Hochohmige porenüberspannende Lipidmembranen: Elektrochemische Untersuchungen zur Aktivität von Gramicidin und Bacteriorhodopsin

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eva Katharina Schmitt
aus Schweinfurt

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Prof. Dr. Ulf Diederichsen

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Doktorarbeit wurde an der Universität Regensburg, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, im November 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem begonnen und von April 2006 bis März 2009 an der Georg-August-Universität Göttingen, Fakultät für Chemie, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie bei Prof. Dr. Claudia Steinem fertiggestellt.

Meinen Eltern

Abstract. To study transmembrane proteins they need to be integrated in a lipid environment to preserve their functionality. For this purpose, model membranes have been developed which allow the investigation of ion channels and transporters in a defined environment. In recent years, a new artificial membrane system based on porous substrates has been developed, which exhibits on the one hand robustness and long-term stability and on the other hand allows for monitoring ion channel activity down to the single channel level. The drawback of this system is that transmembrane proteins can only be inserted from aqueous solution by dilution of a detergent solution. Furthermore, high protein densities, that are required for the investigation of membrane transporters with low turn over rates, cannot be obtained.

Thus, the aim of this work was to develop a method to prepare lipid membranes on porous substrates, which allows the insertion of transmembrane proteins with high density. For this purpose, liposomes were used to generate lipid bilayers on gold coated porous alumina substrates, which were functionalised with the spacer lipid (cholesterylpolyethylen-oxy)thiol CPEO3. Highly insulating and long-term stable pore-spanning membranes were obtained. By means of electrical impedance spectroscopy the membrane capacitance and resistance were elucidated. The obtained specific capacitance of $(0{,}5 \pm 0{,}1)$ µF cm^{-2} is in agreement with the expected value for lipid bilayer membranes. The membrane resistance was in the range of $10^6 – 10^8$ Ω. Partially ruptured membranes can be re-established by the fusion of vesicles. The pore-suspending membranes are very susceptible to the insertion of the detergent octyl-polyoxyetylene (o-POE), the membrane soluble proton carrier carbonyl-cyanide-m-chloro-phenylhydrazone (CCCP) and the bacterial outer membrane protein OmpF.

The suitability of the established method for the transfer of integral membrane proteins from proteoliposomes into pore-spanning membranes was demonstrated by employing the well-investigated model ion channel gramicidin D and the light-driven proton transporter bacteriorhodopsin. The distinct ion channel activity of gramicidin D was investigated by electrical impedance spectroscopy. Gramicidin D-doped pore spanning membranes allowed for the read out of distinct ion channel properties such as the well-known selectivity for monovalent cations and the ion channel block by Ca^{2+} in an integral manner. Furthermore, the mass transport – a result of the concentration gradient towards the Gramicidin D-doped membrane – was clearly discriminated. As an example for a transporter molecule the light driven proton pump Bacteriorhodopsin was integrated into pore-spanning membranes. Its specific activity was investigated by means of light induced photocurrent measurements.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Artifizielle Lipidmembranen 1

1.1.1 Freitragende Lipidmembranen 2

1.1.2 Festkörperunterstützte Lipidmembranen 4

1.1.3 Festkörperunterstützte Lipidmembranen auf Basis von *Spacer*-Molekülen 6

1.1.4 Porenüberspannende Lipidmembranen 7

1.2 Modell-Transmembranproteine 9

1.2.1 Gramicidin 10

1.2.2 *Outer membrane protein* F (OmpF) 12

1.2.3 Bacteriorhodopsin 14

2 Zielsetzung 17

3 Materialien und Methoden 19

3.1 Impedanzspektroskopie 19

3.1.1 Entwicklung und Anwendung 19

3.1.2 Prinzip der Impedanzspektroskopie 20

3.1.3 Physikalische Grundlagen 21

3.1.4 Darstellung von Impedanzspektren 22

3.1.5 Auswertung von Impedanzspektren 23

3.1.5.1 Prinzipien der Datenanpassung 23

3.1.5.2 Physikalische Netzwerkelemente zum Erstellen von Ersatzschaltkreisen zur Beschreibung der Modellmembranen 24

3.1.6 Versuchsdurchführung 29

3.2 Messung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin 32

3.2.1 Allgemeine Anmerkungen zur Messung lichtinduzierter Ströme 32

3.2.1.1 Prinzip der Messung von Photoströmen 32

3.2.1.2 Auswertung von Photostrommessungen 33

3.2.2 Messung von Protonenpumpströmen an BR-haltigen Membranen 34

3.3 UV/VIS-Spektroskopie 35

3.4 CD-Spektroskopie 36

3.5 Präparative Methoden 39

3.5.1 Herstellung von porösem Aluminat mit hochgeordneter Porenstruktur 39

3.5.1.1 Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate 39

3.5.1.2 Herstellung siebartiger poröser Aluminate 42

3.5.2 Präparation von platinierten Platinelektroden 45

3.5.3 Präparation von Ag/AgCl Elektroden 46

3.5.4 Isolierung der Purpurmembranen aus *Halobacterium salinarium* 46

3.5.4.1 Kultivierung 46

3.5.4.2 Fraktionierung der Zellmembranen 47

3.5.5 Synthese von Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) 48

3.5.6 Präparation von CPEO3-Monoschichten auf Gold 52

3.5.7 Präparation von CPEO3-Monoschichten auf porösem Aluminat und Silizium....53

3.5.8 Präparation von unilamellaren Vesikeln 53

3.5.8.1 Extrusionsmethode 53

3.5.8.2 *Reverse phase*-Methode 54

3.5.8.3 Elektroformations-Methode 54

3.5.9 Präparation von Lipiddoppelschichten auf Gold 55

3.5.10 Präparation von Lipiddoppelschichten auf Glas 56

3.5.11 Präparation von Lipiddoppelschichten auf porösem Aluminat 57

3.5.12 Präparation von Lipiddoppelschichten auf porösem Silizium 58

4 Festkörperunterstützte und porenüberspannende Lipidmembranen 59

4.1 Strategie zur Etablierung porenüberspannender und festkörperunterstützter Lipidmembranen 59

4.2 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium 62

4.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung und Untersuchung der lateralen Mobilität durch FRAP 62

4.2.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen 64

4.3 Impedanzverhalten von Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden 66
4.3.1 Elektrisches Modell festkörperunterstützter Lipidmembranen 66
4.3.2 Impedanzverhalten CPEO3-funktionalisierter Goldelektroden 68
4.3.3 Impedanzverhalten festkörperunterstützter Lipidmembranen 70
4.4 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten porösen Aluminaten mit durchgehender Porenstruktur 73
4.4.1 Aufbau isolierender Lipiddoppelschichten durch Vesikelfusion 73
4.4.2 Elektrisches Modell zur Beschreibung porenüberspannender Membranen 75
4.4.3 Impedanzverhalten porenüberspannender Lipidmembranen 77
4.4.3.1 Impedanzspektren mit zwei Dispersionen 78
4.4.3.2 Kinetik des Bildungsprozesses 80
4.4.3.3 Stabilität 82
4.4.3.4 Vesikelfusion auf bereits bestehenden Lipidmembranen 83
4.4.3.5 Elektrische Dichtigkeit 84
4.4.3.6 Einfluss von Detergenz und Detergenz-solubilisiertem OmpF 85
4.5 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten porösen Aluminaten mit flächenbegrenzter Siebstruktur 87
4.5.1 Poröse Aluminate mit flächenbegrenzter Siebstruktur 88
4.5.1.1 Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop 88
4.5.1.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen 89
4.5.2 Elektrisches Modell des Systems zur Datenanalyse 90
4.5.3 Impedanzverhalten der Lipidmembranen 94
4.6 Diskussion 100
4.6.1 Elektrische Modelle zur Beschreibung der Lipidmembranen 100
4.6.2 Aufbau von Lipidmembranen basierend auf CPEO3-funktionalisierten Substraten 102
4.6.3 Eigenschaften der Lipidmembranen 108

5 Funktionalität von Gramicidin D in den Modellmembranen 115

5.1 CD-spektroskopische Untersuchungen an Gramicidin D-dotierten Vesikeln 115

5.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen zur Kanalaktivität in porenüberspannenden Lipidmembranen 118

5.2.1 Elektrisches Modell einer ionenkanalhaltigen porenüberspannenden Membran 118

5.2.2 Einfluss von Alkalikationen 120

5.2.3 Einfluss von Calciumionen 125

5.2.4 Kinetik der Fusion Gramicidin D-haltiger Vesikel 127

5.2.5 Betrachtung zur Diffusion monovalenter Kationen an Gramicidin D-haltigen Membranen 130

5.3 Diskussion 139

6 Funktionalität von Bacteriorhodopsin in den Modellmembranen 147

6.1 Visualisierung BR-haltiger porenüberspannender Membranen 147

6.2 Theoretische Betrachtung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin in Modellsystemen 151

6.2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Modellbetrachtung 151

6.2.2 Modell 1: Protonenpumpströme in Anwesenheit eines begrenzenden Kondensators 153

6.2.3 Modell 2: Protonenpumpströme in Anwesenheit eines begrenzenden Ohmschen Widerstands 157

6.2.4 Modell 3: Protonenpumpströme in Anwesenheit einer begrenzenden Parallelschaltung aus Kondensator und Ohmschem Widerstand 160

6.2.5 Simulation des Einflusses eines Dämpfungsglieds auf die Photostromantwort . 165

6.3 Untersuchung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin an Modellmembranen 167

6.3.1 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen Membranen adsorbiert an *painted membranes* auf Goldelektroden 168
6.3.2 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen festkörper-unterstützten Membranen 180
6.3.3 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen porenüber-spannenden Membranen 186
6.4 Diskussion 195
6.4.1 Immobilisierung BR-haltiger Membranen an *painted membranes* 195
6.4.2 Transfer von Bacteriorhodopsin aus Proteoliposomen in Modellmembranen ... 201

7 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick 207

8 Zusammenfassung 211

9 Literaturverzeichnis 213

10 Anhang 231

10.1 Gleichung zur Beschreibung des Einschaltstroms unter Einfluss eines Dämpfungsglieds 231
10.2 Ersatzschaltbilder 231
10.3 Symbolverzeichnis 233
10.4 Abkürzungsverzeichnis 234
10.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 235
10.6 Materialien 237
10.7 Geräte 237

1 Einleitung

1.1 Artifizielle Lipidmembranen

Lipidmembranen sind in ihrer natürlichen Form ein komplexes Gebilde aus Lipiden und Proteinen, die das Innere einer Zelle gegen ihren Außenraum abgrenzen und so eine Barriere für Zellorganellen, Moleküle und Ionen bilden. Der Transport von Nährstoffen und Ionen über die Zellmembran wird durch die darin integrierten Proteine vermittelt, entweder aktiv durch Energieverbrauch oder passiv. Lange Zeit war der Aufbau der Biomembranen nicht vollständig geklärt, erst 1972 wurde von Singer und Nicolson (1972) das bis heute gültige *fluid mosaic*-Modell aufgestellt. Darin werden die Lipide als zweidimensionales Lösungsmittel für Membranproteine in Form einer Doppelschichtstruktur beschrieben, wobei beide Komponenten laterale Mobilität besitzten. Die Erforschung von Aufbau und Funktion biologischer Membranen ist bis heute hochaktuell. Dahingehend wird z. B. im Rahmen der *raft*-Hypothese diskutiert, inwiefern definierte Membranbereiche Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen. Umso erstaunlicher ist es, dass bereits vor der wegweisenden Veröffentlichung des *fluid mosaic*-Modells artifizielle Membransysteme etabliert wurden, in denen die komplexe Zusammensetzung von Biomembranen auf wenige, definierte Komponenten reduziert wurde. Die Intention dabei war, einzelne Bestandteile der Membranen sowie Transportprozesse über die Membran zu erforschen. Je nach Forschungsschwerpunkt werden unterschiedliche Anforderungen an die Modellmembranen gestellt, was dazu führte, dass bis heute verschiedene Systeme etabliert wurde. Als einfaches Modell sind Liposomen zu nennen, sphärische Gebilde aus Lipiddoppelschichten, welche Biomembranen insofern gut nachbilden, dass beide Membranhälften von einem wässrigen Medium umgeben sind. Liposomen liegen meist als wässrige Suspension vor, weshalb viele Messmethoden, insbesondere die zur Grenzflächencharakterisierung nicht eingesetzt werden können. Im Folgenden werden artifizielle Membranen vorgestellt, die im Gegensatz zu Liposomen auf einem Substrat verankert sind, wobei besonders auf ihre Anwendung eingegangen wird.

1.1.1 Freitragende Lipidmembranen

Freitragende Lipidmembranen wurden schon in den 1960er Jahren entwickelt. Das Prinzip besteht darin, eine Lipiddoppelschicht über einer Öffnung von 0,1 – 2 mm Durchmesser in einer hydrophoben Teflonfolie aufzubauen, die als Trennwand zwischen zwei elektrolytgefüllten Kammern dient. Müller und Rudin (Müller et al., 1963) entwickelten eine nach ihnen benannte Methode, nach der Lipide z. B. mit *n*-Dekan solubilisiert und über die Öffnung in der Teflonfolie gestrichen werden. Unter Verdrängung des Lösungsmittels (Ausdünnen) bildet sich eine Lipiddoppelschicht, die im Lichtmikroskop schwarz erscheint. Davon leitet sich der Name der als *black lipid membranes* (BLMs) bekannten Modellmembranen ab. Die in der Randregion verbleibenden Lösungsmittelreste werden als Plateau-Gibbs-Grenze bezeichnet.

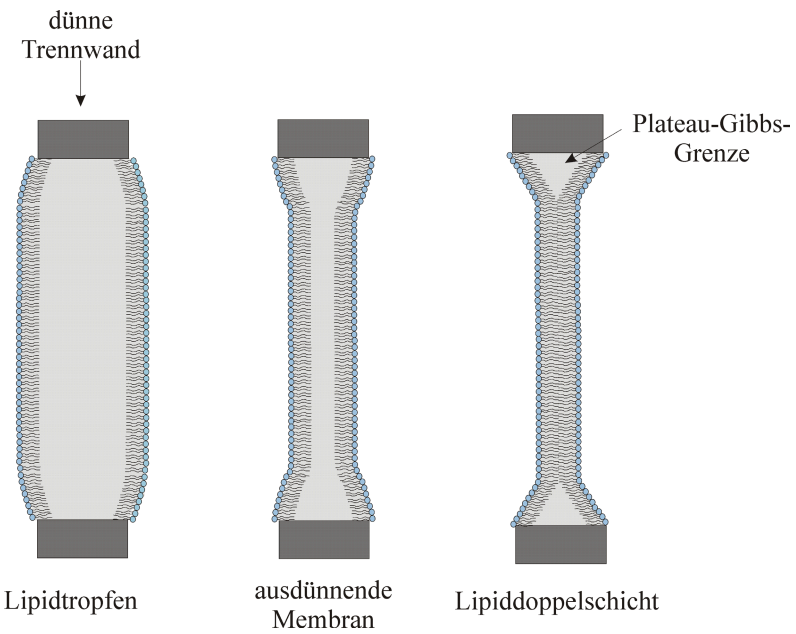


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der BLM-Bildung nach Müller-Rudin (1963).

Die freistehenden Membranen wurden dahingehend weiterentwickelt, dass durch alternative Methoden nahezu lösungsmittelfreie Systeme erhalten wurden. White (1974) hat die BLM-Bildung nach Müller-Rudin so abgeändert, dass die Lipidmembranen unter Verwendung längerkettiger Alkane, z. B. *n*-Oktadekan gebildet werden und das verbleibende Lösungsmittel durch schrittweises Senken der Temperatur als feste Tropfen in der Membran fixiert wird (*solvent „freeze-out“*). Montal und Müller (1972) entwickelten eine elegantere Methode, um lösungsmittelfreie BLMs zu erhalten. Die in einem leicht flüchti-

gen Lösungsmittel solvatisierten Lipide werden an der Wasser-Luft-Grenzfläche der Elektrolytlösung gespreitet, die zunächst knapp unterhalb des Lochs in der Teflonfolie liegt. Wird der Flüssigkeitsspiegel graduell angehoben, so bildet sich beiderseits der Öffnung ein monomolekularer Lipidfilm, der sich zur Doppelschicht vereint. Diese Methode bietet die Möglichkeit, asymmetrische Membranen zu erzeugen.

Nach den oben genannten Methoden werden die freistehenden Membranen über relativ großen Öffnungen (bis 2 mm) aufgespannt, welches zu einer geringen mechanischen Stabilität von nur wenigen Stunden führt. In den letzten Jahren wurden freistehende Membranen an Materialien mit sehr viel kleineren Löchern entwickelt, die dadurch erheblich stabiler sind. White et al. (2007) nutzten Nanoporen in Glasträgern von 100 – 400 nm Durchmesser und generierten Lipiddoppelschichten mit Widerständen von mehreren Gigaohm, die bis zu zwei Wochen stabil sind. Die Lipidmembranen sind trotz der kleinen Öffnung sehr beweglich, wie in einer *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Studie gezeigt wurde. Einen interessanten Ansatz verfolgten auch Sondermann et al. (2006), die mit Unterdruck große unilamellare Vesikel (GUVs) auf ein 1 µm großes Loch in einem Kunststoffchip saugen, wobei die Vesikel platzen und eine isolierende Membran bilden.

Freistehende Membranen sind besonders zur Untersuchung von Transmembranproteinen geeignet, da sie auf beiden Seiten ein wässriges Kompartiment besitzen, welches die funktionelle Integration der Moleküle erlaubt, die häufig große extramembranständige Domänen aufweisen. Die Integration von Ionenkanälen erfolgt spontan, nachdem die durch ein Detergenz solubilisierten Moleküle (z. B. OmpF) in das wässrige Medium gegeben wurden, wodurch das Detergenz stark verdünnt wird und unter seine kritische Mizellkonzentration fällt (Rostovtseva et al., 2002). Alternativ können Transmembranproteine (z. B. spannungsgesteuerte Natriumkanäle), die empfindlicher gegenüber Detergenzien sind, in Liposomen rekonstituiert und durch Fusion der Liposomen mit der freistehenden Membran integriert werden (Zhang et al., 2007). Meist werden sog. *voltage-clamp*-Experimente, d. h. Messungen in Anwesenheit einer Gleichspannung, zur Detektion der Leitfähigkeit von einzelnen Kanälen durchgeführt. Ferner ist es möglich, in Anwesenheit eines Ionengradienten Potentialdifferenzen aufzubauen, die eine Aussage zur Ionenselektivität des Kanals liefern (Miedema et al., 2004).

1.1.2 Festkörperunterstützte Lipidmembranen

Festkörperunterstützte Membranen sind Lipiddoppelschichten, die auf einem Festkörper immobilisiert werden, wobei für ihre Herstellung eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung steht. Dabei können prinzipiell zwei Fälle unterschieden werden. Zum einen können festkörperunterstützte Membranen auf Substraten mit hydrophilen Oberflächen aufgebracht werden, zum anderen werden metallische Oberflächen als unterliegender Festkörper genutzt.

Häufig dienen Glimmer, Siliziumdioxid oder auch Indiumzinnoxid als Substrate, die leicht hydrophilisiert werden können. Darauf kann die Immobilisierung einer Lipidschicht mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik erfolgen (Blodgett, 1935). Das hydrophile Substrat wird in einem ersten Schritt vertikal aus einem wassergefüllten Trog gezogen, auf dessen Wasseroberfläche Lipide gespreitet wurden. Ist der Oberflächendruck ausreichend groß (45 mN m^{-1}), adsorbieren die Lipide über ihre hydrophilen Kopfgruppen an der Substratoberfläche und bilden eine monomolekulare Lipidschicht. Durch erneutes Eintauchen des nun hydrophoben Substrats wird eine zweite Monoschicht abgeschieden, so dass eine Lipiddoppelschicht entsteht. Die Langmuir-Blodgett-Technik ist insbesondere für Fettsäuren geeignet, während viele Phospholipide nicht eingesetzt werden können (Roberts, 1990). Alternativ dazu kann das Substrat für den zweiten Übertrag horizontal zur Wasseroberfläche platziert und durch diese gestoßen werden (Langmuir und Schäfer, 1938). Diese Variante ist für weitaus mehr Lipide geeignet. Der Vorteil beider Techniken besteht darin, dass asymmetrisch zusammengesetzte Lipidfilme erhalten werden können.

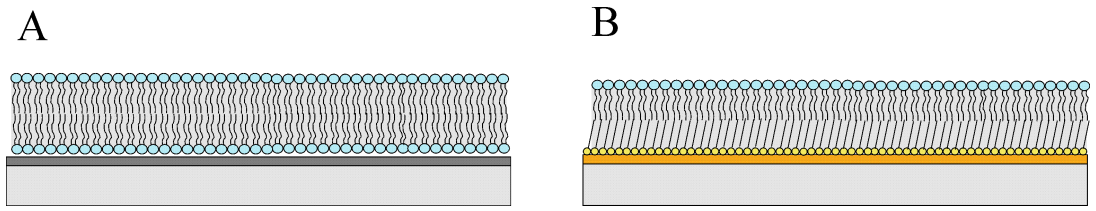


Abb. 1-2: Festkörperunterstützte Membranen, die **A** nach der Langmuir-Blodgett-Technik oder durch Fusion von Vesikeln auf einer hydrophilen Oberfläche (z. B. Glas, Glimmer oder Siliziumdioxid) bzw. **B** auf Gold aus einer chemisorbierten Alkanthiolmonolage und einer zweiten Lipidschicht erhalten wurden.

Im Gegensatz zu der eher aufwendigen Übertragtechnik, bei der die Doppelschicht in zwei Schritten hintereinander aufgebaut wird, liegen in einem alternativen Präparationsansatz schon Lipiddoppelschichten in Form von unilamellaren Vesikeln vor (Cremer und Boxer,

1999; Wiegand et al., 2002). Die Vesikel treten über Adhäsionskräfte mit der hydrophilen Substratoberfläche in Wechselwirkung. Sind diese Kräfte groß genug, platzen die Vesikel auf. Dies kann forciert werden, indem in Anwesenheit von Ca^{2+} oder mit Lipiden gearbeitet wird, die über funktionelle Gruppen starke Wechselwirkungen mit dem Festkörper eingehen. Nach den Gesetzmäßigkeiten der Selbstorganisation (*self assembly*) von Lipiden in wässrigen Medien, nach denen das System eine Minimierung der Grenzfläche zwischen Wasser und hydrophoben Molekülteilen anstrebt, wird durch Spreiten und Fusion der Vesikel eine geschlossene Doppelschicht ausgebilden. Dieser Prozess ist nach Untersuchungen mittels dissipativer Quarzmikrowaagetechnik (QCM-D) oder Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gut verstanden (Keller et al., 2000).

Neben hydrophilen Oberflächen werden auch Goldoberflächen oder Quecksilbertropfen (Becucci et al., 2008) genutzt, um festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten aufzubauen. Die starken quasikovalenten Wechselwirkungen zwischen Gold und schwefelhaltigen Gruppen erlauben die Immobilisierung einer Monoschicht aus Thiolipiden oder Alkanthiolen (Ulman, 1996). Eine zweite Monolage aus Lipiden kann durch das Spreiten von Vesikeln erhalten werden (Plant, 1999; Steinem et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, in *n*-Dekan oder Ethanol gelöste Lipide auf die Monoschicht aufzubringen und anschließend Wasser zuzugeben (Florin und Gaub, 1993; Raguse et al., 1998). Dabei wird das Lösungsmittel stark verdünnt und die Lipide bilden durch Selbstorganisation eine zweite Lipidschicht aus. Diese unter Verwendung von *n*-Dekan erhaltenen Membranen werden auch als *painted membranes* bezeichnet.

Festkörperunterstützte Membranen zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus. Sie eignen sich je nach unterliegendem Substrat für eine Reihe von oberflächenanalytischen und elektrochemischen Methoden. Atomar glatte Oberflächen wie Glimmer oder Siliziumdioxid auf Siliziumeinkristallen werden eingesetzt, um die Wechselwirkungen von peripheren Membranproteinen wie z. B. Annexin A2 mit der Lipidmembran mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) zu untersuchen (Menke et al., 2005). Diese Substrate werden häufig auch zur Untersuchung von Membranen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder bildgebender Ellipsometrie (*imaging ellipsometry*) genutzt (Faiss et al., 2007). Goldunterstützte Membranen erlauben eine elektrochemische Charakterisierung mittels Impedanzspektroskopie sowie die Untersuchung mittels QCM oder QCM-D und SPR (Herrig et al., 2006).

Der große Nachteil der festkörperunterstützten Membranen liegt darin, dass ihre Membranunterseite direkt an das Substrat statt an ein wässriges Kompartiment grenzt und somit die natürliche Umgebung von Transmembranproteinen nur schlecht nachstellen. Unter diesem Aspekt wurden Lipidmembranen entwickelt, die zwar durch einen Festkörper gestützt werden, aber unter Verwendung geeigneter Moleküle wie etwa *Spacer*-Lipiden räumlich von diesem getrennt sind.

1.1.3 Festkörperunterstützte Lipidmembranen auf Basis von *Spacer*-Molekülen

Spacer-Moleküle sind aus einem hydrophoben, membranintegrativen Teil und einem hydrophilen Abstandshalter (*Spacer*) aufgebaut, der meist eine schwefelhaltige Gruppe trägt, um eine Verankerung mit einer Goldoberfläche zu erlauben. Sie bilden die Basis von Lipidmembranen, die je nach Länge des hydrophilen Ankers 10 – 40 Å vom Festkörper getrennt sind, welches die Ausbildung eines wässrigen Reservoirs zwischen Goldoberfläche und Membran erlaubt. Dies verhalf den als *tethered membranes* (engl. *tether*: Leine, Spielraum) bekannten Lipiddoppelschichten zu ihrem Namen.

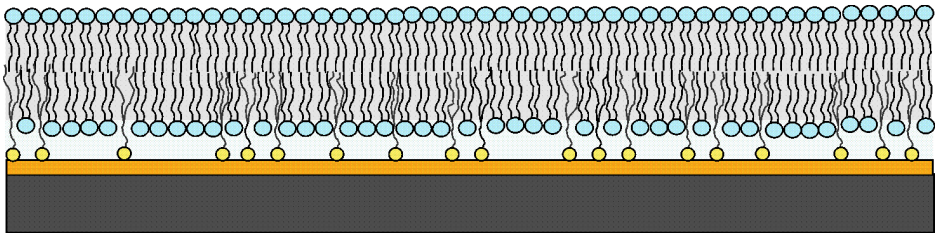


Abb. 1-3: Schematische Darstellung einer *tethered membrane*. Die *Spacer*-Lipide sind über eine Thiolfunktion auf einer Goldelektrode immobilisiert. Durch die Fusion von Vesikeln oder mittels der *painting*-Technik wird eine Lipiddoppelschicht gebildet.

In den letzten Jahren wurde eine enorme Anzahl verschiedener Systeme entwickelt. In den meisten Fällen basiert der Abstandshalter auf einer aus Ethylenoxy-Einheiten aufgebauten Kette, an die Fettsäureketten kovalent gebunden sind. Auf Grund ihrer Länge bilden *Spacer*-Moleküle durch Chemisorption häufig nur lückenhafte Schichten auf Gold, wie es in Abb. 1-3 schematisch dargestellt ist. Durch Spreiten von Vesikeln oder mit Hilfe der *painting*-Methode können isolierende Lipiddoppelschichten erhalten werden (Raguse et al., 1998; Schiller et al., 2003). Ein weiterer Ansatz zur Präparation von *tethered membranes*

greift auf Abstandshalter zurück, die anstelle von hydrophoben Fettsäureketten einen Cholesterinrest tragen (Williams et al., 1997). Der Gruppe um Jeuken gelang die funktionelle Integration einer bakteriellen Cytochrom *b*-Oxidase (Erbe et al., 2007; Jeuken et al., 2006). Während die *Spacer*-Moleküle in den bisher genannten Arbeiten ungerichtet an eine Goldoberfläche chemisorbieren, entwickelten Jenkins et al. (1999; 2002) eine Methode, nach der Thiole durch sog. *microcontact printing* in einem definierten Muster auf Goldelektroden aufgebracht werden. Die Lücken mit einer Kantenlänge von 20 µm können mit kurzen, hydrophilen Thiolen, z. B. Mercaptoethanol aufgefüllt werden. Durch Fusion von Liposomen entsteht eine Lipiddoppelschicht, die in den hydrophilen Bereichen ein wässriges Reservoir besitzt, das nicht von Abstandshaltern durchzogen ist und damit die ungehinderte Integration von Ionenkanälen erlaubt. Es besteht auch die Möglichkeit, *Spacer*-Lipide, die eine aktivierte Carboxylsäuregruppe tragen, zunächst in Vesikel zu integrieren. Durch Fusion dieser Vesikel auf einer Amin-funktionalisierten Oberfläche wird eine Lipidmembran erhalten, welche über die Abstandshalter kovalent mit dem Substrat verankert ist (Rossi et al., 2007).

Cornell et al. (1997) gingen noch einen Schritt weiter und funktionalisierten die Abstandshalter mit Ionenkanälen, die damit direkt in die Lipidmembran integriert sind. Der Gruppe um Cornell gelang es, *tethered membranes* bezüglich der Eigenschaften des wässrigen Reservoirs detailliert zu charakterisieren (Krishna et al., 2003; 2001; Raguse et al., 1998). Sie zeigte, dass das Reservoir eine weitaus kleinere Leitfähigkeit für Ionen besitzt als die Elektrolytlösung über der Membranoberfläche. Dennoch ist dieses Membransystem geeignet, die Aktivität von Ionenkanälen, wie z. B. das porenbildende Segment M2 aus dem Acetylcholinrezeptor mit elektrochemischen Methoden zu untersuchen (Vockenroth et al., 2007). Auch die im vorangegangenen Kapitel genannten, analytischen Methoden können an *tethered membranes* zum Einsatz kommen.

1.1.4 Porenüberspannende Lipidmembranen

Porenüberspannende Membranen vereinen die Vorteile von festkörperunterstützten und freitragenden Lipidmembranen in einem System. Als Substrate können Polycarbonatmembranen, poröses Silizium oder poröse Aluminate dienen. Während die Membran über den Poren eines porösen Substrats beiderseits von einem wässrigen Kompartiment umgeben ist, wird dieser durch den auf den Stegen verankerten Anteil Stabilität verliehen (Abb. 1-4).

In fluoreszenzmikroskopischen Messungen konnte gezeigt werden, dass die einzelnen porenüberspannenden Membranen unabhängig voneinander reißen (Weiskopf et al., 2007). Darin besteht der große Vorteil gegenüber freistehenden Membranen, die lediglich ein einzelnes Loch überspannen. Während mit der Zerstörung freistehender Membranen das Experiment beendet ist, können Untersuchungen an porenüberspannenden Membranen auch trotz des Reißens einzelner Lipiddoppelschichten fortgesetzt werden.

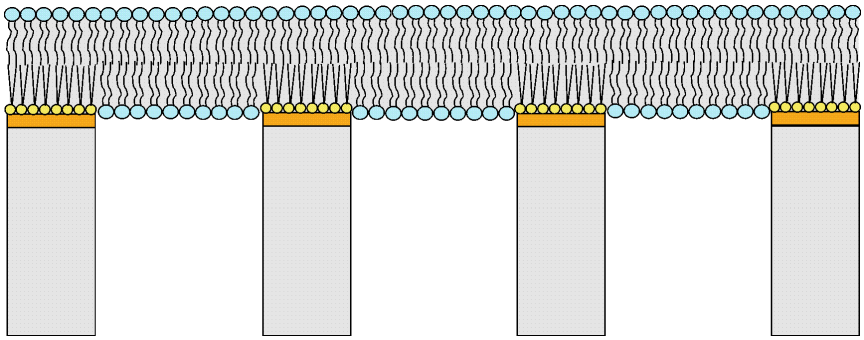


Abb. 1-4: Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran.

Substrate mit einer hochgeordneten Porenstruktur sind dann von Vorteil, wenn einzelne Poren individuell addressiert werden sollen, etwa in automatisierten, chipbasierten Prozessen. Böcker et al. (2009) zeigten, dass mittels eines *scanning ion conductance microscope* (SICM) einzelne porenüberspannende Membranen auf porösem Silizium gezielt angefahren und untersucht werden können. Auch Steltenkamp et al. (2006) manipulierten einzelne Membranen auf einem porösen Aluminat.

Diese Beispiele zeigen, dass porenüberspannende Membranen prinzipiell das Potential besitzen, einzelne freistehende Lipiddoppelschichten unabhängig voneinander untersuchen zu können. Alternativ werden sie als *array* aus vielen einzelnen Membranen verwendet, etwa um die Kanalaktivität integrierter Ionenkanäle zu untersuchen. Die porenüberspannenden Lipidmembranen können nach einer Methode präpariert werden, nach der in Anlehnung an die Müller-Rudin-Technik für BLMs ein Lipid-Lösungsmittelgemisch eingesetzt wird. Analog zu den BLMs bildet sich die Membran unter Verdrängung des Lösungsmittels in einem Ausdünnprozess, wie Schmitt et al. (2006) unter Verwendung von porösen Aluminaten mit Poren von 60 – 280 nm zeigen konnten. Diese als nano-BLMs bezeichneten Membranen sind geeignet, die Aktivität der Ionenkanäle Gramicidin, Alamethicin oder OmpF auf Einzelkanalebene zu detektieren (Römer und Steinem, 2004;

Schmitt et al., 2006). Ferner kann die konzertierte Aktivität vieler Transporter, wie etwa der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin – adsorbiert in Form von Purpurmembranfragmenten – an nano-BLMs untersucht werden (Horn und Steinem, 2005). Die elektrolytgefüllten Poren des porösen Aluminats stellen dabei keine Barriere für die Ionenleitung dar.

Die Rekonstitution einer Vielzahl von Molekülen in porenüberspannende Membranen auf porösen Polycarbonaten gelang Favero et al. (2005) unter Einsatz des Glutamatrezeptors. Dabei sind die Moleküle durch ein Detergenz solubilisiert, um dann spontan in die Membranen zu insertieren. Häufig sind die Insertionsraten nur gering, welches zu einem unnötigen Verbrauch von Proteinen führt. Der Transfer einer Vielzahl von Proteinen in die porenüberspannenden Membranen ist jedoch von großem Interesse, insbesondere dann, wenn Transporter mit nur geringen *turn over*-Raten untersucht werden. Auch für integrale, elektrochemische Messungen an einem Ionenkanal muss dieser in hoher Dichte in einer isolierenden Membran vorliegen, wie es an festkörperunterstützten Membranen durch das Spreiten von Proteoliposomen auf geeigneten Oberflächen gelungen ist (Steinem et al., 1996). Die Herstellung von porenüberspannenden Membranen durch das Spreiten von Vesikeln auf porösen Aluminaten konnte bereits von Hennesthal und Steinem (2000) durch AFM-Untersuchungen gezeigt werden. Drexler und Steinem (2003) charakterisierten mittels Impedanzspektroskopie ebenfalls nach dieser Methode hergestellte Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit einer unterliegenden Aluminiumschicht. Dagegen konnten durch die Fusion von Vesikeln auf porösen Substraten mit durchgehender Porenstruktur bisher keine isolierenden Lipidmembranen erhalten werden.

1.2 Modell-Transmembranproteine

Unter dem Begriff Modell-Transmembranproteine werden Moleküle zusammengefasst, die trotz ihrer einfachen Struktur die Eigenschaften von komplexeren Ionenkanälen besitzen. Basierend auf Untersuchungen zu Mechanismen des Ionentransports oder zum Einfluss struktureller Veränderungen an den Modellmolekülen werden Modelle erstellt, die zum Verständnis komplexerer Transmembranproteine beitragen können. Sehr bedeutend sind dabei die peptidischen Ionenkanäle Gramicidin und Alamethicin, die trotz ihrer einfachen Struktur eine hohe Vielfalt bezüglich des ionenleitenden Verhaltens zeigen, z. B. Ionenselektivität, spannungsabhängiges Öffnen, Kanalblockade oder Modulierung der Eigenschaften durch die Lipidumgebung (Wallace, 2000; Woolley und Wallace, 1992). Auf Grund

der fundierten Kenntnisse der Eigenschaften von Modellkanälen sind sie zur Untersuchung der funktionellen Integration von Ionenkanälen in neuartige Lipidmembransysteme geeignet. Auch größere Proteine wie das bakterielle Porin OmpF und die Protonenpumpe Bacteriorhodopsin besitzen im Vergleich zu komplexeren Ionenkanälen eine relativ einfache Struktur und werden häufig als Modellmoleküle eingesetzt.

1.2.1 Gramicidin

Das Peptid Gramicidin aus *Bacillus brevis*, bestehend aus 15 Aminosäuren, ist erstmals vor mehr als 40 Jahren beschrieben worden. Sarges und Witkop (1965) bestimmten die Sequenz des abwechselnd aus D- und L-Aminosäuren zusammengesetzten Gramicidin A (Abb. 1-5). Daneben sind zwei weitere Formen bekannt, die sich von Gramicidin A darin unterscheiden, dass das an Position 11 liegende Tryptophan, gegen Phenylalanin (Gramicidin B) bzw. Tyrosin (Gramicidin C) ausgetauscht ist. Eine Mischung aus Gramicidin A (80 – 85 %), B (6 – 7 %) und C (5 – 14 %) wird von den Herstellern als Gramicidin oder Gramicidin D bezeichnet.

HCO-NH-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-CO-$NHCH_2CH_2OH$

Abb. 1-5: Aminosäuresequenz von Gramicidin A (Sarges und Witkop, (1965)).

Das hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaute Peptid trägt keine Ladung, da es am N-Terminus formyliert ist und am C-Terminus eine Ethanolamingruppe trägt. So kann sich Gramicidin als linksgängige β-Helix in die hydrophobe Region von Lipidmembranen einlagern, wobei die Helix bei einer Länge von 2,5 – 3,0 nm nur eine Monoschicht durchspannt. Erst durch die Dimerisierung zweier Monomere über sechs Wasserstoffbrücken an den Formylenden wird eine etwa 0,4 nm große ionenleitende Pore gebildet, wie in NMR- und röntgenkristallographischen Studien gezeigt werden konnte (Allen et al., 2003; He et al., 1994). Dabei wird die Struktur der Lipidmembran in der Umgebung des Kanals etwas komprimiert, da dessen Gesamtlänge etwas kürzer ist als die Dicke des durch die Fettsäureketten der Lipide gebildeten hydrophoben Kerns (Lundbaek et al., 2004).

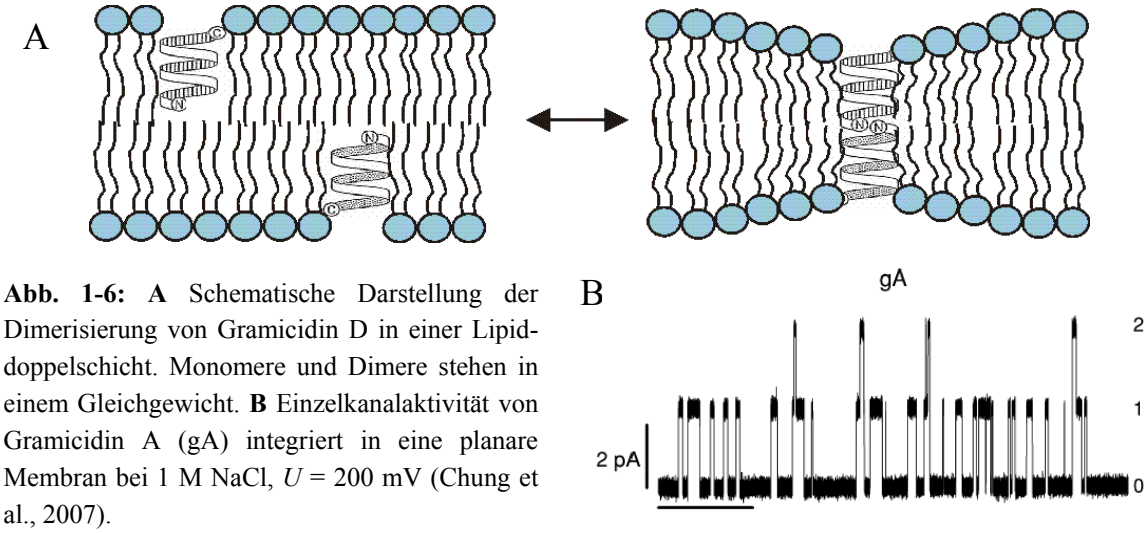


Abb. 1-6: A Schematische Darstellung der Dimerisierung von Gramicidin D in einer Lipiddoppelschicht. Monomere und Dimere stehen in einem Gleichgewicht. **B** Einzelkanalaktivität von Gramicidin A (gA) integriert in eine planare Membran bei 1 M NaCl, U = 200 mV (Chung et al., 2007).

Deshalb ist zur Ausbildung eines leitenden Dimers u. a. die Kettenlänge der Lipide von enormer Bedeutung (Kelkar und Chattopadhyay, 2007; Wallace et al., 1981). Hinsichtlich seiner Leitfähigkeitseigenschaften ist Gramicidin bereits detailliert untersucht worden. Der Kanal ist hauptsächlich für Alkalikationen leitend, wobei die Selektivität, wie die Beweglichkeit der Ionen in wässriger Lösung, in der Reihenfolge $Li^+ < Na^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+$ zunimmt (Myers und Haydon, 1972). In Einzelkanalmessungen wurde die Leitfähigkeit von Gramicidin A bestimmt, für 100 mM NaCl liegt diese bei etwa 6 pS (Neher et al., 1978). Dies entspricht einer Transferrate von etwa vier Millionen Ionen pro Sekunde. Große Kationen wie $N(CH_3)_4^+$, Anionen und mehrwertige Kationen werden praktisch nicht transportiert (Finkelstein und Andersen, 1981; Liberman und Topaly, 1965). Divalente Kationen wie Ca^{2+} reduzieren die Leitfähigkeit durch Wechselwirkungen mit spezifischen Bindungsstellen an der Kanalöffnung. Dadurch verzögern sie den Ionenfluss, blockieren ihn aber nicht vollständig (Bamberg und Läugner, 1977).

Der Ionenfluss erfolgt in einem sog. *single-file*-Mechanismus, d. h. ein Ion wird zusammen mit sechs bis zwölf Wassermolekülen hintereinander durch den Kanal geleitet, ohne dass die Moleküle ihren Platz tauschen können (Andersen, 1984; Levitt et al., 1978). In einem kinetischen Modell werden für den Ionentransport drei Schritte beschrieben, wie in Abb. 1-7 gezeigt ist. Neben der Translokation der Ionen durch den Kanal spielen dabei auch die Diffusion der Ionen zur Kanalöffnung bzw. von dieser weg sowie deren Hydratisierung bzw. Dehydratisierung eine Rolle.

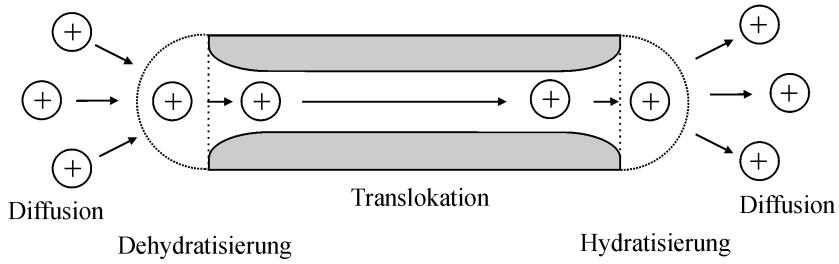
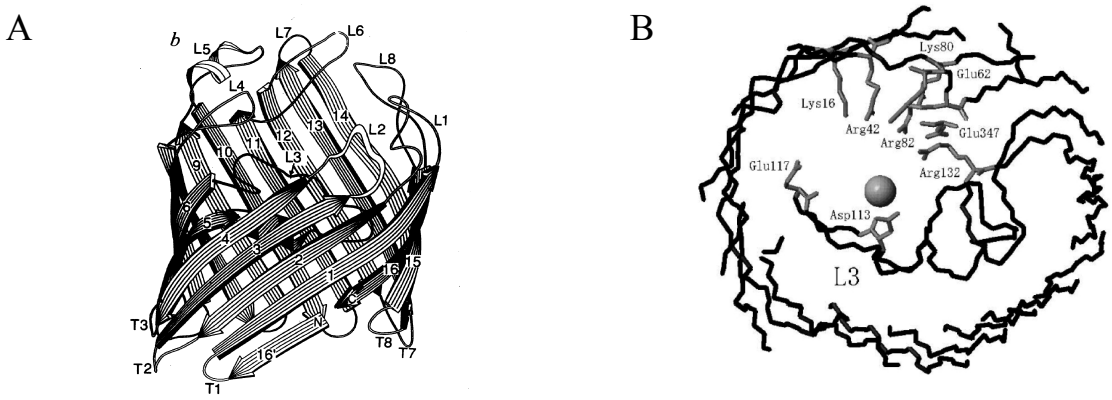


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der kinetischen Schritte, die ein Alkalikation beim Durchtritt durch den Gramicidin-Kanal durchläuft.

Gramicidin ist auf Grund einiger struktureller Gegebenheiten mit komplexeren Ionenkanälen vergleichbar und eignet sich deshalb hervorragend als Modellionenkanal. Wie auch bei komplexeren Transmembranproteinen ordnen sich die Tryptophanreste auf Grund der Fähigkeit, π-π- und schwache hydrophile Wechselwirkungen eingehen zu können, in der Grenzregion zwischen den hydrophilen Kopfgruppen und dem hydrophoben Kern der Lipidmembran an. Interessanterweise stimmt auch die Struktur der Selektivitätsfilter von Gramicidin mit dem des weitaus komplexeren Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans* überein (Kelkar und Chattopadhyay, 2007).

1.2.2 *Outer membrane protein* F (OmpF)

OmpF durchspannt als wassergefüllte Pore (Porin) die äußere Zellmembran des gram-negativen Bakteriums *E. coli* und erlaubt einen passiven und wenig selektiven Transport von Ionen und Molekülen bis 600 Da (Schulz, 2002). Röntgenkristallographische Studien zur Strukturaufklärung des Proteins zeigen, dass OmpF als Trimer vorliegt, das sich aus drei separaten, kanalformenden Motiven, sog. *β*-Fässern (*β-barrels*) zusammensetzt (Cowan et al., 1992). Antiparallel angeordnete *β*-Faltblätter sind über Extramembranschleifen, sog. *loops* und *turns* miteinander verbunden. Von besonderer Bedeutung ist *loop* 3, der in das Innere der Pore reicht und diese auf halber Höhe begrenzt. Dieser als *constriction zone* bezeichnete Bereich bemisst an seiner engsten Stelle (11 × 7) $Å^2$.



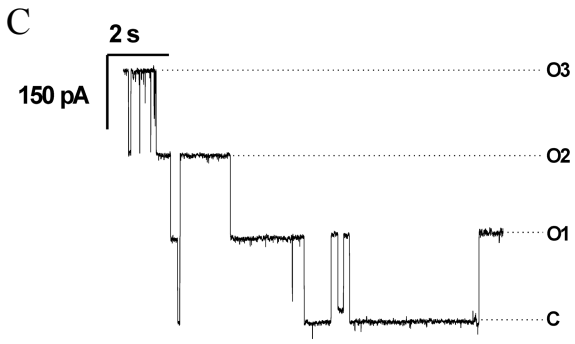


Abb. 1-8: A Struktur des OmpF-Monomers: Die 16 *β*-Faltbblätter sind antiparallel zueinander angeordnet, welches durch Pfeile symbolisiert wird (Cowan et al., 1992). **B** Schematische Darstellung der *constriction zone* von OmpF mit Blick auf die Öffnung des Monomers. Die grau eingezeichneten Aminosäuren sind hinsichtlich der Kanaleigenschaften von Bedeutung. Die Kugel in der Mitte symbolisiert ein passierendes Kation (Danelon et al., 2003). **C** Einzelkanalaktivität eines OmpF-Trimers in nano-BLMs bei 1 M KCl, 1 mM $CaCl_2$, pH 6,0.

Das Innere der Pore ist von hydrophilen Aminosäuren ausgekleidet und kann mit bis zu 324 Wassermolekülen gefüllt sein (Tieleman und Berendsen, 1998). Wie in Abb. 1-8 B zu erkennen ist, stehen in der *constriction zone* die sauren Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) am Ende von *loop* 3 basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin) an der Kanalwand gegenüber. Auf Grund der entgegengesetzten Ladungen wird ein transversales Feld erzeugt, das Einfluss auf Ionenselektivität und Leitfähigkeit nimmt (Im und Roux, 2002; Miedema et al., 2004). Des Weiteren wird die Leitfähigkeit durch externe Parameter wie pH-Wert und Ionenstärke bestimmt; sie liegt für eine 1 M KCl-Lösung und einem pH von 7,0 bei etwa 1,5 nS. OmpF ist in seiner funktionellen Form grundsätztlich als Trimer in der Membran verankert, wobei die einzelnen Monomere unabhängig voneinander oder konzertiert öffnen und schließen, wie es in Untersuchungen an nano-BLMs beobachtet werden konnte (Schmitt et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass Ampicillin die Pore durchqueren kann und dabei die Ionenleitung blockiert (Nestorovich et al. (2002).

In der aktuellen Forschung sind Porine wie OmpF als Werkzeuge zur Detektierung von Einzelmolekülen wie DNA von Interesse. Anhand der Blockade des Ionenflusses durch die

Makromoleküle können Rückschlüsse auf deren Identität, Konzentration, und Struktur geführt werden (Butler et al., 2008). OmpF mit einer veränderten Aminosäuresequenz in der *constriction zone* stellte sich als effizienter, selektiver Detektor für Ca^{2+}-Ionen heraus (Miedema et al., 2004).

OmpF besitzt mit dem β-Fass das gleiche Strukturmotiv wie integrale Kanalproteine der äußeren mitochondrialen Membran. Erst kürzlich konnte die Struktur eines darin integrierten, spannungsgesteuerten Anionenkanals (VDAC) aufgeklärt werden. Die sehr gut charakterisierten bakteriellen Porine dienen häufig als Modell, etwa um die Funktionalität einzelner Proteindomänen zuordnen zu können (Bayrhuber et al., 2008).

