lampe (Hg-Xe Bogenlampe, 200 W)	L.O.T.-Oriol GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aufdampfanlage (Auto 306)	Edwards, Marburg, Deutschland
Ellipsometer	Plasmos, München, Deutschland
UV-Spektrometer (Lambda 15)	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Millipore Anlage (Milli Q Plus 185)	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland

## 10. Literatur

1. Adamson, A. W. (1976): *Physical Chemistry of Surfaces*. John Wiley & Sons, New York.
2. Albersdörfer, A. (1999): Über das Quellverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften ultradünner, festkörpergestützter Polyelektrolytfilme. Doktorarbeit, Technische Universität München.
3. Albersdörfer, A., G. Mathe, K. R. Neumaier, P. Paduschek und E. Sackmann (1998): High resolution imaging microellipsometry of soft surfaces at 3  $\mu\text{m}$  lateral and 5  $\text{\AA}$  normal resolution. *Applied physics letters* **72**: 2930-2932.
4. Albersdörfer, A. und E. Sackmann (1999): Swelling behaviour and viscoelasticity of ultrathin grafted hyaluronic acid films. *European Physical Journal B* **10**: 663-672.
5. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson (1983): *The Cell*. Garland Publishing, New York.
6. Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger und W. W. Webb (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* **16**: 1055-1069.
7. Barabasi, A.-L. und H. E. Stanley (1995): *Fractal Concepts in Surface Growth*. Cambridge University Press, Cambridge.
8. Becker, H. und C. Gärtner (2000): Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* **21**: 12-26.
9. Besseling, N. A. M. (1997): Theory of Hydration Forces between Surfaces. *Langmuir* **13**: 2113-2122.

10. Beyer, D., G. Elender, W. Knoll, M. Kühner, S. Maus, H. Ringsdorf und E. Sackmann (1996): Influence of Anchor Lipids on the Homogeneity and Mobility of Lipid Bilayers on Thin Polymer Films. *Angewandte Chemie, International Edition in English* **35**: 1682-1685.
11. Boxer, S. G. (2000): Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* **4**: 704-709.
12. Bruinsma, R., A. Behrisch und E. Sackmann (2000): Adhesive switching of membranes: Experiment and theory. *Physical Review E* **61**: 4253-4267.
13. Buldyrev, S. V., A.-L. Barabasi, F. Caserta, S. Havlin, H. E. Stanley und T. Vicsek (1992): Anomalous interface roughening in porous media: Experiment and model. *Physical Review A* **45**: R8313-R8316.
14. Charitat, T., E. Bellet-Amalric, G. Fragneto und F. Graner (1999): Adsorbed and free bilayers at the solid-liquid interface. *European Physical Journal B* **8**: 585-593.
15. Cieplak, M. und M. O. Robbins (1990): Influence of contact angle on quasistatic fluid invasion of porous media. *Physical Review B* **41**: 11508-11521.
16. Cohen, J. A. und M. Cohen (1981): Adsorption of monovalent and divalent cations by phospholipid membranes. *Biophysical Journal* **36**: 623-651.
17. Dichtl, M. (1997): Anwendung kolloidaler Sonden zur Untersuchung der Reptation von Aktinfilamenten. Diplomarbeit, Technische Universität München.
18. Dietrich, C., R. Merkel und R. Tampé (1997): Diffusion measurement of fluorescence-labeled amphiphilic molecules with a standard fluorescence microscope. *Biophysical Journal* **72**: 1701-1710.

19. Dubé, M., M. Rost, K. R. Elder, M. Alava, S. Majaniemi und T. Ala-Nissala (1999): Liquid Conservation and Nonlocal Interface Dynamics in Imbibition. *Physical Review Letters* **83**: 1628-1631.
20. Elender, G. (1996): Präparation und Charakterisierung ultradünner, hydrophiler Polymerfilme an der Wasser-Luft-Grenzfläche und auf Festkörperoberflächen. Doktorarbeit, Technische Universität München.
21. Elender, G., M. Kühner und E. Sackmann (1996): Functionalisation of Si/SiO<sub>2</sub> and glass surfaces with ultrathin dextane films and deposition of lipid bilayers. *Biosensors and Bioelectronics* **11**: 565-577.
22. Elender, G. und E. Sackmann (1994): Wetting and Dewetting of Si/SiO<sub>2</sub>-wafers by free and lipid-monolayer covered aqueous solution under controlled humidity. *Journal de Physique 2* **4**: 455-479.
23. Erbacher, P., M.-T. Bousser, J. Raimond, M. Monsigny, P. Midoux und A. C. Roche (1996): Gene transfer by DNA/Glycosylated Polylysine Complexes into Human Blood Monocyte-Derived Macrophages. *Human Gene Therapy* **7**: 721-729.
24. Evans, E. und A. Yeung (1994): Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape. *Chemistry and Physics of Lipids* **73**: 39-56.
25. Family, F. (1990): Dynamic Scaling and Phase Transitions in Interface Growth. *Physica A* **168**: 561-580.
26. de Gennes, P. G. (1985): Wetting : statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics* **57**: 827-863.
27. Groves, J. T., N. Ulman und S. G. Boxer (1997): Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Support. *Science* **275**: 651-653.