1.2.3 Bacteriorhodopsin

Die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin ist ein sehr detailliert charakterisiertes Membranprotein aus der Purpurmembran von *Halobacterium salinarium*. Bei Sauerstoffmangel kann über der Bakterienmembran ein Protonengradient aufgebaut werden, der die Synthese von ATP antreibt. Mit einem Massenanteil von 75 % bildet Bacteriorhodopsin in der Membran eine geordnete Anordnung aus Trimeren, welches der Membran eine zweidimensionale kristalline Struktur verleiht (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971). Ein Monomer bestehend aus sieben hydrophoben, dichtgepackten Transmembranhelices, die über kurze Extramembranschleifen verbunden sind (Abb. 1-9 A), durchspannt die Lipidmembran (Henderson und Unwin, 1975). Im Inneren des Helixbündels kommt ein Retinalrest zu liegen, der als Schiffsche Base über die Aminosäure $Lysin^{216}$ kovalent mit dem Proteingerüst verbunden ist. Dieser Retinalrest ist für die Funktion des Bacteriorhodopsins als Protonenpumpe von zentraler Bedeutung. Durch die Belichtung des Proteins isomerisiert das Retinal von einer protonierten 13-*trans* Konfiguration zu einer protonierten 13-*cis* Konfiguration (Abb. 1-9 B). Dies bewirkt eine pK_S-Änderung der Schiffschen Base von 10 zu 6, was zu der Übertragung eines Protons auf $Aspartat^{85}$ führt. In diesem als M bezeichneten Zustand wird ein Proton auf der extrazellulären Seite der Membran abgegeben. Die Herkunft des Protons wird noch diskutiert. Momentan wird die These favorisiert, dass es aus einem extrazellulären Netzwerk von Wassermolekülen stammt. Das deprotonierte, gestreckt vorliegende Retinal im M-Zustand initialisiert neben der Protonabgabe gleichzeitig seine eigene Reprotonierung, indem es in dieser Konfomation eine der sieben Helices etwas aus der dichten Packung zwingt.

Wassermoleküle füllen die entstehende Lücke und dienen, vermittelt über Aspartat[96], als Protonenquelle für die Schiffsche Base (N → N'), die daraufhin wieder in die all-*trans*-Konfiguration zurückkehrt. Zur Vervollständigung des Photozyklus entlässt Aspartat[85] das zu Beginn übertragene Proton in das oben erwähnte Netzwerk aus Wassermolekülen (Lanyi, 2007).

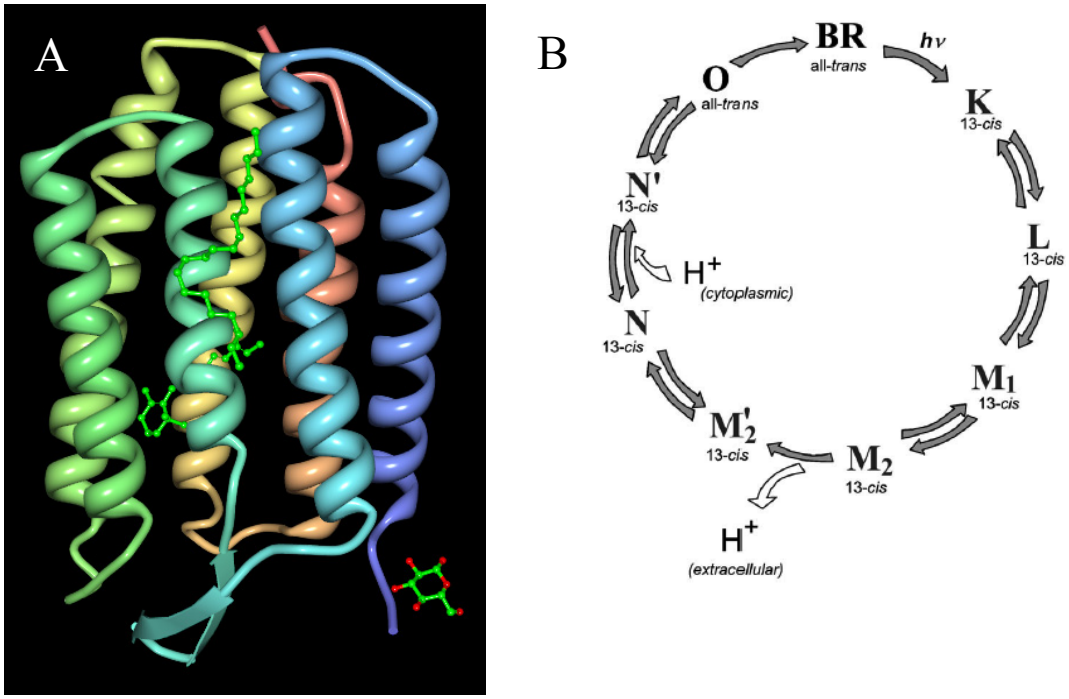


Abb. 1-9: A Kristallstruktur eines Bacteriorhodopsin-Monomers (Faham und Bowie, 2002). **B** Schematische Darstellung des Photozyklus von Bacteriorhodopsin (Lanyi, 2007).

Bacteriorhodopsin ist ein einfaches Modell für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in der Membran verankert eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen und deshalb für das Design neuer Wirkstoffe von Interesse sind.

2 Zielsetzung

Viele Ionenkanäle und Transporter sind transmembranständige Rezeptoren und können durch die Wechselwirkung mit Pharmaka bezüglich ihrer ionenleitenden Funktion moduliert werden. Die Herausforderung bei der Untersuchung von Ionenkanälen und Transportern, welche nur in einer Lipidmembran funktionell sind, besteht darin, sie unter Erhalt ihrer Funktionalität in eine Lipidumgebung zu rekonstituieren. In Anbetracht der Vielfalt von Transmembranproteinen in biologischen Membranen wurden artifizielle Modellmembranen entwickelt, um eine Spezies in einer definierten Lipidumgebung unabhängig von anderen Proteinen und Einflussfaktoren charakterisieren zu können. Die bereits etablierten lösungsmittelhaltigen nano-BLMs auf Basis von porösen Aluminaten erwiesen sich als sehr robustes System zur Untersuchung von Ionenkanälen auf Einzelkanalebene. Nano-BLMs sind allerdings nicht geeignet, Proteine in hoher Dichte zu integrieren. Zudem erfordert die Rekonstitution der Proteine aus der wässrigen Phase, dass diese zuvor mittels eines Detergenz solubilisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Herstellung porenüberspannender Membranen basierend auf porösen Aluminaten entwickelt werden, um Transmembranproteine in hoher Dichte sowie in Abwesenheit von Detergenzien zu rekonstituieren. Die konzertierte Aktivität der Moleküle sollte mittels elektrochemischer Methoden erfasst werden, was die Präparation hochohmiger Lipidmembranen erforderte. Zum einen sollte beispielhaft für einen Ionenkanal Gramicidin D eingesetzt und in impedanzspektroskopischen Messungen gezeigt werden, dass charakteristische Eigenschaften wie dessen Selektivität auch integral erfasst werden können. Zum anderen sollte als Beispiel für einen Transporter Bacteriorhodopsin zum Einsatz kommen. Anhand der spezifischen Aktivität von Bacteriorhodopsin, die in Form von lichtinduzierten Photoströmen detektiert werden kann, sollte gezeigt werden, dass selbst Transporter, welche sehr geringe *turn over*-Raten besitzen, in genügend hoher Dichte funktionell in porenüberspannende Membranen eingebracht werden können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Impedanzspektroskopie

3.1.1 Entwicklung und Anwendung

Die Anfänge der Impedanzspektroskopie begründete Heaviside Ende des 19. Jahrhunderts mit der Schaffung der mathematischen und damit der theoretischen Grundlagen zur Entwicklung dieser Technik (Macdonald, 2006). Seit mehr als 60 Jahren findet diese elektrochemische Methode Anwendung bei der Untersuchung von Korrosions- und Beschichtungsprozessen an Metallen sowie in der Entwicklung neuer Batteriesysteme. Es konnten mit Hilfe der Impedanzspektroskopie u. a. Mechanismen elektrochemischer Reaktionen an und Eigenschaften von Grenzflächen aufgeklärt werden. Bis heute greifen Materialforscher auf die Impedanzspektroskopie zurück, wie etwa bei der Entwicklung von Gassensoren. So geht beispielsweise die Abscheidung von Sauerstoff auf SnO_2-Oberflächen mit einer Änderung der elektrochemischen Eigenschaften des Materials einher und kann impedanzspektroskopisch verfolgt werden (Ponce et al., 2008).

In den letzten Jahren haben neben der Materialforschung auch andere wissenschaftliche Disziplinen das Potential dieser Methode erkannt. Die Impedanzspektroskopie findet heute breite Anwendung in der medizinischen Forschung und in den Biowissenschaften (Lisdat und Schäfer, 2008). Es kann z. B. die Hybridisierung von DNA-Strängen auf Oberflächen verfolgt werden, ohne dass die Moleküle, wie bei anderen Techniken üblich, mit Markierungen (z. B. Fluorophorsonden) versehen werden müssen (Chen et al., 2009). Neben isolierten Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Enzymen und Antikörpern können auch ganze Zellverbunde auf Oberflächen immobilisiert und impedanzspektroskopisch untersucht werden (K'Owino und Sadik, 2005; Lisdat und Schäfer, 2008). Der Effekt pharmakologischer Wirkstoffe auf Zellen ist von besonderem Interesse und kann durch das *monitoring* von elektrochemischen Parametern zeitaufgelöst verfolgt werden (Kloß et al., 2008). Moderne impedanzspektroskopische Techniken (*electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) erlauben die Aufzeichnung des Verhaltens von Zellkulturen nach Modifikation äußerer Parameter in Echtzeit (Liu et al., 2007; Qiu et al., 2008).

Die Anwendung der Impedanzspektroskopie zur Untersuchung biologischer Systeme ist vor allem deshalb attraktiv, weil sie als eine nicht-invasive Methode zerstörungsfreie Messungen zulässt. Dies macht die Technik zusammen mit der Eignung zur Grenzflächenanalytik zu einer effektiven Methode bei der elektrischen Charakterisierung von artifiziellen Lipidmembranen (Alonso-Romanowski et al., 1995; Atanasov et al., 2005; Steinem et al., 1996; Wiegand et al., 2002).

3.1.2 Prinzip der Impedanzspektroskopie

Das grundlegende Messprinzip der Impedanzspektroskopie (IS) besteht darin, ein elektrochemisches System durch ein aufgeprägtes Signal in Form einer sinusförmigen Wechselspannung zu stören und die darauf folgende Stromantwort zu detektieren. Das Erregersignal wird über einen definierten Frequenzbereich appliziert und ist von geringer Amplitude, welches eine zerstörungsfreie Charakterisierung von empfindlichen Proben erlaubt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, das Erregersignal in Form einer aus verschiedenen Frequenzen zusammengesetzten Wechselspannung in Abhängigkeit von der Zeit aufzuprägen (*Fourier-Transform*-IS). Durch eine Fourier-Transformation kann das in der Zeitdomäne aufgezeichnete Signal in die Frequenzdomäne überführt werden. Diese Messtechnik ist dann von Vorteil, wenn kinetische Parameter schneller Reaktionen oder Multikomponentensysteme untersucht werden (Rairigh et al., 2006; Raisch et al., 2001; Wiegand et al., 2000). Zum anderen kann die Frequenz der Wechselspannung über einen festgelegten Bereich diskret variiert werden. Da die Antwort dabei direkt in der Frequenzdomäne aufgezeichnet wird, bezeichnet man dieses Messprinzip als *Fourier*- oder *frequency-domain*-IS. Der Vorteil gegenüber Ersterem besteht in einer rauschärmeren Messung und einer mathematisch einfacheren Verarbeitung der Signale. Die Zeitauflösung dieser Methode ist im Vergleich zur *Fourier-Transform*-IS allerdings geringer.

3.1.3 Physikalische Grundlagen

Der frequenzabhängige Widerstand $Z(\omega)$ eines Wechselstromkreises wird als Impedanz bezeichnet. Analog dem Ohmschen Gesetz bei Gleichstrombedingungen kann die Impedanz durch die Wechselspannung $U(t,\omega)$ und Stromantwort $I(t,\omega)$ definiert werden. Beide Größen sind von der Kreisfequenz ω und der Zeit t abhängig:

$$Z(\omega) = \frac{U(t,\omega)}{I(t,\omega)} = \frac{U_0 \exp(\mathrm{i}\omega t)}{I_0 \exp(\mathrm{i}(\omega t - \varphi(\omega)))} . \tag{3-1}$$

Der Parameter $\varphi(\omega)$ gibt die Phasenverschiebung zwischen Wechselstrom und Wechselspannung von Blindwiderständen an. Die Impedanz ist eine komplexe Größe, die sich in kartesischen Koordinaten mit Z^{Re} als Realteil und Z^{Im} als Imaginärteil beschreiben lässt:

$$Z(\omega) = Z^{\mathrm{Re}}(\omega) + iZ^{\mathrm{Im}}(\omega) . \tag{3-2}$$

In Form von Polarkoordinaten ist die Impedanz wie folgt definiert:

$$Z(\omega) = |Z|(\omega) \exp(\mathrm{i}\varphi(\omega)) . \tag{3-3}$$

Der Parameter $|Z|(\omega)$ wird als Betrag der Impedanz bezeichnet. Die Auftragung von Real- und Imaginärteil in der Gaußschen Zahlenebene erfolgt als ein sog. Zeigerdiagramm. Dies liefert einen Vektor mit dem Betrag $|Z|$ und dem Winkel φ zur reellen Achse (Abb. 3-1).

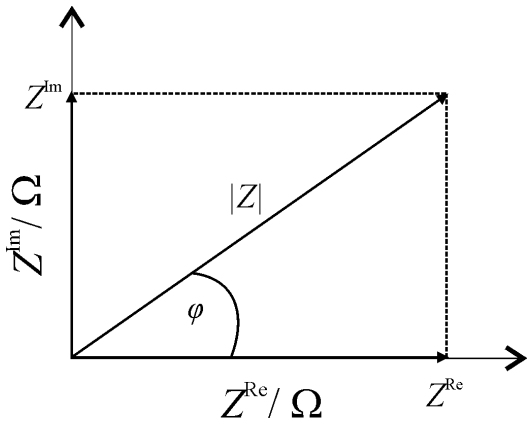


Abb. 3-1: Darstellung der Impedanz in der Gaußschen Zahlenebene. In dem Zeigerdiagramm bezeichnet der durch die Größen Z^{Im} und Z^{Re} aufgespannte Vektor $|Z|$ den Betrag der Impedanz. Der von dem Vektor $|Z|$ und der reellen Achse eingeschlossene Winkel φ gibt die Phasenverschiebung an.

Der mathematische Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Größen ist in den Gln. 3-4 und 3-5 gegeben:

$$|Z| = \sqrt{(Z^{\mathrm{Re}})^2 + (Z^{\mathrm{Im}})^2} \tag{3-4}$$

$$\varphi = \arctan \frac{Z^{\mathrm{Im}}}{Z^{\mathrm{Re}}} \tag{3-5}$$

3.1.4 Darstellung von Impedanzspektren

Die Gln. 3-2 und 3-3 zeigen, dass es unterschiedliche Möglichkeiten gibt, die Impedanz darzustellen. Die zwei häufigsten Formen sind in Abb. 3-2 zu sehen. Dabei bildet ein elektrischer Schaltkreis aus zwei Widerständen und einem Kondensator das physikalische Modell zu den gezeigten Spektren (Abb. 3-2 A).

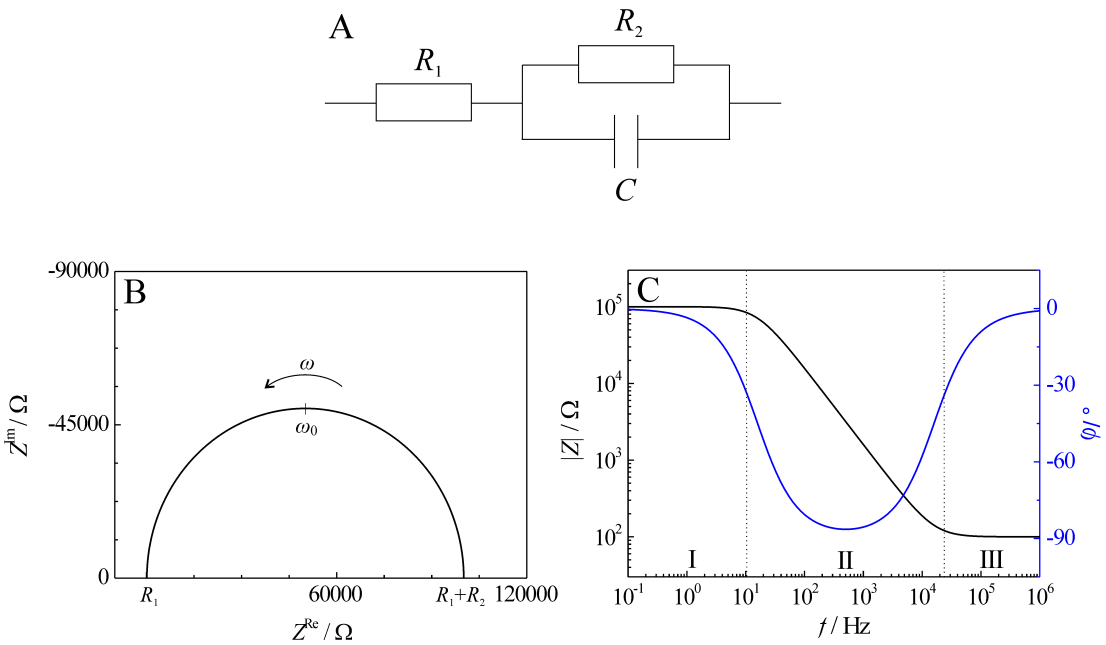


Abb. 3-2: A Netzwerk bestehend aus den Ohmschen Widerständen $R_1 = 100\ \Omega$, $R_2 = 10^5\ \Omega$ und dem Kondensator $C = 10^{-6}$ F. **B** Nyquist-Diagramm zum angegebenen Netzwerk: Die Kurve schneidet die reelle Achse für hohe Frequenzen bei R_1, für niedrige Frequenzen bei R_1+R_2. Die Frequenz ω_0 am Maximum der Kurve gibt die Zeitkonstante des R_2C-Glieds an. **C** Bode Diagramm zum angegebenen Netzwerk: Betrag der Impedanz $|Z|$ und Phasenverschiebung φ sind getrennt voneinander als Funktion der Frequenz f aufgetragen.

Eine Möglichkeit besteht darin, in einem sog. Nyquist-Plot Imaginär- und Realteil der Impedanz, Z^{Im} und Z^{Re}, die jeweils Funktion der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$ sind, aufzutragen. Alternativ dazu können der Betrag der Impedanz $|Z|$ sowie der Phasenwinkel φ getrennt voneinander und jeweils in Abhängigkeit von der Frequenz f in einem sog. Bode-Diagramm abgebildet werden, wodurch komplizierte dreidimensionale Graphiken vermieden werden. Im Nyquist-Diagramm (Abb. 3-2 B) ist der Kurvenverlauf der Impedanz des hier gewählten Netzwerks (Abb. 3-2 A) durch einen Halbkreis gekennzeichnet. Dieser schneidet bei hohen Frequenzen die reelle Achse in R_1, während aus dem Schnittpunkt bei niedrigen Frequenzen die Summe aus R_1+R_2 abgelesen werden kann. Jeder Punkt auf der Kurve repräsentiert die Impedanz bei einer bestimmten Frequenz ω, wobei die Länge des vom Ursprung ausgehenden Vektors den Betrag der Impedanz $|Z|$ angibt und dessen Winkel zur reellen Achse die Phasenverschiebung φ determiniert (siehe Abb. 3-1). Die Kreisfrequenz am Punkt ω_0 entspricht der Zeitkonstante τ des R_2C-Glieds mit dem Wert $\tau = R_2C$. Im Bode-Diagramm in Abb. 3-2 C können drei Bereiche unterschieden werden. Bei sehr hohen und sehr niedrigen Frequenzen (Bereiche I und III) ist der Betrag der Impedanz frequenzunabhängig, der Phasenwinkel φ verläuft bei 0°. Ein solches Impedanzverhalten ist typisch für Ohmsche Widerstände. Während die Impedanz im niederfrequenten Bereich der Summe aus hohen und niedrigen Widerständen R_1+R_2 entspricht, werden bei sehr hohen Frequenzen nur noch niederohmige Widerstände R_1 aufgelöst. Im Gegensatz dazu zeigt $|Z|$ auf Grund des Kondensators C im Bereich II ein frequenzabhängiges Verhalten, wobei sich die Kapazität C aus der Beziehung $\log(|Z|) = -\log(2\pi fC)$ berechnen lässt.

3.1.5 Auswertung von Impedanzspektren

3.1.5.1 Prinzipien der Datenanpassung

Ein Impedanzspektrum enthält Informationen über die elektrischen Eigenschaften des untersuchten Systems. Um die physikalischen Parameter zu extrahieren, können verschiedene Ansätze gewählt werden (Gomadam und Weidner, 2005). Eine Möglichkeit besteht darin, das elektrochemische System ausgehend von der Kontinuumstheorie zu beschreiben. Dabei wird mit den gegebenen Randbedingungen des Systems ein mathematisches Modell entwickelt, welches die Impedanz möglichst genau beschreibt. Basierend auf der erstellten Gleichung kann ein physikalisches Modell in Form eines Ersatzschaltkreises aus

Bauelementen wie Ohmschen Widerständen und Kondensatoren aufgebaut werden. Alternativ zu dieser Methode kann ein semiempirischer Ansatz verfolgt werden, bei dem aus bereits bestehenden Erkenntnissen zur Messanordnung und weiteren theoretischen Überlegungen heraus ein physikalisches Modell erstellt wird, dessen Impedanzcharakteristik der Datenanpassung zu Grunde gelegt wird. Diese Methode ist vor allem dann geeignet, wenn ein bereits elektrisch charakterisiertes System weiterentwickelt wird. So hat es sich im Rahmen dieser Arbeit angeboten, aufbauend aus Erkenntnissen früherer Arbeiten den semiempirischen Ansatz zur Datenanalyse zu verfolgen. In beiden Fällen dienen die auf den Ersatzschaltbildern basierenden Gleichungen der Datenanpassung. Auf diese Weise werden systemspezifische Parameter erhalten, die eine quantitative Interpretation des Systems erlauben.

Die Auswertung der Daten in dieser Arbeit erfolgte mittels einer nicht linearen Kurvenanpassung. Dabei ist zu beachten, dass Impedanzspektren in der Regel Messdaten über mehrere Größenordnungen hinweg enthalten. Aus diesem Grund basieren die Anpassungsroutinen auf dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus, der eine Gewichtung der Fehler berücksichtigt (Macdonald, 1987). Da die Größe des zugewiesenen Gewichtungsfaktors die Fehler der Parameter beeinflusst, werden die aus der Datenanpassung resultierenden Fehlerwerte in dieser Arbeit nicht angegeben.

3.1.5.2 Physikalische Netzwerkelemente zum Erstellen von Ersatzschaltkreisen zur Beschreibung der Modellmembranen

Um ein elektrochemisches System theoretisch zu beschreiben, wird ein Netzwerk aus mehreren Elementen erstellt. Die wichtigsten sind zusammen mit ihrem physikalischen Verhalten im Wechselfeld in Tab. 3-1 aufgelistet.

Tab. 3-1: Impedanz Z und Phasenverschiebung φ verschiedener Netzwerkelemente.

Netzwerkelement	Impedanz Z	Phasenverschiebung φ
Ohmschner Widerstand R	R	0
Kapazität C	$(i\omega C)^{-1}$	$-\pi/2$
Induktivität L	$i\omega L$	$+\pi/2$
Constant Phase Element CPE	$A^{-1}(i\omega)^{-\alpha}$	$-\alpha(\pi/2)$
Warburg Element Z_W	$\sigma(1-i)\omega^{-0,5}$	frequenzabhängig

Ohmscher Widerstand und Kapazität

Bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten Membransysteme sind der Ohmsche Widerstand R und die Kapazität C von besonderer Bedeutung, da sie die Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht charakterisieren. Mit ihrem hydrophoben Kern wirkt die Doppelschichtstruktur wie ein Isolator, der den Ionenfluss über die Membran stark begrenzt und demnach mit einem Widerstand R aufgeführt wird. Daneben lässt sich die planare Grenzfläche analog zu einem Plattenkondensator durch eine Kapazität C beschreiben (Gl. 3-6):

$$C = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 A}{d} \tag{3-6}$$

Die Parameter A und d beschreiben dabei die Fläche bzw. die Dicke der Membran. Während die Fläche vom verwendeten Aufbau abhängig ist, wird für die Dicke einer Doppelschicht je nach Lipidkomposition ein Wert von $d = 4 – 6$ nm berichtet (Ohki, 1970). Die Dielektrizitätskonstante ε_r der durch die Fettsäurereste gebildeten, unpolaren Region liegt zwischen $\varepsilon_r = 2{,}1 - 2{,}8$. Demgegenüber besitzt der hydrophile Kopfgruppenbereich ($d = 0{,}6 – 1$ nm) nach Coster und Smith (1974) eine Dielektrizitätskonstante von $\varepsilon_r = 20$. Diese kann jedoch abhängig vom Hydratationsgrad deutlich davon abweichen und sich in einem Bereich bewegen, der nach oben durch die Dielektrizitätskonstante des Wassers ($\varepsilon_r = 80$) begrenzt wird. Unter Verwendung von Gl. 3-6 lassen sich die Kapazitäten der verschiedenen Membranregion berechnen. Die Kapazität des Kopfgruppenbereichs liegt dabei um 1 - 2 Größenordnungen über der des hydrophoben Kerns. Wird die Lipiddoppelschicht als eine Serienschaltung von Kondensatoren betrachtet, bestimmt hauptsächlich die Fettsäurekettenregion die Gesamtkapazität. Somit beschreibt eine Parallelschaltung aus R und C die Lipiddoppelschicht in erster Näherung. Phänomene wie Helmholtz-Schichten an Grenzflächen oder ionische Reservoire in *tethered membranes* (*t*-BLMs) werden darin nicht berücksichtigt.

Mittels der Impedanzanalyse werden noch weitere Komponenten des Systems elektrochemisch erfasst. Die Kapazitäten von Gold- und Platinelektroden können ebenso detektiert werden wie der Ohmsche Widerstand des verwendeten Elektrolyten. Diese Bauelemente müssen aber nur dann in der Auswertung berücksichtigt werden, wenn ihre Eigenschaften im verwendeten Frequenzbereich erfasst werden.

***Constant phase* Element**

Das 1941 von Cole und Cole beschriebene *constant phase element* (CPE) wird immer dann an Stelle eines Kondensators in Ersatzschaltkreise eingeführt, wenn das elektrochemische System Anteile von nicht idealem kapazitivem Verhalten zeigt (Cole und Cole, 1941). Häufig wird in diesem Zusammenhang von einer Frequenz-Dispersion der Zeitkonstanten $\tau = RC$ bzw. Kapazitäten C gesprochen. Die Frequenzabhängigkeit der Kapazität lässt sich am anschaulichsten anhand der Dielektrizitätskonstante darstellen, die nach der Debye-Theorie mit $\varepsilon = \varepsilon' - i\varepsilon''$ eine komplexe Größe ist. Folgende Gleichung (Gl. 3-7) definiert die Dielektrizitätskonstante in Abhängigkeit von der Frequenz ω:

$$\varepsilon - \varepsilon_\infty = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha}} \tag{3-7}$$

mit den Dielektrizitätskonstanten ε_0 und ε_∞ bei niedrigen bzw. hohen Frequenzen, der Zeitkonstante τ_0 und dem Parameter α mit $0 < \alpha < 1$.

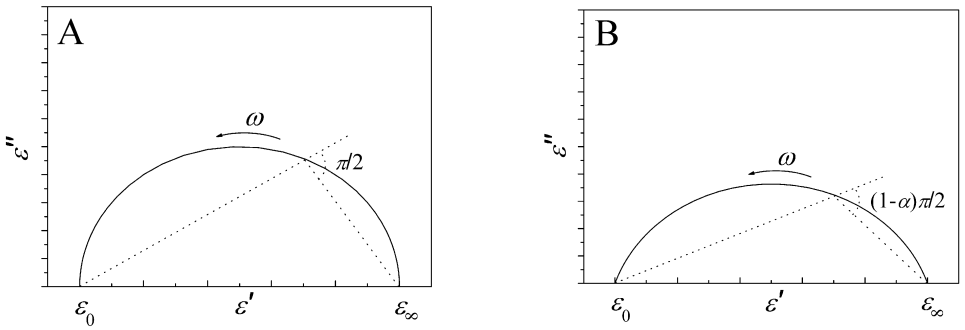


Abb. 3-3: Graphische Darstellung der komplexen Dielektrizitätskonstante: **A** Für den idealen Fall nach Debye liegt der Mittelpunkt des Kreisausschnitts auf der reellen Achse. **B** Für nicht ideales Verhalten liegt der Mittelpunkt unterhalb der reellen Achse. Der Winkel zwischen den Geraden, die von einem Punkt auf der Kurve zu den Achsenabschnitten ε_0 und ε_∞ aufgespannt werden, weicht um den Faktor $(1-\alpha)$ vom idealen Winkel $\pi/2$ ab.

Graphisch wird die komplexe Dielektrizitätskonstante analog zur komplexen Impedanz in Form eines Halbkreises dargestellt, wobei jeder Punkt der Kurve den Wert ε bei einer definierten Frequenz ω repräsentiert (Abb. 3-3). Für ideales Verhalten gemäß Gl. 3-7 liegt der Mittelpunkt des Kreisausschnitts auf der reellen Achse, für nicht ideale Systeme unterhalb dieser. Als Maß für die Abweichung der Kurve von dem Verlauf, der durch die Debye-

Hückel Theorie vorgegeben wird, führten Cole und Cole den Parameter α ein. In der graphischen Darstellung wird diese Abweichung an dem Winkel ersichtlich, der von den Vektoren eingeschlossen wird, die ausgehend von ε_0 bzw. ε_∞ einen Punkt auf der Kurve aufspannen. Im Idealfall (Abb. 3-3 A) weist dieser Winkel bei jeder Frequenz einen Wert von $\pi/2$ auf. Ein Punkt auf der Kurve des nicht idealen Systems (Abb. 3-3 B) ist durch den Winkel $(1-\alpha)\pi/2$ charakterisiert. Auf Grund der in Gl. 3-6 gezeigten Abhängigkeit der Kapazität von der Dielektrizitätskonstante kann der Parameter α als Maß für die Abweichung des CPE vom idealen Verhalten eines Kondensators betrachtet werden. Die Impedanz Z des CPE ist in Tab. 3-1 angegeben, wobei der Parameter A die Einheit F $s^{\alpha-1}$ trägt und für $\alpha = 1$ durch die Kapazität C ersetzt werden kann.

Der Vorteil in der Verwendung eines CPE besteht darin, dass die Datenanpassung mit dem Verlauf der Messpunkte besser übereinstimmt und somit die tatsächlichen Gegebenheiten des elektrochemischen Systems genauer beschreibt. Ein quantitativer Vergleich der Parameter A aus unterschiedlichen Experimenten ist auf Grund der Abhängigkeit von α nicht möglich. Jovic (2003) konnte jedoch zeigen, dass eine Umrechnung von A und α in eine Kapazität C möglich ist (Gl. 3-8):

$$C = \mathrm{A}(\omega_{\max}'')^{\alpha-1} \tag{3-8}$$

Der Parameter $\omega_{\max}''$ bezeichnet die Frequenz, bei welcher der Betrag des Imaginärteils der Impedanz Z^{Im} maximal wird, wenn Z^{Im} als Funktion der Kreisfrequenz ω angegeben wird. Diese Gleichung hat nur dann Gültigkeit, wenn das CPE parallel zu einem Ohmschen Widerstand R liegt (Jovic, 2003). Die Verwendung von CP-Elementen ist in der Literatur für die Analyse von Oberflächenrauhigkeiten und –heterogenitäten sowie für poröse Elektroden und langsame Adsorptionsreaktionen beschrieben (Jorcin et al., 2006; Kerner und Pajkossy, 1998).

Warburg-Element

Mit Hilfe eines Warburg-Elements können diffusionskontrollierte Transportprozesse erklärt werden. Dies wurde zum ersten Mal 1899 von Warburg (1899) basierend auf Untersuchungen von Diffusionsprozessen an Elektroden beschrieben. Noch heute werden elektrochemische Prozesse an Oberflächen unter Verwendung eines Warburg-Elements mit

Hilfe eines sog. Randles-Netzwerks (Abb. 3-4) interpretiert (Degefa und Kwak, 2008; Hsu et al., 2005).

Als einfachstes Beispiel sei die reversible Redox-Reaktion an der Oberfläche einer metallischen Elektrode genannt. Auf Grund der chemischen Reaktion fließen Faradaysche Ströme. Die dabei gemessene Impedanz wird als Faradaysche Impedanz bezeichnet (Bard und Faulkner, 2001). In diesem Prozess erfahren die geladenen Teilchen einen Transportwiderstand Z_W und einen Ladungstransfer- oder Durchtrittswiderstand R_{ct}. In Abb. 3-4 ist das Nyquist-Diagramm eines solchen Systems dargestellt. Neben einem Halbkreis, der durch R_{ct} und C bestimmt wird, ist die Kurve durch einen linearen Ast mit einem Winkel von 45° zur reellen Achse gekennzeichnet. Der Verlauf bei niedrigen Frequenzen ist typisch für Systeme mit diffusionslimitierten Transportphänomenen.

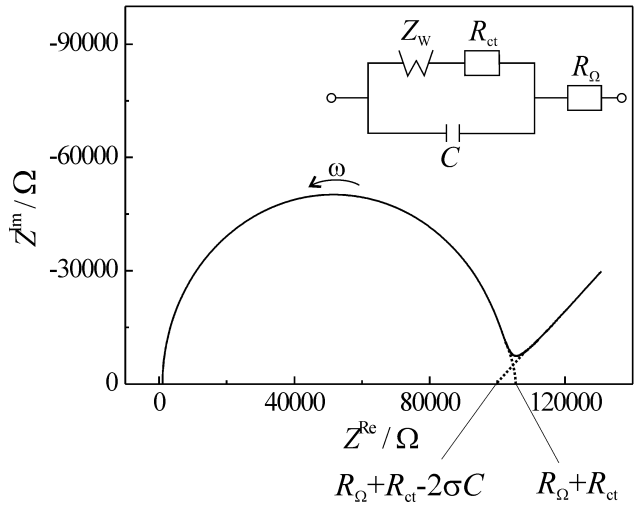


Abb. 3-4: Randles-Netzwerk zur Beschreibung von elektrochemischen Grenzflächenreaktionen an Elektroden unter semiinfiniten linearen Diffusionsbedingungen. R_{ct} gibt den Ladungstransferwiderstand an, Z_W das Warburg-Element zur Beschreibung des Ladungstransports. Mit C ist die Kapazität der Elektrode und mit R_Ω der Elektrolytwiderstand des Systems angegeben. Der Graph zeigt die auf dem Randles-Netzwerk basierende Simulation mit folgenden Parametern: $R_\Omega = 100\ \Omega$, $R_{ct} = 10^5\ \Omega$, $C = 10^{-7}$ F, $\sigma = 23570\ \Omega\ s^{-0,5}$. Die durch Extrapolation der Kurvenabschnitte eingezeichneten Schnittpunkte mit der reellen Achse geben die Netzwerkelemente wieder.

Das in Abb. 3-4 eingefügte Ersatzschaltbild ist nur unter semiinfiniten, linearen Diffusionsbedingungen gültig. Praktisch heißt das, dass die Dicke δ der Nernst-Diffusionsschicht größer ist als die von der diffundierenden Spezies zurückgelegte Entfernung im oszillierenden Wechselfeld. Andere Transportprozesse werden nicht berücksichtigt; d. h., die Nachlieferung der Komponenten aus dem Elektrolytraum beruht ausschließlich auf

Diffusion. Kinetische Parameter wie der Warburg Koeffizient σ, die solche Prozesse beschreiben, können aus Impedanzspektren gewonnen werden. Durch den in Gl. 3-9 gegebenen Zusammenhang sind die Diffusionskonstanten der diffundierenden Teilchen einer Redox-Reaktion definiert (Dawson und John, 1980).

$$\sigma = \frac{RT}{\sqrt{2}n^2F^2} \cdot \left(\frac{1}{c_{\mathrm{ox}}\sqrt{D_{\mathrm{ox}}}} + \frac{1}{c_{\mathrm{red}}\sqrt{D_{\mathrm{red}}}} \right) \tag{3-9}$$

Die Temperatur T und die Konzentration c der Teilchen nehmen ebenso Einfluss auf σ wie die Ladungszahl n. Die Parameter R und F bezeichen die Gaskonstante bzw. die Faraday-Konstante.

Das Warburg-Element kann auch zur Intepretation von Transportprozessen genutzt werden, deren Quelle nicht eine Elektrodenreaktion in Form eines Redoxprozesses ist. So hat de Levie (1974) etwa den Transport von Ionen über eine Lipidmembran mit einem Netzwerk beschrieben, das dem Randles-Netzwerk gleicht. Meist ist der Durchtrittswiderstand in den Impedanzspektren nicht diskriminierbar und wird dann mit dem Membranwiderstand R_{m} zusammengefasst.

3.1.6 Versuchsdurchführung

Zur Aufnahme von Impedanzspektren diente im Rahmen dieser Arbeit ein Frequenzganganalysator (*Impedance Gain-Phase Analyser* SI 1260, Solartron Instruments), der aus zwei Komponenten besteht, einem Generator und einem Analysator. Der Generator erzeugt eine sinusförmige Wechselspannung definierter Amplitude und Frequenz. Aus dem gemessenen Strom und der angelegten Wechselspannung wird die Impedanz des Systems berechnet. Über einen Computer erfolgt die Steuerung der Messung mit dem Programm *ZPlot*. Der Frequenzganganalysator konnte mit dem *Dielectric Interface* SI 1296 (Solartron Instruments) kombiniert werden, um auch kleinere Stromsignale im Bereich von Nanoampere mit guter Auflösung zu detektieren. Dabei wurde die Messung mit dem Solartron *Impedance Measurement*-Packet Version 3.3.0 angesteuert und aufgezeichnet.

Für diese Arbeit wurden die Impedanzspektren bei einer Spannungsamplitude von 30 mV (*peak to peak*) in einem Frequenzbereich von 10^{-3} - 10^{6} Hz aufgenommen. Die Anzahl der

Datenpunkte pro Frequenzdekade wurde dem jeweiligen Experiment angepasst, gewöhnlich wurden je Dekade 10 Messpunkte gesammelt. Für Messungen, die Bereiche < 10^{-1} Hz einschlossen, wurden häufig nur 3 - 5 Datenpunkte pro Dekade erfasst, um die Dauer des Experiments zu verkürzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode auch dazu eingesetzt, die Impedanz in Abhängigkeit von der Zeit bei einer konstanten Frequenz zu beobachten. Dafür wurden Frequenzen von 1 oder 10 Hz gewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Membransysteme impedanzspektroskopisch charakterisiert. Zur Untersuchung festkörperunterstützter Membranen wurde das mit der Goldelektrode (A = 0,0452 cm^2) beschichtete Glassubstrat zusammen mit einer Teflonkammer auf einem Trägertischchen fixiert (Abb. 3-5). Ein O-Ring (Kalrez®, DuPont Dow Elast., Newark, USA) diente als Dichtung zwischen elektrolytgefüllter Kammer und Substrat. Die Goldelektrode stellte die Arbeitselektrode des Systems dar, als Gegenelektrode diente ein platinierter Platindraht, der in den Elektrolyten taucht. Beide Elektroden standen über Kabelleitungen mit dem Frequenzganganalysator in Kontakt.

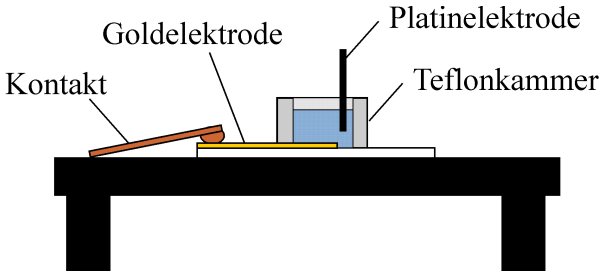


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten.

Dagegen wurden porenüberspannende Membranen in einem Drei-Kammer-System etabliert und untersucht. Das poröse Substrat wurde dabei, wie in Abb. 3-6 zu sehen, zwischen dem ersten und dem zweiten Kammereinsatz unter Verwendung von O-Ringen eingespannt. Der dritte Kammerbestandteil diente zugleich als *trans*-Kompartiment und als Halterung. In diesem Fall wurde das Messsignal durch zwei Platindrähte detektiert, die jeweils in die Elektrolytlösung der beiden Kammerkompartimente getaucht wurden.

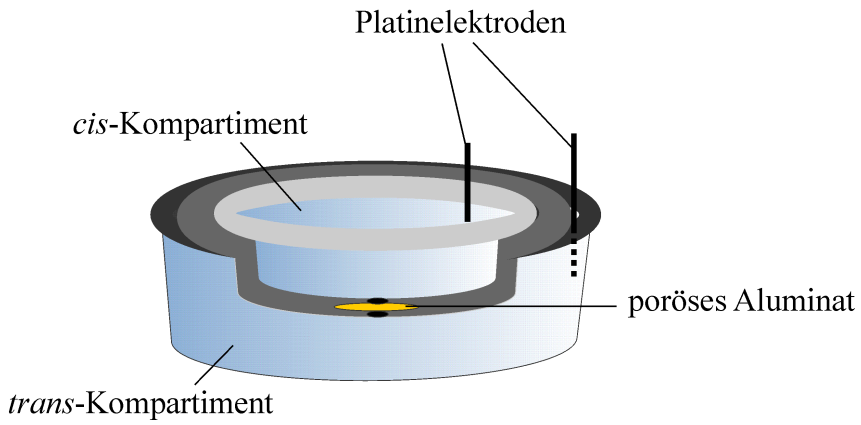


Abb. 3-6: Messaufbau zur Untersuchung von porenüberspannenden Membranen. Das poröse Substrat ist zwischen den ersten beiden Teilen der aus drei Komponenten bestehenden Teflonkammer mit Hilfe von Dichtringen eingespannt. Über das *trans*-Kompartiment werden die einzelnen Teile fixiert. In die elektrolyt-gefüllten *cis*- und *trans*-Kammern tauchen zur Detektion des Stroms Platinelektroden.

3.2 Messung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin

3.2.1 Allgemeine Anmerkungen zur Messung lichtinduzierter Ströme

Es können Ströme durch Licht induziert werden, wenn in einem System nach Bestrahlung eines Photorezeptors unter Aufbau einer Potentialdifferenz ein Fluss von Ladungsträgern erfolgt. Die prominentesten Beispiele aus der Natur sind die zur Photosynthese benötigten Photosysteme I und II, in denen durch Belichtung eine Elektronentransferkaskade ausgelöst wird und eine Ladungstrennung erfolgt. Ein weiteres lichtaktives biologisches System stellt die Gruppe der Rhodopsine dar, die als Ladungsträger Protonen oder andere Ionen wie Na^+ oder Ca^{2+} nutzen. Photostrommessungen wurden und werden neben einer Reihe von anderen Methoden unter anderem dazu genutzt, den Mechanismus der Ladungsübertragung zu untersuchen (Bamberg et al., 1979; Ernst et al., 2008). In jüngerer Zeit werden für Rhodopsine und vor allem für die Photosysteme mit ihrem Chromophor Cytochrom *c* technische Anwendungen gesucht, die von der Entwicklung von Leuchtdioden bis hin zu Energiequellen für chemische Prozesse wie der Wasserstoffgenerierung reichen. Auch auf diesem Forschungsfeld wird auf die Methode der Photostrommessung zurückgegriffen (Badura et al., 2006; Pandey et al., 1999; Trammell et al., 2007).

3.2.1.1 Prinzip der Messung von Photoströmen

Das Prinzip dieser Messmethode besteht darin, die lichtinduzierten Ströme im Nanoamperebereich zu detektieren. Dazu wird ein Operationsverstärker genutzt, welcher als Strom-Spannungs-Wandler dient. So können unter Verwendung großer Widerstände kleine Ströme aufgezeichnet werden. Das Messsignal wird von zwei Elektroden detektiert, wobei das Elektrodenmaterial von dem jeweiligen experimentellen Aufbau abhängt.

Um das Singal möglichst rauscharm aufzeichnen zu können, ist im Strom-Spannungs-Wandler ein Dämpfungsglied, eine Parallelschaltung aus einem Ohmschen Widerstand R und einem Kondensator C, integriert, dessen Zeitkonstante $\tau_d = RC$ variiert werden kann. Die Zeitkonstante τ_d bestimmt die Zeitauflösung des detektierten Signals, im Fall der Photostromessungen also der Potentialdifferenz U_{an} nach Belichtungsbeginn (Gl. 3-10):

$$U_{\mathrm{an}} = U_{\mathrm{an,max}} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{RC} \right) \right) \tag{3-10}$$

In Abb. 3-7 ist der simulierte Verlauf für U_{an} Als Funktion verschiedener Dämpfungsglieder dargestellt.

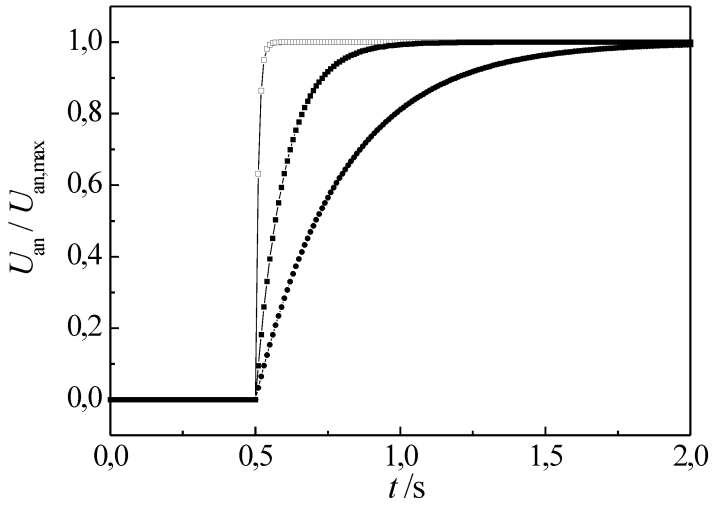


Abb. 3-7: Berechneter zeitlicher Verlauf der normierten Potentialdifferenz $U_{\mathrm{an}}/U_{\mathrm{an,max}}$ in Abhängigkeit vom verwendeten Dämpfungsglied. Dem Rückkopplungswiderstand wurde ein Wert von 100 MΩ zugewiesen. (□) τ = 10 ms mit C = 0,1 nF, (■) τ = 100 ms mit C = 1 nF und (●) τ = 300 ms mit C = 3 nF.

Der Rückkopplungswiderstand R = 100 MΩ wurde festgehalten, während die Kapazität des Kondensator zwischen 0,1 und 3 nF variiert wurde. Am schnellsten wird die maximale Spannung mit einem Dämpfungsglied detektiert, das eine kleine Zeitkonstante von 10 ms aufweist. Wird τ_{d} um eine Größenordnung erhöht, modifiziert dies die Amplitude des Messsignals in den ersten 500 ms des Spannungsaufbaus. Eine weitere Steigerung um den Faktor 3 beeinflusst die Amplitude des Signals in einem etwa doppelt so langen Zeitraum.

3.2.1.2 Auswertung von Photostrommessungen

Entscheidend bei der Auswertung des Messsignals ist die Berücksichtigung des zur Aufzeichnung gewählten Verstärkungsfaktors. Daneben ist es üblich, die Stromdichte J anzugeben, um einen Vergleich zwischen Daten unterschiedlicher Messsysteme zu ermöglichen. In Abwesenheit einer dem System aufgeprägten Spannung ist vor der Belichtung ein Stromfluss von 0 A zu erwarten. Durch Elektrodenpolarisation können Potentiadifferenzen generiert und damit ein von der Belichtung unabhängiger Strom detektiert

werden. Der Betrag dieses Stroms wird je nach Vorzeichen zu den Messwerten addiert oder von diesen subtrahiert.

Des Weiteren wurden die transienten Stromantworten bezüglich der darin enthaltenen Zeitkonstanten τ analysiert. Dazu wurde an ein entsprechendes Datenintervall eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst.

3.2.2 Messung von Protonenpumpströmen an BR-haltigen Membranen

Aufbau der Apparatur

In dieser Arbeit wurde die Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin an unterschiedlichen Membransystemen untersucht. Die lichtinduzierten Stromdichten lagen dabei im Nanoampere-Bereich. Das Messsignal wurde als Spannung ausgegeben und an einen Strom-Spannungs-Wandler (428 *Current Amplifier*, Keithley, Germering) geleitet, der eine Verstärkung des Signals um den Faktor 10^3 - 10^{11} erlaubt. Das Messsignal wurde vor Ausgabe an einen Rechner gefiltert, wobei das verwendete Dämpfungsglied eine Zeitkonstante von 100 ms besaß. Mittels einer A/D-Wandlerkarte (National Instruments, München) konnte das verstärkte Signal von einem Rechner verarbeitet werden. Ein *Labview*-Programm diente dazu, die Strommessung anzusteuern und das Signal aufzuzeichnen. Dabei konnte mit Hilfe der Software die Zeitnahme der Messung sowie die Anzahl der Datenpunkte vorgegeben werden.

Als Stahlungsquelle diente eine Halogenlampe (KL 2500, Opto Sonderbedarf GmbH, München), deren Spektrum den gesamten sichtbaren Bereich abdeckte. Mittels eines 515 nm-Kantenfilters konnten Wellenlängen selektiert werden, die im Absorptionsbereich des Proteins liegen. Über einen Lichtleiter konnte die Strahlung an die in einem abgedunkelten Faradaykäfig platzierten Proben gelangen. Durch den Einbau einer Blende in den Lichtleitergang gelang es, die Belichtungszeit der Proben gezielt zu manipulieren.

Versuchsdurchführung

Die verwendeten Messkammern entsprechen den in Kap. 3.1.6 erläuterten Konstruktionen. Zur Detektion der Protonenpumpströme wurden Platin-, Silber/Silberchlorid- (Ag/AgCl) bzw. Goldelektroden verwendet. Zur Messung an porenüberspannenden Membranen wurden zwei Ag/AgCl-Elektroden in die Pufferlösung getaucht, die über einen Metallblock

mit dem Verstärker kontaktiert wurden. Um das Messsignal an dem Aufbau für festkörperunterstützte Membranen abzugreifen, wurde die Goldelektrode über eine zweite Goldelektrode kontaktiert. Ein in die Pufferlösung eingetauchter platinierter Platindraht diente als Gegenelektrode. Die Anordnung der einzelnen Messelemente entspricht dem Impedanzaufbau, der in den Abb. 3-5 und 3-6 schematisch dargestellt ist. Die Lichtquelle war jeweils vertikal in einem möglichst geringen Abstand von wenigen Millimetern über der Membranoberfläche platziert.

3.3 UV/VIS-Spektroskopie

Die Methode der UV/VIS-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung von Substanzen, die elektromagnetische Strahlung in einem Wellenbereich von 200 – 800 nm absorbieren. Zur Absorption sind Atomgruppen eines Moleküls befähigt, deren elektronische Übergänge energetisch im Bereich des eingestrahlten Lichts liegen. Dabei werden die Moleküle aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 gehoben. Der Übergang von Elektronen erfolgt in der Regel aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Die Absorption A ist in einem gewissen Bereich proportional zur Konzentration der untersuchten Moleküle, wie im Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben (Gl. 3-11):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \tag{3-11}$$

Dabei bezeichnet ε den molaren Extinktionskoeffizienten, einen substanzspezifischen Parameter, der von der Temperatur abhängig ist. Die Konzentration der untersuchten Substanz ist darin mit c, die Dicke der Messküvette mit d berücksichtigt.

Versuchsdurchführung

Die UV/VIS-Spektroskopie (Cary 50, *Software*-Packet Cary WinUV 2.0, Varian, Darmstadt) wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Konzentrationsbestimmung von Gramicidin D- und Bacteriorhodopsin-haltigen Lösungen eingesetzt. Eine Lösung von Gramicidin D in Trifluorethanol wurde in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Wellenlängenbereich von 270 – 320 nm untersucht. Das vom Hersteller als

Gramicidin oder Gramicidin D deklarierte Peptid ist eine Mischung der Peptide Gramicidin A, B und C in einem Verhältnis von 80 – 85 % Gramicidin A, 6 – 7 % Gramicidin B und 5 – 14 % Gramicidin C. Die Peptide unterscheiden sich jeweils in ihrer Aminosäuresequenz, gegenüber Gramicidin A ist einer der vier Tryptophanreste (Position 11 vom N-terminalen Ende ausgehend) gegen Phenylalanin in der Variante B und gegen Tyrosin in der Variante C ausgetauscht. Zur Berechnung der Konzentration ist die Anzahl der Tryptophanreste entscheidend, da deren Absorption bei 283,9 nm mit dem molaren Extintionskoeffizienten $\varepsilon = 5690\ \mathrm{l\ mol^{-1}\ cm^{-1}}$ (Edelhoch, 1967) zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wird. Näherungsweise ist die Berechung der Gramicidin D-Konzentration unter Annahme von vier Tryptophanresten mit $4 \times \varepsilon = 5690\ \mathrm{l\ mol^{-1}\ cm^{-1}}$ gültig.

Zur Untersuchung der Bacteriorhodopsin-Konzentration in den verwendeten Purpurmembranfragmenten wurde die wässrige Pufferlösung (50 mM Tris, pH 7,4) in einem Wellenlängenbereich von 350 – 650 nm unter Verwendung einer 1 cm dicken Kunststoffküvette vermessen. Der Chromophor des Bacteriorhodopsin, ein kovalent gebundener Retinalrest, weist in der nativen Form einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 63000\ \mathrm{l\ mol^{-1}\ cm^{-1}}$ bei 568 nm auf (Oesterhelt und Hess, 1973).

3.4 CD-Spektroskopie

Die Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie ist eine Variante der Absorptionsspektroskopie im UV und VIS-Bereich. Auf Grund der unterschiedlichen Absorption der Komponenten von zirkular polarisiertem Licht durch chirale Biomoleküle kann deren Konformation bestimmt werden. Dies wird insbesondere zur Charakterisierung von Makromolekülen wie Peptiden und Proteinen genutzt (Galla, 1988).

Theoretische Grundlagen

Die in der CD-Spektroskopie eingesetzte elektromagnetische Strahlung ist zirkular polarisiert. Um dieses zu erzeugen, wird linear polarisiertes Licht senkrecht zur optischen Achse auf doppelbrechende Materialien, wie etwa $\lambda/4$-Plättchen aus Quarz oder Glimmer gelenkt. Dabei wird der linear polarisierte Lichtstrahl in zwei aufeinander senkrecht stehende, linear polarisierte Komponenten gleicher Amplitude E_1 und E_2 aufgespalten (Snatzke, 1981).

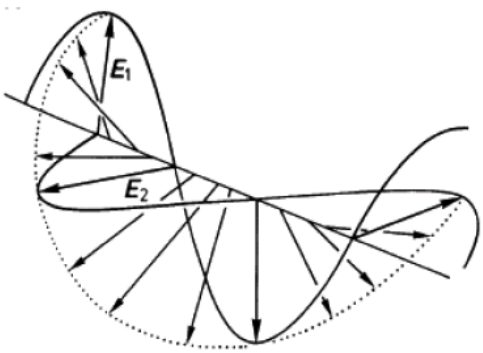


Abb. 3-8: Zirkular polarisiertes Licht mit senkrecht aufeinander stehenden E-Feldvektroden und einem Gangunterschied von $\lambda/4$ (Galla, 1988).

E_1 und E_2 werden als ordentlicher und außerordentlicher Strahl bezeichnet, die auf Grund unterschiedlicher Brechungsindizes n_r und n_l eine voneinander verschiedene Ausbreitungsgeschwindigkeit v im Material besitzten, welches in einem Gangunterschied resultiert. Dieser kann durch die definierte Dicke der Plättchen auf einen festen Wert von $\lambda/4$ eingestellt werden. Nach dem Austritt aus dem Material umläuft die Spitze des resultierenden Summenvektors dann die Ausbreitungsrichtung auf einer Spiralbahn, wie in Abb. 3-8 gezeigt.

Optisch aktive Substanzen absorbieren rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark, ausgedrückt durch die molaren Extinktionskoeffizienten ε_r und ε_l. Der Unterschied $\Delta\varepsilon = \varepsilon_r - \varepsilon_l$ zwischen beiden Extinktionskoeffizienten bildet die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie. In der Praxis findet jedoch die von der Wellenlänge λ abhängige Elliptizität θ_λ Anwendung (Gl. 3-12):

$$\tan\theta_\lambda = \frac{\sqrt{T_r} - \sqrt{T_l}}{\sqrt{T_r} + \sqrt{T_l}} \tag{3-12}$$

mit den Transmissionen T_r und T_l nach erfolgter Absorption. Für kleine θ_λ gilt das Lambert-Beersche Gesetz und damit wie in Gl. 3-13 angegeben näherungsweise:

$$\theta_\lambda = \ln 10 \frac{180°}{4\pi} (\varepsilon_l - \varepsilon_r) \cdot c \cdot d \tag{3-13}$$

mit der Konzentration c der untersuchten Substanz und der Schichtdicke d der Messküvette. Durch Normierung auf die Konzentration können Elliptizitäten unterschiedlicher Experimente quantitativ miteinander verglichen werden. Bei Polymeren, wie etwa Peptiden, wird dabei meist statt der molaren Masse die mittlere molare Masse eines Monomers (*mean residue weight*, MRW) berücksichtigt. Die so berechnete *mean residue weight*-Elliptizität θ_{MRW} wird dabei typischerweise in der Einheit Grad cm^2 dmol^{-1} angegeben (Gl. 3-14):

$$\theta_{\mathrm{MRW}} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot 100 \cdot MRW}{c \cdot d} \tag{3-14}$$

mit der Konzentration c der Dicke d der Messküvette. Die molare Masse von Gramicidin D kann lediglich als mittlere molare Masse aus den Werten der Komponenten Gramicidin A, B und C mit einem Wert von 1875,59 g mol^{-1} angegeben werden (Kleinekofort et al., 1996).

Charakterisierung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen

Die Sekundärstruktur von Proteinen, d. h. α-Helices, β-Faltblättern und Zufallsknäulen wird durch die Aminosäuresequenz bestimmt. Auf Grund der Kopplung von strukturell benachbarten Peptidbindungen, die durch die Verknüpfung chiraler α-C-Atome selbst optisch aktiv sind, wird in der Sekundärstruktur zusätzlich optische Aktivität induziert. Dies kann genutzt werden, um mit Hilfe der CD-Spektroskopie Informationen zur Struktur der Makromoleküle zu erhalten. Die unterschiedlichen Strukturen werden in den CD-Spektren an Maxima und Minima bei charakteristischen Wellenlängen erkannt. Optisch aktive Aminosäureseitenketten oder prosthetische Gruppen beeinflussen die Elliptizität zusätzlich, wodurch eine genaue Aussage zum Aufbau von Proteinen möglich ist.

Versuchsdurchführung

Die Untersuchungen wurden an einem Spectropolarimeter J-810 (Jasco, Groß-Umstadt) in einem Frequenzbereich von 190 - 270 nm mit einer Geschwindigkeit von 100 nm min^{-1} durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 30 °C unter Verwendung einer Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Zur Mittelung der Daten wurden fünf Spektren je Probe akkumuliert. Die Steuerung der Messung sowie die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit dem *Software*-Paket *Spectra Manager*, Version 1.53 von Jasco. Die Vesikel wurden in

Reinstwasser präpariert und auf eine Lipidkonzentration von 0,3 mg ml^{-1} eingestellt. Um allein den Beitrag zur Elliptizität von Gramicidin D darstellen zu können, werden die Daten Gramicidin-haltiger Vesikelsuspensionen mit Daten, erhalten durch Messung an Vesikelsuspensionen in Abwesenheit von Gramicidin, korrigiert.

3.5 Präparative Methoden

3.5.1 Herstellung von porösem Aluminat mit hochgeordneter Porenstruktur

Die Generierung von porösen, hochgeordneten Strukturen während der Anodisierung von Aluminium ist ein gut untersuchter und etablierter Prozess (Jessensky et al., 1998; Li et al., 1998a; Li et al., 1998b; Masuda und Fukuda, 1998; Nielsch et al., 2002). Die gewonnenen Substrate finden Anwendung in einer Reihe von Forschungsfeldern, z. B. bei der Generierung von *carbon nanotubes* (Zheng et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit dienten die porösen Aluminate als Substrate zum Aufbau von porenüberspannenden Lipidmembranen.

3.5.1.1 Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate

Aluminium ist ein leicht oxidierbares Metall mit sehr niedrigem Redoxpotential (-1,68 V bei 25 °C und pH = 0) (Hollemann und Wiberg, 1995). Dies hat zur Folge, dass es an Luft oder in wässriger Lösung schnell von einem Oxidfilm überzogen wird. Diese wenige Nanometer dicke Schicht wirkt wie ein Schutzfilm und verhindert eine weitere Oxidation des Metalls (Passivierung). Die Reaktion kann jedoch durch Anlegen einer äußeren Spannung aufrecht erhalten werden. Dabei laufen an den Elektroden folgende Reaktionen ab:

$$\text{Anode:} \quad 2Al + 3H_2O \rightarrow Al_2O_3 + 6H^+ + 6e^- \qquad (3\text{-}15)$$

$$\text{Kathode:} \quad 6H^+ + 6e^- \rightarrow 3H_2 \qquad (3\text{-}16)$$

Die Oxidation von Al zu Al^{3+} findet an der Metall/Oxid-Grenzfläche statt (Gl. 3-15). Die Al^{3+}-Ionen bilden entweder mit zur Metall/Oxid-Grenzfläche gewanderten O^{2-} bzw. OH^--Ionen Al_2O_3 oder driften auf Grund des angelegten Feldes zur Oxid/Elektrolyt-Grenz-

fläche. An der Kathode werden Protonen zu Wasserstoff reduziert (Gl. 3-16). Das in Folge der Anodisierung erhaltene Produkt ist maßgeblich von dem eingesetzten Elektrolyten abhängig (Tab. 3-2). Schwache Säuren wie Borsäure oder Zitronensäure können das gebildete Oxid nicht auflösen, was zur Ausbildung eines massiven Barriereoxids führt. In Bereichen dünnerer Oxidschichten ist das elektrische Feld stärker ausgeprägt, daraus folgt ein erhöhter Ionenstrom und somit schnellere Oxidbildung an diesen Stellen. Das Oxid wächst so lange, bis die angelegte Spannung nicht mehr ausreicht, um den Ionenstrom durch das Oxid aufrecht zu erhalten.

Tab. 3-2: Produkte und Reaktionen im Rahmen der Anodisierung von metallischem Aluminium.

Produkt	Reaktion	Elektrolyt
Barriereoxid	Oxidbildung an den Grenzflächen H_2O/Al_2O_3 und Al_2O_3/Al	Borsäure Zitronensäure
poröses Oxid	Oxidbildung an der Grenzfläche Al_2O_3/Al	Oxalsäure Phosphorsäure
elektropolierte Aluminiumoberfläche	Alternierende Bildung und Auflösung des Oxids	konz. Säuren

Werden dagegen starke Säuren, etwa konzentrierte Schwefel- und Phosphorsäure verwendet, wird das Oxid sofort nach der Bildung aufgelöst. Auch hier wächst das Oxid wie oben beschrieben auf Grund von Unebenheiten an bestimmten Stellen rascher. Durch ständiges Bilden und Auflösen von Oxid wird die Oberfläche geglättet, es entsteht ein reflektierendes Substrat mit einer dünnen, planaren Oxidschicht. Der Anodisierungsprozess in Gegenwart von Phosphorsäure oder Oxalsäure, welche das Aluminiumoxid relativ langsam auflösen, wird im Folgenden genauer erläutert.

Anodisierungsprozess

In Abb. 3-9 ist der Prozess der Porenbildung schematisch (A) und als Stromantwort in den ersten Sekunden der Anodisierung (B) dargestellt. Nach dem Anlegen einer konstanten Spannung entsteht zunächst ein Barriereoxid, welches zu einem starken Abfall des Stroms auf etwa 10 % seines Anfangswerts führt (Phase 1). Auf Grund von Inhomogenitäten in der Aluminiumoberfläche ist das gebildete Oxid unterschiedlich dick. Dies wirkt sich auf

die lokale Stärke des über der Oxidschicht abfallenden elektrischen Feldes aus. Bereiche kleinerer Schichtdicke besitzen eine größere Feldstärke als Bereiche größerer Schichtdicke. Daher werden an diesen Stellen die Al-O-Bindungen stärker polarisiert, so dass hier das Al_2O_3 schneller aufgelöst wird. Zudem bewirkt die höhere Feldstärke an diesen Stellen einen höheren Ionenfluss, so dass neben der Auflösung des Oxids auch seine Bildung beschleunigt wird. Die im Substrat vorhandenen Unebenheiten dienen demnach als Keime für die entstehenden Poren (Phase 2). Der Strom steigt nun an, bis die ganze Substratoberfläche mit Poren bedeckt ist und diese sich gegenseitig in ihrem Wachstum einschränken (Phase 3). Von hier an stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Oxidbildung an der Oxid/Metall-Grenzfläche und Oxidauflösung an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche ein (Phase 4). Theoretisch hätte dies einen konstanten Strom zur Folge.

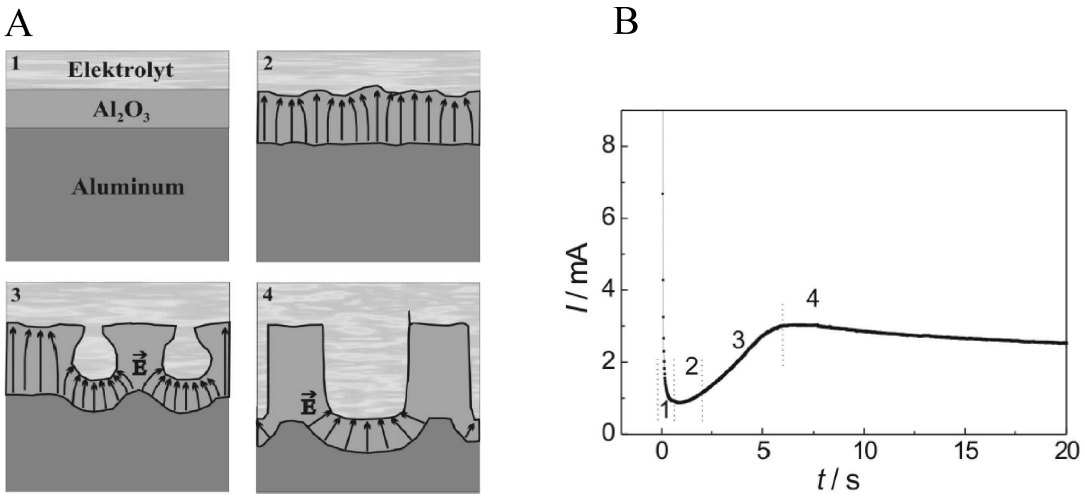


Abb. 3-9: Kinetik des Porenwachstums **A** als schematische Darstellung und **B** in Form der Stromantwort zu Beginn der Anodisierung mit folgenden Teilprozessen: 1) Bildung eines Barriereoxids, 2) Konzentration der elektrischen Feldlinien an Vertiefungen, 3) Entstehung erster Porenkeime, 4) Porenwachstum.

Der in Abb. 3-9 B erkennbare leichte Abfall des Stroms (Phase 4) ist auf Konzentrationsänderungen des Elektrolyten in den Poren zurückzuführen. Jedoch wird auch die Konkurrenz der Poren um den Kontakt mit dem Metall für den Abfall verantwortlich gemacht. Dies bewirkt, dass einige Poren im Wachstum stehen bleiben, wodurch der Gesamtstrom reduziert wird.

Bildung hochgeordneter Strukturen

Im vorherigen Abschnitt wurde erläutert, dass unregelmäßige Vertiefungen auf der Oberfläche des Aluminiums als Keime für das Porenwachstum dienen. Gerade diese Inhomogenitäten führen dazu, dass die Poren zunächst unregelmäßig angeordnet sind. Im Laufe des Ätzprozesses wirken diverse Kräfte zwischen den Poren. Zum einen konkurrieren die Porenböden um den Stromfluss, zum anderen beansprucht das gebildete Oxid ein größeres Volumen als das verbrauchte Metall, welches zu mechanischen Spannungen und damit abstoßenden Kräften führt. Dadurch nehmen die Porenböden eine hexagonale Anordnung ein, wie es für zwei-dimensionale Systeme im Energieminimum bekannt ist. Wird das Oxid abgelöst, bleibt eine hexagonal vorstrukturierte Substratoberfläche zurück, deren Vertiefungen als Keime für geordnete Poren dienen (Masuda und Fukuda, 1998).

Anodisierungsbedingungen

Um eine hohe Ordnung der Porenstruktur zu erreichen, wird meist bei niedrigen Temperaturen um 0 °C anodisiert. Unter diesen Bedingungen sind die Wachstumsraten gering, wodurch die für die Anordnung der Poren verantwortlichen Gleichgewichtsprozesse weniger schwanken. Die Neigung zur Fehlstellenbildung ist somit gering. Durch Variation der Anodisierungsspannung können der Porenabstand sowie der Durchmesser der Poren gesteuert werden. Dabei wächst der Abstand der Poren mit 2,6 nm V^{-1}. Die bislang erreichten Porendurchmesser liegen im Bereich von 10 - 400 nm (Nielsch, 2000). Daneben ist die Schichtdicke des Oxids an den Porenböden ebenfalls eine Funktion der angelegten Spannung, die Abhängigkeit wurde zu 1,3 nm V^{-1} bestimmt. Im Gegensatz dazu hängt die Porentiefe ausschließlich von der Dauer des Ätzprozesses ab. Beispielsweise wurde für Oxalsäure bei einer Spannung von 40 V ein Wachstumsrate von 1 - 2 µm h^{-1} gefunden, während dieser Wert für Phosphorsäure mit 160 V bei 4 – 5 µm h^{-1} liegt (Li et al., 1998a).

3.5.1.2 Herstellung siebartiger poröser Aluminate

Poröse Aluminate mit einer Siebstruktur werden durch eine Reihe von Einzelprozessen erhalten, deren Versuchsbedingungen im Folgenden erläutert werden.

Elektropolieren

Hochreine Aluminiumfolien (99,999 %, Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) mit einer Dicke von 0,5 cm wurden zu Stücken von 2 × 2 cm^2 geschnitten und durch Spülen mit

Ethanol von organischen Rückständen befreit. Als Elektrolyt diente ein Gemisch aus Schwefelsäure (konz.), Phosphorsäure (85 %) und Reinstwasser in einem Massenverhältnis von 1:1:1. Das Elektropolieren ist ein Anodisierungsprozess, folglich wurden die Substrate mit einem als Anode dienenden Kupferblock kontaktiert. Ein in die Elektrolytlösung tauchendes Netz aus Platindraht stellt die Kathode dar. Nach Erwärmen auf 70 °C mittels einer Heizplatte wurde dreimal für 45 s eine Spannung von 2 V (2400 Source Meter, Keithley, Cleveland, USA) angelegt. Dabei fiel der Strom auf einen Wert von 0,3 - 0,4 A ab. Die Substrate wurden anschließend mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Herstellung geordneter Poren

Wie oben erläutert, können hochgeordnete Porenstrukturen durch eine Zwei-Schritt-Anodisierung gewonnen werden. Dabei kam die in Abb. 3-10 schematisch gezeichnete Apparatur zum Einsatz (Jessensky, 1997). Die Anordnung der Elektroden gleicht derjenigen, die für das Elektropolieren beschrieben wurde. Mit Hilfe eines Peltierelements wurde die von einer Isolierung ummantelte Ätzkammer auf eine Temperatur von 1,5 °C gebracht.

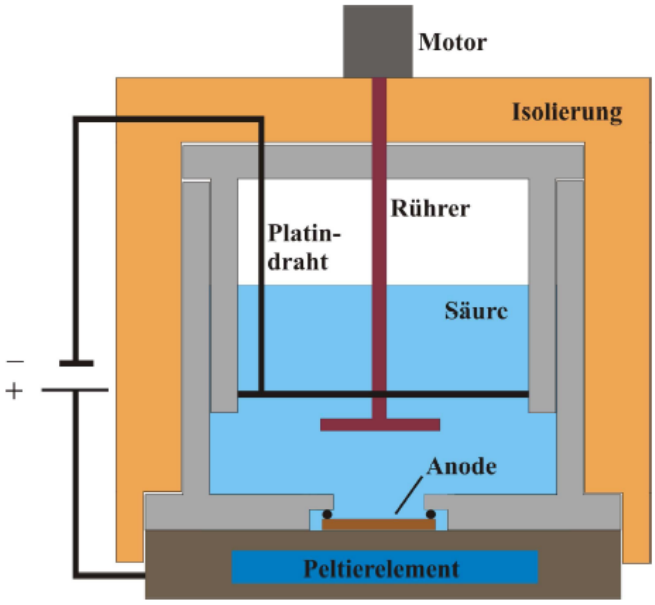


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der Apparatur zur Anodisierung von Aluminium: Die Aluminiumfolien werden am Boden der Apparatur über einen Kupferblock als Anode kontaktiert. Ein Platindraht taucht als Gegenelektrode in die Elektrolytlösung. Der Rührer ist wenige Millimeter über dem Substrat positioniert, um eine konstante Konzentration des Elektrolyten an der Reaktionsfläche zu gewährleisten (Jessensky, 1997).

Die Isttemperatur wurde über ein Thermoelement am Peltierelement gemessen und mittels eines Temperaturreglers (Greisinger Elektronik GmbH, Regenstauf) kontinuierlich geregelt. Durch Rühren der Elektrolytlösung wurde eine konstante Konzentration der an der Reaktion beteiligten Spezies an der Probenoberfläche gewährleistet. Es wurde eine 0,3 M Oxalsäurelösung verwendet und eine Spannung von 40 V (PS 280 DC Power Supply, Tektronix, Beaverton, USA) angelegt. Die Dauer der ersten Anodisierung betrug 12 h, die der zweiten 5 d. Das im ersten Schritt gebildete Aluminiumoxid wurde durch Behandlung mit saurer Chrom(VI)-Oxid-Lösung (1,8 Gew. % CrO_3, 7,06 Gew. % H_3PO_4) bei 70 °C und einer Inkubationsdauer von 5 h entfernt. Nach jedem Schritt wurden die Substrate für 1 h in Reinstwasser eingelegt und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

Gewinnung siebartiger Strukturen

Zum Entfernen des überschüssigen Aluminiums wurden die Substrate in einer gerührten, gesättigten $HgCl_2$-Lösung inkubiert. Die Substrate wurden dafür in Teflonhaltern plaziert und bei Raumtemperatur so lange in der Lösung belassen, bis das Metall vollständig vom Aluminiumoxid abgelöst war. Nach dieser Behandlung wurden die Träger für 1 h in Reinstwasser gelegt, um $HgCl_2$-Reste zu entfernen. Durch chemisches Ätzen mit H_3PO_4 (10 Gew. %) bei 30 °C wurde das Barriereoxid entfernt. Zur Gewinnung siebartiger Substrate wurden die Porenböden in einem definierten Bereich abgelöst (Abb. 3-11). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Substrate mit Siebstrukturen unterschiedlicher Fläche verwendet. Der Durchmesser der geöffneten Porenbodenfläche betrug 1 bzw. 5 mm.

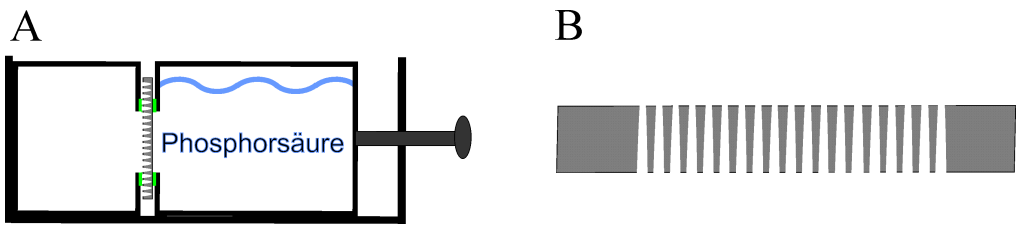


Abb. 3-11: A Schematische Darstellung des Aufbaus zum Herstellen von siebartigen Aluminiumoxidstrukturen. Durch chemisches Ätzen wird an der mit Phosphorsäure benetzten Substratfläche das Barriereoxid aufgelöst. **B** Die Substrate besitzen in einem definierten Bereich eine durchgehend geöffnete Porenstruktur.

3.5.2 Präparation von platinierten Platinelektroden

Um eine möglichst große Elektrodenoberfläche zu erhalten, wurde durch einen elektrochemischen Prozess auf einem Platindraht eine Platinschicht abgeschieden. Große Elektrodenflächen liefern gemäß Gl. 3-6 große Kapazitäten und sind immer dann gewünscht, wenn sie in der Impedanzspektroskopie eingesetzt werden. Unterscheiden sich die Elektrodenkapazitäten stark von den anderen Systemparametern, können sie von diesen diskriminiert werden. Häufig werden sie nicht mehr im gewählten Frequenzfenster detektiert und müssen demnach bei Datenanpassungen nicht berücksichtigt werden. Die platinierten Platindrähte wurden in dieser Arbeit zu impedanzspektroskopischen Untersuchungen sowie zur Messung lichtinduzierter Photoströme verwendet.

Zunächst wurden die Platindrähte (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) mit einer Dicke von 1 mm zur Vergrößerung der Oberfläche mit Schmirgelpapier (grobe Körnung) aufgeraut. Um das Material von Fett und anderen organischen Verunreinigungen zu befreien, wurden die Drähte über Nacht in Aceton belassen und anschließend mit Ethanol p. a. gründlich gespült. Die zur Platinabscheidung verwendete Lösung (3 % (*w*/*v*) $PtCl_4$, 0,025 % (*w*/*v*) $Pb(OOCCH_3)_4$, 25 mM HCl) wurde jeweils frisch hergestellt. An die in die Platinierlösung eingetauchten Platindrähte wurde zunächst für etwa 20 s eine DC-Spannung (DC *Power Supply* PS 280, Textronics, Wilmington, USA) von 1,5 V angelegt. Dies wurde durch Umpolung auf beiden Seiten je zwei Mal durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung auf 3,5 V eingestellt und für 2 min auf diesem Wert belassen, wiederum für jeden der beiden Drähte je zwei Mal. Jetzt konnte sehr deutlich die Abscheidung von schwarzem Platin an der Kathode und die Bildung von Chlorgas an der Anode beobachtet werden. Nach diesem Prozess wurden die Elektroden in ein Gefäß mit Reinstwasser gegeben und für 1 min in einem Ultraschall-Wasserbad (Bandelin Electronics, Berlin) belassen. Dabei löste sich ein Teil des abgeschiedenen Metalls wieder ab. Diese beiden Schritte – elektrochemische Abscheidung und Ultraschallbehandlung – wurden so lange alternierend wiederholt, bis sich in Folge der Beschallung kaum noch Metall ablöste. Die Kapazität der Platinelektroden wurde impedanzspektroskopisch zu ~ 1 mF bestimmt. Anschließend wurden die Elektroden in Reinstwasser gelagert.

3.5.3 Präparation von Ag/AgCl Elektroden

Das Prinzip bei der Herstellung von Ag/AgCl Elektroden besteht, wie im vorherigen Kapitel erläutert, in der Oberflächenvergrößerung durch elektrochemische Materialabscheidung. Im Gegensatz zu platinierten Platinelektroden sind Ag/AgCl Elektroden nicht polarisierbar und eignen sich deshalb zur Messung von Photoströmen an porenüberspannenden Membranen.

Die Silberdrähte (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) mit einem Durchmesser von 1 mm wurden zunächst zur Beseitigung organischer Rückstände über Nacht in Aceton eingelegt. Anschließend wurden sie ca. 1 cm tief in 0,5 M KCl eingetaucht und an eine Spannungsquelle (DC *Power Supply* PS 280, Textronics, Wilmingtion, USA) angeschlossen. Die angelegte Spannung wurde so hoch gewählt, dass an der Kathode deutlich die Bildung von Wasserstoff zu sehen war. Durch regelmäßiges Umpolen nach jeweils 10 s kam es zu einer gleichmäßigen Abscheidung von Silberchlorid an beiden Elektroden, welche dann eine violette bis schwarze Farbe aufwiesen. Die Elektroden wurden vor jeder Messung frisch präpariert.

3.5.4 Isolierung der Purpurmembranen aus *Halobacterium salinarium*

3.5.4.1 Kultivierung

Die Isolierung der Purpurfragmente erfolgte nach einer abgeänderten Vorschrift des Instituts für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. 1 l Normalmedium setzte sich zusammen aus 250 g NaCl, 20 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 2 g KCl, 3 g Trinatriumcitrat-dihydrat und 10 g Oxoid-Pepton, pH = 7,0. Zunächst wurde in einem 100 ml Schüttelkolben eine 30 ml-Vorkultur angesetzt. Um die Sauerstoffzufuhr zu minimieren, wurden die Kolben mit Schaumstoffdeckeln verschlossen. Das garantiert die für ein optimales Zellwachstum semianaeroben Bedingungen. Die Vorkultur wurde unter langsamem Schütteln für 10 Tage bei 37 °C inkubiert. Für die Hauptkulturen wurden in einem 1 l Kolben 500 ml des Nährmediums mit 10 ml der Vorkultur versetzt und 13 Tage bei 37 °C im Dunkeln geschüttelt. Danach konnten die Kulturen noch bis zu einer Woche bei 28 °C im Dunkeln gelagert werden, bevor mit der Fraktionierung der Zellmembranen begonnen wurde.

3.5.4.2 Fraktionierung der Zellmembranen

Die Kulturlösung wurde zunächst bei 4 °C und 12000 × *g* zentrifugiert (Sigma 4K15-Rotor 12256, 8600 rpm, Beckman, Krefeld). Das Zellpellet wurde möglichst konzentriert in frisch angesetztem Basalsalzpuffer (1 l enthält 250 g NaCl, 20 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2 g KCl, pH = 7,0) resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNAase I (Grade II, Roche, Mannheim) versetzt. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension auf das 10-fache ihres Volumens mit H_2O verdünnt und 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellmembranen wurden anschließend bei 4 °C und 186000 × *g* abzentrifugiert (TI 70-Rotor, 43000 rpm, Beckman, Krefeld). Das Pellet wurde in 1,5 ml Pufferlösung (50 mM Tris, pH 7,5) aufgenommen und durch Pottern resuspendiert.

Die Fraktionierung der Zellmembranfragmente erfolgte mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierfür wurden mit einem Gradientenmischer durch Mischen von 16 ml 45 % (*w*/*w*) und 18 ml 20 % (*w*/*w*) Sucroselösung Sucrosegradienten hergestellt und mit ca. 2 ml Membransuspension beschichtet. Die Proben wurden bei 80000 × *g* und 15 °C für 14 h zentrifugiert, wobei die Zentrifuge am Ende des Vorgangs ohne Bremse auslief (Ausschwingrotor SW 28, 16500 rpm, Beckman). Nach erfolgreicher Trennung waren drei Banden zu sehen: eine violette (Purpurmembranen), eine braun-gelbe (braune Membran, enthält Cytochrom *b* und monomeres Bacteriorhodopsin) und eine gelb-orange. Die violette Bande wurde mit einer Pasteurpipette isoliert und zwei Mal mit H_2O gewaschen. Die Zellmembranen wurden dafür jeweils bei 186000 × *g* bei 4 °C für 1 h abzentrifugiert (TI 70-Rotor, 43000 rpm, Beckman). Am Ende wurde das Zellpellet in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und durch Pottern homogenisiert. Mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie wurde die Bacteriorhodopsin-Konzentration in den Purpurmembranen ($\varepsilon = 63000\ \mathrm{l\ mol^{-1}\ cm^{-1}}$ bei $\lambda = 568$ nm (Oesterhelt und Hess, 1973)) zu 9,42 mg $\mathrm{ml^{-1}}$ bestimmt.

3.5.5 Synthese von Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3)

Die Synthese der Verbindnung Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) erfolgte ausgehend von 2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol **1** in sechs Stufen nach einer modifizierten Vorschrift von Boden et al. (1997). In Abb. 3-12 ist der Syntheseweg in einer Übersicht dargestellt. Im Folgenden wird die Präparation der einzelnen Stufen (*i* – *vi*) ausführlich erläutert.

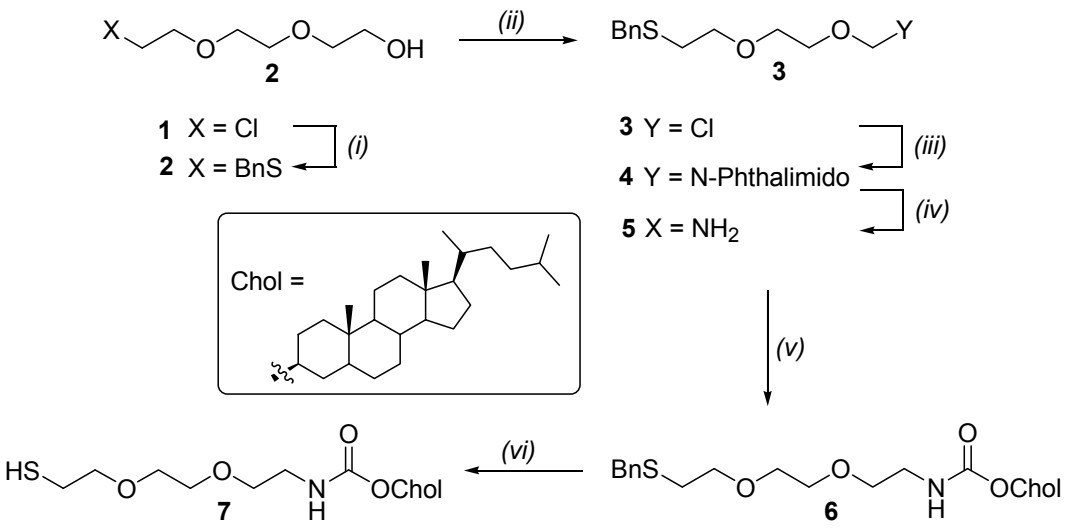


Abb. 3-12: Schematischer Überblick zur Synthese der Verbindung Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) aus der Ausgangssubstanz 2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol. Reagenzien, Bedingungen und Ausbeute: (*i*) BnSH, EtONa, EtOH (86 %); (*ii*) $SOCl_2$, Pyridin (64 %); (*iii*) Kaliumphthalimid, DMF, 100 °C (81 %); (*iv*) NH_2NH_2, EtOH, unter Rückfluss (70 %); (*v*) Cholesteryl-chloroformiat, Et_3N, CH_2Cl_2 (81 %); (*vi*) Na-NH_3 (93 %).

(*i*) Synthese von 8-Benzylthio-3,6-dioxaoctanol 2

100 ml eiskaltes Ethanol wurden mit Natrium (4,4 g, 192 mmol, 1,1 eq.) versetzt, das in kleinen Stückchen zugegeben wurde. Das Auflösen der Natriumstücke dauerte etwa 1 h. Dann wurden mittels einer Spritze zunächst Benzylmercaptan (20,4 ml, 174 mmol) und anschließend 2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol **1** (29,4 g, 174 mmol), das in Ethanol (50 ml) gelöst wurde, zugegeben. Das Gemisch wurde unter Rückfluss über Nacht erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktion durch Zugabe zu gesättigter Ammoniumchloridlösung (200 ml) beendet. Darauf wurde die Lösung mit Chloroform (3 × 200 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, gefiltert und dann am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Aufreinigung erfolgte

mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Cyclohexan, Ethylacetat und Methanol in einem Volumenverhältnis von 5:10:0,5. Die gewünschte Verbindung **2** wurde als farbloses Öl (40,02 g, 149,84 mmol, 86 %) isoliert. δ_H (300 Hz): 7,40 - 7,20 (5H, m, ArH), 3,80 (2H, s, Benzyl CH_2), 3,76 - 3,60 (10H, m, CH_2O), 2,63 (2H, t, J = 7 Hz, SCH_2), 2,58 (1H, t, OH; D_20); *m/z* ESI: 279 $[M+Na]^+$.

(*ii*) Synthese von 8-Benzylthio-3,6-dioxaoctylchlorid 3

Zu einer Lösung des Alkohols **2** (20,0 g 78,1 mmol) in Methylenchlorid (250 ml) wurde unter Rührern frisch über KOH destilliertes Pyridin (12,7 ml, 156,2 mmol, 2,0 eq.) und Thionylchlorid (6,3 ml, 85,9 mmol, 1,1 eq.) gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht unter Rückfluss sowie unter Argon erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde diese zu 2 M Salzsäure (250 ml) gegossen und mit Methylenchlorid (2 × 250 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser (50 ml) und 2 M Salzsäure (2 × 50 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung mit Cyclohexan und Ethylacetat in einem Volumenverhältnis von 2:1 wurde das Produkt **3** als fast farbloses Öl (13,58 g, 49,59 mmol, 64 %) erhalten. δ_H (300 MHz): 7,30 (5H, m, ArH), 3,80 (2H, s, Benzyl CH_2), 3,75 - 3,60 (10H, m, CH_2O), 2,65 (2H, t, $J \approx 7$ Hz, SCH_2); *m/z* ESI: 297 $[M+Na]^+$.

(*iii*) Synthese von 8-Benzylthio-1-(*N*-phtalimido)-3,6-dioxaoctan 4

Zu einer Lösung des Chlorids **3** (14,5 g, 53,1 mmol) in Dimethylformamid (50 ml) wurde Kaliumphtalimid (11,8 g, 63,72 mmol, 1,2 eq.) gegeben und über Nacht bei 100 °C belassen. Danach wurde die abgekühlte Reaktionslösung in kaltes Wasser gegossen (100 ml) und mit Diethylether (3 × 75 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Wasser sowie gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und gefiltert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein Öl erhalten, aus dem durch Säulenchromatographie mit Cyclohexan und Ethylacetat in einem Volumenverhältnis von 2:1 das gewünschte Produkt **4** als farbloses Öl (16,63 g, 43,26 mmol, 81 %) isoliert wurde. δ_H (300 MHz): 7,85 (2H, m, Phthalimidrest, *ortho),* 7,68 (2H, m, Phthalimidrest, *meta),* 7,20 - 7,30 (5H, m, ArH), 3,92 (2H, t, J = 5 Hz, CH_2N), 3,76 (2H, t, J = 6 Hz, CH_20), 3,72 (2H, s, Benzyl, CH_2), 3,64 (2H, t, J = 6 Hz), 3,58 (4H, m, OCH_2), 2,58 (2H, t, J = 7,5 Hz, SCH_2); *m/z* ESI: 408 $[M+Na]^+$, 792,5 $[2M+Na]^+$.

(*iv*) Synthese von 8-Benzylthio-3,6-dioxaoctylamin 5

Zu einer gerührten Lösung des Phtalimids **4** (11,34 g, 29,5 mmol) in heißem Ethanol (60 ml) wurde Hydrazinhydrat (ca. 1 ml) gegeben und die Reaktion für 30 min unter Rückfluss erhitzt, bis ein weißer Niederschlag ausfiel. Nach einer weiteren Zugabe von Ethanol (50 ml) wurde mit Salzsäure (konz.) ein pH von 1 eingestellt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde eingeengt, bis ein weißer Niederschlag zu erkennen war. Die beiden Feststoffe wurden vereinigt, in Wasser (30 ml) gelöst und mit 1 M Natriumhydroxid alkalisch gestellt. Nach Extraktion mit Diethylether (3 × 50 ml) wurden die organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und gefiltert. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels unter verringertem Druck wurde ein schwach gelbfarbenes Öl erhalten, aus dem mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Ethylacetat und Methanol in einem Volumenverhältnis von 1:1 das Produkt **5** (5,27 g, 20,65 mmol, 70 %) isoliert wurde. δH (300 MHz) 7,30 - 7,20 (5H, m, ArH), 3,78 (2H, s, CH_2 Benzyl), 3,70 - 3,42 (8H, m, CH_2), 2,90 (2H, br. s, NH_2), 2,62 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH_2S); *m/z* ESI: 256 $[M-H]^-$, 510 $[2M-H]^-$.

(*v*) Synthese von Cholesterylurethan 6

Eine gerührte Lösung des Amins **5** (4,29 mg, 16,82 mmol) in trockenem Methylenchlorid (10 ml) wurde mit Argon gespült. Anschließend wurde mit einer Spritze Triethylamin (3,51 ml, 25,23 mmol, 1,5 eq.) sowie der Feststoff Cholesteryl-chloroformiat (8,33 g, 18,50 mmol, 1,1 eq.) zugegeben und für 1,5 h gerührt. Danach wurde die Lösung in gesättigte Natriumbicarbonat-Lösung (100 ml) gegeben und mit Diethylether (3 × 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-lösung (50 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und gefiltert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde eine glasartige farblose Substanz erhalten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Methylenchlorid und Ether in einem Volumenverhältnis von 9:1 wurde das Produkt **6** (9,06 g, 13,59 mmol, 81 %) als glasartiger Feststoff erhalten. δ_H (300 MHz): 7,40-7,20 (5H, m, ArH), 5,38 (1H, d, J = 3 Hz Vinyleinheit Steroid), 5,22 (1H, br. s, NH Amid), 4,50 (1H, br. s, CHOR Steroid), 3,70 (2H, s, CH_2 Benzyl), 3,60 - 3,50(8H, m, CH_2O), 3,38 (2H, m, CH_2N), 2,62 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH_2S), 2,40 - 2,20 (2H, m, Steroid), 2,00 - 1,70 (4H, m, Steroid), 1,60 - 0,85 (34H, m, Steroid), 0,68 (3H, s, CH_3 Steroid); *m/z* ESI: 690,5 $[M+Na]^+$, 1357 $[2M+Na]^+$.

(*vi*) Synthese von Cholesterylpolyethylenoxythiol 7

Ein 250 ml Dreihalskolben mit Trockeneiskühler, Innenthermometer und Gaseinleitungsrohr wird im Dewar-Gefäß auf –78 °C abgekühlt, so dass der über einen Trockenturm eingeleitete Ammoniak (75 ml) verflüssigt werden konnte. Der Kühler war über einen Schlenkhahn mit einem Gasblasenzähler versehen, über den das Gas in den Abzug geleitet wurde. Bei der Verflüssigung konnte sich in der Apparatur ein Unterdruck bilden, der durch Öffnen und Schließen des Schlenkhahns ausgeglichen wurde. Nach Verflüssigung der gewünschten Menge Ammoniak wurde der Kolben mit Argon gespült und anschließend unter Erhalt des Argonstroms mit einem Septum verschlossen. Danach wurde 1 g Natrium, in Pentan abgewogen, zugegeben, das sich unter kräftiger Blaufärbung löst. Nach Einstellen auf –35 °C wurde eine Lösung von **6** (1,46 g, 2,19 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 ml) mittels einer Spritze zugeführt und 45 min unter Ammoniak-Rückfluss gekühlt. Danach wird wieder auf –78 °C abgekühlt und nasses Tetrahydrofuran zugegeben, worauf die Blaufärbung verschwunden ist. Es wurde langsam auf 0 °C erwärmt, wobei zuvor die Argonzuleitung beendet und das Entweichen von gasförmigem Ammoniak ermöglicht wurde. Nach Einstellung auf 10 - 20 °C wurde die Lösung mit Diethylether (50 ml) und gesättigter Ammoniumchloridlösung (25 ml) versetzt und gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in Wasser (100 ml) gegeben und mit Chloroform (3 × 100 ml) eluiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Drück entfernt. Das zurückbleibende, ölartige Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Diethylether aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als farbloses Öl isoliert (1,18 g, 2,05 mmol, 93 %). δ_H (300 MHz): 5,36 (1H, m, Vinyleinheit Steroid), 5,10 (1H, br. s, NH), 4,50 (1H, m, CHO Steroid), 3,61 (6H, t, J = 6,5 Hz, CH_20), 3,55 (2H, t, J = 5,1 Hz, CH_2N), 3,37 (2H, q, J = 5,1 Hz, CH2 β zu N), 2,70 (2H, q, J = 6,5, CH_2S) 2,39 - 2,22 (2H, m, Steroid), 2,10 - 1,78 (4H, m, Steroid), 1,60 - 0,82 (34H, m, Steroid CH_2,CH_3), 0.66 (3H, CH_3 Steroid); *m/z* ESI: 600 $[M+Na]^+$, 576 $[M-H]^-$, 1177 $[2M+Na]^+$, 1153 $[2M-H]^-$.

3.5.6 Präparation von CPEO3-Monoschichten auf Gold

Herstellung der Goldelektroden

Die Goldelektroden wurden durch Bedampfen von Glasträgern (Hämazytometerplättchen, 2 × 2 cm^2, Roth GmbH, Karlsruhe) mit Chrom und Gold im Hochvakuum hergestellt. Eine aufliegende Schablone definierte dabei zwei Bereiche, von denen der eine als Arbeitselektrode und der andere als Kontakt für elektrochemische Messungen genutzt wurde. Die kreisrunde Arbeitselektrode mit einer Fläche von 0,0452 cm^2 war über einen dünnen Steg mit dem Kontaktbereich verbunden (Abb. 3-13).

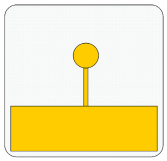


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der durch Bedampfung gewonnenen Goldelektroden. Die kreisrunde Fläche (A = 0,0452 cm^2) diente als Abeitselektrode, die rechteckige Fläche als Kontaktbereich.

Präparation der Monoschichten

Die Elektroden wurden zunächst unter Verwendung eines Argonplasmas (*Plasma Cleaner*, Harrick Plasma, Ithaca, USA) für 5 min gereinigt. Anschließend wurden die Substrate in der Messkammer fixiert und sofort mit einer *n*-propanolischen 0,1 mM CPEO3-Lösung versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur auf den Goldelektroden belassen. Nach der Inkubation wurden die Träger mit *n*-Propanol p. a. gründlich gespült und anschließend mit der jeweiligen Pufferlösung versetzt, um die Monoschicht impedanzspektroskopisch zu charakterisieren. Vor der Präparation von Lipiddoppelschichten wurden die Proben für mindestens 1 h in der Pufferlösung belassen.

Reinigung der Goldelektroden

Die Goldelektroden konnten mehrmals verwendet werden. Zur Entfernung der Thiole wurden sie für 1 min in eine frisch hergestellte Lösung aus zwei Volumenteilen Schwefelsäure (konz.) und einem Volumenteil Wasserstoffperoxid (30 %) getaucht und anschließend mit Reinstwasser und Isopropanol p. a. gründlich gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.5.7 Präparation von CPEO3-Monoschichten auf porösem Aluminat und Silizium

Funktionalisierung der porösen Substrate mit Gold

Die porösen Aluminate und Siliziumträger (Porendurchmesser 1,2 bzw. 2 µm, FluXXion, Eindhoven, Niederlande) wurden zur Reinigung für 5 min in einem Argonplasma belassen. Anschließend wurden auf die porösen Aluminate unter Verwendung eines *Sputter Coaters* (108 auto, Cressington, USA) eine haftvermittelnde 2,5 nm dicke Titanschicht und eine 25 nm dicke Goldschicht aufgebracht. Poröse Siliziumträger, die in fluoreszenzmikroskopische Messungen eingesetzt wurden, wurden mit 2,5 nm Titan und 60 nm Gold besputtert. Dagegen wurden die porösen Siliziumträger für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen mit 3 nm Chrom und 60 nm Gold bedampft. Danach konnten die Substrate sofort in den folgenden Präparationsschritten eingesetzt werden.

Präparation der Monoschichten

Die goldfunktionalisierten Substrate wurden über Nacht bei 4 °C oder Raumtemperatur mit einer 0,1 mM Lösung von CPEO3 in *n*-Propanol p. a. inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie gründlich mit *n*-Propanol p. a. gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort in weiteren Arbeitsschritten verwendet.