28. Hamdorf, M. und D. Johannsmann (2000): Surface-rheological measurements on glass forming polymers based on the surface tension driven decay of imprinted corrugation gratings. *Journal of Chemical Physics* **112**: 4262-4270.
29. He, S., G. L. Kahanda und P. Wong (1992): Roughness of Wetting Fluid Invasion in Porous Media. *Physical Review Letters* **69**: 3731-3733.
30. Hetzter, M., S. Heinz, S. Grage und T. M. Bayerl (1998): Asymmetric Molecular Friction in Supported Phospholipid Bilayers revealed by NMR Measurements of Lipid Diffusion. *Langmuir* **14**: 982-984.
31. Hillebrandt, H., G. Wiegand, M. Tanaka und E. Sackmann (1999): High Electric Resistance Polymer/Lipid Composite Films on Indium-Tin-Oxide Electrodes. *Langmuir* **15**: 8451-8459.
32. Israelachvili, J. und H. Wennerström (1996): Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* **379**: 219-224.
33. Israelachvili, J. N. (1991): Intermolecular and surface forces. Academic Press, London.
34. Jacobs, K., S. Herminghaus und K. R. Mecke (1998): Thin Liquid Polymer Films Rupture via Defects. *Langmuir* **14**: 965-969.
35. Joanny, J. F. und P. G. de Gennes (1984): A model for contact angle hysteresis. *Journal of Chemical Physics* **81**: 552-562.
36. Joanny, J. F. und M. O. Robbins (1990): Motion of a contact line on a heterogeneous surface. *Journal of Chemical Physics* **92**: 3206-3212.
37. Kacher, C. (2000): Struktur und Dynamik von Kinesin - eine kraftmikroskopische Untersuchung. Doktorarbeit, Technische Universität München.

38. Kalb, E., S. Frey und L. K. Tamm (1992): Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1103**: 307-16.
39. Kardar, M., G. Parisi und Y.-C. Zhang (1986): Dynamic Scaling of Growing Interfaces. *Physical Review Letters* **56**: 889-892.
40. Kardar, M. und Y.-C. Zhang (1987): Scaling of Directed Polymers in Random Media. *Physical Review Letters* **58**: 2087-2090.
41. Klein, J., E. Kumacheva, D. Mahalu, D. Perahia und L. J. Fetters (1994): Reduction of frictional forces between solid surfaces bearing polymer brushes. *Nature* **370**: 634-636.
42. Koenig, B. W., S. Krueger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton und K. Gawrisch (1996): Neutron Reflectivity and Atomic Force Microscopy Studies of a Lipid Bilayer in Water Adsorbed to the Surface of a Silicon Single Crystal. *Langmuir* **12**: 1343-1350.
43. Kühner, M. (1992): Photobleichuntersuchungen der lateralen Diffusion in Lipidschichten auf Polymeren und von Polymeren in Lipidschichten. Doktorarbeit, Technische Universität München.
44. Kühner, M., R. Tampé und E. Sackmann (1994): Lipid mono- and bilayer supported on polymer films: composite polymer-lipid films on solid substrates. *Biophysical Journal* **67**: 217-226.
45. Lambacher, A. und P. Fromherz (1996): Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Applied Physics A* **63**: 207-216.
46. Lau, A. L. Y., A. C. McLaughlin, R. C. McDonald und S. McLaughlin (1980): The Adsorption of Alkaline Earth Cations to Phosphatidyl Choline Bilayer Membranes: A Unique Effect of Calcium. *Advances in Chemistry* **188**: 49-56.