3.5.8 Präparation von unilamellaren Vesikeln

3.5.8.1 Extrusionsmethode

Die zur Herstellung der Vesikel benötigten Lipide und Peptide wurden in einem geeigneten Lösungsmittel und in dem gewünschten Konzentrationsverhältnis in einem Reagenzglas gelöst. Dabei wurde in Abwesenheit von Gramicidin D Chlorofrom p. a. als Lösungsmittel verwendet, in Anwesenheit des Peptids Trifluorethanol. Die Gesamtmenge der Substanzen betrug 1 mg. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Stickstoffstrom bei 30 °C, in Gegenwart von Gramicidin D bei 40 °C weitestgehend entfernt. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurden die Lipidfilme für 3 h bei der entsprechenden Temperatur unter Vakuum belassen. Die Lipidfilme wurden mit 1 ml Pufferlösung versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend konnte durch dreimaliges Schütteln für 30 s mittels eines Kreisschüttlers (Heidolph Instruments, Schwabach), jeweils im

Abstand von 5 min eine Suspension aus multilamellaren Vesikeln gewonnen werden. Unter Verwendung eines Miniextruders (Avestin, Mannheim) wurden unilamellare Vesikel hergestellt, indem die Lipidsuspension 31 Mal durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 1000 nm gepresst wurde (MacDonald et al., 1991). Es wurden so unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von (600 ± 20) nm erhalten (Steltenkamp et al., 2006). In der Regel wurden die Vesikel am gleichen Tag zu Präparationszwecken eingesetzt und nur in seltenen Fällen über Nacht bei 4 °C gelagert.

3.5.8.2 *Reverse phase*-Methode

Diese Methode ist dazu geeignet, Bacteriorhodospin (BR) in *large unilamellar vesicles* (LUVs) einzubringen. Analog zur Extrusionsmethode wurden Lipidfilme in einem kleinen Rundkolben hergestellt. Die Lipide wurden in 500 µl Diethylether aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Puffer versetzt. Zu dieser Mischung wurden Purpurmembran (PM)-Fragmente gegeben, so dass ein Lipid-Protein Verhältnis von 100:1 erhalten wurde. Anschließend wurde das Gemisch für 2 min unter Verwendung eines *Tip-Sonifiers* im puslierenden Modus bei einer Leistung von 70 % (Bandelin Electronic, Berlin) mit Ultraschall behandelt. Die Lösung ändert hierbei ihre Farbe von violett zu gelb, was auf eine Denaturierung des BR hinweist. Anschließend wurde der Ether an einem Rotationsverdampfer unter Vakuum für etwa 2 - 3 min entfernt. Der Lösung wurden dann erneut 500 µl Puffer zugesetzt, wonach der Rest des Ethers am Rotationsverdampfer entzogen wurde. Die so erhaltene Vesikelsuspension war leicht trüb und violett eingefärbt, was auf eine Renaturierung des Proteins unter Einbau in die Lipidmatrix der Vesikel hindeutet (Rigaud et al., 1983).

3.5.8.3 Elektroformations-Methode

Diese Methode wurde angewendet, um unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser im Bereich von 10 – 60 µm zu erhalten (*giant unilamellare vesicles*, GUVs). Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit die von Girard et al. (2004) etablierte Methode zur GUV-Herstellung verfolgt, die es erlaubt, große Transmembranproteine in die Lipiddoppelschichten zu integrieren. Nach diesem Protokoll wurden sowohl BR-freie, als auch BR-haltige GUVs präpariert. Während der Präparation wurde stets darauf geachtet, die Proben vor Belichtung zu schützten.

Zunächst wurden mit Hilfe der in Kap. 3.5.8.2 beschriebenen *reverse phase*-Methode LUVs einer Lipidkomposition von DPhPC/DOPC 6:4 ohne bzw. mit 1 mol % BR präpariert. Da die GUVs in fluoreszenzmikroskopischen Studien zum Einsatz kamen, wurden der Lipidmischung die fluoreszenzmarkierten Lipide 0,5 mol % *β*-Bodipy-C12-HPC (Bodipy-PC, $C_{46}H_{79}BF_2N_3O_8P$, M = 881,93 g mol^{-1}) bzw. 0,1 mol% Texas Red-DHPE (Sulforhodamin 101 DHPE Triethylammoniumsalz, $C_{74}H_{117}N_4O_{14}PS_2$, M = 1381,84 g mol^{-1}) zugegeben. Die erhaltene Vesikellösung wurde zu Tröpfchen von je 2 µl auf Indiumzinnoxid (ITO)-beschichtete Glasträger (12 mm, Präzisionsglas & Optik, Iserlohn) getropft und über Nacht im Exsikkator über einer gesättigten NaCl-Lösung im Vakuum partiell hydriert. Um die Glasträger elektrisch kontaktieren zu können, wurde an gegenüberliegenden Seiten ein Kupferklebeband aufgebracht. Mittels Hämatokrit-Versiegelungskit (Brand, Wertheim) wurden die ITO-Gläser zu einer Kammer zusammengefügt, luftblasenfrei mit Puffer (1 mM MOPS/TRIS, 2 mM KCl, pH 7,0) und mit Hämatokritpaste versiegelt. Über die beiden Kupferbänder wurde mittels eines Frequenzgenerators (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) eine Sinusspannung (12 Hz) aufgeprägt, die innerhalb von 30 min schrittweise von 0,05 V auf 1,6 V geregelt wurde. Nach 3 h konnten die GUVs nach Einstellung einer Rechteckspannung (5 Hz, 1,6 V) von der Glaswand abgelöst werden. Die erhaltenen Vesikelsuspensionen wurden bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche aufgebraucht.

3.5.9 Präparation von Lipiddoppelschichten auf Gold

Es wurden Lipiddoppelschichten auf den in Kap. 3.5.6 beschriebenen, impedanzspektroskopisch charakterisierten CPEO3-Monoschichten durch Fusion unilamellarer Vesikel bzw. durch die *painting*-Methode hergestellt.

Fusion von unilamellaren Vesikeln

Eine Suspension unilamellarer Vesikel (LUVs) der gewünschten Lipidkomposition mit einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} wurde auf die hydrophobisierten Goldträger gegeben, nachdem von diesen die überstehende Pufferlösung abgezogen worden war. Die Substrate wurden für 2 – 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Auch BR-dotierte Lipiddoppelschichten wurden durch Fusion von Proteoliposomen auf diese Weise hergestellt. Suspensionen bestehend aus Gramicidin-D-haltigen Vesikeln wurden über Nacht auf den Goldträgern

belassen. Anschließen wurden die Präparationen 10 Mal mit Puffer gespült, um die Vesikelsuspension zu entfernen (Steinem et al., 1996).

***Painting*-Methode**

Die Monoschichten wurden fünf Mal mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. 20 µl einer Lösung bestehend aus 2 % (*w*/*v*) DPhPC und 0,1 mol% Oktadecylamin (ODA) in *n*-Dekan wurden auf die Goldelektrode getropft. Nach etwa 30 s wurde die Probe mit Puffer versetzt und so lange unter Austausch der Pufferlösung gespült, bis keine Spuren von organischem Lösungsmittel mehr zu erkennen waren (Florin und Gaub, 1993).

Immobilisierung von Proteoliposomen und PM-Fragmenten

BR-haltige Vesikel bzw. PM-Fragmente wurden auf lösungsmittelhaltigen Lipiddoppelschichten immobilisiert, indem sie nach deren Präparation zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Substrat belassen wurden. Die Konzentration der Proteoliposomen betrug 1 mg ml^{-1} bezogen auf die Lipidmasse, die der PM-Fragmente 0,1 mg ml^{-1} bezogen auf die Proteinmasse. Die PM-Fragmente wurden vor Zugabe zur Membran unter Eiskühlung für 2 min mit einem *Tip-Sonifier* (Bandelin Electronic, Berlin) unter den oben genannten Bedingungen beschallt. Nach der Inkubation wurde die Probe 10 Mal mit Puffer gespült.

3.5.10 Präparation von Lipiddoppelschichten auf Glas

Es wurden Glasträger (r = 12 mm, Plano, Wetzlar) in einer 5 Vol % Hellmanex-Lösung und zwei weitere Male in Reinstwasser für 15 min bei 70 °C im Ultraschallbad gereinigt. Die gereinigten Glasträger wurden in Reinstwasser aufbewahrt und vor der Verwendung nochmals mit Reinstwasser gespült. Die Glasträger wurden vor Aufbringen einer Suspension aus LUVs oder GUVs für 15 min im Sauerstoffplasma hydrophilisiert und anschließend in Teflonhalter mittels einer Gummidichtung eingespannt. Nach Überschichtung mit Puffer (100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4) und Einstellung einer $CaCl_2$-Konzentration wurde Vesikelsuspension zugegeben und für 1 h bei 40 °C inkubiert. Danach wurden überschüssige Vesikel durch Spülen mit Puffer (100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, 1 mM $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, pH 7,4) entfernt, wobei darauf geachtet wurden,

den Glasträger stets mit Puffer bedeckt zu halten. Während der Präparation wurde stets darauf geachtet, die Proben vor Belichtung zu schützen.

3.5.11 Präparation von Lipiddoppelschichten auf porösem Aluminat

Zur Präparation von porenüberspannenden Membranen wurden die funktionalisierten Substrate horizontal zwischen zwei Teflonkammern mit einer kreisrunden Öffnung von 2 mm Durchmesser eingespannt. Eine Abdichtung erfolgte mit Dichtringen aus NBD (Nitril-Butadien-Kautschuk) mit einem Innendurchmesser von 2 mm. Bei den Substraten mit partieller Siebstruktur von 1 mm Durchmesser musste darauf geachtet werden, dass dieser Bereich in der Mitte der Kammeröffnung platziert wurde. Die obere der beiden Kammern stellt das *cis*-Kompartiment dar. Das *trans*-Kompartiment ist in dem Aufbau in Form einer dritten Messkammer integriert, wie in Abb. 3-6 schematisch zu erkennen ist.

Während die *trans*-Kammer sofort mit 0,1 M NaCl-Lösung versetzt wurde, erfolgte auf der *cis*-Seite zunächst für wenige Minuten eine Inkubation mit Ethanol p. a., um die Benetzung der Porenkanäle des Aluminats zu gewährleisten. Nach intensivem Spülen mit Elektrolytlösung wurde diese vom Substrat abgezogen und in der Dichtringregion mittels eines bis auf wenige Borsten ausgedünnten Pinsels etwas *n*-Dekan aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde auf Substraten mit durchgehender Siebstruktur reine *n*-Dekan-Lösung, auf solchen mit partieller Siebstruktur eine *n*-Dekan-Emulsion in dem jeweiligen Messpuffer (1 % *v*/*v*) appliziert. In einer zeitaufgelösten Messung der Impedanz bei einer festen Frequenz von 1 oder 10 Hz wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die elektrischen Eigenschaften des Substrats ermittelt. Nur wenn das Lösungsmittel die Impedanz des Systems wenig beeinflusste, das heißt $|Z|$ in den ersten 10 min nach Zugabe $< 10^4\ \Omega$ beträgt, wurde mit der Präparation fortgefahren.

In dem darauf folgenden Schritt wurde eine Suspension unilamellarer Vesikel (LUVs, DPhPC/DOPC 6:4) mit einem nominellen Durchmesser von 1000 nm und einer Lipidkonzentration von 1 mg ml^{-1} aufgebracht. Für die Dauer des Membranbildungsprozesses wurden die LUVs auf dem Substrat belassen. Dieser Prozess wurde impedanzspektroskopisch verfolgt. Erst wenn sich die Impedanz des Systems nicht mehr änderte, wurde die Vesikelsuspension gegen Pufferlösung ausgetauscht.

Gramicidin-D-dotierte porenüberspannende Membranen

Zur Integration von Gramicidin D in porenüberspannende Membranen wurde zunächst unter Verwendung einer Pufferlösung (10 mM TRIS/HCl, 100 mM Tetramethylammoniumchlorid (TMA), pH 8,6) analog zu der oben beschriebenen Prozedur verfahren. Nachdem mit LUVs bestehend aus DPhPC und DOPC 6:4 ein Membranwiderstand von etwa 10^6 Ω erreicht wurde, wurden Gramicidin-D-haltige DOPC Vesikel mit einem Lipid-Protein-Verhältnis von 50:1 in einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} mit einem nominellen Durchmesser von 1000 nm zugesetzt und für mindestens 12 h auf dem Substrat belassen. Danach wurde intensiv mit Pufferlösung gespült.

Bacteriorhodopsin-haltige porenüberspannende Membranen

Zunächst wurde unter Verwendung von LUVs aus DPhPC und DOPC in einem Verhältnis von 6:4 und 0,1 mol% ODA eine porenüberspannende Membran mit einem Membranwiderstand von mindestens 10^5 Ω präpariert. Als Puffer diente hierbei eine Lösung aus 10 mM TRIS/HCl und 100 mM KCl, pH 7,4. Anschließend wurden die nach der *reverse phase*-Methode hergestellten Proteoliposomen zugegeben und für etwa 12 h auf der Probe belassen. Danach wurden die überschüssigen Vesikel durch intensives Spülen entfernt.

3.5.12 Präparation von Lipiddoppelschichten auf porösem Silizium

Die mit CPEO3 funktionalisierten porösen Siliziumträger wurden in einen Teflontrog eingespannt und für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen mit 0,1 M NaCl bzw. für fluoreszenzmikroskopische Messungen mit Puffer (100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4) überschichtet. Die Lösung wurde auf 90 mM $CaCl_2$ eingestellt, anschließend mit 200 µl einer GUV-Suspension versetzt und für 1 h bei 40 °C inkubiert. Danach wurden überschüssige Vesikel durch Spülen mit 0,1 M NaCl bzw 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, 1 mM $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, pH 7,4 entfernt.

4 Festkörperunterstützte und porenüberspannende Lipidmembranen

Im folgenden Kapitel werden zwei Modellsysteme für biologische Membranen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem Ziel entwickelt wurden, die Untersuchung der Aktivität von Ionenkanälen und Transportern mit integralen Messmethoden zu ermöglichen. Beide Systeme können als eine Weiterentwicklung von bereits bestehenden artifiziellen Membranmodellen betrachtet werden. Für die an dieser Stelle vorgestellten festkörperunterstützten Membranen oder auch *tethered membranes* gibt es bereits eine Reihe von Beispielen aus anderen Arbeiten (Erbe et al., 2007; Vockenroth et al., 2008). Sie dienten in dieser Arbeit vor allem als Vergleichssystem für die porenüberspannenden Membranen, die im Gegensatz zu den bisher bekannten Modellen wie etwa den nano-BLMs (Römer und Steinem, 2004) erstmals nahezu lösungsmittelfrei hergestellt werden konnten.

Zunächst lag der Fokus auf der Charakterisierung der festkörperunterstützten und porenüberspannenden Lipidmembranen in Abwesenheit von Transmembranproteinen. Neben der Visualisierung durch bildgebende Methoden wie Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie stand in dieser Arbeit vor allem die Untersuchung hinsichtlich des elektrischen Verhaltens mittels Impedanzspektroskopie im Vordergrund. Daran war die Erstellung von Ersatzschaltbildern geknüpft, um die Interpretation der erhaltenen Daten zu ermöglichen.

4.1 Strategie zur Etablierung porenüberspannender und festkörperunterstützter Lipidmembranen

In dieser Arbeit wurde der Aufbau von Lipidmembranen durch die Fusion von Vesikeln oder Proteoliposomen auf einem Festkörper bzw. auf porösen Materialien angestrebt. Die Grundidee besteht darin, die mit Gold funktionalisierte Oberfläche der Substrate mit Thiolipiden zu hydrophobisieren, die nach Fusion von Liposomen in die Lipiddoppelschichtstruktur integriert sind. Zur Etablierung solcher Systeme wurden bereits in früheren Studien die starken, quasi-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Gold und Schwefel genutzt, um Oberflächen mit Thiolipiden zu funktionalisieren (Kalb et al., 1992; Plant, 1993; Steinem et al., 1996). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Thiolipids Cholesteryl-

polyethylenoxythiol (CPEO3) Grenzschichten erhalten, deren hydrophober Cholesterinrest durch einen Rest aus drei Ethylenoxyeinheiten räumlich von der Elektrodenoberfläche getrennt ist (Abb. 4-1). Die Überlegung dabei war, dass der hydrophile Abstandhalter den Membranen größere Flexibilität und damit eine höhere Stabilität verleiht, da Unebenheiten der Substratoberflächen, die zu energetisch ungünstigen Membranspannungen führen, ausgeglichen werden können. Die zum Aufbau einer Doppelschicht verwendeten Vesikel sind aus den synthetischen Lipiden 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) zusammengesetzt.

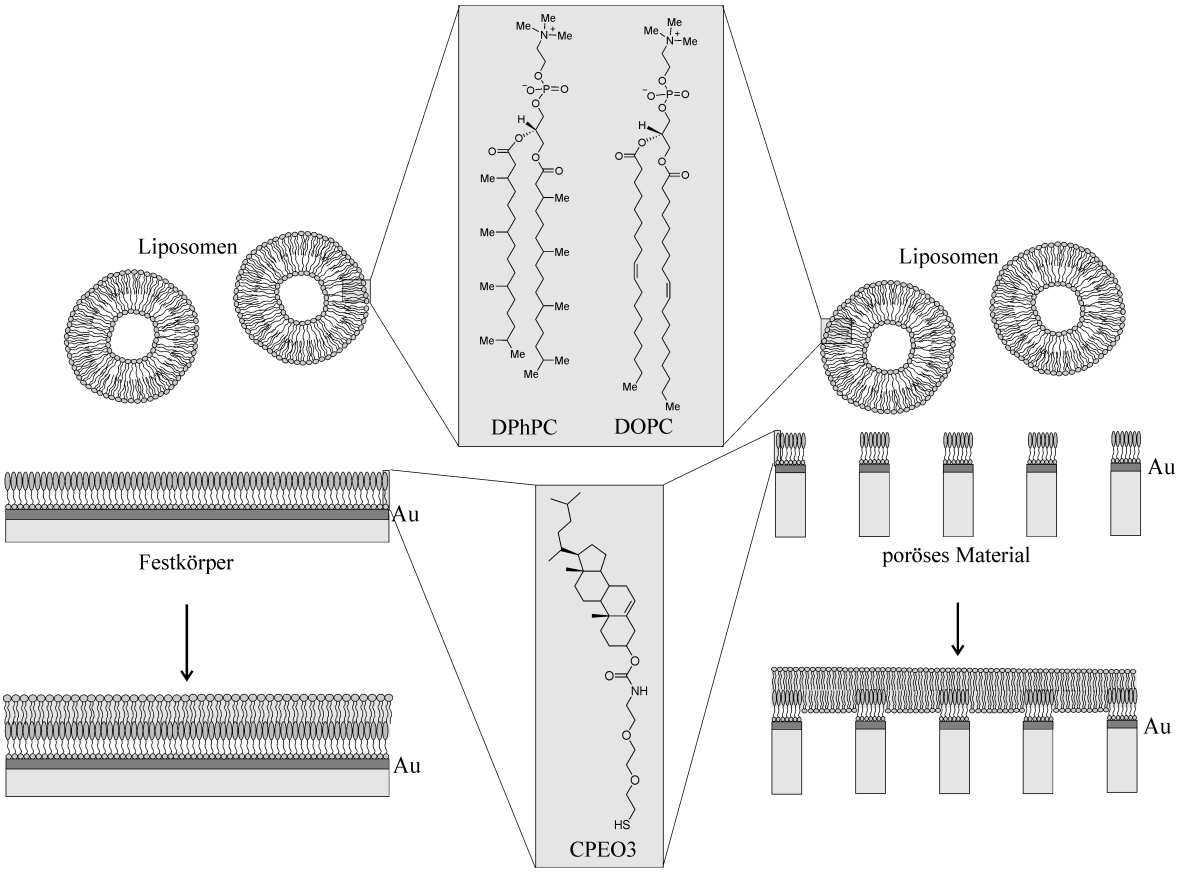


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung festkörperunterstützter und porenüberspannender Membranen. Das Größenverhältnis der Liposomen zu den Substraten entspricht nicht den tatsächlichen Größenverhältnissen.

Dabei dient DPhPC, das in der Lipidmischung in einem molaren Anteil von 60 % vorliegt, als Matrixlipid und verleiht den Membranen durch seine Methylverzweigungen Stabilität. Schon in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass DPhPC maßgeblich zur Stabilität von Membranen auf porösen Materialien beträgt (Kratzke, 2008; Römer und Steinem, 2004). Zudem wird auf das Lipid DOPC zurückgegriffen, das durch seine einfach

ungesättigten Fettsäurereste sterisch anspruchsvoller ist, wodurch die Lipide weniger dicht gepackt werden. Dies ist insbesondere dann von Interesse, wenn durch die Fusion von Proteoliposomen Ionenkanäle oder Transporter in die Lipidmatrix integriert werden sollen.

Für fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen dienten porenüberspannende Membranen basierend auf porösem Silizium mit einer Porengröße von 1,2 bzw. 2 µm. Dagegen wurde für elektrochemische Experimente poröses Aluminat mit einer Porengröße von 60 nm verwendet. In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die hochgeordnete, hexagonale Porenstruktur visualisiert werden (Abb. 4-2).

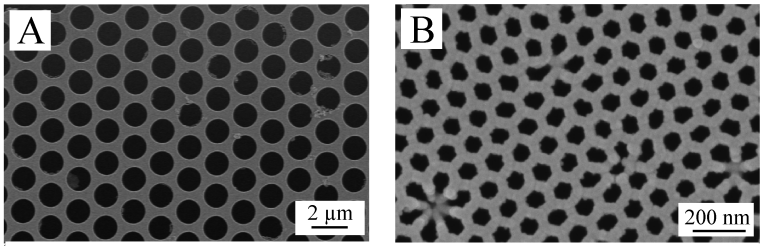


Abb. 4-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von **A** porösem Silizium mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm (bedampft mit 3 nm Cr und 60 nm Au) und **B** porösem Aluminat mit einem Porendurchmesser von 60 nm (besputtert mit 2,5 nm Ti und 25 nm Au).

Diese gleichmäßige Porenanordnung ist besonders vorteilhaft, wenn mittels ortsauflösender Methoden definierte Membranareale angesteuert werden sollen. So konnten beispielsweise durch *scanning ion conductance microscopy* (SICM) an porenüberspannenden Membranen lokal Leitfähigkeitsunterschiede detektiert und einzelne Membranen manipuliert werden (Böcker et al., 2009).

4.2 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium

Um das System der porenüberspannenden Membranen zu visualisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Studien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde auf poröses Silizium mit Poren eines Durchmessers von 1,2 bzw. 2 µm zurückgegriffen. Diese Substrate eigneten sich für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, da einzelne, mit fluoreszenzmarkierten Lipiden dotierte porenüberspannende Membranen aufgelöst werden konnten. Zudem erlaubte dies die Durchführung von Studien zur lateralen Mobilität der Lipide mit Hilfe der Methode des *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops war neben der Visualisierung der porenüberspannenden Membranen eine Untersuchung ihrer mechanischen Eigenschaften durch Kraft-Indentations-Experimente möglich.

4.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung und Untersuchung der lateralen Mobilität durch FRAP

Um Lipidmembranen fluoreszenzmikroskopisch abbilden zu können, müssen diese mit Lipiden dotiert sein, die kovalent mit einer Fluoreszenzsonde verbunden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das fluoreszenzmarkierte Lipid *β*-Bodipy-C12-HPC (Bodipy-PC) verwendet, dessen Absorptionsmaximum bei 500 nm und dessen Emissionsmaximum bei 510 nm liegt. Dadurch konnten, wie in Abb. 4-3 A zu sehen, nach Bestrahlung mit Licht unter Verwendung eines geeigneten Filtersatzes porenüberspannende Membranen visualisiert werden. Die Membranen wurden durch die Fusion von großen unilamellaren Vesikeln (*giant unilamellar vesicles*, GUVs) auf CPEO3-funktionalisierten porösen Substraten mit Poren im Maßstab von 2 µm präpariert. Der Durchmesser der GUVs wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie zu 15 - 60 µm bestimmt und übersteigt demnach den Porendurchmesser um das 7- bis 30-fache. Auf Liposomen dieser Größe wurde deshalb zurückgegriffen, um auszuschließen, dass die Poren des Substrats von Lipidmembranen ausgekleidet statt überspannt werden.

Um die laterale Mobilität der Lipidmembranen zu evaluieren, wurde die Fluoreszenzregenerierung nach Laser-induziertem Bleichen der Fluoreszenzsonden untersucht. Dazu wurden die fluoreszierenden Moleküle in einem diskreten Bereich der Präparation mit

Hilfe eines Lasers zerstört, wodurch diese Stelle schwarz erscheint, wie in Abb. 4-3 B zu erkennen ist. Durch Detektion der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 100 s wurde ein Anstieg der Intensität im Bleichfleck beobachtet (Abb. 4-3 C). So konnte die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aufgetragen werden, wobei die Werte auf die Ausgangsintensität zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert wurden (Abb. 4-3 D).

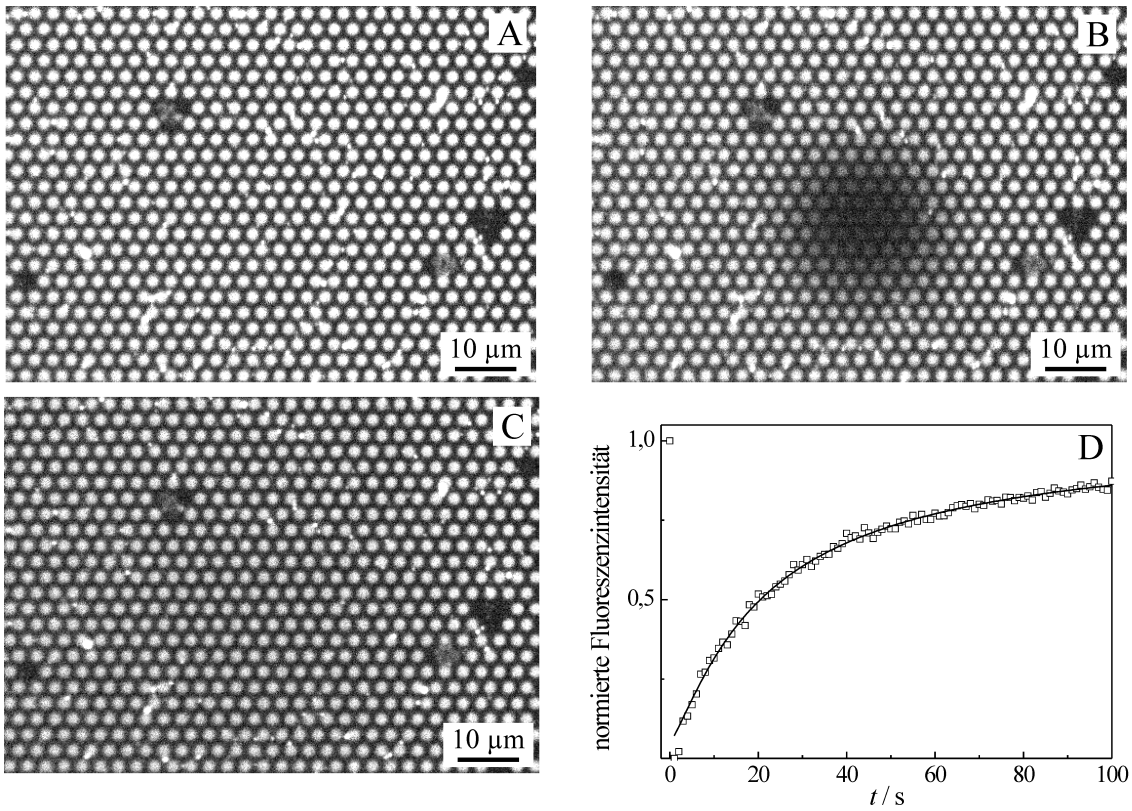


Abb. 4-3 FRAP-Untersuchung zum Diffusionsverhalten der Lipide einer porenüberspannenden Membran, präpariert durch Spreiten von GUVs (DPhPC/DOPC 6:4, 0,5 mol % Bodipy-PC) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium mit einer Porengröße von 2 µm. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Membran **A** bei $t = 0$ s, **B** bei $t = 1$ s und **C** $t = 100$ s, wobei der Bleichvorgang zum Zeitpunkt $0 < t < 1$ stattfindet. **D** Verlauf der Fluoreszenzintensität normiert auf die Intensität bei $t = 0$ s. Effektiver Diffusionskoeffizient: $D_{eff} = 8{,}6\ \mu m^2\ s^{-1}$. Immobiler Anteil: 13 %. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

In diesem Experiment wurde eine Fluoreszenzregenerierung von 87 % detektiert, welches einem immobilen Anteil der Membrankomponenten von 13 % entspricht. Mit der Zeitkonstante τ_D, die den Zeitpunkt nach 50 % der maximal erreichten Fluoreszenzregenerierung beschreibt (Abb. 4-3 D) und der Breite ω des Gaussprofils des Bleichflecks, das aus den Intensitätsprofilen eines definierten Bereichs erstellt wurde, konnte nach der Theorie von Axelrod (1976) der Diffusionskoeffizient D ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass

mit diesem Experiment lediglich ein effektiver Diffusionskoeffizient $D_{eff} = 8{,}6\ \mu m^2\ s^{-1}$ angegeben werden kann, der sich aus der lateralen Beweglichkeit der Lipide der freitragenden sowie der auf den Stegen des Substrats verankerten Membranen zusammensetzt. Aus 19 unabhängigen Messungen wurde ein mittlerer effektiver Diffusionskoeffizient $D_{eff} = (7{,}6 \pm 1{,}1)\ \mu m^2\ s^{-1}$ und ein immobiler Anteil von (11 ± 6) % ermittelt. Demgegenüber wurde in FRAP-Untersuchungen an glasunterstützten Membranen der gleichen Lipidkomposition ein geringerer Diffusionskoeffizient von $(4{,}1 \pm 0{,}8)\ \mu m^2\ s^{-1}$ ermittelt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der CPEO3-Funktionalisierung porenüberspannende Membranen erhalten wurden, deren Beweglichkeit über der von festkörperunterstützten Membranen liegt.

4.2.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) ist es möglich, porenüberspannende Membranen in hoher Auflösung abzubilden. So gelang es Steltenkamp et al. (2006) mittels AFM, Doppelschichten aus Dimethyldioktadekylammoniumbromid (DODAB), die auf Mercaptopropionsäure (MPA)-funktionalisierten porösen Aluminaten präpariert wurden, zu visualisieren. Dabei konnten offene und bedeckte Poren klar voneinander unterschieden werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Membranen etwa 20 nm tief in die Porenöffnung reichen. Im Gegensatz zum beschriebenen System sind die in dieser Arbeit entwickelten porenüberspannenden Membranen über einen hydrophoben Thiolanker auf dem Substrat fixiert, der auf den Stegen zugleich die untere Monolage der Lipiddoppelschicht bildet. Um die in dieser Arbeit entwickelten porenüberspannenden Membranen zu visualisieren sowie bezüglich ihrer Verankerung auf dem Substrat und ihrer mechanischen Eigenschaften zu charakterisieren, wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden GUVs aus DPhPC auf porösem Silizium mit 1,2 µm Poren gespreitet. Die mit 3 nm Chrom sowie 60 nm Gold funktionalisierten Oberflächen unterscheiden sich nur in dem zur Hydrophobisierung verwendeten Oktanthiol (OT) von dem in dieser Arbeit etablierten System (Abb. 4-1). Die Messung erfolgte mit einer Kraft von 0,3 nN im *contact mode.* Abb. 4-4 A zeigt eine AFM-Abbildung, in der die hexagonale Porenstruktur des porösen Siliziums zu erkennen ist, wobei tieferliegende Bereiche durch eine dunklere Farbe gekennzeichnet sind. Mit dem in Abb. 4-4 B gezeigten Höhenprofil

wird gefolgert, dass die dunkel erscheinenden Poren offen, die helleren Poren dagegen von einer Membran überspannt sind. Die Tatsache, dass die abgebildete Grenzschicht ca. 75 nm tief in der Pore liegt, ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Lipidmembran zunächst vertikal entlang der 60 nm dicken Goldschicht verläuft. Andererseits besitzen Lipidmembranen elastische Eigenschaften und lassen somit als Folge der applizierten Kraft bis zu einem gewissen Grad eine Dehnung zu (Sackmann, 1994).

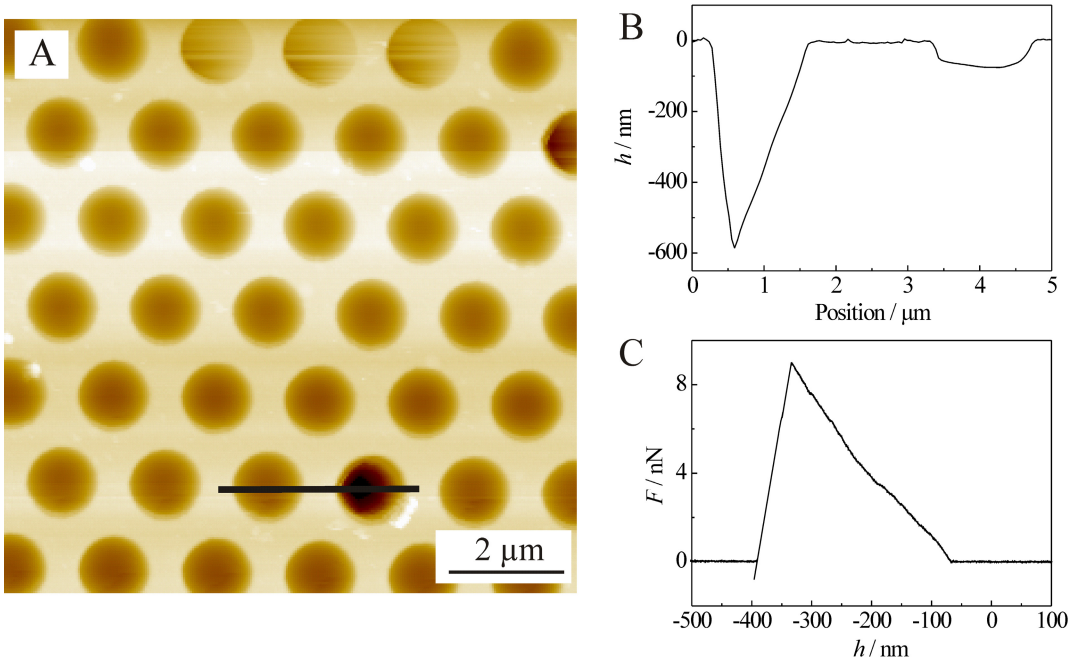


Abb. 4-4: A Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*contact mode*, 0,3 nN) einer porenüberspannenden DPhPC-Membran auf OT-funktionalisiertem porösen Silizium (Porendurchmesser 1,2 µm). Die von einer Lipidmembran überspannten Poren erscheinen heller als offene. Die in **A** eingezeichnete Linie gibt den Verlauf des Höhenprofils wieder (**B**), an dem die Eindringtiefe der Messspitze zu erkennen ist. **C** Kraft-Indentationsexperiment, das die Existenz einer porenüberspannenden Membran zeigt. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Um zu verifizieren, dass die mit dem Rasterkraftmikroskop erfasste Schicht tatsächlich die Poren überspannt und nicht etwa mit Lipidmaterial gefüllte Kanäle vorliegen, wurden Kraft-Indentations-Experimente duchgeführt. Dabei wurde die Messspitze der Lipidmembran von oben angenähert. 65 nm unterhalb der Substratoberfläche kam es, wie in Abb. 4-4 C zu erkennen ist, zum Kontakt zwischen Messspitze und Probenoberfläche. Die Tatsache, dass der Kontaktpunkt 65 nm unterhalb der Oberfläche des porösen Siliziums liegt, wird darauf zurückgeführt, dass die Lipidmembran zunächst vertikal entlang der aufgebrachten Goldschicht (60 nm) verläuft, bevor sie die Pore horizontal überspannt. Von diesem Punkt an wurde durch kontinuierliches Annähern der Messspitze in Form der Kraft

F die elastische Antwort der Membran gemessen. Es konnte nach einer auf das System angepassten Berechnung der elastischen Membraneigenschaften eine apparente laterale Membranspannung σ_{app} von (18 ± 3) mN m^{-1} ermittelt werden. Bei etwa 330 nm unter der Substratoberfläche fällt die Kraft abrupt zurück auf einen Wert von 0 nN, welches als ein Reißen der indentierten Membran interpretiert wird.

In einer ausführlichen Studie (Ingo Mey, unveröffentliche Ergebnisse) konnte gezeigt werden, dass diese rasterkraftmikroskopischen Ergebnisse auf Lipidmembranen hinweisen, welche die Poren des porösen Materials überspannen. Darüber hinaus konnten diese Membranen detailliert bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften charakterisiert werden.

4.3 Impedanzverhalten von Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden

Mit den festkörperunterstützten Membranen steht dem System der porenüberspannenden Lipiddoppelschichten ein System gegenüber, das in anderen Arbeiten hinsichtlich seiner elektrischen Eigenschaften bereits gut charakterisiert wurde. Die dabei verwendeten Goldelektroden erlaubten die elektrochemische Untersuchung der Grenzschicht hinsichtlich ihrer kapazitiven und resistiven Eigenschaften, welche durch die immobilisierten CPEO3-Moleküle erhalten wurde. Auf diese Weise wurden wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen, inwiefern das synthetisch hergestellte CPEO3 zur Hydrophobisierung der in dieser Arbeit verwendeten Substrate geeignet ist. Des Weiteren war die Eignung der CPEO3-funktionalisierten Oberflächen bezüglich der Fusion von Vesikeln zu Lipiddoppelschichten von Interesse und wurde impedanzspektroskopisch untersucht.

4.3.1 Elektrisches Modell festkörperunterstützter Lipidmembranen

Zur Evaluierung des schematisch in Abb. 4-5 A gezeigten Membransystems wurde ein Ersatzschaltbild erstellt, das die elektrischen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile wiedergibt. Auf Grund ihres Grenzflächencharakters besitzt die Lipiddoppelschicht kapazitive Eigenschaften, die in das Ersatzschaltbild (Abb. 4-5 B) mit C_m eingehen. Darüber hinaus kann sie wegen ihres hydrophoben Kerns, der mit $\varepsilon_r = 2$ eine geringe Dielektrizitätskonstante besitzt, als ein Isolator mit dem Ohmschen Widerstand R_m betrachtet werden. Diese Anordnung ist auch zur elektrischen Charakterisierung einer Monoschicht aus

CPEO3 gültig. Daneben müssen die Kapazitäten der Platin- und Goldelektrode, C_{pt} und C_{au}, sowie der Widerstand der Elektrolytlösung R_Ω berücksichtigt werden. Diese sind jeweils in Serie zur Parallelschaltung aus C_m und R_m geschaltet. Kapazitäten von Helmholtzschichten an den Grenzflächen sind nicht dargestellt, da sie an den in dieser Arbeit verwendeten Systemen mittels Impedanzspektroskopie nicht getrennt von anderen Systemkomponenten erfasst werden können.

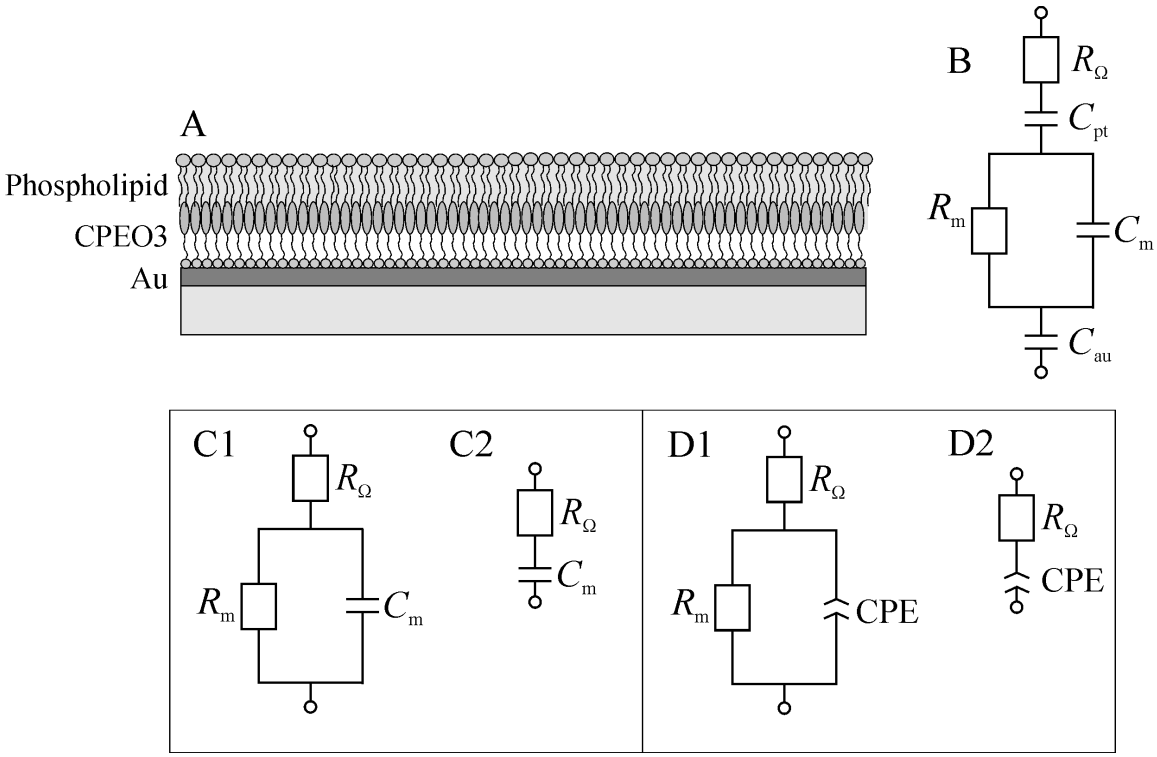


Abb. 4-5: **A** Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht auf einer CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode. Die Gegenelektrode (Platinelektrode) ist nicht eingezeichnet. **B** Elektrisches Modell zur Beschreibung des Systems: Der Elektrolytwiderstand wird durch R_Ω, die Elektrodenkapazitäten durch C_{au} und C_{pt} beschrieben. Die Parallelschaltung aus C_m und R_m kennzeichnet die Lipidschicht. **C** Netzwerke unter Vernachlässigung der Elektrodeneigenschaften: C1 *RRC*-Kreis. C2 *RC*-Kreis. **D** Netzwerke unter Berücksichtigung nicht idealen kapazitiven Verhaltens: D1 *RR*CPE-Kreis. D2 *R*CPE-Kreis.

In der Praxis unterscheiden sich die Kapazitäten der Elektroden von der Membrankapazität C_m und können im niederfrequenten Bereich dann aufgelöst werden, wenn R_m klein ist. Da die Elektrodenkapazität in dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Frequenzfenster nicht erfasst wurde, werden die Netzwerkelemente C_{au} und C_{pt} in den zur Auswertung herangezogenen Ersatzschaltbildern vernachlässigt. Daraus resultiert ein vereinfachtes Netzwerk, welches im Folgenden als *RRC*-Kreis (Abb. 4-5 C1) bezeichnet wird. Für den Fall, dass der Membranwiderstand R_m im applizierten Frequenzfenster nicht mehr detektiert wird, beschreibt ein *RC*-Kreis mit den Komponenten C_m und R_Ω das elektrochemische System

(Abb. 4-5 C2). Während die kapazitiven Eigenschaften der Grenzschicht unter Verwendung eines Kondensators C als ideal betrachtet werden, kann mit Hilfe der Parameter A und α eines *constant phase element* (CPE) nicht ideales kapazitives Verhalten berücksichtigt werden (Abb. 4-5 D1, D2). Dabei beschreibt der Faktor α mit $0 < \alpha < 1$ die Abweichung vom Verhalten eines idealen Kondensators, für den $\alpha = 1$ gilt.

4.3.2 Impedanzverhalten CPEO3-funktionalisierter Goldelektroden

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie wurde die Immobilisierung von CPEO3 auf Goldelektroden untersucht. Die Substrate wurden sowohl direkt nach Austausch der *n*-propanolischen CPEO3-Lösung (0,1 mM) gegen Elektrolytlösung, als auch 1 h später impedanzspektroskopisch untersucht (Abb. 4-6). Dabei wurden neben dem Elektrolytwiderstand R_Ω die kapazitiven Eigenschaften der funktionalisierten Goldelektrode erfasst. Der Widerstand der Grenzfläche konnte im verwendeten Frequenzfenster nicht aufgelöst werden. Die Daten in Abb. 4-6 lassen erkennen, dass die Membran nach einstündiger Inkubation mit Elektrolytlösung ein verändertes frequenzabhängiges Verhalten zeigt, welches auf eine Modifikation der CPEO3-Grenzschicht hindeutet.

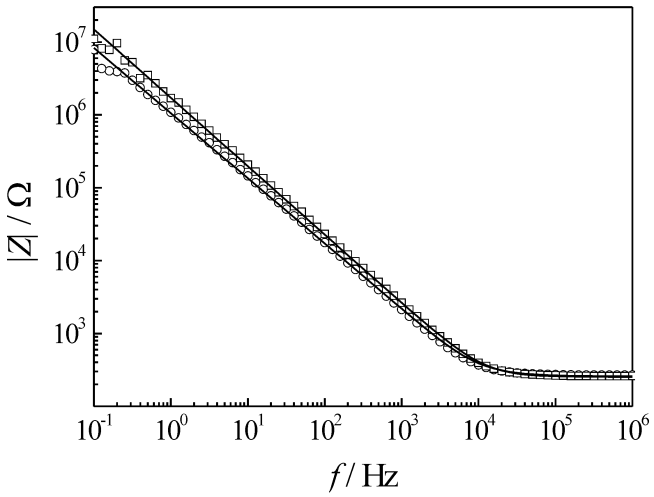


Abb. 4-6: Impedanzspektren einer Monoschicht des Thiolipids CPEO3 auf Gold (○) direkt nach 12-stündiger Inkubation mit 0,1 mM CPEO3 in *n*-Propanol und (□) 1 h nach Belassen der Probe in 0,1 M NaCl-Lösung. Die Kurvenanpassung (—) nach dem in Abb. 4-5 D2 dargestellten Ersatzschaltbild liefert folgendes Ergebnis: (○) $R_\Omega = 250\ \Omega$, $A = 1{,}8 \cdot 10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}89$. (□) $R_\Omega = 240\ \Omega$, $A = 1{,}0 \cdot 10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}94$. Elektrolytlösung: 0,1 M NaCl.

Durch längeren Verbleib in Elektrolytlösung veränderte sich das kapazitive Verhalten der CPEO3-Schicht nicht mehr. Mit der Anpassung eines *R*CPE-Ersatzschaltkreises (Abb. 4-5 D2), der neben dem Elektrolytwiderstand das nicht ideale kapazitive Verhalten der Grenzschicht beschreibt, konnte deren Impedanzverhalten quantifiziert werden. Für die Grenzschicht direkt nach Beendigung der Inkubation mit Thiollösung wurden die Parameter $A = 1{,}8 \cdot 10^{-7}$ F $s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}89$ erhalten. Dagegen lieferte die Kurvenanpassung an die Daten nach einstündiger Inkubation mit Elektrolytlösung für das CPE die Werte $A = 1{,}0 \cdot 10^{-7}$ F $s^{\alpha-1}$ sowie $\alpha = 0{,}94$. Hinsichtlich des Parameters A ist ein quantitativer Vergleich der Datensätze nicht sinnvoll, da A abhängig vom Faktor α ist, der sich für beide Messungen um 0,05 unterscheidet. Eine Umrechnung von A in die Kapazität C nach Gl. 3-8 war nicht möglich, da die Frequenz ω_{max}'', bei welcher der Betrag von Z^{Im} maximal wird, im verwendeten Frequenzfenster nicht detektiert worden ist. Um die erhaltenen Impedanzspektren trotzdem quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde eine Datenanpassung unter Verwendung eines *RC*-Kreises durchgeführt, welches immer dann zulässig ist, wenn die Werte für den Faktor α nahe an 1 liegen. So wurde für die Grenzschicht nach Entfernen der *n*-propanolischen Lösung $C = 1{,}02 \cdot 10^{-7}$ F bzw. nach 1 h in Elektrolytlösung $C = 0{,}74 \cdot 10^{-7}$ F erhalten. Dies entspricht bei einer Elektrodenfläche $A = 0{,}0452$ cm^2 einer spezifischen Kapazität C_{sp} von 2,3 µF cm^{-2} bzw. 1,6 µF cm^{-2}. Aus sieben äquivalent durchgeführten Experimenten konnten die in Tab. 4-1 angegebenen Mittelwerte bestimmt werden. Es wird deutlich, dass die mittlere spezifische Kapazität der Thiolgrenzschicht direkt nach dem Entfernen der *n*-propanolischen Thiollösung mit einem Wert von (2,1 ± 0,8) µF cm^{-2} größer und deutlich variabler war als nach einstündigem Verbleib in Elektrolytlösung ((1,5 ± 0,3) µF cm^{-2}).

Tab. 4-1: Mittlere spezifische Kapazität C_{sp} der CPEO3-Grenzschicht in Abhängigkeit von der Dauer *t* der Inkubation mit 0,1 M NaCl-Lösung.

t / h	C_{sp} / µF cm^{-2}
0	2,1 ± 0,8 n = 7
1	1,5 ± 0,3 n = 7

Die Verringerung der spezifischen Kapazität dieser Grenzschicht kann bei gleichbleibender Fläche A nach Gl. 3-6 am ehesten auf eine Zunahme der Dicke d der CPEO3-Schicht zurückgeführt werden. Zudem lässt die Gegenüberstellung des Faktors α aus den Daten in Abb. 4-6 erkennen, dass das kapazitive Verhalten der Grenzschicht nach Belassen in Elektrolytlösung mit $\alpha = 0{,}94$ als idealer betrachtet werden kann als direkt nach dem Entfernen der CPEO3-Lösung ($\alpha = 0{,}89$). Dieser Trend war so auch in anderen Präparationen zu erkennen. Anhand der Impedanzdaten konnte mit der Oberflächenbelegung θ noch ein weiterer Parameter des Systems analysiert werden. Um eine Aussage zur Oberflächenbelegung der Goldelektroden mit CPEO3 treffen zu können, wurde angenommen, dass sich die detektierte Gesamtkapazität anteilig aus den Beiträgen des Golds und der CPEO3-Schicht zusammensetzt (Gl. 4-1). Wie in Abb. 4-24 angedeutet, sind die Kapazitäten C_{au} und C_{CPEO3} in einer Parallelschaltung verknüpft, wodurch sich ihre Beträge unter Berücksichtigung von θ zu der Gesamtkapazität C_{ges} addieren.

$$C_{\mathrm{ges}} = \theta C_{\mathrm{CPEO3}} + (1-\theta) C_{\mathrm{au}} \tag{4-1}$$

Dabei wird die Kapazität der Goldelektrode nach impedanzspektroskopischen Erkenntnissen zur Berechung der Oberflächenbelegung θ mit 30 µF cm^{-2} berücksichtigt. Ferner wurde von Jenkins et al. (1998) für eine CPEO3-Monoschicht mit maximaler Oberflächenbelegung eine Kapazität von 0,85 µF cm^{-2} ermittelt. Mit diesen Angaben errechnet sich nach Gl. 4-1 der Flächenanteil θ von CPEO3 des in Abb. 4-6 gezeigten Beispiels mit $C = 1{,}6$ µF cm^{-2} nach einstündiger Inkubation in Pufferlösung zu 92 % des maximal erreichbaren Wertes. Trotz dieser hohen Oberflächenbelegung weicht der tatsächlich gemessene Wert für C_{sp} erheblich vom theoretischen Wert bei maximaler Belegung ab.

4.3.3 Impedanzverhalten festkörperunterstützter Lipidmembranen

Um die in Abb. 4-1 schematisch dargestellten Lipidmembranen aufzubauen, wurden unilamellare Vesikel, bestehend aus DPhPC und DOPC 6:4 und einem nominellen Durchmesser von 1000 nm, zu CPEO3-funktionalisierten Elektroden gegeben. Eine Messung direkt nach Zugabe zeigte sofort eine Änderung im Impedanzverhalten, das sich in den nächsten Stunden nur noch wenig änderte. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde das in Abb. 4-7 dargestellte Impedanzspektrum erhalten. Daneben ist der Kurvenverlauf

der dazugehörigen CPEO3-Schicht gezeigt. Zur Analyse der Spektren wurde ein *RC*-Kreis (Abb. 4-5 C2) gewählt. Die darauf basierende Datenanpassung entspricht dem Verlauf der Messpunkte mit genügend großer Übereinstimmung. Dies konnte auch quantitativ durch eine Anpassung basierend auf einem *R*CPE-Kreis belegt werden, nach welcher der Parameter α einen Wert von 0,95 annimmt und damit nahe an dem Idealwert von $\alpha = 1$ liegt.

Mit einem *RC*-Kreis zur Anpassung der Daten der CPEO3-Schicht wurde eine Kapazität von $0{,}72 \cdot 10^{-7}$ F erhalten, die Doppelschichtkapazität wurde zu $0{,}43 \cdot 10^{-7}$ F bestimmt. Daraus ergeben sich die spezifischen Kapazitäten C_{sp} von 1,6 µF cm^{-2} für die Thiolmonoschicht sowie 1,0 µF cm^{-2} nach Vesikelzugabe. Die Verringerung der spezifischen Kapazität indiziert, dass in Folge einer Vesikelfusion eine zweite Lipidschicht aufgebaut wurde.

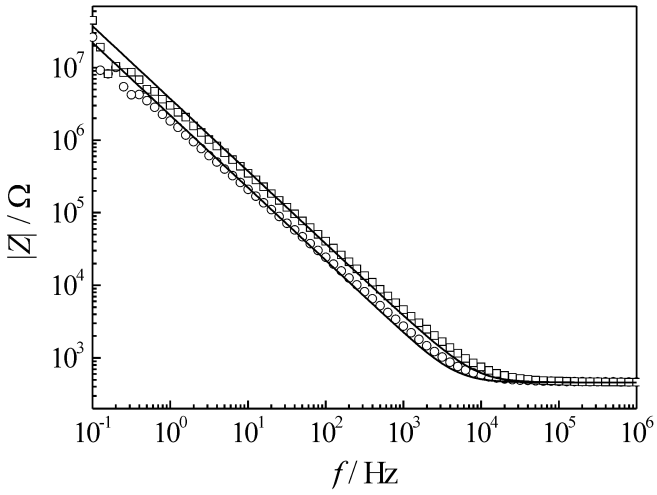


Abb. 4-7: Impedanzspektroskopische Analyse (○) einer Monoschicht aus CPEO3 und (□) einer Lipiddoppelschicht nach Fusion von unilamellaren Vesikeln (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mg/ml) mit einem nominellen Durchmesser von 1000 nm. Die Kurvenanpassung (—) erfolgte mittels eines *RC*-Kreises (Abb. 4-5 C2): (○) $R_\Omega = 460\ \Omega$, $C_m = 0{,}72 \cdot 10^{-7}$ F. (□) $R_\Omega = 450\ \Omega$, $C_m = 0{,}43 \cdot 10^{-7}$ F. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Der Aufbau der Lipiddoppelschichten besaß mit einer Erfolgsrate von 70 – 80 % eine recht hohe Reproduzierbarkeit. So konnte die Kapazität der Lipiddoppelschicht sowohl unter Verwendung von 0,1 M NaCl als auch in elektrolytfreiem Puffer (0,01 M TRIS/HCl, pH 8,6) aus den Daten von jeweils vier unabhängigen Experimenten extrahiert und die in Tab. 4-2 angegebenen mittleren spezifischen Kapazitäten ermittelt werden:

Tab. 4-2: Mittlere spezifische Kapazität C_{sp} nach Fusion von Liposomen auf CPEO3-beschichteten Goldelektroden. $C_{sp,pl}$ gibt die nach Gl. 4-2 berechnete spezifische Kapazität der 2. Monolage aus Phospholipiden an. Die Messungen wurden in 0,1 M NaCl oder elektrolytfreiem Puffer (0,01 M TRIS/HCl, pH 8,6) durchgeführt.

Wässriges Milieu	n	Lipide	C_{sp} / µF cm^{-2}	$C_{sp,pl}$ / µF cm^{-2}
0,1 M NaCl	3	POPC	1,1 ± 0,2	2,4 ± 0,2
0,1 M NaCl	3	DPhPC/DOPC 6:4	0,92 ± 0,09	2,2 ± 0,3
0,01 M TRIS/HCl, pH 8,6	4	DPhPC/DOPC 6:4	0,8 ± 0,1	3,6 ± 0,6

Da die CPEO3-Schicht in Serie zu der zweiten, durch Vesikelfusion generierten Lipidschicht liegt, kann die Kapazität der Phospholipidschicht $C_{sp,pl}$ nach Gl. 4-2 berechnet werden:

$$\frac{1}{C_{ges}} = \frac{1}{C_{CPEO3}} + \frac{1}{C_{pl}} \tag{4-2}$$

Dabei wurden für die Lipidmischung DPhPC/DOPC 6:4 mittlere spezifische Kapazitäten von (2,2 ± 0,3) µF cm^{-2} in 0,1 M NaCl Lösung sowie (3,6 ± 0,6) µF cm^{-2} in elektrolytfreiem Puffer erhalten. Um den Erfolg der Ausbildung einer isolierenden Lipiddoppelschicht durch Vesikelfusion mit früheren Arbeiten vergleichen zu können, wurde neben oben genannter Mischung das Lipid POPC verwendet und damit $C_{sp,pl}$ zu (2,4 ± 0,3) µF cm^{-2} bestimmt. Dieser Wert liegt über dem von Steinem et al. (1996) ermittelten Wert von ≈ 2 µF cm^{-2} für POPC-Monoschichten auf Oktadekanthiol. Daraus wird geschlossen, dass durch die Fusion von Phospholipiden auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden eine mit Defektstellen behaftete Lipiddoppelschicht vorliegt.

Neben unilamellaren Vesikeln mit einem nominellen Durchmesser von 1000 nm wurden zur Präparation der Proben auch Liposomen mit 200 bzw. 400 nm Durchmesser verwendet. In der impedanzspektroskopischen Analyse der geformten Lipiddoppelschichten konnten keine Unterschiede bezüglich der Membrankapazität festgestellt werden.

4.4 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten porösen Aluminaten mit durchgehender Porenstruktur

4.4.1 Aufbau isolierender Lipiddoppelschichten durch Vesikelfusion

Formuliertes Ziel dieser Arbeit war es, hochohmige, porenüberspannende Lipidmembranen lösungsmittelfrei durch die Fusion von Vesikeln auf einem porösen Substrat aufzubauen. Basierend auf den Ergebnissen von Hennesthal (2000) sowie Drexler und Steinem (2003) zur Ausbildung von Lipiddoppelschichten auf porösen Aluminaten wurde bereits in früheren Arbeiten versucht, isolierende Membranen durch die Fusion von Liposomen auf porösen Substraten zu erhalten (Lanzl, 2005; Römer, 2004). Mit dem in diesen Arbeiten verfolgten Ansatz der Fusion von Thiolipid-haltigen Vesikeln auf goldbeschichteten porösen Aluminaten wurden lediglich geringe Membranwiderstände im Bereich von 10^3 Ω erhalten. Im Gegensatz dazu bestand die Strategie der vorliegenden Arbeit darin, Lipiddoppelschichten durch die Fusion großer unilamellarer Vesikeln (LUVs) auf porösen Aluminaten, die bereits mit einem Thiolipid, in diesem Fall dem *Spacer*-Lipid CPEO3, funktionalisiert sind, aufzubauen.

Ein entscheidender Faktor bei der elektrischen Erfassung isolierender Grenzschichten war vor allem die Größe der elektrisch aktiven Fläche des Substrats, die durch die Platzierung des Dichtrings und dessen Durchmesser begrenzt wird (Abb. 3-6). Erst für Dichtringdurchmesser von 2,0 mm und kleiner konnten hochohmige Schichten impedanzspektroskopisch erfasst werden. Die Wahl von noch kleinerer Flächen stellte sich als wenig sinnvoll heraus, da die entsprechend erhaltenen, kleineren Grenzschichtkapazitäten nicht mehr im gewählten Frequenzfenster von $10^6 – 10^{-1}$ Hz impedanzspektroskopisch aufgezeichnet werden konnten. Des Weiteren erwies sich die Applizierung sehr geringer Mengen eines organischen Lösungsmittels, wie etwa *n*-Dekan, vor Zugabe der Liposomen in der Dichtringregion als wichtig für den Aufbau hochohmiger Schichten. Das Lösungsmittel selbst lieferte keinen signifikanten resistiven Beitrag, weshalb es zu diskutieren gilt, inwieweit es für den Erfolg der Präparationen notwendig ist. Zudem wurde im Vergleich zu früheren Arbeiten ein horizontaler Aufbau gewählt (Abb. 3-6), der es ermöglichte, die Vesikelsuspension und das Lösungsmittel gezielt in definierten Mengen an das poröse Substrat heranzubringen.

So wurde unter Verwendung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) der Zusammensetzung DPhPC/DOPC in einem Verhältnis 6:4 eine hochohmige Schicht auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat erhalten (Abb. 4-8). Es zeigte sich, dass eine Variation der Vesikelgröße von 200 - 1000 nm keinen Einfluss auf den Erfolg des Experiments hat. Vor Vesikelzugabe wurde etwas *n*-Dekanlösung in der Dichtringregion aufgetragen, um Leckströme zu begrenzen. Dabei wurde nur soviel *n*-Dekan verwendet, dass keine signifikante Veränderung des Impedanzverhaltens zu erkennen war. Abb. 4-8 (offene Quadrate) zeigt das Impedanzspektrum einer isolierenden Schicht, das 30 h nach Beginn der Inkubation mit Liposomen erstellt wurde.

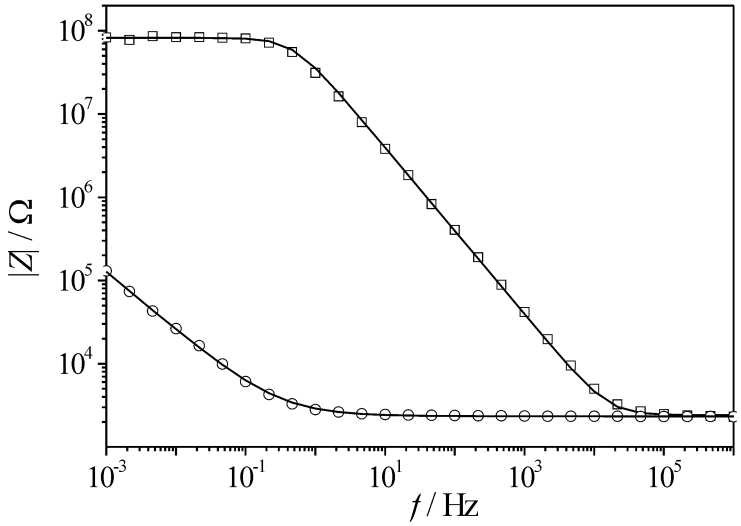


Abb. 4-8: (○) Impedanzspektrum des porösen Substrats nach Funktionalisierung mit Gold und CPEO3 zusammen mit der Datenanpassung (—) nach einem *R*CPE-Netzwerk: $R_\Omega = 2{,}3\cdot10^3$ Ω, A = $0{,}3\cdot10^{-3}$ F $s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}70$. (□) Impedanzanalyse einer isolierenden Schicht auf einem CPEO3-beschichteten porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) 30 h nach Inkubation mit Liposomen (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mg/ml, 1000 nm). Die Datenanpassung (—) erfolgte nach dem Ausdruck eines *RRC*-Kreises: $R_\Omega = 2{,}3\cdot10^3$ Ω, $R_m = 8{,}2\cdot10^7$ Ω und $C_m = 4{,}0\cdot10^{-9}$ F. Poröse Fläche: 0,0104 cm^2. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Zur Ermittlung der elektrischen Parameter dieses Systems wurde eine nicht lineare Kurvenanpassung auf Basis eines *RRC*-Kreises durchgeführt, der die Ohmschen und kapazitiven Eigenschaften der Grenzschicht *R* und *C* sowie den Elektrolytwiderstand R_Ω, der im hochfrequenten Bereich erfasst wird, berücksichtigt. Es wurden ein hochohmiger Widerstand $R = 8{,}2\cdot10^7$ Ω und die Grenzschichtkapazität $C = 4{,}0\cdot10^{-9}$ F bestimmt. Mit der Annahme, dass die elektrisch aktive Fläche (0,0104 cm^2) nur durch den porösen Anteil des Substrats bestimmt wird, lässt sich eine spezifische Kapazität C_{sp} von 0,39 µF cm^{-2}

angeben. Während aus fünf unabhängigen Experimenten eine mittlere spezifische Kapazität von (0,5 ± 0,1) µF cm^{-2} ermittelt werden konnte, variierte der Widerstand in einer Größenordnung von $10^6 – 10^8$ Ω. Ein Vergleich der spezifischen Grenzschichtkapazität mit typischen Literaturwerten für Lipiddoppelschichten zeigt, dass der erhaltene Wert in der für diese zu erwartenden Größenordnung von 0,5 – 1 µF cm^{-2} liegt (Benz et al., 1975).

In Abb. 4-8 ist außerdem die elektrische Antwort des mit Gold und CPEO3-beschichteten porösen Aluminats vor Zugabe der Vesikellösung abgebildet (offene Kreise). Neben R_Ω konnte lediglich die Doppelschichtkapazität der Platinelektroden erfasst werden, wodurch gezeigt wird, dass das poröse Aluminat selbst keinen Beitrag zum resistiven Verhalten des Systems leistet. Die Elektrodenkapazität wird in einem Netzwerk zur Kurvenanpassung in Serie zu R_Ω durch ein CPE repräsentiert. Dieses von einem idealen Kondensator abweichende Verhalten ist auf Grund des zur Oberflächenvergrößerung durchgeführten Platinierprozesses zu erwarten.

Ausgehend von den Erkenntnissen der Fluoreszenz- und AFM-Studien bezüglich der lateralen Mobilität und der elastischen Eigenschaften der untersuchten Grenzschichten, wird zusammen mit dem Impedanzverhalten der Präparationen gefolgert, dass es sich bei den Grenzschichten um hochohmige porenüberspannende Lipiddoppelschichten handelt, deren Aufbau im Rahmen dieser Arbeit erstmals durch Fusion von Liposomen auf porösen Substraten gelang. Mit dem Erhalt hochohmiger Membranen konnte die Methode der Impedanzspektroskopie genutzt werden, um diese zu charakterisieren. Darüber hinaus besteht unter Verwendung dieser elektrochemischen Methode die Möglichkeit, die Aktivität von integrierten Ionenkanälen zu untersuchen. Zur Auswertung von Impedanzdaten wird ein elektrisches Modell benötigt, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

4.4.2 Elektrisches Modell zur Beschreibung porenüberspannender Membranen

Abb. 4-9 A zeigt die schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran, wobei nicht berücksichtigt wurde, dass die Lipiddoppelschicht zunächst vertikal entlang der Goldoberfläche verläuft, bevor sie die Poren überspannt, worauf die Ergebnisse der rasterkraftmikroskopischen Studie hinwiesen (Abb. 4-4). Während auf dem Festkörper des Substrats Hybriddoppelschichten bestehend aus CPEO3 und der in Form der Vesikel

zugegeben Phospholipide gebildet werden, überspannt eine Membran aus Phospholipiden die offenen Poren. Das elektrische Verhalten der porenüberspannenden Membranen kann mit einem Ersatzschaltbild beschrieben werden, das den Elektrolytwiderstand R_Ω sowie die Lipiddoppelschicht mit den kapazitiven und Ohmschen Eigenschaften C_m und R_m einschließt

(Abb. 4-9 B). Um nicht ideales kapazitives Verhalten von Lipidmembranen zu berücksichtigen, wird C_m durch ein *constant phase element* (CPE) ersetzt (Abb. 4-9 C). Es gilt, dass der Elektrolyt innerhalb und außerhalb der Poren gleiches elektrisches Verhalten zeigt. Diese Annahme kann als gültig betrachtet werden, da in bisherigen Arbeiten an Membranen auf porösen Aluminaten keine Einschränkung der Ionendiffusion durch die Poren beobachtet wurde (Horn und Steinem, 2005a; Horn und Steinem, 2005b; Römer und Steinem, 2004). Zudem wurde gezeigt, dass die Stege der Substrate keinen zusätzlichen elektrischen Beitrag liefern. Sie müssen deshalb in den dargestellten Netzwerken nicht berücksichtigt werden. Da die Doppelschichtkapazitäten der Messelektroden (Platinelektroden) mit einem Wert von etwa 1 mF impedanzspektroskopisch meist nicht erfasst wurden, wurden sie aus Gründen der Vereinfachung im Modell vernachlässigt.

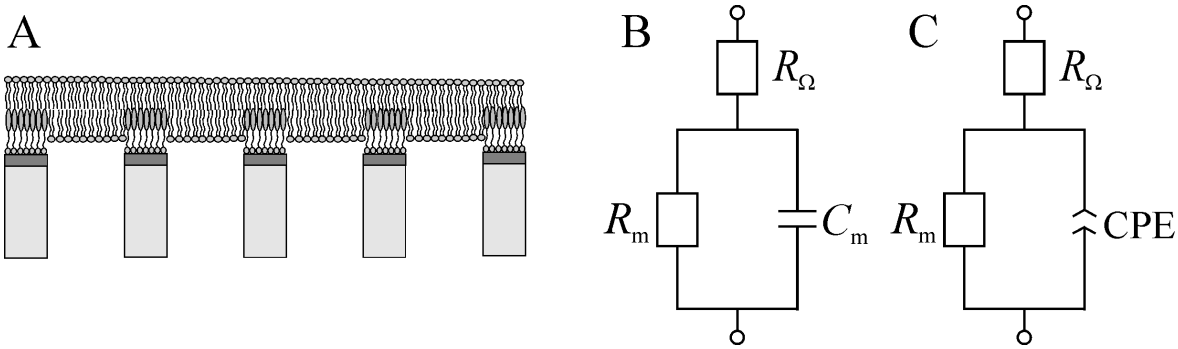


Abb. 4-9: A Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran auf Gold- und CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat mit einer Lipiddoppelschicht aus Phospholipiden. **B** *RRC*-Kreis zur Evaluierung der elektrischen Eigenschaften des Systems mit dem Elektrolytwiderstand R_Ω und den Elementen R_m und C_m stellvertretend für die Lipiddoppelschicht. **C** *RR*CPE-Kreis, der nicht ideales kapazitives Verhalten mit dem Netzwerkelement CPE berücksichtigt.

Neben der Frage eines geeigneten Ersatzschaltkreises zur Beschreibung der Membranen galt es zu klären, welcher Anteil der Substratoberfläche als die elektrisch aktive Fläche angesehen werden kann. Zur Klärung dieses Problems, über welchen Anteil des Substrats der Messstrom fließt, kann ebenfalls auf frühere Studien verwiesen werden. Horn (2005) betrachtete für ein vergleichbares System zwei Modelle, die sich darin unterschieden, ob

die einzelnen Poren in elektrischem Kontakt stehen oder voneinander isoliert sind. In dem sogenannten *parallel-layer*-Modell sind die Poren elektrisch miteinander verbunden, so dass die gesamte Substratfläche als „aktiv“ betrachtet werden muss. Dagegen wird für den Fall, dass die Ionenleitung nur innerhalb der Poren stattfindet, lediglich der poröse Anteil des Substrats für flächenspezifische Betrachtungen herangezogen. Das letztgenannte *series-layer*-Modell hat sich in bisherigen Arbeiten an nano-BLMs durchgesetzt, mit der Begründung, dass die Stegfläche durch die Funktionalisierung mit Thiolen wie Oktadekanthiol (ODT) oder Dipalmitoylphosphatidylthioethanol (DPPTE) elektrisch isoliert wird. Das in dieser Arbeit verwendete Thiol grenzt die Lipidmembran durch drei Ethylenoxyeinheiten vom porösen Substrat ab und könnte, wie in Abb. 4-9 A dargestellt, einen elektrischen Kontakt zwischen den Poren erlauben. Allerdings konnte bisher keine Methode entwickelt werden, die eine eindeutige Zuweisung des *parallel*- oder *series-layer*-Modells ermöglicht. Höfer (2007) hat in Impedanzstudien an Membranen mit CPEO3-funktionalisierten Aluminaten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu Ergebnissen an Substraten mit chemisorbierten Oktanthiolen erkennen können, weshalb auch in dieser Arbeit die poröse Fläche als die elektrisch aktive betrachtet wird.

4.4.3 Impedanzverhalten porenüberspannender Lipidmembranen

Im Folgenden werden impedanzspektroskopische Untersuchungen von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit durchgehender Porenstruktur bezüglich verschiedener Aspekte in einzelnen Unterkapiteln betrachtet. Zunächst werden Spektren beschrieben, deren elektrisches Verhalten von dem Fall abweicht, der in Kap. 4.4.2 erörtert wurde. Des Weiteren werden kinetische Gesichtspunkte wie der Bildungsprozess und die Stabilität der Membranen näher beleuchtet. Zudem wird auf die Wiederverwendung von bereits defekten Membranen eingegangen. In zwei letzten Unterpunkten liegt der Fokus auf der Untersuchung der Eignung von porenüberspannenden Membranen zur Studie von Ionenkanälen. Dabei werden zum einen die elektrische Dichtigkeit des Systems und zum anderen die Integration des detergenzsolubilisierten Transmembranproteins OmpF gezeigt.

4.4.3.1 Impedanzspektren mit zwei Dispersionen

Häufig sind in den impedanzspektroskopischen Daten von porenüberspannenden Membranen zwei Dispersionen zu erkennen, d. h., mindestens zwei Systembestandteile mit unterschiedlichen Zeitkonstanten $\tau = RC$ können getrennt voneinander aufgelöst werden. Jede der Dispersionen wird somit durch die Parameter R und C beschrieben. In Abb. 4-10 wird dieser Fall am Impedanzverhalten einer porenüberspannenden Membran gezeigt, die 10 h nach Zugabe einer Vesikelsuspension zu einem CPEO3-funktionalisierten porösen Aluminat erhalten wurde. Zusammen mit R_Ω sind nun fünf Parameter in einem Netzwerk so anzuordnen, dass sie Bestandteilen des elektrochemischen Systems in sinnvoller Art und Weise zugeordnet werden können. Fletcher (1994) konnte zeigen, dass es für einen Parametersatz mehrere „entartete“, also gleichwertige, elektrische Modelle gibt.

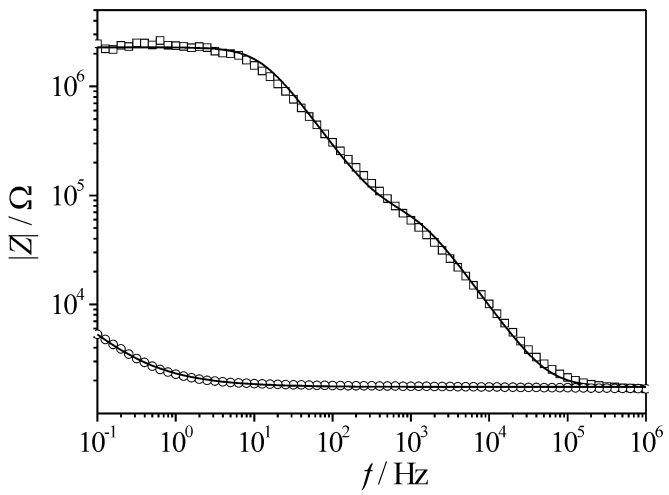


Abb. 4-10: (○) Impedanzverhalten des mit Gold und CPEO3 funktionalisierten porösen Aluminats (Porendurchmesser 60 nm) vor Präparation einer Membran. (□) Impedanzspektrum einer porenüberspannenden Membran auf porösem Aluminat 10 h nach Vesikelzugabe (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mg/ml, 1000 nm). Die Datenanpassung erfolgte nach dem Ersatzschaltkreis Abb. 4-11 A und liefert folgendes Ergebnis: $R_\Omega = 1{,}8 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_1 = 5{,}4 \cdot 10^4\ \Omega$, $C_1 = 2{,}4 \cdot 10^{-9}$ F, $R_2 = 2{,}2 \cdot 10^6\ \Omega$ und $C_2 = 5{,}7 \cdot 10^{-9}$ F. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

So können die Elemente eines Impedanzspektrums mit zwei Zeitkonstanten – R_1, R_2, C_1, C_2 und R_Ω – in drei verschiedenen Anordnungen zusammengestellt werden (Abb. 4-11).

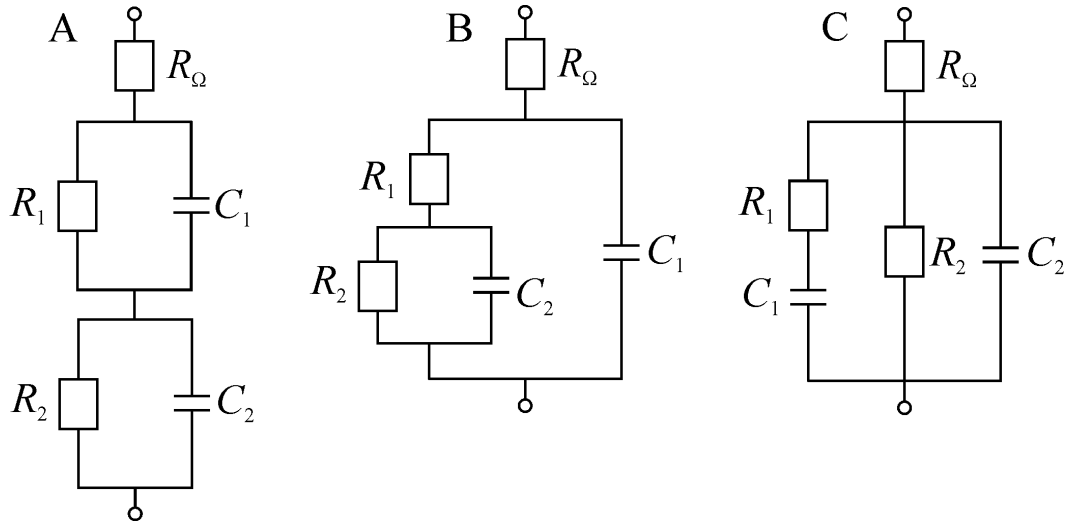


Abb. 4-11: Ersatzschaltkreise zur Beschreibung von Impedanzspektren, in denen neben dem Elektrolytwiderstand R_Ω zwei Elemente mit unterschiedlichen Zeitkonstanten $\tau = RC$ berücksichtigt werden.

Die Datenanpassung der drei verschiedenen Netzwerke an ein Impedanzspektrum mit zwei erkennbaren Dispersionen liefert Kurven, die gut mit den Daten übereinstimmen und in ihrem Verlauf nicht voneinander unterschieden werden können. Dagegen werden je nach verwendetem Ersatzschaltbild unterschiedliche Werte für die Netzwerkparameter erhalten, die in Tab. 4-3 zusammengefasst sind.

Tab. 4-3: Ergebnisse der Kurvenanpassung an das Impedanzspektrum in Abb. 4-10 nach den in Abb. 4-11 gezeigten Modellen.

Netzwerkelement	Modell A	Modell B	Modell C
R_Ω / kΩ	1,8	1,8	1,8
R_1 / MΩ	0,05	0,12	0,11
R_2 / MΩ	2,23	2,17	2,28
C_1 / nF	2,4	1,7	1,7
C_2 / nF	5,7	4,2	3,8

Es zeigte sich, dass die in der Datenanpassung ermittelten Werte der Netzwerkparameter in ähnlichen Größenordnungen liegen. Auf das in Abb. 4-10 gezeigte Impedanzspektrum wurde Modell A (Abb. 4-11) angewendet, welches in Serie zum Elektrolytwiderstand R_Ω

zwei seriell verbundene *RC*-Glieder besitzt. Es stellte sich nach der impedanzspektroskopischen Untersuchung vieler Präparationen heraus, dass das Auftreten von zwei Zeitkonstanten häufig in den ersten Stunden nach Vesikelzugabe zu erkennen ist und erst zu späteren Zeitpunkten nur noch eine Dispersion detektiert wird. Dieses Phänomen wird im folgenden Kapitel genauer betrachtet. Es wird postuliert, dass zu Beginn der Präparation einer porenüberspannenden Membran die Vesikel noch vermehrt hemifusioniert sind. Diese Systemkomponenten liegen in Serie zueinander, weshalb eine Datenanpassung nach Modell A durchaus sinnvoll ist. Dagegen kann eine Zuordnung der Werte aus der Datenanpassung mangels genauerer Kenntnisse über die einzelnen Systemkomponenten, etwa ihrer Fläche, nicht erfolgen.

4.4.3.2 Kinetik des Bildungsprozesses

Es wurde im vorangegangenen Kapitel angesprochen, dass die Impedanz von porenüberspannenden Membranen unter anderem von der Dauer des Inkubationsprozesses abhängt. Um dies zu verifizieren, wurde in einer Studie an einer Präparation die Änderung des elektrischen Verhaltens in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden nach Zugabe der Vesikel zum Substrat in regelmäßigen Abständen Impedanzspektren erstellt. In Abb. 4-12 sind der Betrag der Impedanz $|Z|$ (f) und der Phasenwinkel φ (f) gezeigt, die in einem Zeitraum von 4 – 22 h nach Vesikelzugabe aufgenommen wurden. Der Pfeil deutet den zeitlichen Verlauf der impedanzspektroskopischen Untersuchung an. Es sind zunächst sehr deutlich zwei Dispersionen zu erkennen, die über die Dauer des Experiments zu einer verschmelzen. Dabei ist es die Dispersion bei höheren Frequenzen, die in diesem Prozess nahezu verschwindet. Dies führt zu dem bereits in Kap. 4.4.3.1 postulierten Modell, dass die Substratoberfläche zu Beginn der Inkubation durch zwei unterschiedliche Systembestandteile in Form der porenüberspannenden Membran und der hemifusionierten Vesikel gekennzeichnet ist, deren Zeitkonstanten τ so stark variieren, dass sie impedanzspektroskopisch aufgelöst werden können (Abb. 4-12 B).

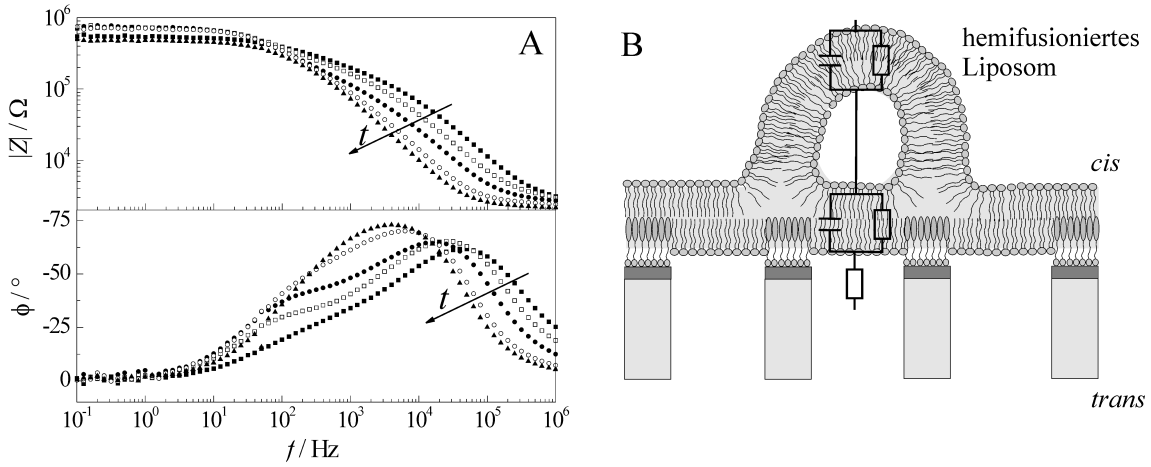


Abb. 4-12: A Betrag der Impedanz $|Z|$ und Phasenwinkel φ als Funktion der Frequenz f von porenüberspannenden Membranen auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) in Gegenwart einer Vesikelsuspension (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mg/ml, 1000 nm) (■) 4 h, (□) 9 h, (●) 12 h, (○) 15 h und (▲) 22 h nach Zugabe der Liposomen. Der Pfeil kennzeichnet den zeitlichen Verlauf des Experiments, in dem am Ende von anfäglich zwei Dispersionen nur noch eine bei niedrigeren Frequenzen zu erkennen ist. Elektrolyt: 0,1 M NaCl. **B** Modellvorschlag zur Interpretation von Impedanzspektren mit zwei Dispersionen.

Nach diesem Modell könnte die vollständige Fusion von zunächst hemifusionierten Vesikeln zu dem in Abb. 4-12 A gezeigten Impedanzverhalten, das sich in Abhängigkeit von der Zeit ändert, führen. Während in den meisten Experimenten der bei niedrigen Frequenzen erkennbare Gesamtwiderstand nahezu konstant bleibt oder leicht ansteigt, fällt er bei anderen Präparationen leicht ab, was beispielhaft in Abb. 4-12 A zu sehen ist. Es ist also möglich, dass hemifusionierte Vesikel erst dann nicht mehr detektiert werden, wenn die porenüberspannenden Membranen bereits wieder reißen.

Abschließend sei erwähnt, dass die Schwierigkeit beim Aufbau einer Membran darin bestand, nach Beginn der Präparation Widerstände zu erreichen, die in einer Größenordnung von $10^4 - 10^5\ \Omega$ liegen. So führten letztendlich nur etwa 30 % aller Präparationen zum Erfolg. Es wird postuliert, dass es im Bereich der Dichtringregion trotz lokaler Applikation geringer Mengen *n*-Dekan zu erheblichen Leckströmen kommt.

4.4.3.3 Stabilität

Erklärtes Ziel der Präparation von porenüberspannenden Membranen in dieser wie in vorangegangenen Arbeiten (Horn und Steinem, 2005a) war, ein Membransystem mit hoher mechanischer Stabilität über einen langen Zeitraum zu erhalten.

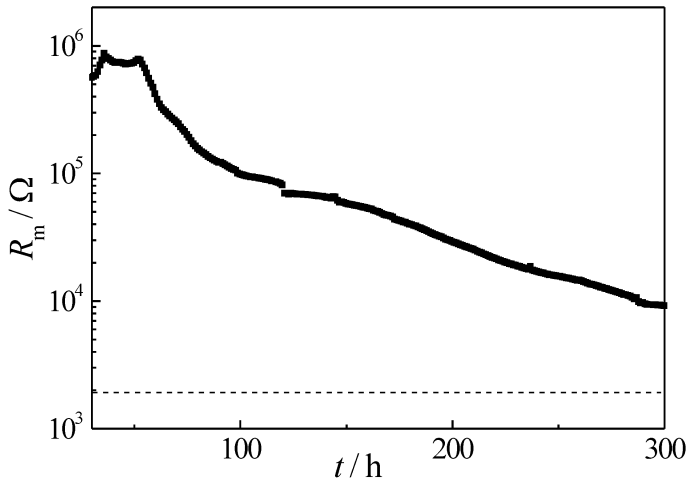


Abb. 4-13: Langzeitstabilität einer porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm). Aus einzelnen Spektren wurde durch Kurvenanpassung der Membranwiderstand R_m bestimmt und als Funktion der Zeit t aufgetragen. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Um dies auch für die in dieser Arbeit etablierten porenüberspannenden Membranen zu verifizieren, wurden regelmäßig im Abstand von 1 h Impedanzspektren erstellt, aus denen durch Kurvenanpassung der Parameter des Membranwiderstands R_m extrahiert wurde. Dieser Parameter bietet sich deshalb für Stabilitätsuntersuchungen an Membranen an, da nach Weiskopf et al. (2007) ein Abfall in R_m auf das Reißen einzelner porenüberspannender Membranen zurückzuführen ist. In Abb. 4-13 ist R_m in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Bis zu einem Zeitpunkt von 50 h wurde eine leichte Zunahme des Membranwiderstands erfasst. Danach konnte innerhalb von 70 h ein Abfall von R_m um eine Größenordnung detektiert werden. Eine Änderung um eine weitere Größenordnung ereignete sich im Anschluss daran in einem Zeitraum von 70 – 170 h. Nach 300 h näherte sich R_m der Größenordnung des Elektrolytwiderstands R_Ω, gekennzeichnet durch eine unterbrochene Linie in Abb. 4-13.

4.4.3.4 Vesikelfusion auf bereits bestehenden Lipidmembranen

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass der Widerstand der porenüberspannenden Membranen über einen längeren Zeitraum hinweg sinkt. Es stellte sich die Frage, ob die entstandenen Defektstellen durch erneute Zugabe unilamellarer Vesikel wieder aufgefüllt werden und somit eine Erhöhung des Membranwiderstands erzielt werden kann.

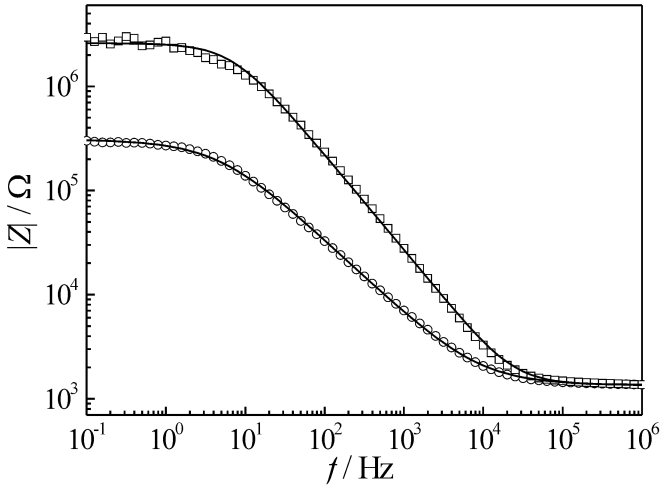


Abb. 4-14: Impedanzanalyse einer porenüberspannenden Membran auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) (○) vor und (□) 4 h nach Zugabe unilamellarer Vesikel bestehend aus DPhPC und DOPC 6:4 (1 mg ml^{-1}). An die Daten wurde die durch einen *RR*CPE-Kreis definierte Funktion mit folgendem Ergebnis angepasst: (○) $R_\Omega = 1{,}7\cdot10^3\ \Omega$, $R_m = 3{,}1\cdot10^5\ \Omega$, $A = 2{,}54\cdot10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}74$. (□) $R_\Omega = 1{,}7\cdot10^3\ \Omega$, $R_m = 2{,}6\cdot10^6\ \Omega$, $A = 0{,}12\cdot10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}91$. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Um dies zu untersuchen, wurde eine Probe mit einem Membranwiderstand von $3{,}1\cdot10^5\ \Omega$ mit frisch präparierten Liposomen versetzt. In Abb. 4-14 sind die Impedanzspektren vor und 4 h nach Vesikelzugabe gezeigt. Es ist zu erkennen, dass durch diesen Präparationsschritt eine Erhöhung von R_m um etwa eine Größenordnung auf einen Wert von $2{,}6\cdot10^6\ \Omega$ erreicht wurde. Die Membranwiderstände wurden in einer Datenanpassung basierend auf einem *RR*CPE-Kreis (Abb. 4-9 C) ermittelt. Nach dieser wird das CPE vor Vesikelzugabe durch die Parameter $A = 2{,}54\cdot10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ sowie $\alpha = 0{,}74$ und 4 h später mit $A = 0{,}12\cdot10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}91$ beschrieben. Der Wert für den Faktor α ist nach Vesikelfusion signifikant erhöht und zeigt damit an, dass das kapazitive Verhalten der untersuchten Grenzfläche dem eines idealen Kondensators näher kommt, was mit einer Verringerung von Defektstellen interpretiert werden kann. Um die kapazitiven Anteile der Spektren vergleichen zu können, wurde nach Ermittlung der maximalen Frequenz aus dem

Zusammenhang $Z^{Im}(\omega)$ nach Gl. 3-8 die Kapazität C der Membran berechnet. Vor Vesikelzugabe wurde mit $\omega_{max}'' = 35{,}6$ Hz der Wert $C = 1{,}0 \cdot 10^{-7}$ F, für die Daten nach Zugabe mit $\omega_{max}'' = 45{,}0$ Hz $C = 8{,}5 \cdot 10^{-9}$ F erhalten. Die spezifische Kapazität von 9,6 µF cm^{-2} vor Zugabe der Vesikel deutet an, dass bei gleichbleibender Membrandicke d und Dielektrizitätskonstante ε_r (Gl. 3-6) ein geringerer Teil der aktiven Fläche von einer Lipiddoppelschicht bedeckt wird als nach erneutem Aufbringen von Liposomen (0,8 µF cm^{-2}).

Mit diesem Experiment wurde demonstriert, dass durch Zugabe von Vesikeln zu einer porenüberspannenden Membran mit Defektstellen innerhalb weniger Stunden eine Lipiddoppelschicht mit verbesserten isolierenden Eigenschaften generiert werden kann. Dies könnte dann von Nutzen sein, wenn Ionenkanäle innerhalb kurzer Zeit in eine porenüberspannende Membran eingebracht werden sollen.

4.4.3.5 Elektrische Dichtigkeit

Um die elektrische Dichtigkeit von porenüberspannenden Membranen gegenüber hohen Ionenkonzentrationen zu untersuchen, wurde die 0,1 M NaCl-Lösung auf der *cis*-Seite der Membran gegen 1 M NaCl ausgetauscht. Die wässrige 0,1 M NaCl-Lösung im *trans*-Kompartiment wurde dabei nicht verändert. Damit konnte neben der erhöhten Elektrolytkonzentration ein Ionengradient die elektrischen Eigenschaften der Membran beeinflussen. In Abb. 4-15 A sind die Impedanzspektren eines solchen Experiments gezeigt. Im Bereich hoher Frequenzen ist die variierende Elektrolytstärke deutlich zu erkennen. Dagegen zeigt sich im niederfrequenten Bereich kein signifikanter Unterschied zwischen den Spektren in Gegenwart von 0,1 bzw. 1 M NaCl. Zur Quantifizierung der Daten wurde eine Kurvenanpassung basierend auf dem in Abb. 4-9 C dargestellten Netzwerk durchgeführt. Damit wird dem nicht idealen kapazitiven Verhalten durch ein CPE Rechnung getragen. In Abb. 4-15 wird deutlich, dass die nicht lineare Kurvenanpassung den Datenverlauf bei 10^6 – 1 Hz in sehr gut wiedergibt. Damit werden mit 0,1 M NaCl auf der *cis*-Seite der Elektrolytwiderstand $R_\Omega = 3{,}0 \cdot 10^3\ \Omega$ sowie $A = 6{,}9 \cdot 10^{-8}$ F s$^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}75$ erhalten. Durch Umrechung der CPE-Parameter nach Gl. 3-8 kann mit $\omega_{max}'' = 62{,}6$ Hz eine Kapazität von $C = 2{,}4 \cdot 10^{-8}$ F ermittelt werden, was einer spezifischen Kapazität von 0,2 µF cm^{-2} entspricht. Der Membranwiderstand konnte zu $7{,}6 \cdot 10^5\ \Omega$ bestimmt werden. Nach Austausch der Elektolytlösung im *cis*-Kompartiment sind die Ohmschen Eigenschaften des Systems verändert, wie die Größen $R_\Omega = 1{,}9 \cdot 10^3\ \Omega$ vor Austausch und $R_m = 6{,}9 \cdot 10^5\ \Omega$ danach zeigen. Die Kapazität, welche aus den Größen $A = 6{,}7 \cdot 10^{-8}$ F s$^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}75$ und

$\omega_{max}'' = 62{,}6$ Hz nach Gl. 3-8 berechnet wurde, bleibt mit einem Wert von $C = 2{,}6 \cdot 10^{-8}$ F nahezu konstant.

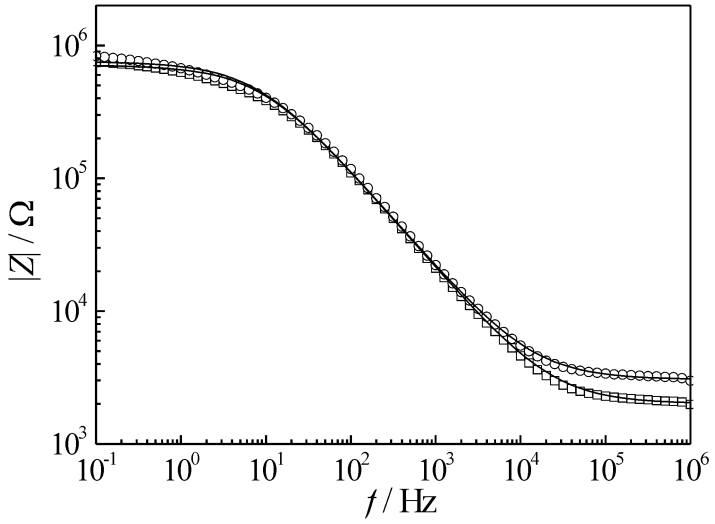


Abb. 4-15: Impedanzspektren einer porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) in Anwesenheit von 0,1 M NaCl *trans* sowie (○) 0,1 M NaCl bzw. (□) 1 M NaCl *cis*. Die Datenanpassung (—) erfolgte nach einem *RR*CPE-Kreis (Abb. 4-9 C) und liefert folgende Parameter: (○) $R_\Omega = 3{,}0 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_m = 7{,}6 \cdot 10^5\ \Omega$, $A = 6{,}9 \cdot 10^{-8}$ F $s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}75$. (□) $R_\Omega = 1{,}9 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_m = 6{,}9 \cdot 10^5\ \Omega$, $A = 6{,}7 \cdot 10^{-8}$ F $s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}75$.

R_m fiel unter Einfluss des höher konzentrierten Elektrolyten gegenüber dem Wert in niedermolarer NaCl-Lösung um 10 % ab. In Anbetracht dessen, dass der Membranwiderstand in der Anwesenheit von Ionenkanälen, wie in Kap. 5 gezeigt wird, um mehrere Größenordnungen sinken kann, werden diese Änderungen in R_m als vernachlässigbar klein angesehen. Bezüglich der Leitfähigkeit der Membran entspricht die ermitteltelte Änderung einem Wert von 0,13 µS.

4.4.3.6 Einfluss von Detergenz und Detergenz-solubilisiertem OmpF

Es wurde versucht, das Porin OmpF durch Zugabe zu einer porenüberspannenden Membran in diese zu rekonstituieren, um damit die Funktionalität des Systems zu verifizieren. Dabei lag der Fokus in dieser Arbeit auf der Untersuchung der konzertierten Aktivität einer Vielzahl von Proteinen. Im Prinzip wird dadurch die Leitfähigkeit des Systems moduliert, weshalb es sich anbietet, den Membranwiderstand des Systems zu beobachten. Hierfür wurde eine zeitaufgelöste Untersuchung des Betrags der Impedanz $|Z|$

bei einer geeigneten, festen Frequenz durchgeführt. Um auszuschließen, dass bei der gewählten Frequenz auch kapazitives Verhalten erfasst wird, wurde diese aus einem vorab erstellten Impedanzspektrum ermittelt.

Das Protein OmpF ist durch das Detergenz Octylpolyoxyethylen (*o*-POE) solubilisiert. Es wurde zunächst in einem Referenzexperiment der Einfluss des Detergenz auf die porenüberspannenden Membranen untersucht. Abb. 4-16 zeigt, dass bei einer Messfrequenz von 1 Hz der Betrag der Impedanz $|Z|$ der Lipidmembran von $8{,}5 \cdot 10^5\ \Omega$ innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe einer 1 % (*v*/*v*) *o*-POE-Lösung in 0,1 M NaCl zu der *cis*-Membranseite um zwei Größenordnungen auf einen Wert von $3{,}8 \cdot 10^3\ \Omega$ abfällt.