47. Lee, G. M., A. Ishihara und K. A. Jacobson (1991): Direct observation of Brownian motion in lipids in a membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 6274-6278.
48. Lee, R. J. und L. Huang (1996): Folate-targeted, Anionic Liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for Tumor Cell-specific Transfer. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 8481-8487.
49. Leger, L. und J. F. Joanny (1992): Liquid spreading. *Reports on Progress in Physics* **55**: 431-486.
50. Lingler, S., I. Rubinstein, W. Knoll und A. Offenhäuser (1997): Fusion of Small Unilamellar Lipid Vesicles to Alkanethiol and Thiolipid Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* **13**: 7085-7091.
51. Lipowsky, R. und U. Seifert (1991): Adhesion of Vesicles and Membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **202**: 17-25.
52. Lohmeyer, S. (1984): Die speziellen Eigenschaften der Kunststoffe. Expert Verlag, Grafenau.
53. Mahanty, J. und B. W. Ninham (1976): Dispersion Forces. Academic Press, New York.
54. Maier, B. und J. Rädler (1999): Conformation and Self-Diffusion of Single DNA Molecules Confined to Two Dimensions. *Physical Review Letters* **82**: 1911-1914.
55. Majewski, J., J. Y. Wong, C. K. Park, M. Seitz, J. N. Israelachvili und G. S. Smith (1998): Structural Studies of Polymer-Cushioned Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **75**: 2363-2367.
56. Martys, N., M. Cieplak und M. O. Robbins (1991): Critical Phenomena in Fluid Invasion of Porous Media. *Physical Review Letters* **66**: 1058-1061.



57. McConnell, H. M., T. H. Watts, R. M. Weis und A. A. Brian (1986): Supported planar membranes in studies of cell-cell-recognition in the immune system. *Biochimica et Biophysica Acta* **846**: 95-106.
58. McLaughlin, A., C. Grathwohl und S. McLaughlin (1978): The Adsorption of Divalent Cations to Phosphatidylcholine Bilayer Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **513**: 338-357.
59. Merkel, R., E. Sackmann und E. Evans (1989): Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers. *Journal de Physique* **50**: 1535-1555.
60. Moser, K., J. Kertesz und D. E. Wolf (1991): Numerical solution of the Kardar-Parisi-Zhang equation in one, two and three dimensions. *Physica A* **178**: 215-226.
61. Nissen, J. (1998): Benetzung rauher und mikrostrukturierter Festkörperoberflächen durch Phospholipidmembranen. Diplomarbeit, Technische Universität München.
62. Parsegian, A., N. Fuller und R. P. Rand (1979): Measured work of deformation and repulsion of lecithin bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 2750-2754.
63. Parsegian, V. A. und D. Gingell (1972): On the interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges. *Biophysical Journal* **12**: 1192-1204.
64. Pfeiffer, W., S. König, J. F. Legrand, T. Bayerl, D. Richter und E. Sackmann (1993): Neutron Spin Echo Study of Membrane Undulations in Lipid Multibilayers. *Europhysics Letters* **23**: 457-462.
65. Plant, A. L. (1999): Supported Hybrid Bilayer Membrane as Rugged Cell Membrane Mimics. *Langmuir* **15**: 5128-5135.

66. Rädler, J. und E. Sackmann (1997): Functionalization of solids by ultrathin soft polymer films and polymer/lipid film composites: modeling of cell surfaces and cell recognition processes. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2**: 330-336.
67. Rädler, J. O., H. Strey und E. Sackmann (1995): On the phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir* **11**: 4539-4548.
68. Raphael, R. M. und R. E. Waugh (1996): Accelerated Interleaflet Transport of Phosphatidylcholine Molecules in Membranes Under Deformation. *Biophysical Journal* **71**: 1374-1388.
69. Rehse, N., C. Wang, M. Geoghegan, R. Magerle und G. Krausch (2001): Stability of thin polymer films on a corrugated substrate. *European Physical Journal E* **4**: 69-76.
70. Russell, T. P. (1990): X-ray and neutron reflectivity for the investigation of polymers. *Materials Science Reports* **5**: 171-271.
71. Sackmann, E. (1996): Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**: 43-48.
72. Sackmann, E. und M. Tanaka (2000): Supported membranes on soft polymer cushions: fabrications, characterization and applications. *Trends in Biotechnology* **18**: 58-63.
73. Saffmann, P. G. und M. Delbrück (1975): Brownian Motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **72**: 3111-3113.
74. Sahimi, M. (1995): Flow and Transport in Porous Media and Fractured Rock. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
75. Salafsky, J., J. T. Groves und S. G. Boxer (1996): Architecture and Function of Membranes in Planar Supported Bilayers. *Biochemistry* **35**: 14773-14781.