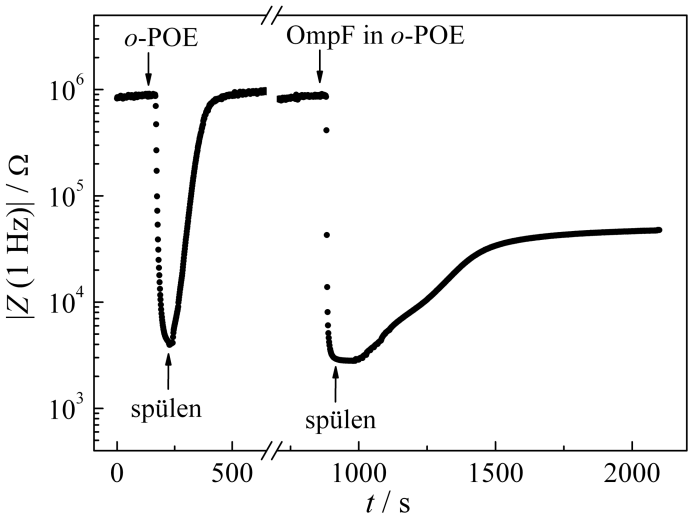


Abb. 4-16: Zeitaufgelöste Änderung des Betrags der Impedanz |Z| einer porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat bei einer Messfrequenz von 1 Hz nach Zugabe von *o*-POE bzw. *o*-POE-solubilisiertem OmpF und anschließendem Spülen mit Elektrolytlösung. Der Zeitpunkt der durchgeführten Arbeitsschritte ist durch Pfeile markiert. Die Endkonzentration von *o*-POE betrug 0,0002 %, von OmpF 0,5 nM. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Die *o*-POE-Endkonzentration in der *cis*-Kammer betrug 0,0002 % (*v*/*v*) und lag damit weit unter der sog. kritischen mizellaren Konzentration von 1 % (*v*/*v*), bei der das Detergenz Mizellen ausbildet. Durch intensives Spülen wurde für $|Z\,(1\ \mathrm{Hz})|$ wieder der Ausgangswert erreicht. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Detergenz die Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht in einem reversiblen Prozess erhöht. Wird an der gleichen Präparation *o*-POE-solubilisiertes OmpF zugegeben, fällt $|Z|$ auf $2{,}7 \cdot 10^3\ \Omega$ ab. Im Anschluss daran wird die Elektrolytlösung der *cis*-Kammer mit einer OmpF-Konzentration von 0,5 nM und einem *o*-POE-Gehalt von 0,0002 % (*v*/*v*) gegen 0,1 M NaCl-Lösung ausgetauscht. In diesem Fall

steigt $|Z|$ ebenfalls an, jedoch sehr viel langsamer und auch nicht bis auf den Ausgangswert von $8{,}5 \cdot 10^5\ \Omega$, sondern lediglich auf $4{,}8 \cdot 10^4\ \Omega$. Die Erhöhung der Membranleitfähigkeit um 19,7 µS wird auf die Kanalaktivität von insertierten OmpF-Molekülen zurückgeführt. Unter Berücksichtigung der Einzelkanalleitfähigkeit eines OmpF-Trimers in 0,1 M NaCl-Lösung von 535 pS (Danelon et al., 2003) kann abgeschätzt werden, dass etwa $1{,}1 \cdot 10^6$ OmpF-Moleküle in die porenüberspannende Membran eingebaut wurden. Es wurde versucht, durch Ampicillin, von dem bekannt ist, dass es den Kanal zeitweise blockiert (Nestorovich et al., 2002), die Membranleitfähigkeit zu erniedrigen. Diese Spezifizierung der Kanalaktivität gelang im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht.

4.5 Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisierten porösen Aluminaten mit flächenbegrenzter Siebstruktur

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminaten mit durchgehender Siebstruktur etabliert werden können, mit dem Nachteil, dass die Erfolgsrate der Präparationen nur bei etwa 30 % lag. Es wurde vermutet, dass dies auf Leckströme zurückzuführen ist, die vermehrt in der Dichtringregion auftreten. Hieraus entstand die Idee, die poröse Fläche der Substrate so zu gestalten, dass in der Region des Dichtrings geschlossene Porenböden vorliegen und damit die Leitfähigkeit über das Substrat begrenzt wird (Abb. 4-17). Es wurde erwartet, dass dadurch im Vergleich zu Substraten mit durchgehender Siebstruktur eine schnellere und erfolgreichere Präparation von elektrisch isolierenden Lipidmembranen möglich ist. Allerdings ist das Aluminiumoxid der Porenböden kein idealer Isolator und liefert demnach einen Beitrag zur elektrischen Impedanz des Systems.

Infolgedessen sind genaue Kenntnisse über die elektrischen Eigenschaften des Aluminiumoxids, die im ersten Unterkapitel erörtert werden, unabdingbar für die analytische Auswertung der Impedanzspektren von Lipidmembranen auf den selektiv strukturierten porösen Aluminaten. Davon ausgehend wird in einem zweiten Unterpunkt detailliert auf die Etablierung von Anpassungsroutinen zur Charakterisierung der Messanordnung eingegangen. Insbesondere wird dabei diskutiert, welche Art der Analyse geeignet ist, um Leitfähigkeitsänderungen aus Impedanzdaten zu extrahieren, die bezüglich der Kanalaktivität von integrierten Ionenkanälen von Interesse sind. In einem letzten Punkt werden die ent-

wickelten Modelle zur Kurvenanpassung auf ein repräsentatives Beispiel angewandt. Auf eine ausführliche Studie zur Langzeitstabilität dieser Lipidmembranen wurde verzichtet.

4.5.1 Poröse Aluminate mit flächenbegrenzter Siebstruktur

In Kap. 3.5.1.2 wurde gezeigt, dass die Porenböden poröser Aluminate selektiv in einem definierten Bereich geöffnet werden können. Zur Untersuchung von porenüberspannenden Membranen auf Aluminaten mit geschlossenen und offenen Porenböden wurden Substrate hergestellt, die in einem definierten Flächenbereich von 1 mm Durchmesser eine siebartige Struktur besitzen. Im Folgenden werden Ergebnisse zur rasterelektronenmikroskopischen und impedanzspektroskopischen Untersuchung der so modifizierten porösen Aluminate präsentiert.

4.5.1.1 Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop

Die rasterelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahme in Abb. 4-17 zeigt den Übergang von geschlossenen zu offenen Porenböden eines porösen Aluminats.

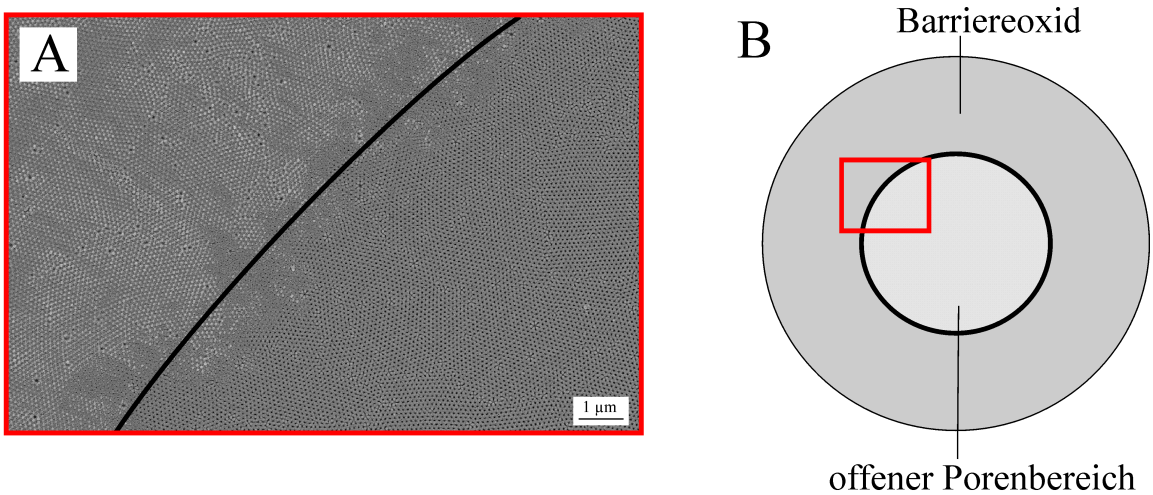


Abb. 4-17: A Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines porösen Aluminats mit einem Porendurchmesser von 60 nm in der Grenzregion (angedeutet durch die schwarze Linie) zwischen geschlossenen (linker Bildbereich) und offenen (rechter Bildbereich) Porenböden nach chemischem Ätzen mit 10 % (*w*/*v*) H_3PO_4 in einem kreisrunden Bereich von A = 0,0079 cm^2. Maßstabsbalken: 1 µm. **B** Schemazeichnung eines porösen Aluminats mit partiell geöffneter Porenstruktur. Der rot eingefasste Bereich verdeutlicht (nicht maßstabsgetreu) die im SEM-Bild gezeigte Grenzregion zwischen offenen und geschlossenen Poren.

Darin ist zu erkennen, dass sich beide Regionen relativ scharf voneinander abgrenzen. Eine exakte Trennlinie zwischen den beiden Bereichen war auf Grund der zur Porenbodenöffnung verwendeten Vorrichtung aus Teflon (Abb. 3-11 A), deren Öffnung durch die Bearbeitung mit dem zur Bohrung verwendeten Drillbohrer aus Metall nicht ideal glatt ist, nicht zu erwarten. In der REM-Aufnahme wird zudem die hochgeordnete, hexagonale Anordnung der Poren deutlich. Dabei liegen definierte Bereiche vor, die durch die Korngrenzen des metallischen Aluminiums vorgegeben werden.

4.5.1.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

Vor dem Entfernen des überschüssigen Barriereoxids der Porenböden wurde dessen Impedanzverhalten untersucht. An dem in Abb. 4-18 beispielhaft dargestellten Impedanzspektrum ist zu erkennen, dass in einem Bereich von $10^6 - 10^{-2}$ Hz sowohl die kapazitiven als auch die resistiven Eigenschaften aufgezeichnet und durch Anpassung eines *RRC*-Kreises (Abb. 4-9 B) zu $C_{ox} = 2{,}6 \cdot 10^{-9}$ F sowie $R_{ox} = 3{,}05 \cdot 10^8\ \Omega$ quantifiziert werden können.

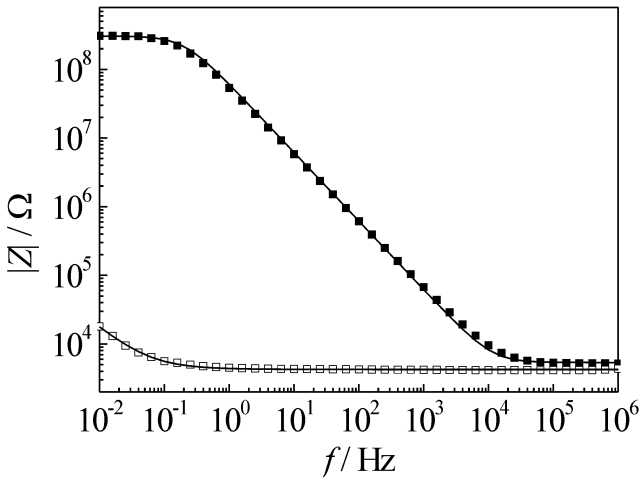


Abb. 4-18: Impedanzverhalten eines porösen Aluminats (Porendurchmesser 60 nm) (■) vor und (□) nach selektiver Porenbodenöffnung durch chemisches Ätzen mit 10 % (*w*/*v*) H_3PO_4 in einem kreisrunden Bereich mit $A = 0{,}0079$ cm^2. Die Kurvenanpassung vor Säurebehandlung basiert auf einem *RRC*-Kreis mit folgendem Ergebnis: $R_\Omega = 5{,}4 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_{ox} = 3{,}05 \cdot 10^8\ \Omega$ and $C_{ox} = 2{,}6 \cdot 10^{-9}$ F. Nach Ablösen der Porenböden dient die Gleichung eines *R*CPE-Kreises der Datenanpassung: $R_\Omega = 4{,}3 \cdot 10^3\ \Omega$, A = 0,6 mF s$^{\alpha-1}$ and $\alpha = 0{,}80$. Elektrolyt: 0,1 M NaCl.

Aus diesen Werten wurden unter Berücksichtigung der aktiven Fläche von 0,0026 cm^2, die nur den porösen Anteil des Substrats von (33 ± 4) % (Römer und Steinem, 2004) einschließt, die spezifische Kapazität $C_{ox,sp} = 1{,}0\ \mu$F cm^{-2} und der spezifische Widerstand

$R_{ox,sp}$ = 7,9 10^5 Ω cm^2 des Aluminiumoxids berechnet. Während die kapazitiven Eigenschaften der Oxidschicht verschiedener poröser Aluminate recht einheitlich in einem Bereich von (1,1 ± 0,3) µF cm^{-2} (n = 16) liegen, unterscheiden sich die spezifischen Widerstände mit 10^4 - 10^7 Ω cm^2 um mehrere Größenordnungen. Es ist anzunehmen, dass die Dicke des Barriereoxids der Porenböden, die, wie in Kap. 3.5.1.1 erläutert, von der Anodisierungsspannung abhängig ist (1,3 nm V^{-1}), am Ende des Anodisierungsprozesses für alle Substrate gleich ist. Dagegen ist das Ablösen des metallischen Aluminiums durch Oxidation in gesättigter $HgCl_2$-Lösung weniger leicht dirigierbar. Es wurde beobachtet, dass das Aluminiumoxid, wenn auch sehr viel langsamer, durch Inkubation in $HgCl_2$-Lösung ebenfalls abgetragen wird. Die Unterschiede in den elektrischen Eigenschaften könnten demnach bei diesem Prozess hervorgerufen werden.

Das Impedanzverhalten nach dem Entfernen der Porenböden wird (Abb. 4-18, offene Quadrate) lediglich durch den Elektrolyten und die kapazitiven Eigenschaften der Platinelektroden bestimmt. Durch diese Messung wird belegt, dass die Oxidstege des porösen Substrats, wie bereits in Kap. 4.4.2 erwähnt, keinen elektrischen Beitrag liefern. Mit dem zur Datenanpassung verwendete *R*CPE-Kreis (Abb. 4-5 D2) wurden der Elektrolytwiderstand und die Elektrodeneigenschaften berücksichtigt.

4.5.2 Elektrisches Modell des Systems zur Datenanalyse

Membranen auf porösen Aluminaten mit selektiv geöffneten Porenböden sind, wie in Abb. 4-19 A gezeigt in einen Bereich, der durch das unterliegende Barriereoxid gestützt wird, und in einen porenüberspannenden Bereich einteilbar. Da das Barriereoxid der Porenböden selbst auch elektrische Eigenschaften besitzt, die wie in Kap. 4.5.1 gezeigt, impedanzspektroskopisch detektiert werden, wird es mit R_{ox} und C_{ox} in das theoretische Modell des Systems einbezogen (Abb. 4-19 B). Somit ist das Netzwerk in zwei Äste gegliedert, wodurch mit $R_{m,c}$ und $C_{m,c}$ die Membran mit unterliegendem Barriereoxid und parallel dazu die porenüberspannende Membran mit $R_{m,o}$ und $C_{m,o}$ berücksichtigt wird. Der Elektrolyt in den Porenkanälen des Substrats und in der Lösung wird äquivalent behandelt, und wird als R_Ω in Serie zu den übrigen Netzwerkparametern geschaltet. Insgesamt beinhaltet das Modell dieses Systems sieben Elemente, deren Werte in einer Datenanpassung basierend auf dem angegebenen Modell (Abb. 4-19 B) ermittelt werden. Erfolgt dies nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate in einer nicht linearen

Kurvenanpassung (*non-linear least square fit*), so kann die Summe der Fehlerquadrate mehrere Minima besitzen, das heißt, theoretisch können mehrere Parameterkombinationen gefunden werden. Häufig lieferte die Datenanpassung an die erhaltenen Impedanzspektren in Abhängigkeit von der Initialisierung der Werte neben sinnvollen Ergebnissen auch irrelevante Größenordnungen. Aus diesem Grund wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Zahl der variablen Parameter während der Anpassung so zu reduzieren, dass die Datenanpassung mit höchstens drei zu bestimmenden Größen durchgeführt werden kann. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass durch die impedanzspektroskopische Charakterisierung der geschlossenen Porenböden für jedes individuelle Substrat die elektrischen Parameter R_{ox} und C_{ox} zur Verfügung standen, die in der Anpassungsroutine festgehalten werden konnten. Zur weiteren Reduktion der Variablenzahl wurden zwei Ansätze verfolgt, die im Folgenden näher erläutert werden.

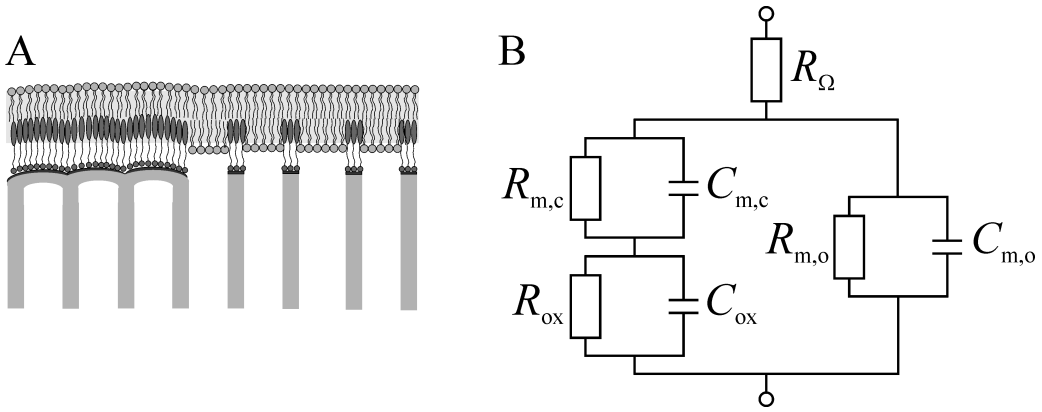


Abb. 4-19: A Schematische Darstellung einer Lipidmembran präpariert auf porösem Aluminat mit selektiv geöffneten Porenböden. **B** Ersatzschaltkreis zur Beschreibung des Membransystems: Die zwei Äste des Netzwerks berücksichtigen getrennt voneinander die elektrischen Eigenschaften der Membran auf geschlossenen Porenböden ($R_{m,c}$, $C_{m,c}$) mit dem unterliegenden Aluminiumoxid (R_{ox}, C_{ox}) sowie die porenüberspannende Membran ($R_{m,o}$, $C_{m,o}$).

Ansatz 1

Dieser Ansatz sieht vor, dass die Membranen über den offenen und geschlossenen Poren getrennt voneinander betrachtet werden. Es wird angenommen, dass die Parameter $R_{m,sp}$ und $C_{m,sp}$ aus Impedanzdaten von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten die auf dem Barriereoxid liegende Membran in erster Näherung beschreiben. Damit können aus den spezifischen Größen $R_{m,sp}$ und $C_{m,sp}$ nach Bezug auf die Fläche des Barriereoxids $R_{m,c}$ und $C_{m,c}$ abgeschätzt und während der Datenanpassung konstant gehalten werden. Dies setzt aber voraus, dass der gesamte geschlossene Porenbereich von einer Lipiddoppel-

schicht bedeckt ist. Dagegen gehen $R_{m,o}$ und $C_{m,o}$, welche die Membranen im offenen Porenbereich beschreiben, sowie der Elektrolytwiderstand R_{Ω} als Variablen in die Anpassungsroutine ein.

Ansatz 2

In einem zweiten Ansatz zur Reduktion der Anzahl der Variablen gilt die Annahme, dass die spezifische Kapazität C_{sp} und der spezifische Widerstand R_{sp} der Lipidmembranen auf offener und geschlossener Porenfläche einander entsprechen (Gln. 4-3 und 4-4):

$$\frac{C_{m,o}}{A_2} = \frac{C_{m,c}}{A_1} \tag{4-3}$$

$$R_{m,o} \cdot A_2 = R_{m,c} \cdot A_1 \tag{4-4}$$

Hinsichtlich der Dimensionen des in dieser Arbeit untersuchten Systems fließen die Flächen des geschlossenen und des offenen Porenbereichs mit $A_1 = 0{,}0078\ \mathrm{cm}^2$ bzw. $A_2 = 0{,}0026\ \mathrm{cm}^2$ in die Berechnungen ein, wobei sich die Größen auf den porösen Anteil der Substrate beziehen. Durch die in den Gln. 4-3 und 4-4 gegebenen Zusammenhänge können nun die Parameter $C_{m,o}$ und $R_{m,o}$ durch Ausdrücke ersetzt werden, welche die Größen $C_{m,c}$ und $R_{m,c}$ sowie die bekannten Flächen A_1 und A_2 beinhalten. Damit werden die elektrischen Parameter der Membran über den offenen Poren in der Datenanpassung nur indirekt berücksichtigt und können nachträglich aus $C_{m,c}$ und $R_{m,c}$ über die Gln. 4-3 und 4-4 ermittelt werden.

Es wurden somit zwei mögliche Anpassungsroutinen zur Analyse von Impedanzspektren gefunden, die alle elektrischen Parameter der porenüberspannenden Membranen auf Substraten mit flächenbegrenzter Siebstruktur einschließen.

Wird dagegen die Untersuchung von integrierten Peptiden oder Proteinen angestrebt, so ist vor allem die Leitfähigkeitsänderung der Lipidmembran von Interesse, da diese eine Aussage zur Kanalaktivität der Moleküle liefert. Aus diesem Grund wurde die komplexe Anpassungsroutine für Untersuchungen, deren Fokus auf der Beobachtung von Änderungen des Membranwiderstands liegt, vereinfacht (Ansatz 2').

Ansatz 2'

Die Impedanz des Ersatzschaltbildes (Abb. 4-19 B) für niedrige und hohe Frequenzen wird ausschließlich durch den Realteil in Form der im System enthaltenen Ohmschen Widerstände beschrieben. Dabei war insbesondere der Grenzwert für niedrige Frequenzen von Interesse, da in diesem Bereich hochohmige Widerstände wie der Membranwiderstand erfasst werden. Es wurde für die Impedanz des Systems (Gln. 10-6 – 10-10) folgende Grenzwertbetrachtung, getrennt nach Real- und Imaginärteil (Gln. 4-5 und 4-6), durchgeführt:

$$\lim_{\omega \to 0} Z^{\mathrm{Re}}(\omega) = R_{\mathrm{a}} = R_{\mathrm{m,o}} \frac{R_{\mathrm{ox}} + R_{\mathrm{m,c}}}{R_{\mathrm{m,o}} + R_{\mathrm{ox}} + R_{\mathrm{m,c}}} \tag{4-5}$$

$$\lim_{\omega \to 0} Z^{\mathrm{Im}}(\omega) = 0\,. \tag{4-6}$$

Dies zeigt, dass bei sehr niedrigen Frequenzen ($\omega \to 0$) allein die im Netzwerk enthaltenen Ohmschen Widerstände zur Impedanz beitragen. Sie werden im Folgenden zu dem Gesamtwiderstand R_{a} zusammengefasst. Damit wurde zur Beschreibung des Systems ein Ersatzschaltbild erstellt (Abb. 4-20), das neben R_{a} die gesamten kapazitiven Eigenschaften des Systems für den Fall nicht idealen Verhaltens mit einem CPE berücksichtigt. Dieses Modell erlaubt die Durchführung einer Datenanpassung, durch die der Widerstand des Systems direkt ermittelt werden kann.

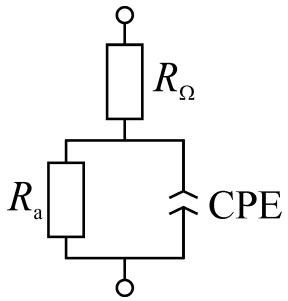


Abb. 4-20: Vereinfachtes Netzwerk zur Beschreibung von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit selektiv geöffneten Porenböden. Es berücksichtigt mit R_{a} den Gesamtwiderstand des Systems nach Gl. 4-3, mit CPE nicht ideales kapazitives Verhalten. R_{Ω} repräsentiert den Elektrolytwiderstand.

Über den in Gl. 4-5 gezeigten Zusammenhang können mit dem bekannten Parameter R_{ox} die Membranwiderstände $R_{\mathrm{m,c}}$ und $R_{\mathrm{m,o}}$ unter der Annahme berechnet werden, dass der

spezifische Widerstand der Membranen auf geschlossenen bzw. offenen Porenböden gleich ist (Gl. 4-4). Bezüglich des kapazitiven Verhaltens kann nur ein Gesamtwert angegeben werden, der die Beiträge der Lipidmembran sowie des Barriereoxids einschließt.

In Tab. 4-4 sind die Konventionen für die Netzwerkparameter nach den verschiedenen Ansätzen zur Datenanpassung zusammengefasst.

Tab. 4-4: Konventionen zur Datenanpassung nach den beschriebenen Ansätzen 1, 2 und 2'.

	Netzwerkparameter						
Ansatz	R_Ω	R_{ox}	$R_{m,c}$	$R_{m,o}$	C_{ox}	$C_{m,c}$	$C_{m,o}$
1	**variabel**	fest[1]	fest[2]	**variabel**	fest[1]	fest[2]	**variabel**
2	**variabel**	fest[1]	**variabel**	$R_{m,c} \cdot \frac{A_1}{A_2}$ [3]	fest[1]	**variabel**	$C_{m,c} \cdot \frac{A_1}{A_2}$ [3]

	R_Ω	R_a [4]	CPE
2'	**variabel**	**variabel**	**variabel**

4.5.3 Impedanzverhalten der Lipidmembranen

Um das elektrische Verhalten der auf porösem Aluminat mit selektiv geöffneten Poren in einem Bereich von $A = 0{,}0078\ \text{cm}^2$ (Durchmesser = 1 mm) präparierten Lipidmembranen zu untersuchen, wurden impedanzspektroskopische Messungen durchgeführt. Zunächst wurde das Impedanzverhalten des mit CPEO3 funktionalisierten Substrats, das in einer Messkammer mit einem Dichtringdurchmesser von 2 mm fixiert worden ist (siehe Abb. 3-6), vor Beginn der Membranpräparation überprüft. Das in Abb. 4-21 A (offene Kreise) gezeigte Impedanzspektrum lässt den Einfluss des Barriereoxids der ungeöffneten Porenböden in Form einer Dispersion zwischen $10^4 - 10^5$ Hz erkennen. Dabei ist der resistive Beitrag von etwa 600 Ω zum Gesamtwiderstand gering. Um Leckströme zu

[1] Aus Impedanzdaten des jeweiligen Substrats mit noch geschlossenen Porenböden.
[2] Abschätzung aus Impedanzdaten, ermittelt an festkörperunterstützten Membranen auf Goldelektroden.
[3] Gültig unter der Annahme, dass die spezifischen Eigenschaften der Membranen auf den offenen und geschlossenen Porenböden gleich sind.
[4] Gültig bei niedrigen Frequenzen, wenn Z^{Im} vernachlässigbar ist.

verringern, wurde vor Vesikelzugabe eine geringe Menge einer Emulsion aus 1 % (*v/v*) *n*-Dekan in Pufferlösung im Bereich des Dichtrings aufgetragen. Diese sehr geringen Mengen des organischen Lösungsmittels erhöhten den Gesamtwiderstand des Systems nur wenig in einer Größenordnung von 10^2 Ω, wie in Abb. 4-21 A gezeigt.

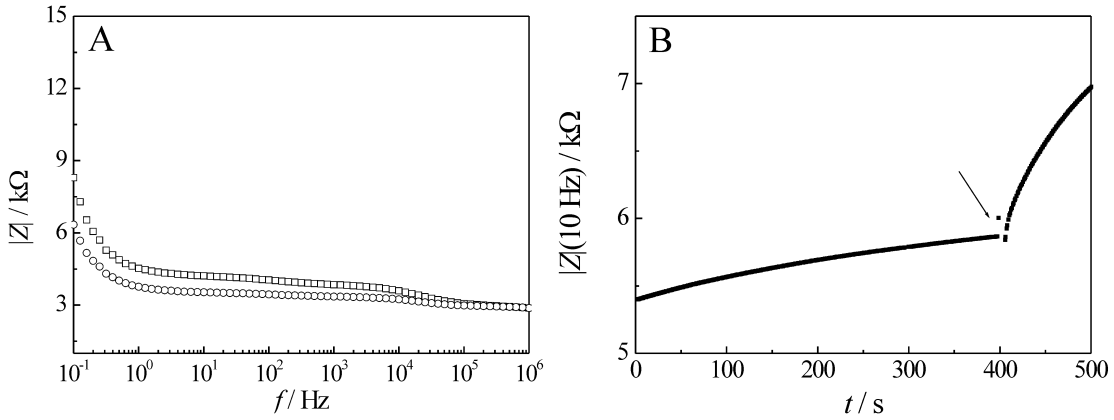


Abb. 4-21: A Impedanzspektren von CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (60 nm Porendurchmesser) mit selektiv geöffneten Porenböden (A = 0,0078 cm^2), fixiert in einer Messkammer zwischen Dichtringen (2 mm Durchmesser, A = 0,0314 cm^2) (○) vor und (□) nach der Applikation einer Emulsion von 1 % (*v/v*) *n*-Dekan in Pufferlösung in der Dichtringregion. **B** Betrag der Impedanz als Funktion der Zeit bei einer Messfrequenz von 10 Hz. Bei t = 0 wurde eine 1 % (*v/v*) wässrige Emulsion von *n*-Dekan aufgetragen, der Pfeil indiziert den Zeitpunkt der Vesikelzugabe (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mg/ml, nomineller Durchmesser 1000 nm). Puffer: 10 mM TRIS/HCl, 100 mM TMA, pH 8,6.

Wurde der Betrag der Impedanz bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz zeitlich aufgelöst, so war zu erkennen (Abb. 4-21 B), dass die Applikation einer Emulsion von *n*-Dekan in Puffer zu einem graduellen Anstieg der Messgröße führte. Es ist denkbar, dass sich das organische Lösungsmittel langsam über das mit CPEO3 hydrophobisierte Substrat verteilt und so das Impedanzverhalten ändert. Ein sehr viel deutlicherer Anstieg der Impedanz wurde nach Zugabe einer Suspension bestehend aus Liposomen der Zusammensetzung DPhPC und DOPC 6:4 erfasst. Dies zeigt, dass sofort nach Vesikelzugabe eine detektierbare, isolierende Lipidschicht erhalten wurde, wobei deren Aufbau in 80 % der Präparationen nach etwa 3 h abgeschlossen war. Im Vergleich zum Bildungsprozess von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit durchgehender Siebstruktur wird deutlich, dass der Vorteil der Substrate mit selektiv geöffneten Porenböden in einem schnelleren Aufbau von Lipidmembranen mit einer hohen Erfolgsrate liegt. Dagegen ist die Bestimmung der elektrischen Parameter von Lipidmembranen der Substratvariante mit partiell geöffneten Poren komplexer als für Systeme mit durchgehender Porenstruktur. Die

Anpassungsroutine basierend auf den in Kap. 4.5.2 erstellten Ansätzen wird im Folgenden anhand eines Beispiels erläutert.

Die drei verschiedenen Varianten zur Datenanalyse wurden auf das in Abb. 4-22 ausgewählte Beispiel des Impedanzspektrums einer Lipidmembran angewendet. Darin ist neben dem Impedanzspektrum einer Membran 3 h nach Präparationsbeginn auch das Impedanzverhalten des Substrats vor Zugabe einer *n*-Dekan Emulsion (1 % (*v/v*)) gezeigt. Wie in Kap. 4.5.2 ausführlich erläutert, müssen für die Datenanalyse die elektrischen Parameter des Barriereoxids, das unter Berücksichtigung eines porösen Anteils von 33 % eine Gesamtfläche von 0,0079 cm^2 besitzt, bekannt sein. Für das hier behandelte Beispiel trägt das Oxid mit $R_{ox} = 8{,}9 \cdot 10^6\ \Omega$ und $C_{ox} = 6{,}7 \cdot 10^{-9}$ F zum elektrischen Verhalten des Systems bei. Nach Ansatz 1 wurden die Eigenschaften der Lipidmembran mit unterliegender Oxidschicht $R_{m,c}$ und $C_{m,c}$ aus Impedanzdaten von Lipiddoppelschichten immobilisiert auf Goldelektroden abgeleitet.

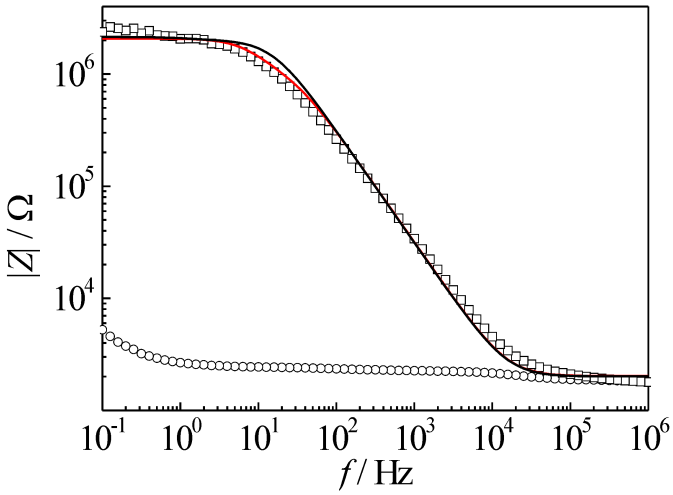


Abb. 4-22: Impedanzspektrum einer Lipidmembran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) mit selektiv geöffneten Porenböden (○) vor und (□) 3 h nach Präparationsbeginn. Die Kurvenanpassung basierte auf dem in Abb. 4-19 B angegebenen Ersatzschaltkreis mit $R_{ox} = 8{,}9 \cdot 10^6\ \Omega$ und $C_{ox} = 6{,}7\ 10^{-9}$ F. Nach Reduktion der variablen Parameter unter konstanthalten von $R_{m,c} = 5{,}8 \cdot 10^8\ \Omega$ und $C_{m,c} = 6{,}6 \cdot 10^{-9}$ F folgt nach Ansatz 1 (—): $R_\Omega = 2 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_{m,o} = 2{,}1 \cdot 10^6\ \Omega$ und $C_{m,o} = 1{,}8 \cdot 10^{-9}$ F. Nach Ansatz 2 (—) unter Annahme einheitlicher spezifischer Membraneigenschaften (Gln. 4-1 und 4-2) gilt: $R_\Omega = 2 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_{m,o} = 2{,}6 \cdot 10^6\ \Omega$, $C_{m,o} = 1{,}9 \cdot 10^{-9}$ F, $R_{m,c} = 8{,}9 \cdot 10^5\ \Omega$ und $C_{m,c} = 5{,}8 \cdot 10^{-9}$ F. Puffer: 10 mM TRIS/HCl, 100 mM TMA, pH 8,6.

Während der spezifische Widerstand mit $4{,}5 \cdot 10^5\ \Omega\ cm^2$ festgesetzt wurde, ging die Membrankapazität nach den in Kap. 4.3.3 angegebenen spezifischen Werten mit 0,8 µF cm^{-2} (in 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6) in die Datenanpassung ein. Mit dieser Annahme wurde

impliziert, dass die Fläche des Barriereoxids vollständig von einer Lipidmembran bedeckt ist. Die Kurvenanpassung nach diesem Ansatz lieferte den in Abb. 4-22 in Form der schwarzen durchgezogenen Linie gezeigten Verlauf, der bis auf den Frequenzbereich von 10 – 100 Hz gut mit den Daten übereinstimmt. Unter Berücksichtigung einer porösen Fläche von 0,0026 cm^2 des Bereichs geöffneter Porenböden wurden die spezifischen Werte $R_{m,o} = 5{,}5 \cdot 10^3\ \Omega\ cm^2$ und $C_{m,o} = 0{,}69\ \mu F\ cm^{-2}$ erhalten.

Im Gegensatz dazu wurde nach Ansatz 2, der impliziert, dass die spezifischen Membraneigenschaften auf geschlossenen und offenen Porenböden gleich sind, eine Anpassung erhalten, die den Verlauf der Daten im gesamten Frequenzfenster in guter Übereinstimmung wiedergibt (Abb. 4-22, rote Linie). Die Anpassungsroutine lieferte die Parameter $R_{m,c,sp} = 6{,}9 \cdot 10^3\ \Omega\ cm^2$ und $C_{m,c,sp} = 0{,}75\ \mu F\ cm^{-2}$. Mit den Gln. 4-1 und 4-2 konnten die Parameter $R_{m,o}$ und $C_{m,o}$ berechnet werden. Die Ergebnisse der Datenanalyse nach den beiden Ansätzen sind in Tab. 4-5 zusammengefasst.

Tab. 4-5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Datenanpassung nach den in Kap. 4.5.2 entwickelten Ansätzen 1, 2 und 2' zur Datenanalyse eines beispielhaft dargestellten Impedanzspektums einer Lipidmembran auf porösen Aluminaten mit selektiv geöffneten Porenböden. Folgende Systemkomponenten sind in der Tabelle zusammengefasst: Elektrolytwiderstand (R_Ω), Widerstand des Barriereoxids (R_{ox}), Kapazität des Barriereoxids (C_{ox}), Widerstand der Membran auf geschlossenen Porenböden ($R_{m,c}$), Kapazität der Membran auf geschlossenen Porenböden ($C_{m,c}$), Widerstand der Membran auf geöffneten Poren ($R_{m,o}$), Kapazität der Membran auf geöffneten Poren ($C_{m,o}$). Die hervorgehobenen Werte wurden in der Anpassungsroutine variiert.

	Netzwerkparameter						
Ansatz	R_Ω / Ω	R_{ox} / Ω	$R_{m,c}$ / Ω	$R_{m,o}$ / Ω	C_{ox} / nF	$C_{m,c}$ / nF	$C_{m,o}$ / nF
1	**$2 \cdot 10^3$**	$8{,}9 \cdot 10^6$	$5{,}8 \cdot 10^8$	**$2{,}1 \cdot 10^6$**	6,7	6,6	**1,8**
2	**$2 \cdot 10^3$**	$8{,}9 \cdot 10^6$	**$8{,}9 \cdot 10^5$**	**$2{,}6 \cdot 10^6$**	6,7	**5,8**	**1,9**
2'	**$2 \cdot 10^3$**	$8{,}9 \cdot 10^6$	**$9{,}8 \cdot 10^5$**	**$3{,}0 \cdot 10^6$**	6,7	**--**	**--**

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass die nach Ansatz 1 und 2 ermittelten Membrankapazitäten $C_{m,o}$ des offenen Porenbereichs mit einer Abweichung von 6 % gut übereinstimmen. Dagegen unterscheiden sich die Membranwiderstände $R_{m,o}$ um etwa 20 % voneinander. Als Grund für die Abweichung des Parameters $R_{m,o}$ zwischen den beiden Ansätzen ist der in der Anpassungsroutine nach Ansatz 1 berücksichtigte Wert

$R_{m,c} = 5{,}8 \cdot 10^8\ \Omega$ zu nennen, der sich um drei Größenordnungen von dem nach Ansatz 2 bestimmten Wert unterscheidet. Da der isolierende Beitrag des geschlossenen Porenbereichs nach Ansatz 1 als groß angenommen wurde, ist $R_{m,o}$ mit $2{,}1 \cdot 10^6\ \Omega$ im Vergleich zu $R_{m,o} = 2{,}6 \cdot 10^6\ \Omega$ nach Ansatz 2 folgerichtig zu einem niedrigeren Wert bestimmt worden. Es stellt sich nun die Frage, welcher der beiden Ansätze die Membranparameter möglichst genau wiedergibt. An den in Abb. 4-22 dargestellten Kurven ist zu erkennen, dass die Anpassung nach Variante 2 das Impedanzspektrum in größerer Übereinstimmung beschreibt. Das heißt, dass mit der Annahme gleicher spezifischer Parameter für die Lipidmembranen in den zwei Bereichen des Substrats (Ansatz 2) das elektrochemische System besser beschrieben wird als nach Ansatz 1, der eine ideale Lipiddoppelschicht auf dem Barriereoxid vorsieht.

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, war es das Ziel, die Datenanpassung soweit zu vereinfachen, dass zunächst ein Gesamtwiderstand R_a aus den Impedanzdaten bestimmt werden kann. Dazu wurde Ansatz 2' formuliert, der nach wie vor die Annahme beinhaltet, dass die spezifischen Membraneigenschaften über das ganze Substrat hinweg gleich sind. Basierend auf dem danach erstellten Netzwerk (Abb. 4-20) wurde in der Anpassungsroutine die in Abb. 4-23 schwarz dargestellte Kurve erhalten, die den Verlauf des Impedanzspektrums in sehr guter Übereinstimmung wiedergibt.

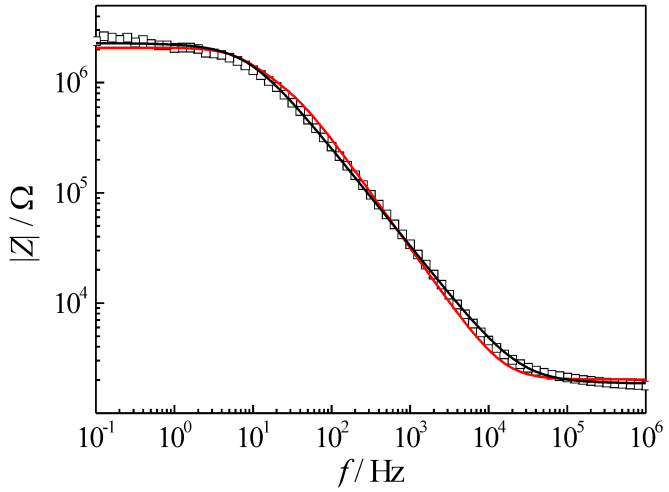


Abb. 4-23: Impedanzspektrum einer Lipidmembran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem Aluminat (Porendurchmesser 60 nm) mit selektiv geöffneten Porenböden 3 h nach Präparationsbeginn. Die Kurvenanpassung basierte auf dem in Abb. 4-19 B angegebenen Ersatzschaltkreis mit $R_{ox} = 8{,}9 \cdot 10^6\ \Omega$ und $C_{ox} = 6{,}7\ 10^{-9}$ F nach (—) Ansatz 2 (Anpassungsparameter siehe Abb. 4-22). Alternativ wurde eine Kurvenanpassung (—) basierend auf dem vereinfachten Netzwerk (Abb. 4-20) durchgeführt: $R_\Omega = 2 \cdot 10^3\ \Omega$, $R_a = 2{,}3 \cdot 10^6\ \Omega$, $C_a = 8{,}2 \cdot 10^{-9}$ F. Puffer: 10 mM TRIS/HCl, 100 mM TMA, pH 8,6.

Zum Vergleich ist noch einmal der nach Ansatz 2 erhaltene Graph in rot gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Ansatz 2' der Verlauf der Datenpunkte bei niedrigen Frequenzen, in dem Bereich also, der die Membranwiderstände erfasst, sehr viel genauer nachgestellt wurde. Der Grund dafür ist vor allem in der Verwendung eines CPE zur Berücksichtigung nicht idealen kapazitiven Verhaltens zu sehen, das nach Gl. 3-8 mit den erhaltenen Parametern $A = 12{,}3\ \mathrm{nF\ s^{\alpha-1}}$ und $\alpha = 0{,}89$ sowie mit $\omega_{max}'' = 48{,}3\ \mathrm{s^{-1}}$ einer Kapazität $C_a = 8{,}2 \cdot 10^{-9}$ F entspricht. Bezogen auf die poröse Fläche des Substrats ergibt dies einer spezifischen Kapazität $C_{a,sp} = 0{,}78\ \mu\mathrm{F\ cm^{-2}}$, die sowohl den Beitrag der Lipidmembranen als auch des Barriereoxids einschließt. In gleicher Weise werden mit dem Gesamtwiderstand $R_a = 2{,}3 \cdot 10^6\ \Omega$ alle resistiven Beiträge des Systems erfasst. Unter Verwendung der Gln. 4-3 und 4-4 konnten mit R_{ox} die Membranwiderstände $R_{m,c}$ zu $9{,}8 \cdot 10^5\ \Omega$ sowie $R_{m,o}$ zu $3{,}0 \cdot 10^6\ \Omega$ berechnet werden (siehe Tab. 4-4).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die in Kap. 4.5.2 vorgestellten Ansätze zur Datenanalyse prinzipiell geeignet sind, um die Membranparameter zu erfassen. Dabei konnte die Datenanpassung nach Ansatz 2 den Verlauf der Impedanzspektren etwas genauer wiedergeben. Dies impliziert jedoch nicht, dass dieses Modell korrekter ist als das nach Ansatz 1. So wurden nach Ansatz 2 in vier unabhängigen Präparationen spezifische Kapazitäten von $C_{m,sp}$ von 0,75 bis 1,80 $\mu\mathrm{F\ cm^{-2}}$ ermittelt. Wie diese unterscheiden sich auch die spezifischen Widerstände $R_{m,sp}$ mit $2{,}3 \cdot 10^3$ bis $6{,}9 \cdot 10^3\ \Omega\ \mathrm{cm^2}$ um den Faktor 2 - 3. Allerdings ist keine Korrelation zwischen der Größe der Kapazität und des Widerstands zu erkennen. So werden die unterschiedlichen Werte zum einen darauf zurückgeführt, dass zur Ermittlung der Parameter eine Reihe von flächenbezogenen Größen eingehen, ohne dass der Anteil der porösen Fläche jedes Substrats individuell ermittelt wird. Zum anderen könnten hemifusionierte Vesikel, deren kapazitiver Betrag nicht in Form einer zweiten Dispersion impedanzspektroskopisch aufgelöst wurde, zu einer Variation der Kapazität beitragen. Im Gegensatz zu Ansatz 2 liefert die vereinfachte Variante 2' keinen expliziten Wert $C_{m,sp}$, kann aber darüber hinaus den Gesamtwiderstand R_a des Systems direkt und genauer wiedergeben. Damit konnte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, den Widerstand der Lipidmembran auf Aluminaten mit selektiv geöffneten Porenböden mit den notwendigen Kenntnissen über das Impedanzverhalten des Aluminats nach einer einfachen Anpassungsroutine zu extrahieren. Dies ist dann von großem Interesse, wenn Widerstandsänderungen auf Grund der Aktivität von insertierten Ionenkanälen impedanzspektroskopisch untersucht werden.

4.6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals hochohmige porenüberspannende Membranen durch die Fusion von Vesikeln auf CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen erhalten, welche die Untersuchung der Aktivität von Ionenkanälen und Transportern erlaubten. Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht, lösungsmittelfreie Lipidmembranen durch Spreiten von Vesikeln auf porösen Substraten herzustellen. Dabei gelang es nicht, eine ausreichend hohe Belegung für eine isolierende Barriere zu erhalten, wenn die Poren durchgehend geöffnet waren (Lanzl, 2005; Römer, 2004). Impedanzspektroskopische und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an porösen Aluminaten mit unterliegender Aluminiumbarriere deuteten aber darauf hin, dass porenüberspannende Membranen prinzipiell durch das Spreiten von Vesikeln präpariert werden können (Drexler und Steinem, 2003; Hennesthal und Steinem, 2000; Steltenkamp et al., 2006).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Lipidmembranen konnten auf Grund ihrer elektrisch isolierenden Eigenschaften mittels Impedanzspektroskopie untersucht werden. Dabei wurden der Aufbau der porenüberspannenden Lipidmembranen detailliert verfolgt, sowie elektrische Modelle erstellt, die eine Analyse der Impedanzdaten erlauben. So konnten Eigenschaften wie die Stabilität der Membranen untersucht werden. Daneben gelang die Integration des Transmembranproteins OmpF in hoher Dichte. Die Charakterisierung der porenüberspannenden Membranen wurde durch fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen unterstützt.

4.6.1 Elektrische Modelle zur Beschreibung der Lipidmembranen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Ersatzschaltbildern zur Beschreibung der Impedanzdaten genutzt. Wie in Kap. 3.1 erläutert, basiert diese Art der Datenanpassung auf einem semiempirischen Ansatz, d. h., bereits bestehende Erkenntnisse über die zu untersuchenden Systeme flossen bei der Erstellung der Ersatzschaltbilder mit ein. Diese Methode ist weit verbreitet und vor allem dann bewährt, wenn die Impedanzspektren klar voneinander getrenntes kapazitives und resistives Verhalten zeigen, welches einzelnen Systemkomponenten zugeordnet werden kann. So wurden etwa die elektrischen Eigenschaften von festkörperunterstützten Membranen (Steinem et al., 1996) oder nano-BLMs (Römer und Steinem, 2004) ermittelt. Im Folgenden wird diskutiert, inwieweit

dieser Ansatz für die Anpassung der Daten von porenüberspannenden Membranen sinnvoll ist und gültige Informationen zu einzelnen Systemkomponenten liefert.

Im Zuge der Modellierung der Impedanzspektren von porenüberspannenden Membranen, in denen zwei Dispersionen, d. h. zwei Komponenten mit unterschiedlichen Zeitkonstanten erfasst wurden (Abb. 4-10, Abb. 4-12), erwies sich diese Methode als schwierig, da nach Fletcher (1994) prinzipiell drei mögliche, entartete Modelle zur Verfügung stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Anpassung der Daten die Variante aus zwei Parallelschaltungen, bestehend aus einem Widerstand *R* und einem Kondensator *C* (*RC*-Glied), in Serie zueinander gewählt. Nach dem postulierten Modell von hemifusionierten Vesikeln während des Membranaufbaus beschreiben die beiden *RC*-Glieder die elektrischen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht der porenüberspannenden Membran und der Vesikel (Abb. 4-12). Der wässrige Vesikelinhalt ist dabei nicht berücksichtigt worden. Es ist aber durchaus denkbar, dass die Summe vieler Vesikelinhalte, ähnlich wie das wässrige Reservoir von *tethered membranes* (*t*-BLMs), einen endlichen Widerstand besitzt, der größer als der Elektrolytwiderstand ist. Krishna et al. (2003) zeigten, dass der Widerstand der Elektrolytlösung innerhalb eines ionischen Reservoirs stark erhöht, aber dennoch endlich ist, so dass er bei der elektrischen Betrachtung des Systems theoretisch nicht vernachlässigt werden kann. Damit werden Ersatzschaltbilder mit sehr vielen Elementen erhalten, deren Verwendung zur Datenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate dahingehend schwierig wird, dass die Summe der Fehlerquadrate mehrere Minima besitzt und somit verschiedene Lösungen möglich sind. Dies war auch bei der Datenanpassung an Impedanzspektren von porenüberspannenden Membranen auf Aluminaten mit partieller Porenstruktur der Fall. Erst durch die Einführung von Annahmen, wie etwa gleicher elektrischer Eigenschaften der Membranen auf offenen und geschlossenen Poren, konnten für die Lipiddoppelschichten sinnvolle Kapazitäts- und Widerstandswerte erhalten werden. Ist allein der Wert des Gesamtwiderstands von Interesse, so kann die Impedanz, wie in dieser Arbeit erfolgt, durch eine Grenzwertbetrachtung für sehr kleine Frequenzen vereinfacht formuliert werden. Die exakte Ermittlung des Gesamtwiderstands erfolgt aber auf Kosten einer ungenauen Bestimmung des kapazitiven Verhaltens der Lipidmembranen, da der kapazitive Beitrag des Barriereoxids der geschlossenen Porenböden sowie der Lipidmembranen auf den offenen und geschlossenen Poren in einem Element (*constant phase element*, CPE) zusammengefasst wurden (Abb. 4-19).

Wiegand et al. (2002) zeigten ebenfalls, dass bei der Anpassung von Impedanzspektren nicht alle Parameter mit gleicher Genauigkeit bestimmt werden können. Zur Modellierung von Impedanzdaten mit zwei erkennbaren Dispersionen wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Die Güte der Anpassungen wurde durch einen Vergleich der Residuen ermittelt. Der erste basierte, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, auf einem einfachen Ersatzschaltkreis aus zwei *RC*-Gliedern, wobei die Residuen der Anpassung über den gesamten Frequenzbereich relativ groß waren. Deshalb wurde für einen zweiten Ansatz angenommen, dass die elektrischen Eigenschaften der vertikal aufeinanderfolgenden, molekularen Regionen einer Lipiddoppelschicht zu einer Frequenzdispersion führen. Unter Berücksichtigung von Stern-Schichten auf beiden Seiten der Kopfgruppenregion kann eine Lipiddoppelschicht so durch sechs *RC*-Glieder modelliert werden. Unter Verwendung dieses Ansatzes wurden weitaus geringere Residuen erhalten, jedoch war eine Zuordnung der sechs verschiedenen Zeitkonstanten (*RC*) zu systemspezifischen Komponenten uneindeutig. Deshalb wurde in einer dritten Variante ein Ansatz gewählt, in dem die Impedanz mit einer Verteilung von Zeitkonstanten formuliert wurde, die nach Fuoss und Kirkwood (1941) einer Gaussschen Verteilung folgen. Damit wurden im Zuge der Anpassung wesentlich kleinere Residuen erhalten als mit dem ersten, einfachen Modell. Die Zeitkonstante, bei der die Gaussverteilung maximal wird, wurde der Lipiddoppelschicht zugewiesen und erlaubte eine Berechnung von Membranwiderstand und –kapazität. Hinsichtlich der porenüberspannenden Membranen könnte diese Art der Datenanpassung eine Möglichkeit sein, Spektren mit mehr als einer Zeitkonstante auszuwerten.

4.6.2 Aufbau von Lipidmembranen basierend auf CPEO3-funktionalisierten Substraten

Während im vorangegangenen Kapitel die Frage nach der Wahl eines Modells zur Datenanpassung diskutiert wurde, werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse zum Aufbau der Membranen auf Gold bzw. auf porösem Aluminat erörtert. Die impedanzspektroskopischen Untersuchungen zum Verhalten des *Spacer*-Lipids CPEO3 sowie zum darauf basierenden Aufbau von Lipiddoppelschichten auf Gold und auf porösem Aluminat können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die CPEO3-Monoschichten zeigen nach Verbleib in wässriger Lösung unter Abnahme der Grenzschichtkapazität zunehmend idealeres kapazitives Verhalten.

- Die Zeit zum Aufbau von Lipiddoppelschichten variiert in Abhängigkeit vom gewählten Substrat. Während Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit durchgehender Siebstruktur bis zu 30 h nach Präparationsbeginn erst vollständig ausgebildet sind, werden diese auf Substraten mit partieller Siebstruktur nach etwa 3 h, auf festkörperunterstützten Membranen innerhalb weniger Minuten erhalten.

- Die Defektstellen porenüberspannender Membranen können durch Zugabe von Liposomen aufgefüllt werden, wodurch der Widerstand der Membranen steigt.

Während die in dieser Arbeit etablierten porenüberspannenden Membranen ein neuartiges Membransystem sind, welches in dieser Weise in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, sind einzelne Komponenten des Systems, wie etwa das *Spacer*-Lipid CPEO3 sowie die Fusion von Vesikeln auf CPEO3-funktionalisierten Oberflächen bereits untersucht worden (Jeuken et al., 2007; Williams et al., 1997). So werden im Folgenden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse Arbeiten aus der Literatur gegenübergestellt, um die Eigenschaften von CPEO3 zu klären sowie mögliche Modelle zum Aufbau von porenüberspannenden Membranen aus Liposomen zu erstellen.

In impedanzspektroskopischen Messungen an CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen zeigte sich, dass die Kapazität dieser Schicht durch die Inkubation mit Elektrolytlösung zunehmend kleiner wird, welches bei gleichbleibender Elektrodenfläche und Dielektrizitätskonstante der Lipiddoppelschicht eine Zunahme der Schichtdicke vermuten lässt. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass in diesem Zuge die kapazitiven Eigenschaften idealer wurden. Ein Ansatz zur Interpretation der Impedanzdaten besteht darin, dass die CPEO3-Moleküle nach dem Austausch von *n*-Propanol mit einer Dielektrizitätskonstante ε_r von 18,1 gegen wässrige Elektrolytlösung mit ε_r von etwa 80 zunächst ungleichmäßig auf der Elektrodenfläche angeordnet sind. Naumann et al. (2003) konnten dieses Phänomen ebenfalls in einer Studie an Monoschichten des *Spacer*-Lipids Diphytanoylglyceroltetraethylenglycolthionsäureester (DPTL) mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) beobachten. DPTL besitzt neben zwei Phytanoylsäureketten einen Abstandhalter aus vier Ethylenoxyeinheiten sowie eine Disulfidgruppe,

womit die Moleküle an eine Goldoberfläche chemisorbieren. In der SPR-Studie, die eine Bestimmung der effektiven optischen Dicke der immobilisierten Grenzschicht erlaubt, wurde gezeigt, dass die Dicke der DPTL-Monoschicht durch die Überführung in Elektrolytlösung um etwa 1 nm zunahm und damit den aus der Molekülstruktur abgeleiteten Wert erreicht. Dies wurde auf die Eigenschaften des Polyethylenoxy-*Spacers* zurückgeführt, der in einem Medium mit höherer Dielektrizitätskonstante, wie etwa Wasser, eine Konformation einnimmt, die ein größeres Dipolmoment besitzt (Matsuura und Satawa, 1995). Im Fall der Kette aus Ethylenoxyeinheiten entspricht dies einer eher gestreckten Konformation. Es ist denkbar, dass die hydrophile Region der CPEO3-Moleküle nach Überführung aus einem Medium mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante ε_r (*n*-Propanol, s. o.) in ein Medium mit einem höheren Wert für ε_r (wässrige Elektrolytlösung, s. o.) ihre Konformation ändert, was zum Aufrichten sowie zu einer gleichmäßigeren Ausrichtung der CPEO3-Moleküle führt, wie in Abb. 4-24 schematisch dargestellt. Naumann et al. (2003) sprechen in diesem Zusammenhang von einem „Quellen“ der Monoschicht.

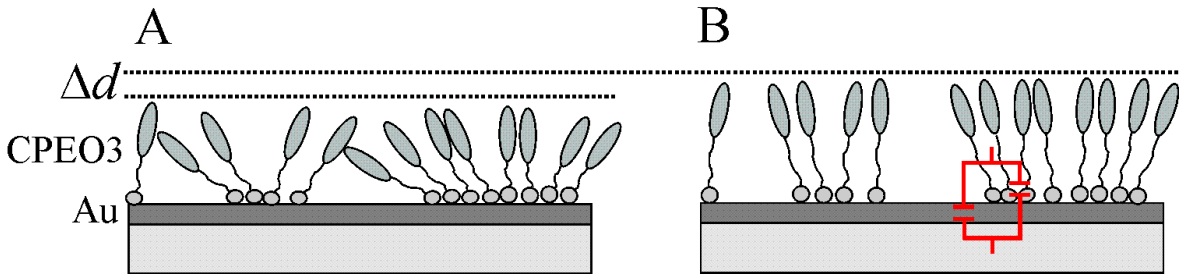


Abb. 4-24: Schematische Darstellung des Modells einer CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode **A** direkt nach Austausch der *n*-propanolischen 0,1 mM CPEO3-Lösung gegen Elektrolytlösung und **B** nach 1 h in Elektrolytlösung. Die Hilfslinien verdeutlichen den postulierten Unterschied der Schichtdicke *d*, das in rot dargestellte Netzwerk gibt die Kapazitäten der Goldelektrode C_{au} und der CPEO3-Schicht C_{CPEO3} an.

Die Tatsache, dass das kapazitive Verhalten einer CPEO3-Monoschicht selbst nach längerem Verbleib in Elektrolytlösung am besten mit einem *constant phase element* (CPE) beschrieben wird, zeigt nicht ideales kapazitives Verhalten an. Der Parameter α, der für einen idealen Kondensator 1 wird, gilt dabei als Maß für die Inhomogenitäten der Grenzschicht. Diao et al. (1999) zeigten, dass das kapazitive Verhalten einer Oktadekanthiolschicht auf Gold dann idealer wird, d. h., dass der Faktor α gegen 1 geht, wenn gleichzeitig cyclovoltammetrisch in Anwesenheit des Redoxpaares $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ weniger Defektstellen detektiert wurden. Ein Hinweis auf Defektstellen in den präparierten CPEO3-Monoschichten liefern auch Berechnungen zur Oberflächenbelegung des *Spacer*-

Lipids. Es wurde gezeigt, dass nur 92 % der maximal möglichen CPEO3-Belegung (Jenkins et al., 1998) erreicht wurden. Eine SPR-Studie an CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen zeigte, dass das Thiol bei maximal möglicher Belegung weniger als 65 % der zur Verfügung stehenden Goldoberfläche bedeckt (Williams et al., 1997). Welcher Anteil der Gesamtelektrodenfläche tatsächlich von CPEO3-Molekülen besetzt ist, kann abschließend nicht beantwortet werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaften der CPEO3-Schichten mittels Impedanzspektroskopie sehr sensitiv erfasst werden können.

Die impedanzspektroskopischen Messungen während der Fusion von Vesikeln zu Lipiddoppelschichten auf porösen Substraten zeigten, dass sich dieser Prozess über einen Zeitraum von mindestens zehn Stunden erstreckt. Dabei wurden Impedanzspektren mit zwei Dispersionen erhalten, wonach postuliert wurde, dass hemifusionierte Vesikel eine Zwischenstufe zur Ausbildung der Membranen darstellen (Abb. 4-12). Um zu erörtern, welche Faktoren für den erfolgreichen Aufbau von Lipidmembranen auf CPEO3-funktionalisiertem Gold bzw. porösem Aluminat durch die Fusion von Liposomen entscheidend sein könnten, werden folgende Problemstellungen formuliert:

1.) Welchen Einfluss hat der Belegungsgrad von CPEO3 und damit der hydrophobe Flächenanteil auf das Spreiten von Vesikeln zu Lipiddoppelschichten?

2.) Können bereits bestehende Lipiddoppelschichten die Ausbildung angrenzender Membranbereiche beschleunigen?

3.) Welchen Einfluss haben die geringen Mengen *n*-Dekan, die benötigt werden, um auf porösen Aluminaten hochohmige Membranen zu erhalten?

Zur Beantwortung der ersten Frage können eine Reihe von Studien herangezogen werden, in denen die Fusion von Vesikeln an Thiol-funktionalisierten Goldoberflächen behandelt wurde. Erbe et al. (2007) führten Untersuchungen an Goldelektroden mit unterschiedlich hoher CPEO3-Belegung durch, in denen impedanzspektroskopische Messungen mit der Fouriertransform-Infrarotspektroskopie (FTIR) in Form der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR) kombiniert wurden. Damit konnten die erzeugten Grenzschichten elektrochemisch sowie bezüglich der Ausrichtung der Moleküle charakterisiert

werden. Sie zeigten, dass erst dann nach Zugabe von Liposomen Lipiddoppelschichten erhalten wurden, wenn der Flächenanteil der maximal möglichen Belegung von CPEO3 (s. o.) größer als 65 % war. Dabei wurde nicht eine kritische Oberflächenbelegung mit Vesikeln als treibende Kraft zur Ausbildung einer isolierenden Membran angeführt, sondern der Energiegewinn durch die Überführung der hydrophoben Cholesterinreste vom wässrigen Medium in die hydrophobe Lipiddoppelschicht. Dies ist in Einklang mit früheren Arbeiten zur Ausbildung von Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Oberflächen, in denen berechnet wurde, dass der Energiebeitrag eines einzelnen fusionierenden Liposoms ausreicht, um den Prozess der Membranbildung anzutreiben (Cheng et al., 1998).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass der Membranbildungsprozess umso schneller abläuft und schließlich im Rahmen des Experiments zeitlich nicht mehr aufgelöst werden konnte, je höher der Anteil der Cholesterinreste in der Monoschicht war (Erbe et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Ausbildung von Lipiddoppelschichten innerhalb weniger Minuten auf den hydrophobisierten Goldelektroden könnte auf den hohen Belegungsgrad mit CPEO3 zurückzuführen sein. Dagegen besitzen die porösen Aluminate entsprechend der Stegfläche einen Anteil von maximal 71 %, der hydrophobisiert werden kann, wenn das untere Limit der Porösität von 33 % mit einem Fehler von ± 4 % angenommen wird (Römer und Steinem, 2004).

In einem zweiten Punkt wurde die Frage aufgeworfen, ob bereits vorhandene Lipiddoppelschichten ähnlich wie etwa bei Kristallisierungsvorgängen als Keimzellen wirken, welche die Ausbildung von angrenzenden Lipiddoppelschichten beschleunigen. Einen Hinweis darauf gab ein Impedanzexperiment, in dem durch Zugabe frischer Vesikelsuspension zu einer bereits mit Defektstellen behafteten porenüberspannenden Membran innerhalb von 4 h, und damit in sehr viel kürzerer Zeit, eine isolierende Schicht erhalten wurde als auf unbedeckten Substraten mit bis zu 30 h Präparationsdauer. Jenkins et al. (2002) präparierten mit der Methode des *microcontact printing* (Stempeltechnik) hydrophobe Monoschichten aus Oktanthiol in einem definierten Muster. Die verbliebenen Lücken wurden mit dem hydrophilen Thiol Mercaptoethanol aufgefüllt. So wurde eine heterogene Oberfläche erhalten, die, wie poröse Aluminate, definierte, hydrophobe Bereiche besitzt, die von hydrophilen Lücken unterbrochen sind. Nach der Zugabe von Vesikeln aus Ei-Phosphatidylcholin (Ei-PC) konnte in rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass im hydrophoben Teil eine nahezu lückenlose Hybriddoppelschicht, bestehend aus der Thiolschicht und einer Monolage Ei-PC, gebildet

wurde. Die hydrophilen Regionen waren dagegen hauptsächlich von Vesikeln bedeckt, nur in der Randregion zur Hybridschicht konnten Lipiddoppelschichten aus Ei-PC abgebildet und damit die Fusion der Vesikel nachgewiesen werden. Der Einfluss dieser Randregion wurde auch am elektrischen Verhalten des Systems deutlich. Mittels Impedanzspektroskopie wurde der Kapazitätswert der Grenzschicht bestimmt, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser umso mehr dem einer defektfreien Lipiddoppelschicht entspricht, je größer die Kantenlänge der Randregion war. Auch Okazaki et al. (2006) beobachteten an Mikrostrukturen aus polymerisierbaren Lipiden eine vermehrte Fusion von Vesikeln aus Ei-PC in der Randregion der immobilisierten Doppelschichten. Sowohl letztgenannte, als auch Jenkins et al. (2002) sprechen der Kante der Lipiddoppelschicht eine katalytische Funktion bei der Fusion von Vesikeln zu Lipiddoppelschichten auf hydrophilen Oberflächen zu. Dies könnte den beobachteten Effekt des Aufbaus isolierender Schichten an bereits bestehenden porenüberspannenden Membranen erklären (Abb. 4-14). Auch Substrate mit vorhandenem Barriereoxid besitzen eine solche Membrankante (Abb. 4-17), welche die Fusion von Vesikeln über der offenen Porenstruktur beschleunigen könnte. Damit könnten die deutlich kürzeren Präparationszeiten von porenüberspannenden Membranen unter Verwendung von Substraten mit partieller Siebstruktur begründet werden.

Als letztes wird diskutiert, inwiefern die sehr geringen Mengen an Lösungsmittel, die auf Grund der Applikationsart mittels eines Pinsels nur schwer quantifiziert werden können, Einfluss auf den Aufbau der porenüberspannenden Membranen nehmen. Die rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopischen Studien zur Fusion von GUVs auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium zeigten, dass porenüberspannende Membranen auch in Abwesenheit von organischem Lösungsmittel erhalten werden. Dem Lösungsmittel, das für impedanzspektroskopische Untersuchungen in der Region des Dichtrings aufgetragen wird, wird deshalb in erster Linie eine isolierende Funktion gegenüber Leckströmen zugewiesen. Die Tatsache, dass zur Präparation von hochohmigen Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit partieller Porenstruktur lediglich eine 1 %ige Emulsion von *n*-Dekan in Pufferlösung ausreichte, zeigt, dass das Barriereoxid in der Randregion Leckströme begrenzt. Darüber hinaus ist es denkbar, dass das organische Lösungsmittel eine gewisse Rolle bei der Fusion der Vesikel zu Lipiddoppelschichten spielt. Während die Doppelschichtstruktur der Vesikel zum Überspannen der Poren beibehalten wird, wird zur Ausbildung einer Doppelschicht auf den Stegen lediglich eine Monolage der Lipide benötigt. In diesem Prozess werden womöglich energetisch ungünstige Zwischenstufen

erhalten, bei denen die hydrophoben Fettsäureketten der Membranen die energetisch favorisierte Doppelschichtstruktur der Vesikel verlassen, bevor eine solche mit der CPEO3-Schicht eingegangen werden kann. Dies haben auch Lingler et al. (1997) aus impedanzspektroskopischen und cyclovoltammetrischen Untersuchungen zur Fusion von Vesikeln auf Alkanthiol-beschichteten Goldelektroden gefolgert. Bezüglich der Fusion von Liposomen auf den hydrophobisierten porösen Substraten ist es denkbar, dass durch die Anwesenheit der *n*-Dekan-Moleküle an den Stellen, wo Elektrolytlösung und Fettsäureketten miteinander in Kontakt kommen, ungünstige Wechselwirkungen begrenzt werden und die Ausbildung der Lipiddoppelschicht begünstigt wird. Auch die Fusion von zwei mit Hexadekan-dotierten Vesikeln im wässrigen Medium ist durch die Anwesenheit langkettiger Alkane erleichert, wie Malinin et al. (2002) in Versuchen zum sog. *content mixing* zeigen konnten. Sie schrieben den Alkanen eine entscheidende Rolle bei der Fusion der Doppelschichten durch Verminderung ungünstiger Zwischenstufen zu, in denen die hydrophoben Fettsäureketten in Kontakt zur wässrigen Phase treten.

Abschließend sei erwähnt, dass der Aufbau porenüberspannender Membranen durch weitaus mehr Faktoren als die in dieser Arbeit untersuchten beeinflusst werden könnte. So könnten unter anderem $CaCl_2$ und Polyethylenglykole, die als Fusogene bekannt sind, die Bildung einer Lipiddoppelschicht vorantreiben. In diesem Zusammenhang ist auch die Untersuchung des Einflusses von osmotischem Druck von Interesse (Malinin et al., 2002). Ferner könnte eine andere Lipidzusammensetzung Einfluss auf die Ausbildung der porenüberspannenden Membranen nehmen.

4.6.3 Eigenschaften der Lipidmembranen

Das neue artifizielle Membransystem wurde impedanzspektroskopisch bezüglich der spezifischen Membrankapazität und des Membranwiderstands untersucht. Des Weiteren wurden impedanzspektroskopische Versuche zur Stabilität der Membranen sowie zur Integration des Proteins OmpF durchgeführt. In rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten Erkenntnisse zur Mechanik sowie zur lateralen Mobilität der porenüberspannenden Membranen gewonnen werden. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- Es wurden Lipiddoppelschichten erhalten, deren spezifische Kapazität charakteristisch für lösungsmittelfreie Modellmembranen ist.

- Die porenüberspannenden Membranen zeichnen sich durch eine hohe Langzeitstabilität aus.

- Die porenüberspannenden Membranen besitzen einen hohen Grad an Elastizität und lateraler Mobilität.

- Die porenüberspannenden Membranen sind geeignet, das Protein OmpF in hoher Dichte zu integrieren.

Diese Ergebnisse werden im Folgenden mit bereits bekannten Modellmembranen verglichen, um das neuartige System der durch Vesikelfusion erhaltenen porenüberspannenden Membranen entsprechend einordnen zu können.

Durch die Fusion von Vesikeln auf porösen Aluminaten wurde angestrebt, lösungsmittelfreie Membranen zu erhalten. Deshalb wird zunächst der Einfluss von organischem Lösungsmittel auf die Eigenschaften der Lipiddoppelschichten diskutiert. Die spezifische Kapazität der porenüberspannenden Membranen mit einem Wert von $(0,5 \pm 0,1)$ µF cm^{-2} liegt in einem Bereich, der für lösungsmittelfreie, freistehende Membranen (BLMs) zu 0,5 – 1,0 µF cm^{-2} bestimmt wurde (Benz et al., 1975). Auch die Werte der in dieser Arbeit untersuchten festkörperunterstützten Membranen, basierend auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden, von 0,8 – 1,1 µF cm^{-2} stimmen gut mit der von Jenkins et al. (1998) angegebenen Kapazität von 0,85 µF cm^{-2} von Lipiddoppelschichten überein. Dies zeigt, dass durch die Methode der Fusion von Vesikeln auf CPEO3-funktionalisiertem Gold und goldbeschichtetem porösen Aluminat Grenzschichten erhalten wurden, deren spezifische Kapazität der von vergleichbaren Lipiddoppelschichten entspricht. Eine Gegenüberstellung mit den bereits detailliert charakterisierten, lösungsmittelhaltigen nano-BLMs zeigt, dass deren spezifische Kapazitäten in einem ähnlichen Bereich um 0,5 µF cm^{-2} liegen, während der Gesamtwiderstand der nano-BLMs um ein bis drei Größenordnungen größer ist (Schmitt et al., 2006). Daraus wird gefolgert, dass das durch die Fusion von Liposomen

erhaltene Membransystem Defektstellen, sprich, nicht vollständig von einer isolierenden Lipidschicht überspannte Bereiche besitzt. Dies bestätigten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an CPEO3-beschichtetem porösen Silizium. Porenüberspannende Membranen auf porösem Silizium, die nach der *painting*-Methode, also in Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels präpariert wurden (mikro-BLMs), hatten kaum Defektstellen (Daniela Weiskopf, unveröffentlichte Ergebnisse). Unterdessen sind nach der Fusion von *giant unilamellar vesicles* (GUVs) membranüberspannte Bereiche mehr oder weniger von unbedeckten Poren durchsetzt. Eine Erklärung für die hohe Oberflächenbelegung von mikro-BLMs könnte die Anwesenheit von Lösungsmittelresten sein, die membrandestabilisierende Faktoren wie Oberflächeninhomogenitäten oder lückenhaft ausgebildete CPEO3-Monoschichten ausgleichen sowie überschüssige Lipide lösen, die entstandene Membrandefekte mit Lipiddoppelschichten auffüllen können. Einen Hinweis darauf liefert eine Studie mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) an porenüberspannenden Membranen, die in An- und Abwesenheit von *n*-Dekan hergestellt wurden (Daniela Weiskopf, unveröffentlichte Ergebnisse). Es wurde gezeigt, dass die laterale Mobilität der lösungsmittelhaltigen Membranen mehr als doppelt so groß ist wie die der Membranen in Abwesenheit von *n*-Dekan. Diesen Effekt beobachteten auch Fahey et al. (1978) an BLMs, die mit bzw. ohne Zuhilfenahme eines organischen Lösungsmittels präpariert wurden. Dem organischen Lösungsmittel wird neben dem Einfluss auf die Ausbildung und die Mobilität der Membranen auch ein entscheidender Effekt bezüglich deren Langzeitstabilität zugeschrieben, wie im Folgenden beschrieben wird.

Die impedanzspektroskopischen Daten einer durch Fusion von Vesikeln erhaltenen, porenüberspannenden Membran auf porösen Aluminaten zeigten, dass deren Widerstand über einen Zeitraum von 300 h nur sehr langsam abfiel (Abb. 4-13). Dieser stetige Abfall ist nach fluoreszenzmikroskopischen Erkenntnissen an mikro-BLMs, präpariert auf Oktadekanthiol-funktionalisiertem porösen Silizium, bedingt durch das unabhängige Reißen von Membranen über einzelnen Poren (Weiskopf et al., 2007). Den Prozess des Reißens einzelner porenüberspannender Membranen konnten Böcker et al. (2009) an einem System mit äquivalenter Oberflächenfunktionalisierung und Lipidkomposition mit einem *scanning ion conductance microscope* (SICM) visualisieren. Offene und bedeckte Poren modifizieren dabei den Ionenstrom zwischen einer Elektrode, die in einer Messpipette von weniger als 50 nm Öffnungsdurchmesser platziert ist und einer in die Messlösung eintauchenden Gegenelektrode unterschiedlich stark und können so

differenziert werden. Ferner wurde in diesen Messungen beobachtet, dass die Stabilität der mikro-BLMs vom Porendurchmesser abhängt. Membranen auf porösem Silizium mit 450 nm großen Poren waren weitaus stabiler als die auf Substraten mit Poren von 800 nm Durchmesser. Dies konnte auch in impedanzspektroskopischen Messungen an Membranen auf Substraten unterschiedlicher Porengröße beobachtet werden. Der Membranwiderstand von mikro-BLMs über Poren einer Kantenlänge von 7 µm sank innerhalb von 9 h um zwei Größenordnungen (Weiskopf et al., 2007), während an porösen Aluminaten mit 60 bzw. 280 nm großen Poren erst nach 1,5 Tagen ein Abfall um eine Größenordnung beobachtet wurde (Römer und Steinem, 2004). Eine Untersuchung der Abhängigkeit der Stabilität der durch Vesikelfusion erhaltenen Membranen von der Porengröße des Substrats wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Es ist denkbar, dass das an lösungsmittelhaltigen Systemen gut charakterisierte unabhängige Reißen einzelner Membranen auch für die lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen gilt. Dennoch besteht bezüglich der Membranstabilität von lösungsmittelfrei präparierten porenüberspannenden Membranen zu dem System lösungsmittelhaltiger nano-BLMs auf ähnlichem Substrat ein Unterschied. An nano-BLMs konnten neben dem langsamen Abfall des Membranwiderstands Prozesse detektiert werden, bei denen dieser abrupt über mehrere Größenordnungen abfiel oder etwas anstieg. Im Gegensatz dazu wurde für das lösungsmittelfreie System stets ein langsamer Abfall und nie ein Wiederanstieg des Widerstands verzeichnet. Diese Beobachtung an nano-BLMs wurde auf den Einfluss von Lösungsmittelresten zurückgeführt, deren Dynamik das plötzliche Reißen oder das Ausheilen größerer Membranareale bewirken kann (Höfer, 2007; Schmitt, 2005). Der Prozess des Wiederverschließens konnte auch von Böcker et al. (2009) mit dem SICM visualisiert werden. Dabei wurde die Regeneration von bereits gerissenen, porenüberspannenden Membranen in Regionen mit größeren Mengen Restlösungsmittel vermehrt beobachtet. Womöglich erfolgt das Reißen einzelner porenüberspannender Membranen, die durch die Fusion von Liposomen lösungsmittelfrei gewonnen wurden, völlig unabhängig voneinander und erstreckt sich aus diesem Grund über einen längeren Zeitraum.

Die Stabilität von Membranen ist eng mit deren elastischen Eigenschaften verbunden (Needham und Nunn, 1990), die durch die Größe der apparenten lateralen Membranspannung quantifiziert werden können. Durch Kraft-Indentations-Experimente unter Verwendung des Rasterkraftmikroskops (AFM) konnte dieser Parameter an porenüberspannenden Membranen bestimmt werden (Ingo Mey, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine

weitere Größe, welche die mechanischen Eigenschaften von Membranen charakterisiert, ist die laterale Mobilität der Lipide. Informationen zur lateralen Mobilität von porenüberspannenden Membranen, d. h. Diffusionskonstanten und immobile Anteile der Lipide, wurden in einer FRAP-Studie erhalten. In einer gemeinsamen Betrachtung dieser Ergebnisse soll im Folgenden hervorgehoben werden, welchen Einfluss die Oberflächenfunktionalisierung der porösen Substrate auf die Eigenschaften von porenüberspannenden Membranen nehmen. Dabei wurden in der AFM-Studie lösungsmittelhaltige, in der FRAP-Studie dagegen lösungsmittelfreie Lipidmembranen verwendet. Da hier lediglich eine qualitative Betrachtung erfolgt, wird die Gegenüberstellung dieser sich ergänzenden Ergebnisse trotzdem vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Elastizität durch die Wahl des auf den Stegen immobilisierten Thiols, das die Membran auf dem Substrat verankert, entscheidend beeinflusst wird. Unter Verwendung von Oktanthiol, das eine dicht gepackte, kristalline Monoschicht auf Gold ausbildet (Poirier und Tarlov, 1994), wurden höhere laterale Spannungen ((21 ± 4) mN m^{-1}) ermittelt als für Membranen, die basierend auf einer CPEO3-Funktionalisierung präpariert wurden ((15 ± 3) mN m^{-1}). D. h., durch das *Spacer*-Lipid CPEO3 werden wesentlich flexiblere Membranen erhalten. Dieser Trend konnte auch in einer FRAP-Studie an porenüberspannenden Membranen auf vergleichbaren Substraten erkannt werden, die mit dem Thiolipid DPPTE bzw. CPEO3 funktionalisiert wurden (Daniela Weiskopf, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Lipide von porenüberspannenden Membranen basierend auf DPPTE, das über seine Thioethanolkopfgruppe auf dem goldbeschichteten Substrat fixiert ist, sind mit einem effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} von $(2{,}4 \pm 1{,}0)$ µm^2 s^{-1} und einem immobilen Anteil von (51 ± 3) % weitaus weniger mobil als die auf CPEO3-Basis aufgebauten mit einem effektiven Diffusionskoeffizienten von $(4{,}0 \pm 1{,}3)$ µm^2 s^{-1} und einem immobilen Anteil von (30 ± 4) %.

Eine Erklärung für die höhere Mobilität der porenüberspannenden Membranen auf Basis von CPEO3 liefern die unter Kap 4.6.1 diskutierten impedanzspektroskopischen Untersuchungen an CPEO3-Monoschichten auf Gold. Es zeigte sich, dass diese Grenzschichten, im Gegensatz zu sehr dicht gepackten Alkanthiolmonoschichten, mit Lücken behaftet und weniger kompakt sind. Dies könnte dazu führen, dass die untere Monolage im Fall von CPEO3 neben dessen Cholesterinrest auch aus einem mobilen Anteil von Lipiden aufgebaut ist, wodurch die Membran weniger starr wird. Zudem kann die untere Monoschicht als Lipidreservoir dienen, woraus bei Kraft-Indentations-Experimenten

während des Eindrückens der Membran Lipide „nachfließen“ können. Danach könnten die Lipide der unteren Monolage lateral diffundieren, welches in einem immobilen Anteil von weniger als 50 % resultieren würde. Dies wird durch die oben beschriebenen Ergebnisse der FRAP-Studie gestützt. Des Weiteren wurde dem CPEO3 eine Abstandshalterfunktion zugewiesen, wodurch die Membran auf den Stegen nicht direkt auf dem porösen Substrat verankert ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse an in Abwesenheit von Ca^{2+} präparierten porenüberspannenden Membranen mit einem effektiven Diffusionskoeffizienten von (7,6 ± 1,1) $\mu m^2 s^{-1}$ und einem immobilen Anteil von (13 ± 6) % können den oben erläuterten Ergebnissen von Weiskopf (unveröffentlicht) gegenübergestellt werden, da diese bei gleicher Lipidkomposition und Oberflächenfunktionalisierung erhalten wurden. Es zeigt sich, dass sich die Diffusionskoeffizienten und der immobile Anteil um einen Faktor von zwei unterscheiden. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Weiskopf Membranen in Anwesenheit von Ca^{2+} hergestellt hat, welches die Mobilität der Lipide durch elektrostatische Wechselwirkungen einschränken könnte. Gegenüber anderen etablierten artifiziellen Membransystemen zeichnen sich die in dieser Arbeit erhaltenen porenüberspannenden Membranen durch eine vergleichweise hohe laterale Mobilität aus. Ladha et al. (1996) erhielten an lösungsmittelfreien BLMs in Abhängigkeit von der Lipidkomposition Werte um 13 $\mu m^2 s^{-1}$. Dagegen wurde für festkörperunterstützte Membranen auf Glas, die in der vorliegenden Arbeit als Vergleichssystem untersucht wurden, ein Diffusionskoeffizient von (4,1 ± 0,8) $\mu m^2 s^{-1}$ ermittelt, der damit unter dem von porenüberspannenden Membranen liegt.

Abschließend werden die Ergebnisse zur Integration des Proteins OmpF anhand von Erkenntnissen aus anderen Membransystemen diskutiert. Vorab konnte an einer porenüberspannenden Membran gezeigt werden, dass mit einer Steigerung der Elektrolytkonzentration um einen Faktor von 10 die Leitfähigkeit der Membran nur um 0,13 µS erhöht wird (Abb. 4-15). Das beweist die elektrische Dichtigkeit der Lipidmembranen, welches eine Vorraussetzung für die Untersuchung von Ionenkanälen ist. Nach Zugabe einer Lösung von OmpF, solubilisiert mit dem Detergenz Octylpolyoxyethylen (*o*-POE), zu einer porenüberspannenden Membran wurden etwa 10^6 Proteinmoleküle eingebaut, welches eine Beobachtung ihrer Kanalaktivität auf makroskopischer Ebene erlaubt. Eine Spezifizierung in Form einer Blockade der Kanäle durch Ampicillin ist nicht gelungen. Nestorovich et al. (2002) zeigten auf Einzelkanalebene, dass die Leitfähigkeit von OmpF durch Ampicillin

für wenige Millisekunden blockiert wird, wobei die daraus resultierende Stromantwort als „Flickern“ bezeichnet wird. Eine vollständige Blockade wird dabei jedoch nicht erreicht. Danach ist zu erwarten, dass durch die Wechselwirkung von OmpF mit Ampicillin die mittlere Leitfähigkeit der porenüberspannenden Membran reduziert wird. Im Vergleich dazu wurden in nano-BLMs nur wenige Moleküle OmpF integriert und auf Einzelkanalebene nachgewiesen (Schmitt et al., 2006), was unter anderem damit zu erklären ist, dass die Endkonzentration von OmpF in der Messkammer im letzteren Fall ein bis drei Größenordnungen geringer war. Es ist nicht anzunehmen, dass die höheren OmpF-Konzentrationen in den Experimenten an lösungsmittelfreien, porenüberspannenden Membranen die hohe Insertionsrate bedingen. Womöglich ist die Insertionseffizienz an dem durch Fusion von Liposomen erhaltenen Membransystem größer als für nano-BLMs. Ein Hinweis auf eine erhöhte Sensitivität dieser Membranen zeigt der Einfluss des Detergenz *o*-POE, nach dessen Zugabe die Permeabilität der untersuchten porenüberspannenden Membran mit einer Leitfähigkeitsänderung von 0,26 mS deutlich erhöht wurde (Abb. 4-16). Die Konzentration des Detergenz lag mehrere Größenordnungen unter der kritischen Mizellkonzentration (*critical micellar concentration*, cmc), wodurch die Lipide nicht solubilisiert wurden und die Permeabilisierung der Membran reversibel war. In Arbeiten zu OmpF an nano-BLMs wurden keine Membranpermeabilisierungen in der oben angegebenen Größenordnung beobachtet. Eine Einzelkanalstudie bei ähnlichen *o*-POE-Konzentrationen an nano-BLMs zeigte jedoch Leitfähigkeitsereignisse im Bereich von 20 - 400 pS mit einer Länge von (1,60 ± 0,01) ms (Grottker, 2007). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Detergenzien weit unterhalb der cmc in Lipidmembranen partitionieren und diese permeabilisieren, wie auch in Studien an Vesikeln beschrieben (Lasch, 1995; Ollila und Slotte, 2002). Dennoch ist zu erkennen, dass die Modifizierung der resistiven Membraneigenschaften der nano-BLMs gegenüber den lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen dabei stets moderat war. Möglicherweise kann sich *o*-POE in Resten des zur Präparation der nano-BLMs verwendeten *n*-Dekans lösen, wodurch es seine permeabilisierenden Eigenschaften verliert. Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen zur Membranpermeabilisierung durch *o*-POE wird geschlossen, dass die lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen eine hohe Effizienz bezüglich der Integration von membranlöslichen Molekülen wie Transmembranproteinen oder amphiphilen Verbindungen besitzten. Dies wurde auch in Untersuchungen zum membranlöslichen Protonencarrier CCCP deutlich, was in Kap. 6 ausführlich behandelt wird.

5 Funktionalität von Gramicidin D in den Modellmembranen

Die Strategie zum Aufbau der in dieser Arbeit etablierten Modellmembranen beinhaltete, dass Lipiddoppelschichten durch das Spreiten von Vesikeln lösungsmittelfrei hergestellt werden. Dabei liegt das Potential dieser Herangehensweise darin, dass unter Verwendung von Proteoliposomen Lipidmembranen mit hoher Ionenkanaldichte erhalten werden können. Zu diesem Zweck wurde Gramicidin D als Modellkanal gewählt, da dieses Peptid hinsichtlich seiner Kanalaktivität wie etwa der Selektivität für monovalente Kationen detailliert beschrieben wurde. Mittels Impedanzspektroskopie kann die Ionenkanalaktivität einer Vielzahl von Kanälen auf makroskopischer Ebene elektrochemisch erfasst werden.

Im folgenden Kapitel wird zunächst die funktionelle Rekonstitution von Gramicidin D in Liposomen erläutert. Danach wird die Kanalaktivität von Gramicidin D in porenüberspannenden Membranen hinsichtlich monovalenter und divalenter Kationen gezeigt und mittels eines dafür entwickelten elektrischen Modells quantifiziert. In einem letzten Abschnitt werden Diffusionsprozesse an Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membranen genauer beleuchtet.

5.1 CD-spektroskopische Untersuchungen an Gramicidin D-dotierten Vesikeln

Um einen Ionenfluss über Lipiddoppelschichten zu ermöglichen, muss Gramicidin in Form von Dimeren vorliegen, wobei die helikalen Peptide, die an den formylierten N-terminalen Enden über Wasserstoffbrücken verknüpft sind, in der Membranebene zu liegen kommen (Katsaras et al., 1992). Neben dieser Kanalform kann eine weitere Anordnung vorkommen, in der die β-Helices antiparallel umeinander gewunden sind und dabei die sog. Nicht-Kanalform ausbilden. Beide Formen existieren sowohl in Lösung als auch in Lipidmembranen (Wallace et al., 1981). Zur Rekonstitution von Gramicidin in Vesikel nach der Extrusionsmethode (Kap. 3.5.8.1) wird das Peptid zusammen mit den Lipiden zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst, welches die Konformation maßgeblich beeinflusst (LoGrasso et al., 1988). In dieser Arbeit wurde zur Solubilisierung von Lipiden und Peptid Trifluorethanol verwendet, in dem Gramicidin nach den Erkenntnissen

von LoGrasso et al. (1988) weitestgehend seine Kanalform behält. Nach Präparation der Vesikel wurde CD-spektroskopisch ermittelt, in welcher Form Gramicidin in die Lipiddoppelschicht eingebaut wurde.

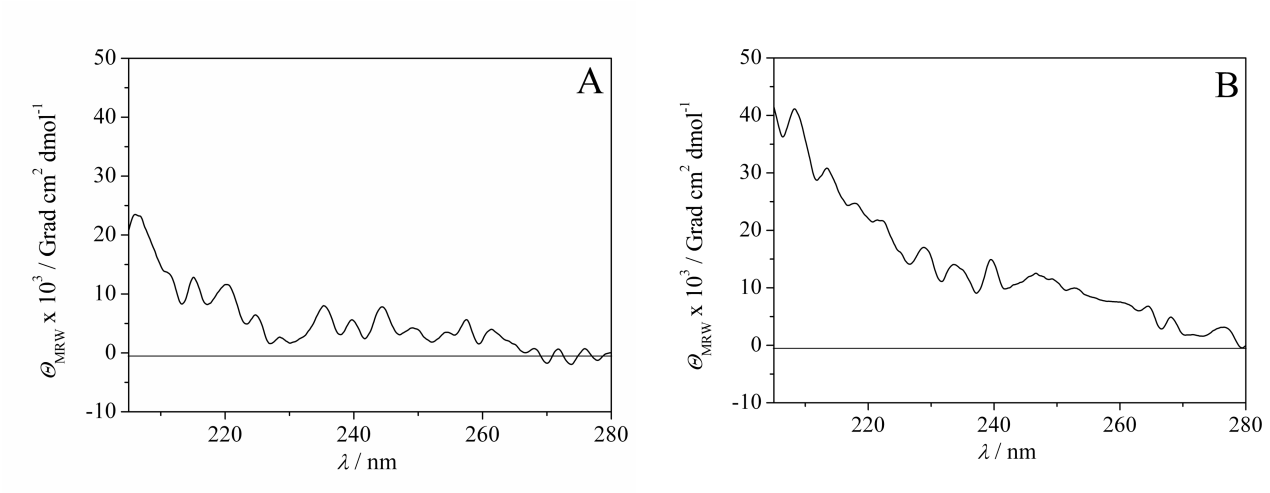


Abb. 5-1: CD-Spektren einer Vesikelsuspension von **A** DPhPC/DOPC 6:4 und **B** DPhPC in Reinstwasser mit einer Lipidkonzentration von 0,3 mg/ml. Die Vesikel sind mit 1 mol % Gramicidin D dotiert. Von den gezeigten Spektren wurde das Spektrum einer Suspension von Vesikeln ohne Gramicidin subtrahiert.

Wie in Kap. 4 erläutert, wurden zum Aufbau von porenüberspannenden und festkörperunterstützten Membranen Vesikel bestehend aus einer Mischung von DPhPC und DOPC in einem molaren Verhältnis von 6:4 verwendet. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese Lipidkomposition nicht geeignet ist, um Gramicidin D in seiner ionenleitenden Form in die Liposomen zu rekonstituieren. Das CD-Spektrum in Abb. 5-1 A zeigt weder die für die Kanalform charakteristischen Maxima bei 217 und 237 nm noch eine negative Elliptizität bei 229 nm, wie es für Gramicidin in seiner nichtleitfähigen Konformation typisch ist (LoGrasso et al., 1988). Bei dem Vesuch, Gramicidin D in reine DPhPC-Vesikel zu rekonstituieren, wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt (Abb. 5-1 B).

Dagegen erwies sich DOPC als geeignetes Matrixlipid, um das Peptid in seiner Kanalform in Vesikel einzubringen. Wie in Abb. 5-2 zu sehen, sind bei einem Gramicidin D-Gehalt von 1 bzw. 3 mol % die für die ionenleitende Struktur typischen Maxima bei 219 nm und 236 nm deutlich zu erkennen.

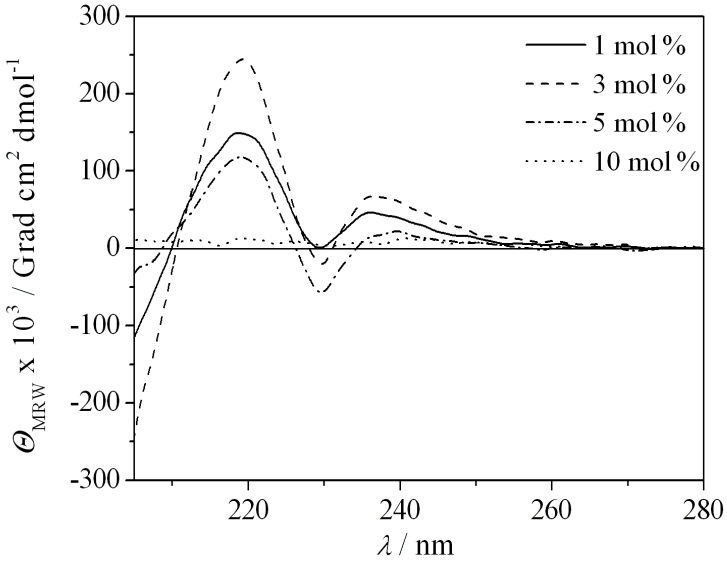


Abb. 5-2: CD-Spektren einer Suspensionen von DOPC-Vesikeln in Reinstwasser mit variierendem Gramicidin D-Gehalt (1, 3, 5 und 10 mol %). Von den gezeigten Spektren wurde das Spektrum einer Gramicidin D-freien Vesikelsuspension abgezogen.

Eine genauere Betrachtung der Elliptizität bei diesen Wellenlängen zeigt, dass durch die Änderung der Gramicidin D-Konzentration von 1 auf 3 mol % die Anzahl der Gramicidin D-Moleküle in der Kanalform bei gleichzeitigem Auftreten der Nicht-Kanalform erhöht wurde. Eine weitere Steigerung des Gramicidin D-Gehalts bewirkte eine Zunahme der Nicht-Kanalform, wie an dem deutlich hervortretenden Minimum bei 230 nm der Kurve bei einem Peptidanteil von 5 mol % zu erkennen ist. Die Elliptizität bei den für die Kanalform charakteristischen Maxima dagegen ist bei 5 mol % Gramicidin D gegenüber einem Gehalt von 3 mol % geringer, was auf einen kleineren Anteil der ionenleitenden Konformation in den Vesikeln hindeutet. Bei 10 mol % Gramicidin D konnten keine Vesikel mehr gebildet werden, was an der fehlenden Trübung der Lösung zu erkennen war. Aus dem Anstieg der Elliptizität bei 1 und 3 mol % Gramicidin D wird geschlossen, dass das Peptid in diesem Konzentrationsbereich vollständig und funktional rekonstituiert wurde, wobei mit der Erhöhung der Peptidkonzentration eine Zunahme der Nicht-Kanalform erfolgt. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit mit DOPC-Vesikeln gearbeitet, welche mit 2 mol % Gramicidin D dotiert waren.

5.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen zur Kanalaktivität in porenüberspannenden Lipidmembranen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Verwendung Gramicidin D-dotierter Vesikel zum Aufbau von porenüberspannenden Membranen gezeigt werden, dass auf diese Weise eine hohe Ionenkanaldichte in das System eingebracht werden kann. Die Strategie war, zunächst durch Fusion von Vesikeln aus DPhPC und DOPC 6:4 auf porösen Aluminaten mit partieller Porenstruktur eine Membran aufzubauen, die dann als Matrix für die Fusion der peptidhaltigen Vesikel zur Verfügung steht. Diese Herangehensweise wurde verfolgt, da durch die Fusion der Gramicidin D-haltigen Vesikel allein lediglich das Lipid DOPC die Lipidmembran ausbildet. Wie bereits in Kap. 4.4.3.3 sowie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte (Kratzke, 2008), trägt DPhPC jedoch maßgeblich zur Stabilität von Membranen auf porösen Strukturen bei.

5.2.1 Elektrisches Modell einer ionenkanalhaltigen porenüberspannenden Membran

Wie einleitend erwähnt, wurden Gramicidin D-haltige Lipidmembranen auf porösen Aluminaten mit partieller Porenstruktur präpariert. Auf Grund dessen muss zur Auswertung der Impedanzdaten ein Modell gewählt werden, das die elektrischen Eigenschaften des vorhandenen Barriereoxids berücksichtigt. In Kap. 4.5.2 wurden dazu unterschiedliche Ansätze vorgeschlagen und geprüft. Dabei konnte ein Ansatz (Ansatz 2') erarbeitet werden, der die Ohmschen Eigenschaften des Systems in einem Gesamtwiderstand R_a zusammenfasst. Nachträglich können daraus mit dem bekannten Oxidwiderstand R_{ox} die Widerstände der Membranen über den offenen und geschlossenen Porenböden, $R_{m,o}$ und $R_{m,c}$, ermittelt werden (Gl. 4-5). Dieser Ansatz wurde mit der Intention entwickelt, die durch Ionenkanalaktivität induzierten Änderungen in R_a unter Verwendung eines einfachen Ersatzschaltkreises ermitteln zu können. Das dafür erstellte Netzwerk (Abb. 4-20) wurde zur Auswertung von Impedanzspektren, die in Anwesenheit von aktiven Ionenkanälen erhalten wurden, um den Parameter des Konzentrationswiderstands Z_W erweitert (Abb. 5-3 B). Abb. 5-3 A zeigt bespielhaft das Impedanzspektrum einer porenüberspannenden Membran mit aktiven Gramicidin D-Kanälen als Nyquist-Plot.

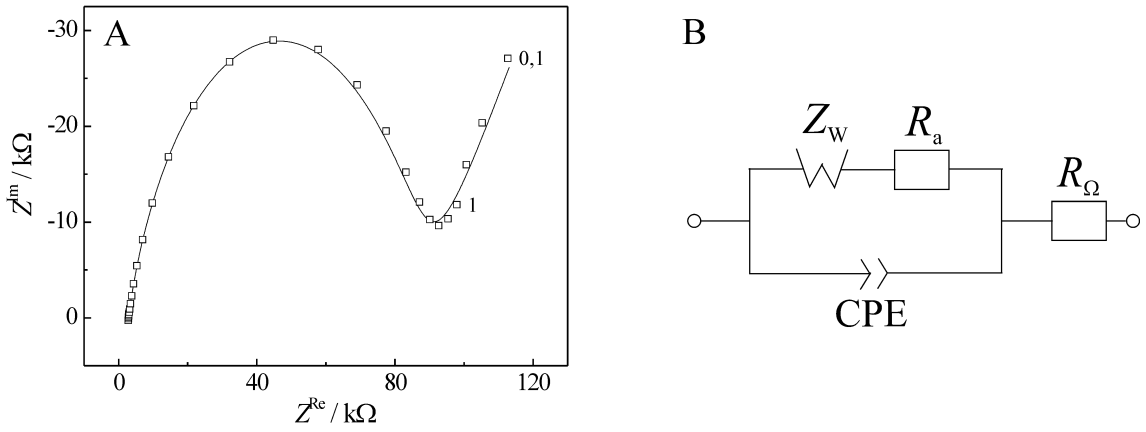


Abb. 5-3: A Impedanzspektrum einer porenüberspannenden Membran auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) aus DPhPC/DOPC 6:4 nach Inkubation mit Gramicidin D-haltigen (2 mol %) DOPC-Vesikeln über Nacht. Puffer: 2,5 mM NaCl, 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6. Die Kurvenanpassung (—) basiert auf dem in **B** gezeigten Ersatzschaltkreis unter erhalt folgender Werte: $R_\Omega = 2800\ \Omega$, $R_a = 85\ k\Omega$, $A = 8{,}5 \cdot 10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}76$, $\sigma_W = 14{,}8\ k\Omega\ s^{-0{,}5}$. Die Zahlen markieren die Frequenz des entsprechenden Datenpunkts. **B** Ersatzschaltkreis zur Beschreibung von Impedanzspektren Gramicidin D-haltiger porenüberspannender Membranen in Anwesenheit von Alkalikationen. R_Ω: Elektrolytwiderstand, R_a: Gesamtwiderstand, Z_W: Konzentrationswiderstand, CPE: *constant phase element*.