76. Salditt, T. (2000): *in Vorbereitung*: .
77. Sandré, O., L. Moreaux und F. Brochard-Wyart (1999): Dynamics and transient pores in stretched vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 10591-10596.
78. Schilling, J. (1999): Entwicklung einer Echtzeit-Bildverarbeitungssoftware und digitaler Videoaufnahmetechnik zur quantitativen Mikrorheometrie von Aktin-Netzwerken. Diplomarbeit, Technische Universität München.
79. Sheiko, S. S., M. Möller, E. M. C. M. Reuvekamp und H. W. Zandbergen (1994): Evaluation of the probing profile of scanning force microscopy tips. *Ultramicroscopy* **53**: 371-380.
80. Sigl, H., G. Brink, M. Seufert, M. Schulz, G. Wegner und E. Sackmann (1997): Assembly of polymer/lipid composite films on solids based on hairy rod LB-films. *European Biophysical Journal* **25**: 249-259.
81. Sinha, S. K., E. B. Sirota, S. Garoff und H. B. Stanley (1988): X-ray and neutron scattering from rough surfaces. *Physical Review B* **38**: 2297-2311.
82. Soumpasis, D. M. (1983): Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* **16**: 95-97.
83. Spatz, J. P., T. Herzog, S. Mößmer, P. Ziemann und M. Möller (1999): Micellar Inorganic-Polymer Hybrid Systems-A Tool for Nanolithography. *Advanced Materials* **11**: 149-153.
84. Strey, H. (1993): Bestimmung elastischer Eigenschaften von Zellmembranen und Zytoskelett mittels Flickerspektroskopie. Doktorarbeit, Technische Universität München.

85. Swain, P. S. und D. Andelman (1999): The Influence of Substrate Structure on Membrane Adhesion. *Langmuir* **15**: 8902-8914.
86. Tatulian, S. A. (1993): Ionization and Ion Binding. *In: Phospholipids Handbook*. Herausgegeben von G. Cevc. Marcel Dekker, New York. 511-552.
87. Theato, P. und R. Zentel (2000): Formation of Lipid Bilayers on a New Amphiphilic Polymer Support. *Langmuir* **16**: 1801-1805.
88. Tolan, M. (1999): X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films. Springer, Heidelberg.
89. Vogel, M. (2000): Röntgenbeugung an hochorientierten Phospholipidmembranen. Doktorarbeit, Universität Potsdam.
90. Wagner, M. L. und L. K. Tamm (2000): Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophysical Journal* **79**: 1400-1414.
91. Washburn, E. W. (1921): The Dynamics of Capillary Flow. *Physical Review* **17**: 273-283.
92. Weber, L. und W. Ehrfeld (1998): Mikroabformung - Verfahren, Werkzeuge, Anwendungen. *Kunststoffe* **88**: 1791-1802.
93. Weiss, I. (1997): Charakterisierung von festkörperadsorbierten Proteinen und Lipidschichten mit em Rasterkraftmikroskop. Diplomarbeit, Technische Universität München.
94. Zantl, R. (1997): Untersuchung an Lipid-DNA-Kondensaten mittels Kleinwinkelröntgenstreuung und Kalorimetrie und Diffusionsmessungen von DNA-ds-Oligonukleotiden auf festkörpergestützten Membranen aus kationischen Lipiden im Bereich des Phasenüberganges. Diplomarbeit, Technische Universität München.

95. Zhelev, D. V. und D. Needham (1993): Tension-stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tension. *Biochimica and Biophysica Acta* **1147**: 89-104.

96. Ziemann, F. (1997): Untersuchung der lokalen viskoeleastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer. Doktorarbeit, Technische Universität München.

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:**

Nissen, J., S. Gritsch, G. Wiegand und J. O. Rädler (1999): Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - Concepts towards self-healing membranes. *European Physical Journal B* **10**: 335-344.

Nissen, J., K. Jacobs und J. O. Rädler (2001): Interface Dynamics of Lipid membrane Spreading on Solid Surfaces. *Physical Review Letters*: **86** 1904-1907.