Der Konzentrationswiderstand oder die Warburgimpedanz Z_W berücksichtigt ein Impedanzverhalten, das immer dann beobachtet wird, wenn der Transport von Ionen über eine Grenzfläche durch die Diffusion zu dieser begrenzt wird. In Abb. 5-3 A ist dieses Verhalten am Verlauf der Datenpunkte bei kleinen Frequenzen zu erkennen, der mit der reellen Achse einen Winkel von 45° einschießt. Unter semiinfiniten Diffusionsbedingungen ist Z_W wie folgt von der Frequenz ω der angelegten Wechselspannung abhängig (Gl. 5-1).

$$Z_w = \frac{\sigma_W}{\sqrt{\omega}}(1 - i) \tag{5-1}$$

Dabei beschreibt der Parameter σ_W mit der Einheit $\Omega\ s^{-0{,}5}$ den Konzentrationswiderstand. Der Übertritt der Ionen von der wässrigen Phase in die Lipidphase erfolgt gegen den sog. Phasentransfer-Widerstand R_{pt}, der in den Gesamtwiderstand R_a miteinfließt und deshalb nicht in das Ersatzschaltbild aufgenommen wurde.

Während der Parameter Z_W die Diffusion in der wässrigen Lösung beschreibt, bewirkt der Transport von Ionen über die Grenzfläche und in der Membran eine Leitfähigkeitsän-

derung, die anhand des Parameters R_a quantifiziert werden kann. Prinzipiell ist es denkbar, dass Beiträge von aktiven Ionenkanälen in den Membranen auf den offenen wie auf den geschlossenen Poren eine Änderung des Gesamtwiderstands verursachen. Eine Unterscheidung dieser Beiträge kann mit dem elektrischen Modell nach Ansatz 2' allerdings nicht erfolgen. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde der Einfluss des an den geschlossenen Porenböden vorliegenden Barriereoxids auf die Impedanz des Systems beleuchtet. Zu diesem Zweck wurde der Grenzfall des Zusammenhangs von R_a mit den Ohmschen Widerständen des Barriereoxids R_{ox} sowie der Membranen über den offenen ($R_{m,o}$) und geschlossenen Poren ($R_{m,c}$) für sehr große Werte von R_{ox} betrachtet (Gl. 5-2).

$$\lim_{R_{ox}\to\infty} R_{m,o} \frac{R_{m,c} + R_{ox}}{R_{m,c} + R_{ox} + R_{m,o}} = R_{m,o} \tag{5-2}$$

Anhand dieser Grenzwertbetrachtung wird deutlich, dass der Parameter R_a dann dem Widerstand $R_{m,o}$ gleichgesetzt werden kann, wenn das Oxid der Porenböden einen sehr hohen Widerstand aufweist. D. h., R_{ox} wirkt dann wie ein Isolator, so dass der Strom hauptsächlich über die porenüberspannende Membran fließt, deren Eigenschaften dann den Gesamtwiderstand bestimmen. Für diesen Grenzfall werden die auf dem Barriereoxid vorliegenden Membranen mit dem Widerstand $R_{m,c}$ und somit die Aktivität von darin integrierten Ionenkanälen nicht erfasst.

5.2.2 Einfluss von Alkalikationen

Nach Fusion Gramicidin D-haltiger Liposomen auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat mit partiell geöffneten Poren, auf dem bereits eine Lipidmembran aus DPhPC und DOPC ausgebildet worden ist, wurde die Funktionalität der Ionenkanäle in den porenüberspannenden Membranen in einer Studie zur Selektivität für Li^+, Na^+ und K^+ untersucht. Da die Ionenkanaldichte in jeder Präparation unterschiedlich hoch ist, konnten Ergebnisse zu den drei Kationen nur dann untereinander verglichen werden, wenn sie an einer Präparation erhalten wurden. Zur Durchführung dieser Studien wurde eine Gramicidin D-dotierte porenüberspannende Membran in Abwesenheit sowie in Gegenwart von LiCl, NaCl und KCl untersucht, wobei die Salze ausschließlich von der Membranoberseite appliziert wurden.

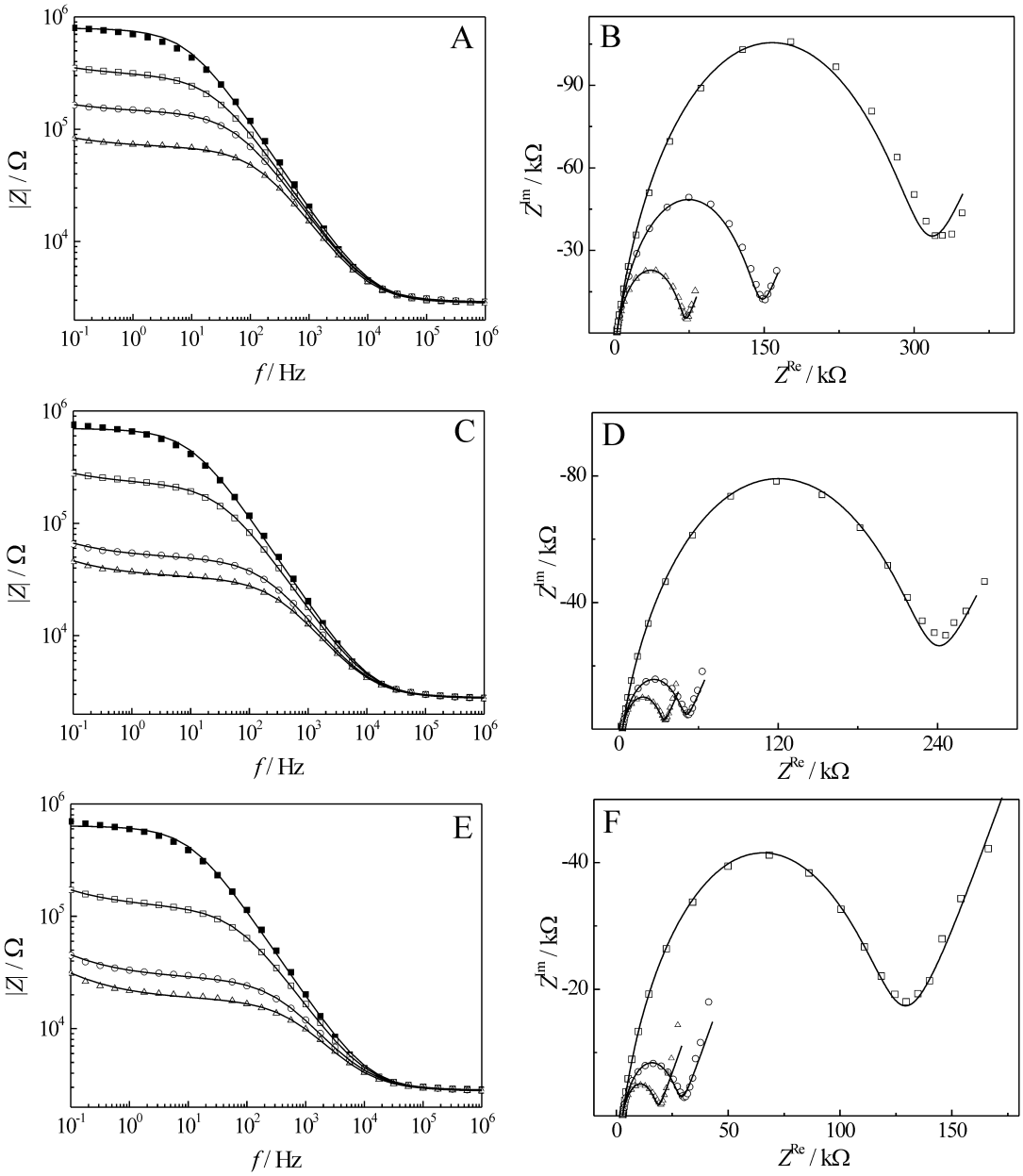


Abb. 5-4: Impedanzspektren einer porenüberspannenden Membran auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) aus DPhPC/DOPC 6:4 nach Inkubation mit Gramicidin D-haltigen (2 mol %) DOPC-Vesikeln über Nacht in Bode-Darstellung (linke Spalte) und als Nyquist-Plot (rechte Spalte) bei (■) 0 mM, (□) 1 mM, (○) 5 mM und (Δ) 10 mM des jeweiligen Alkalisalzes in 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6. **A** und **B**: LiCl. **C** und **D**: NaCl. **E** und **F**: KCl. Die Kurvenanpassung (—) basierte in Abwesenheit von monovalenten Kationen auf einem *RR*CPE-Kreis mit folgendem Ergebnis: $R_\Omega = 2{,}7\cdot10^3\ \Omega$, **A/B**: $A = 5{,}12\cdot10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}79$, $\omega_{max}'' = 58{,}6$ Hz; **C/D**: $A = 5{,}28\cdot10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}79$, $\omega_{max}'' = 63{,}2$ Hz; **E/F**: $A = 5{,}55\cdot10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}79$, $\omega_{max}'' = 70{,}7$ Hz. In Gegenwart der Alkalisalze basierte die Anpassung auf einem *RR*CPEZ_W-Kreis. Die Werte sind in Tab. 5-1 angegeben.

Nach der impedanzspektroskopischen Untersuchung einer Ionensorte bei fünf verschiedenen Konzentrationen wurde die Lösung mehrmals gegen alkalikationenfreien Puffer ausgetauscht, um die monovalenten Kationen vollständig aus der Probe zu entfernen. Dabei wurden dann die besten Ergebnisse erzielt, wenn das Wechseln der Pufferlösung in Abständen von 10 min erfolgte. In Abb. 5-4 ist zu sehen, dass in Anwesenheit der Alkalisalze die Leitfähigkeit der Membran je nach Ionenart und -konzentration unterschiedlich stark steigt. Zudem ist in den Bode-Diagrammen (Abb. 5-4 A, C und E) im Bereich von 10^0 - 10^{-1} Hz ein frequenzabhängiges Verhalten der Impedanz zu erkennen, das auf die Diffusion von Ionen zur Membranoberfläche hinweist. In der Darstellungsform nach Nyquist zeichnen sich diese Datenpunkte durch einen linearen Verlauf im Winkel von 45° zur Achse des Realteils der Impedanz Z^{Re} aus.

Tab. 5-1: Zusammenfassung der Parameter $R_{m,o}$ und σ_W aus der Kurvenanpassung an die Impedanzspektren in Abb. 5-4, basierend auf einem *RR*CPE-Kreis (Abb. 4-20) für 0 mM bzw. einem *RR*CPEZ_W-Kreis (Abb. 5-3) für 1 – 10 mM monovalente Kationen.

c / mM	LiCl		NaCl		KCl	
	$R_{m,o}$ / kΩ	σ_W / kΩ $s^{-0,5}$	$R_{m,o}$ / kΩ	σ_W / kΩ $s^{-0,5}$	$R_{m,o}$ / kΩ	σ_W / kΩ $s^{-0,5}$
0	847	-----	740	-----	681	-----
1	303	36,6	224	39,3	119	35,5
2,5	242	24,8	85	20,3	50	18,6
5	141	16,5	47	12,2	26	11,7
7,5	98	14,9	41	12,1	22	11,1
10	67	10,2	31	9,3	16	8,7

Um die elektrischen Parameter des Systems zu erhalten, wurden die Spektren in Gegenwart von Alkalikationen basierend auf dem in Abb. 5-3 gezeigten Ersatzschaltbild analysiert, wohingegen in Abwesenheit der monovalenten Ionen das Netzwerk aus Abb. 4-20 zur Datenauswertung herangezogen wurde. Für die hier präsentierten Ergebnisse wurde ein Substrat verwendet, dessen Barriereoxid mit $R_{ox} = 7{,}5 \cdot 10^6$ Ω einen Widerstand aufwies, der so hoch war, dass $R_a = R_{m,o}$ gilt. Da das CPE mit den Parametern A und α das nicht ideale kapazitive Verhalten des gesamten Systems berücksichtigt, die Aktivität von Gramicidin aber ausschließlich im porenüberspannenden Bereich des Membransystems detektiert

wurde, ist auf eine detaillierte Darstellung dieser Parameter verzichtet worden. Lediglich aus den drei Impedanzspektren in Abwesenheit der Alkalikationen wurde nach Gl. 3-6 eine mittlere Gesamtkapazität C_a von (22,2 ± 0,5) nF ermittelt, welches unter Berücksichtigung der gesamten porösen Fläche $A = 0{,}0104\ \mathrm{cm}^2$ einer spezifischen Kapazität $C_{a,sp}$ von 2,1 µF cm^{-2} entspricht. Hinsichtlich einer Aussage zur Kanalaktivität der integrierten Gramicidin-Moleküle sind vor allem der Membran- und der Konzentrationswiderstand ausschlaggebend und entsprechend in Tab. 5-1 angegeben.

Mit der Bestimmung der Widerstandswerte $R_{m,o} = G_{m,o}^{-1}$ konnte die durch die Alkalikationenzugabe erfolgte Änderung der Membranleitfähigkeit ΔG quantifiziert werden, indem die Leitfähigkeit $G_0 = R_0^{-1}$ bei 0 mM LiCl, NaCl oder KCl als Referenzwert angenommen wurde (Gl. 5-3).

$$\Delta G = \frac{1}{R_{m,o}} - \frac{1}{R_0} = G_{m,o} - G_0 \tag{5-3}$$

Die damit errechneten Werte ΔG (Tab. 5-2) zeigen eine eindeutige Tendenz. Während die Leitfähigkeit durch die Konzentrationsänderung einer Ionensorte kontinuierlich steigt, ist bei einem Vergleich der Werte für die verschiedenen Alkalisalze untereinander festzustellen, dass die Selektivität dem in der Literatur beschriebenen Trend $K^+ > Na^+ > Li^+$ folgt (Finkelstein und Andersen, 1981).

Tab. 5-2: Leitfähigkeitsänderungen ΔG nach den in Tab. 5-1 angegebenen Werten. ΔG entspricht der Differenz der Leitfähigkeit R_0^{-1} bei 0 mM und $R_{m,o}^{-1}$ bei variierender Alkalikationenkonzentration. Die Steigung s_{I+} wurde durch lineare Regression an die Daten erhalten.

c / mM	LiCl	NaCl	KCl
	ΔG / µS	ΔG / µS	ΔG / µS
0	0	0	0
1	2,1	6,9	6,9
2,5	3,0	10,4	18,5
5	5,9	19,3	37,0
7,5	9,6	23,0	44,0
10	13,7	30,9	61,0
s_{I+} / µS mM^{-1}	1,29 ± 0,05	3,3 ± 0,2	6,3 ± 0,3

Durch die Auftragung von ΔG als Funktion der Alkalikationenkonzentration (Abb. 5-5) und einer daran durchgeführten linearen Regression konnte dieser Trend mit der Leitfähigkeitsänderung pro Konzentrationseinheit quantifiziert werden.

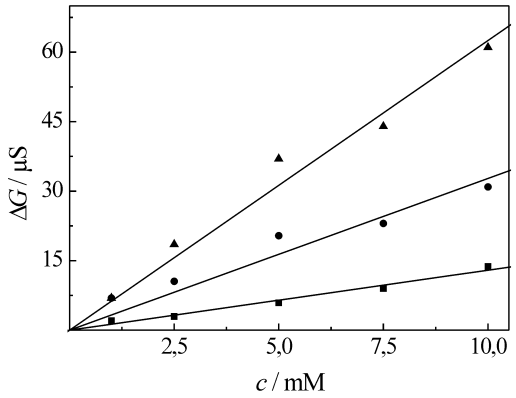


Abb. 5-5: Leitfähigkeitsänderung ΔG der Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membran in Abhängigkeit der Konzentration c von (■) LiCl, (●) NaCl und (▲) KCl. Die aus der linearen Regression (—) erhaltenen Steigungen s_{I+} sind in Tab. 5-2 angegeben.

Danach beträgt die Steigung s_{I+} für LiCl (1,29 ± 0,05) µS mM^{-1}, für NaCl (3,3 ± 0,2) µS mM^{-1} und für KCl (6,3 ± 0,3) µS mM^{-1}. Im Vergleich zu den Werten, die an Gramicidin D-dotierten festkörperunterstützten Lipidmembranen erhalten wurden liegen die an porenüberspannenden Membranen ermittelten Werte um den Faktor 10^3 höher. Das aus den Steigungen für KCl und NaCl gebildetet Verhältnis von 1,9 stimmt gut mit dem Literaturwert für BLMs von 1,8 überein (Gritsch et al., 1998).

Es stellte sich die Frage, wie viele aktive Gramicidinkanäle zu der Leitfähigkeitsänderung der porenüberspannenden Membran beitragen. Zur Abschätzung wurde in erster Näherung die Einzelkanalleitfähigkeit von Gramicidin A bei 10 mM KCl in planaren freistehenden Membranen mit G = 2,15 pS herangezogen (Neher et al., 1978). Damit wurde die Anzahl der leitenden Gramicidin-Dimere unter Berücksichtigung von ΔG bei 10 mM KCl zu etwa $3 \cdot 10^7$ berechnet. Diese nehmen unter Berücksichtigung der Fläche eines einzelnen Kanals von 0,4 nm^2 einen Anteil von 0,001 % an der insgesamt zur Verfügung stehenden aktiven Fläche des Substrats (A = 0,0104 cm^2) ein. Würde ein vollständiger Peptidtransfer von den mit 2 mol % Gramicidin D-dotierten Vesikeln in die porenüberspannende Membran stattfinden, so wäre für die Gramicidin D-Moleküle ein Flächenanteil von 0,6 % zu erwarten. Dass die Transferrate von Gramicidin D in die porenüberspannenden Membranen trotz gleicher Präparationsbedingungen unterschiedlich sein kann, zeigt sich daran, dass in

anderen Präparationen für Leitfähigkeitsänderungen, die mit dem in Abb. 5-5 gezeigten Beispiel vergleichbar sind, 10 - 15-fach höhere Alkalikationenkonzentrationen eingesetzt werden mussten.

Experimente mit Gramicidin D-freien porenüberspannenden Membranen zeigten, dass Alkalikationen den Membranwiderstand modulieren. Dies führt aber selbst bei Konzentrationen von bis zu 100 mM zu Leitfähigkeitsänderungen von weniger als 0,4 µS.

5.2.3 Einfluss von Calciumionen

Es ist bekannt, dass divalente Kationen die Leitfähigkeit des Gramicidin D-Kanals verringern (Bamberg und Läugner, 1977). Um die Funktionalität der insertierten Peptide hinsichtlich eines weiteren Parameters zu verifizieren, wurden analog zu den in Kap. 5.2.2 erläuterten Ausführungen Experimente in Anwesenheit von 20 mM $CaCl_2$ an der gleichen Membranpräparation durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Einfluss von Ca^{2+} auf das Impedanzverhalten der porenüberspannenden Membran untersucht (Abb. 5-6).

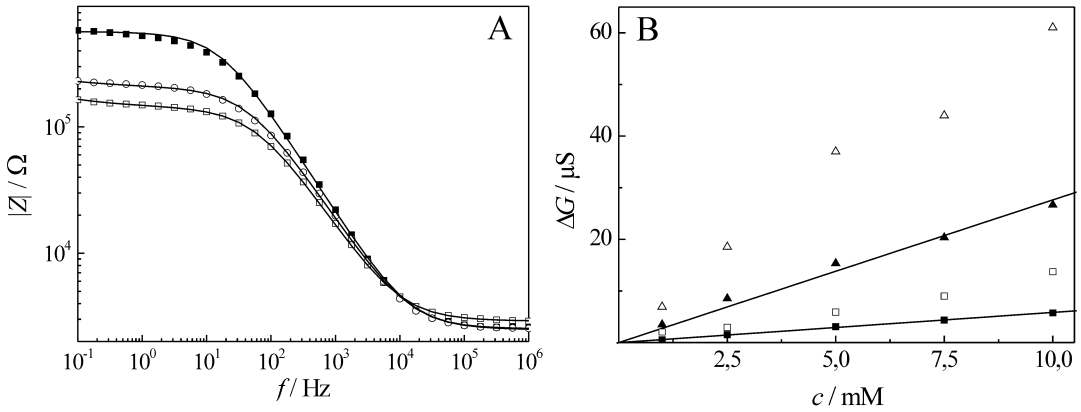


Abb. 5-6: A Impedanzspektren der Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) in Gegenwart von (■) 20 mM $CaCl_2$, (○) 20 mM $CaCl_2$ + 2,5 mM LiCl (□) sowie 2,5 mM LiCl. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6. Die durchgezogenen Linien sind Ergebisse der Kurvenanpassung an (■) basierend auf einem *RR*CPE-Kreis bzw. an (○,□) basierend auf einem *RR*CPEZ_W-Kreis. Die ermittelten Parameter sind in Tab. 5-3 zusammengefasst. **B** Auftragung der Leitfähigkeitsänderung ΔG als Funktion der Alkalikationenkonzentration c in Abwesenheit von $CaCl_2$ (□) für LiCl und (Δ) KCl sowie in Gegenwart von 20 mM $CaCl_2$ für (■) LiCl und (▲) KCl. Die lineare Regression (—) ist aus Gründen der Übersicht nur für die mit Ca^{2+} erhaltenen Daten eingezeichnet, die Steigungen s_{I+} sind in Tab. 5-4 angegeben.

Die Zugabe von Ca^{2+} führte zu einer nur geringen Modulation der Leitfähigkeit von etwa 0,14 µS gegenüber Ca^{2+}-freien Versuchsbedingungen. Dagegen konnte nach Zugabe von LiCl bzw. KCl eine signifikante Änderung des Widerstands detektiert werden. In Abb. 5-6 A ist exemplarisch das Impedanzverhalten der Probe bei 2,5 mM Li^{+} mit (offene Kreise) und ohne Ca^{2+}-Zusatz (offene Quadrate) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Gramicidin D in Gegenwart der Calciumionen weniger stark leitend für monovalente Kationen ist. Ein Vergleich der Elektrolytwiderstände bei einer Frequenz von 10^6 - 10^5 Hz zeigt, dass es nicht die Elektrolytstärke der Pufferlösung ist, welche die Membranleitfähigkeit in diesem Maße beeinflusst. Zur Ermittlung der elektrischen Parameter $R_{m,o}$ und σ_W der porenüberspannenden Membran wurde in Abwesenheit von monovalenten Kationen ein *RR*CPE-Kreis verwendet, nach Zusatz von Alkalikationen das *RR*CPEZ_W-Netzwerk. Die daraus ermittelten Leitfähigkeitsänderungen ΔG sind in Abb. 5-6 B zusammen mit den entsprechenden Daten ohne Ca^{2+}-Zusatz aufgetragen. Durch lineare Regression wurde der Parameter s_{I+} bestimmt, der zusammen mit den Werten aus der Kurvenanpassung in Tab. 5-4 angegeben ist.

Tab. 5-4: Zusammenfassung der Parameter $R_{m,o}$ und σ_W aus der Kurvenanpassung mit einem *RR*CPE- bzw. *RR*CPEZ_W-Kreis an die Daten in Gegenwart von 20 mM Ca^{2+}. ΔG entspricht der Differenz von R_0^{-1} bei 0 mM und $R_{m,o}^{-1}$ bei entspechend variierter Alkalikationenkonzentration.

c / mM	LiCl + 20 mM $CaCl_2$			KCl + 20 mM $CaCl_2$		
	$R_{m,o}$ / kΩ	ΔG / µS	σ_W / kΩ $s^{-0,5}$	$R_{m,o}$ / kΩ	ΔG / µS	σ_W / kΩ $s^{-0,5}$
0	567	-----	-----	531	-----	-----
1	433	0,6	21,8	186	3,5	22,7
2,5	305	1,5	19,9	96	8,5	18,6
5	205	3,1	16,2	58	15,4	15,9
7,5	163	4,4	15,1	45	20,3	13,7
10	133	5,8	13,9	35	26,7	12,6
s_{I+} / µS mM^{-1}	0,585 ± 0,008			2,76 ± 0,09		

Im Vergleich zu den Ergebnissen in Abwesenheit von $CaCl_2$ sind die Leitfähigkeitsänderungen pro Konzentrationseinheit etwa um den Faktor zwei kleiner. Das Verhältnis der Steigungen s_{K+} und s_{Li+} zueinander beträgt in Ca^{2+}-freiem wie in Ca^{2+}-haltigem Puffer 4,7.

Der Quotient der Steigungen einer Ionensorte in An- und Abwesenheit von $CaCl_2$ liefert für Li^+ einen Wert von 2,2 und für K^+ einen Wert von 2,3. Dies zeigt, dass die divalenten Kationen die Kanaleigenschaften von Gramicidin D unabhängig von der Art der Alkalikationen gleichermaßen modulieren.

5.2.4 Kinetik der Fusion Gramicidin D-haltiger Vesikel

Im vorangegangenen Kapitel konnte der funktionelle Transfer von Gramicidin D aus Proteoliposomen in eine porenüberspannende Membran gezeigt werden. Dazu wurden vorab gebildete porenüberspannende Membranen aus DPhPC und DOPC über Nacht mit Gramicidin D-haltigen Vesikeln inkubiert, wordurch sich ihr Impedanzverhalten derart änderte, dass nach diesem Zeitintervall ein kleinerer Gesamtwiderstand R_a detektiert werden konnte. Da der Widerstand des Barriereoxids mit $R_{ox} = 1{,}0 \cdot 10^7\ \Omega\ cm^2$ sehr groß war, entsprach R_a dem Widerstand $R_{m,o}$ der Lipidmembran über den offenen Poren. In Abb. 5-7 sind beispielhaft die Impedanzspektren einer Membran direkt nach Zugabe der Gramicidin D-dotierten Vesikel sowie nach Inkubation über Nacht dargestellt, wobei die Vesikel auf der Probe belassen wurden. Dabei wurde mit einem alkalikationenfreien Puffer gearbeitet.

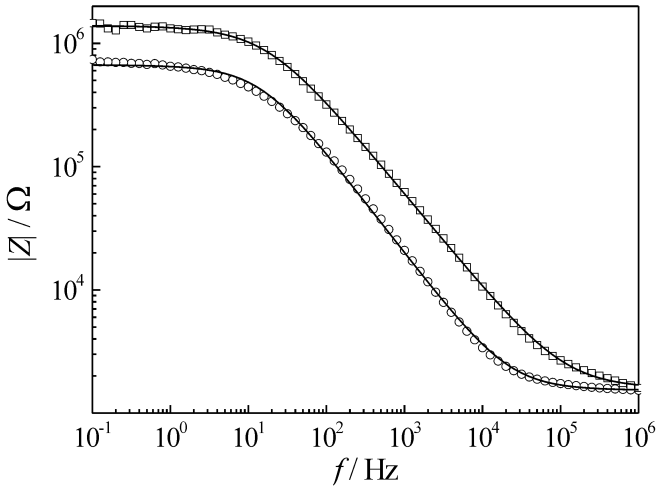


Abb. 5-7: Impedanzspektrum einer porenüberspannenden Membran auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser), aufgebaut aus DPhPC/DOPC 6:4 (□) direkt nach Zugabe von Vesikeln aus DOPC mit 2 mol % Gramicidin D und (○) 15 h später. Zur Kurvenanpassung (—) wurde ein *RR*CPE-Kreis gewählt: (□) $R_{m,o} = 1{,}4 \cdot 10^6\ \Omega$, $A = 1{,}86 \cdot 10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}78$, $\omega_{max}'' = 100{,}2$ Hz; (○) $R_{m,o} = 6{,}7 \cdot 10^5\ \Omega$, $A = 3{,}49 \cdot 10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$, $\alpha = 0{,}83$, $\omega_{max}'' = 79{,}7$ Hz. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6.

Während der Inkubationszeit von 15 h nahm die spezifische Gesamtkapazität $C_{a,sp}$ der Präparation von 0,7 µF cm^{-2} auf 1,6 µF cm^{-2} zu. Die Werte $C_{a,sp}$ wurden nach Gl. 3-6 mit den das CPE beschreibenden Parametern A und α sowie der Frequenz ω_{max}'', bei welcher der Betrag von Z^{Im} als Funktion von ω maximal wird, berechnet. Beim Vergleich der Werte von α wird deutlich, dass das kapazitive Verhalten nach dem Inkubationsintervall mit $\alpha = 0{,}83$ dem Wert für ideale kapazitive Eigenschaften von $\alpha = 1$ näher ist als zuvor mit $\alpha = 0{,}78$. Zusammen mit der höheren Gesamtkapazität ist es denkbar, dass zu Beginn der Inkubation eine inhomogenere Oberfläche mit hemifusionierten Vesikeln vorliegt. Dies konnte aber in Form einer in diesem Fall zu erwartenden, zweiten Dispersion impedanzspektroskopisch nicht aufgelöst werden (Kap. 4.4.3.1). Vielmehr ist es vorstellbar, dass die Zeitkonstanten τ der porenüberspannenden Membran und die der hemifusionierten Vesikel sehr ähnlich sind, weshalb nur die kleinere Zeitkonstante bei höheren Frequenzen detektiert und in der Kurvenanpassung erfasst wird. $R_{m,o}$ sinkt in diesem Prozess etwa um einen Faktor von zwei, welches einer Leitfähigkeitsänderung ΔG von 0,8 µS entspricht.

Hinsichtlich dieser Erkenntnisse war es von Interesse, den Spreitprozess der Proteoliposomen und somit den Transfer von Gramicidin D in die porenüberspannenden Membranen näher zu beleuchten. Der Ionenkanal wurde dabei als „Detektor" benutzt, da er erst dann leitend für monovalente Kationen ist, wenn er durch die Fusion aus den Vesikeln in die porenüberspannenden Membran transferiert wurde. Hierfür wurden die Gramicidin D-haltigen Vesikel in alkalikationenfreiem Puffer präpariert und erst vor der Zugabe zu einer bereits gebildeten Membran mit KCl versetzt. Dadurch sollte verhindert werden, dass Ionenkanäle aus hemifusionierten Vesikeln mit K^+-haltigem Vesikelinhalt einen Beitrag zur Leitfähigkeitsänderung leisten. In einem Kontrollexperiment wurde analog verfahren, jedoch wurden hier Peptid-freie DOPC Vesikel verwendet. In Abständen von 30 min wurden Impedanzspektren aufgenommen. Zur Bestimmung des Widerstands R_a wurde eine Datenanpassung basierend auf den Ersatzschaltbilder *RR*CPE in Abwesenheit bzw. *RR*CPEZ_W in Anwesenheit von KCl durchgeführt. Da lediglich ein Trend bezüglich der Leitfähigkeitsänderung ΔG von Interesse war, wurde auf eine detaillierte Auswertung der einzelnen Membrankomponenten $R_{m,c}$ und $R_{m,o}$ verzichtet. Der Bezugswert für die Berechnung von ΔG nach Gl. 5-3 ist dabei G zum Zeitpunkt $t = 0$.

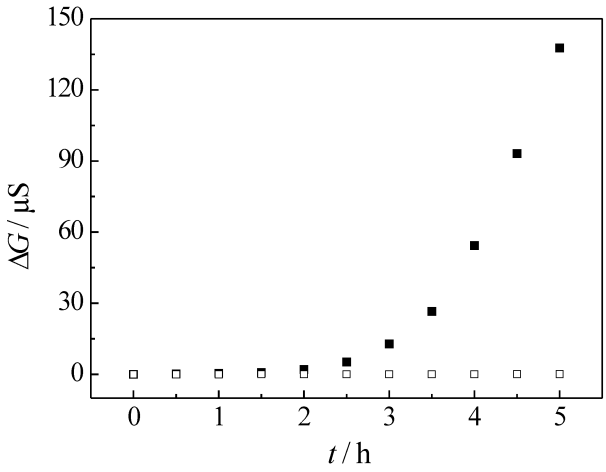


Abb. 5-8: Leitfähigkeitsänderung ΔG einer porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) während der Inkubation mit DOPC-Liposomen (□) ohne und (■) mit 2 mol % Gramicidin D. Der aus dem Impedanzspektrum zum Zeitpunkt $t = 0$ bestimmte Widerstandswert gilt jeweils als Referenzwert. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6 und 10 mM KCl von der Membranoberseite.

In Abb. 5-8 sind die Werte für ΔG in Abwesenheit (offene Symbole) und in Gegenwart von Gramicidin D (geschlossenen Symbole) als Funktion der Zeit aufgetragen. Während die Leitfähigkeitsänderung in den ersten zwei Stunden für beide Fälle nahezu gleich verläuft, zeichnet sich von diesem Zeitpunkt an für die Gramicidin D-haltige Präparation ein exponentieller Anstieg in ΔG ab. Nach 5 h ist ΔG gegenüber der Blindprobe um zwei Größenordnungen erhöht und liegt bei einem Wert von 138 µS. Dieses Ergebnis konnte mehrfach reproduziert werden. In allen Fällen konnte nach etwa 1 - 3 h Inkubationsdauer in Gegenwart von Gramicidin D und KCl ein Anstieg der Membranleitfähigkeit um mehr als das zehnfache detektiert werden. Durch Austausch der Inkubationslösung gegen alkalikationenfreien Puffer nach einem Inkubationszeitraum von 12 h war meist eine Verringerung der Leitfähigkeitsänderung um eine Größenordnung messbar, eine vollständige Herstellung des Zustands zum Zeitpunkt $t = 0$ war jedoch nicht möglich. Eventuell konnten die über das gesamte Inkubationsintervall anwesenden monovalenten Kationen nicht mehr vollständig entfernt werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass im Laufe des Fusionsprozesses auch das Reißen der porenüberspannenden Membranen einen Beitrag zur Leitfähigkeitsänderung lieferte.

5.2.5 Betrachtung zur Diffusion monovalenter Kationen an Gramicidin D-haltigen Membranen

Modell zum Ionentransport

Basierend auf den physikalischen Erkenntnissen zur Diffusion in Form der Fick'schen Gesetze wird die Diffusion geladenen Teilchen in einem Medium beschrieben. Der diffusionskontrollierte Transport von Ionen über planare, freitragende Lipidmembranen kann ausgehend von de Levie's Kontinuums-Modell mathematisch beschrieben werden (De Levie und Seidah, 1974). Die mit Gramicidin D-dotierten porenüberspannenden Membranen stellen entgegen der Modellmembran nach de Levie's Theorie ein komplexes System aus porösem Substrat, Lipidmembran, und Ionenkanälen mit einer Fülle von Randbedingungen dar, das noch zu wenig charakterisiert ist, um einen korrekten mathematischen Ansatz zu formulieren. Zur Auswertung der Impedanzspektren in Gegenwart von Alkalikationen wurde deshalb ein empirischer Ansatz gewählt und der Konzentrationswiderstand Z_W durch ein Warburg-Element mit semiinfiniten Diffusionsbedingungen im Ersatzschaltkreis berücksichtigt, ohne den Parameter σ_W genauer zu definieren.

Für eine Diskussionsgrundlage jedoch sollen die in der Kurvenanpassung erhaltenen Daten auf das Modell angewendet werden, das von Steinem et al. (1996) für Gramicidin-dotierte festkörperunterstützte Membranen entwickelt wurde. In diesem Ansatz wurden ausgehend von de Levie's Modell unter der Annahme einer eindimensionalen Diffusion an einer planaren Membran die durch Ionenkanalaktivität veränderlichen Parameter $R_{m,o}$ und σ_W wie folgt definiert (Gln. 5-4 und 5-5):

$$R_{m,o} = \frac{RTd}{z^2 F^2 D_m} \frac{1}{c} \tag{5-4}$$

$$\sigma_W = \frac{RTK}{z^2 F^2 \sqrt{2D_w}} \frac{1}{c} \tag{5-5}$$

Dabei ist K die Gleichgewichtskonstante der Verteilung der monovalenten Kationen zwischen Lipid und wässriger Phase und d die Dicke der Membran. D_w und D_m repräsentieren die Diffusionskoeffizienten der Kationen in der wässrigen Phase und in der

Membran. $R_{m,o}$ und σ_W sind nach Gl. 5-4 und 5-5 eine Funktion der reziproken Kationenkonzentration c^{-1}. Der in Gl. 5-4 angegebene lineare Zusammenhang wurde bereits in Abb. 5-5 als Abhängigkeit der Leitfähigkeitsänderung von der Kationenkonzentration gezeigt. Für das Parameterpaar σ_W und c^{-1} ist ebenfalls ein linearer Zusammenhang zu erkennen (Abb. 5-9). Bei der linearen Regression wurde im Fall von Li^+ der Datenpunkt bei sehr niedriger Konzentration (1,0 mM^{-1}) nicht berücksichtigt, da dieser deutlich vom linearen Verlauf der übrigen Datenpunkte abweicht. Eine Erklärung hierfür ist in der Datenanpassung an das entsprechende Impedanzspektrum bei 1 mM LiCl (Abb. 5-4 B) zu finden. Es ist zu erkennen, dass die Kurvenanpassung nach dem in Abb. 5-3 gezeigten Ersatzschaltbild, das einen Massentransport in Form des Konzentrationswiderstands Z_W berücksichtigt, den Datenverlauf bei niedrigen Frequenzen nur schlecht wiedergibt. In diesem Bereich jedoch wird der Ionentransport detektiert und der Parameter σ_W bestimmt (Kap. 3.1.5.2). Dies zeigt, dass das zur Datenanpassung gewählte Netzwerk im Bereich sehr niedriger Alkalikationenkonzentrationen nicht mehr uneingeschränkt gültig ist.

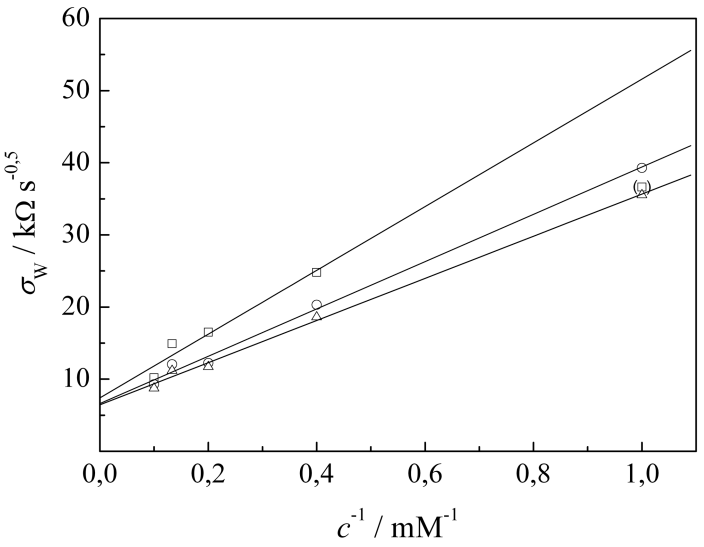


Abb. 5-9: Auftragung von σ_W in Abhängigkeit von c^{-1} für (□) LiCl, (○) NaCl und (Δ) KCl. Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei für LiCl der Datenpunkt bei 1 mM^{-1} vernachlässigt wurde. Für die Steigung s und den y-Achsenabschnitt $\sigma_{W,0}$ wurden folgende Werte erhalten: s_{Li+} = 44,2 kΩ s^{-1} mM, $\sigma_{W,0,Li+}$ = 7,4 kΩ s^{-1}, s_{Na+} = 32,8 kΩ s^{-1} mM, $\sigma_{W,0,Na+}$ = 6,6 kΩ s^{-1}, s_{K+} = 29,2 kΩ s^{-1} mM, $\sigma_{W,0,K+}$ = 6,4 kΩ s^{-1}. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6.

In Abb. 5-9 ist zu erkennen, dass die Steigung s in der Reihenfolge $Li^+ > Na^+ > K^+$ zunimmt. Dieser Trend ist nach dem in Gl. 5-5 gegebenen reziproken Zusammenhang von s und den Diffusionskoeffizienten der Ionen in wässriger Lösung mit der Tendenz $D_{Li+} < D_{Na+} < D_{K+}$ zu erwarten. Das Verhältnis der Steigungen s_{I+} / s_{J+} für zwei Ionen gibt

nach Gl. 5-5 das Verhältnis der entsprechenden Diffusionskoeffizienten $D_{J+}^{-0,5} / D_{I+}^{-0,5}$ wieder, unter der Annahme, dass die Gleichgewichtskonstante K für alle Ionen gleich ist. In Tab. 5-5 sind die mit den Steigungen s ermittelten Werte für $D_{J+}^{-0,5} / D_{I+}^{-0,5}$ einem theoretischen Wert gegenübergestellt, der basierend auf den Diffusionskoeffizienten der Ionen in wässriger Lösung ermittelt wurde (Samec et al., 1995).

Tab. 5-5: Verhältnis der Diffusionskoeffizienten $D_{J+}^{-0,5} / D_{I+}^{-0,5}$ für zwei Alkalikationen. Die experimentellen Werte wurden aus den Steigungen s nach Gl. 5-5 ermittelt. Die theoretischen Werte wurden aus den Diffusionskoeffizienten der Alkalikationen in Wasser berechnet (Samec et al., 1995).

I^+ / J^+	$D_{J+} / D_{I+\ \text{experimentell}}$	$D_{J+} / D_{I+\ \text{theoretisch}}$
K^+ / Na^+	0,89	0,83
Na^+ / Li^+	0,74	0,88
K^+ / Li^+	0,66	0,72

Die aus den experimentellen Daten ermittelten Verhältnisse D_{J+} / D_{I+} stimmen gut mit den theoretisch ermittelten Werten überein. Dies zeigt, dass das impedanzspektroskopisch beobachtete Verhalten eines Massentransports u. a. auf einen diffusionslimitierten Transport der Ionen nach Gl. 5-5 zurückgeführt werden kann. Interessanterweise wird für unendlich hohe Konzentrationen ein konstanter, von der Ionensorte unabhängiger Wert $\sigma_{W,0}$ erreicht, der als Mittelwert aus den drei linearen Regressionen zu $6800 \pm 500\ \text{k}\Omega\ \text{s}^{-0,5}$ bestimmt wurde. Es ist vorstellbar, dass in diesem System ein steter Massentransport aufrechterhalten wird, der den Transport überlagert, welcher durch die Diffusion der Ionen zur Membran bei niedrigen Konzentrationen entsteht. In einer ersten Approximation wird dies auf einen Effekt zurückgeführt, der durch einen an der Lipidmembran vorliegenden Ionengradienten auftritt. Nach dem von Nernst formulierten Zusammenhang (Gl. 5-6) wird unabhängig von der Ionensorte eine Potentialdifferenz erzeugt, wenn auf beiden Seiten der Membran unterschiedliche Ionenkonzentrationen c_1 und c_2 vorliegen.

$$\Delta U = -\frac{RT}{zF} \cdot \frac{c_2}{c_1} \tag{5-6}$$

Neben den Konzentrationen ist in Gl. 5-6 die ideale Gaskonstante R, die Temperatur T, die Ladung der Ionen z und die Faraday-Konstante F enthalten. Auf Grund der alleinigen Zugabe von Alkalikationen zum *cis*-Kompartiment der porenüberspannenden Membran könnte eine Potentialdifferenz als Triebkraft für den Ionenfluss wirken. In dem von Steinem (1997) entwickelten Modell zum Ionentransport an Gramicidin D-dotierten Membranen wurde der Einfluss eines Ionengradienten nicht berücksichtigt.

Impedanzverhalten bei sehr niedrigen Konzentrationen monovalenter Kationen im *cis*-Kompartiment

Im Folgenden wird die in den Impedanzspektren beobachtete Komponente der Diffusion nach Zugabe von Alkalikationen zur Membranoberseite (*cis*-Kompartiment) bezüglich ihrer Übereinstimmung mit dem zur Anpassung gewählten Netzwerk (RRCPEZ_W-Kreis Abb. 5-3) näher betrachtet. Die Einführung des Parameters Z_W erfolgte dabei empirisch. Wie in Kap. 5.2.1 gezeigt werden konnte, beschreibt dieses Netzwerk die elektrischen Eigenschaften der Membranen in erster Näherung sehr gut. Die genauere Betrachtung der Impedanzspektren einer Gramicidin D-dotierten porenüberspannenden Membran in Anwesenheit von 1 mM NaCl zeigt, dass der Verlauf der Daten und der Kurvenanpassung im Bereich niedriger Frequenzen voneinander abweichen (Abb. 5-10). Im Gegensatz zur Kurvenanpassung schließen die Datenpunkte mit der reellen Achse Z^{Re} einen Winkel von weniger als 45° ein. Ein ähnliches Phänomen wurden für Valinomycin-dotierte PVC-Membranen beschrieben und damit erklärt, dass mit sinkender Ionenkonzentration nicht nur die Diffusion zur Grenzfläche hin sondern auch der über die Grenzfläche stattfindende Ionentransport kinetisch begrenzt wird (Nahir und Buck, 1993). Der Verlauf der Kurvenanpassung bei höheren NaCl-Konzentrationen von 2,5 bzw. 5 mM stimmt sehr gut mit dem der Daten überein.

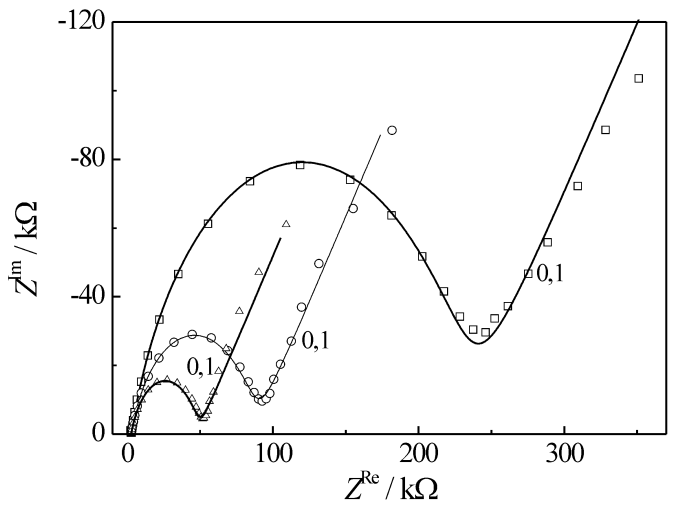


Abb. 5-10: Impedanzspektren einer mit Gramicidin D dotierten, porenüberspannenden Membran (DPhPC/ DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) in Nyquist-Darstellung bei (□) 1 mM, (○) 2,5 mM und (Δ) 5 mM NaCl. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6. Die Kurvenanpassungen (—) basieren auf einem *RR*CPEZ_W-Kreis, deren Ergebnisse in Tab. 5-1 zusammengefasst sind. Die angegebenen Zahlen markieren die Frequenz *f* an diesem Datenpunkt.

Impedanzverhalten in Anwesenheit monovalenter Kationen im *trans*-Kompartiment

Bei allen bisher gezeigten Experimenten zur Leitfähigkeit von Gramicidin D in Gegenwart monovalenter Kationen wurden diese ausschließlich von der Membranoberseite (*cis*-Seite) appliziert, an der die Lipiddoppelschicht in direktem Kontakt zur Elektrolytlösung steht. Unter diesen experimentellen Bedingungen bestand an der Membran bezüglich der Alkalikationen eine asymmetrische Ionenverteilung. Demzufolge war es von Interesse, das System unter dem Gesichtspunkt einer asymmetrischen Verteilung mit entgegengesetztem Ionengradienten zu untersuchen, indem Alkalikationen ausschließlich von der Membranunterseite zugegeben wurden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Ionen zu gewährleisten, wurde die Elektrolytlösung im unteren Messkammerkompartiment (*trans*-Kompartiment) nach Zugabe der monovalenten Kationen durchgehend gerührt. Das in Abb. 5-11 (gefüllte Symbole) dargestellte Impedanzspektrum zeigt das elektrische Verhalten einer Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membran etwa 1 h nach Zugabe von 10 mM KCl zur *trans*-Membranseite.

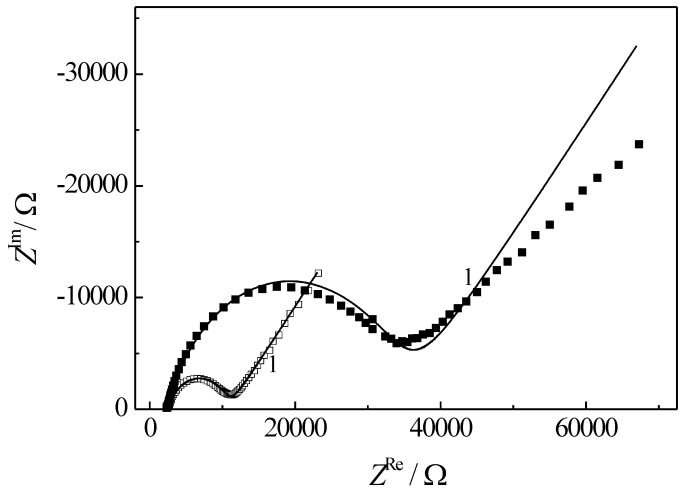


Abb. 5-11: Impedanzspektren eine Gramicidin D-haltigen, porenüberspannenden Membran (DPhPC/ DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) in Nyquist-Darstellung (□) bei 10 mM KCl im *cis*- bzw. (■) im *trans*-Kompartiment. 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6. Die Kurvenanpassung (—) beruht auf einem *RR*CPEZ_W-Kreis mit folgendem Ergebnis: (□) R_a = 8440 Ω, Z_W = 9713 Ω $s^{-0,5}$, A = 1,54·10^{-7} F $s^{\alpha-1}$, α = 0,73 und (■) R_a = 32510 Ω, Z_W = 25713 Ω $s^{-0,5}$, A = 0,84·10^{-7} F $s^{\alpha-1}$, α = 0,77. Die angegebenen Zahlen markieren die Frequenz *f* an diesem Datenpunkt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die auf einem *RR*CPEZ_W-Kreis basierende Kurvenanpassung den Verlauf der Daten im Bereich von 1 - 0,1 Hz nicht korrekt wiedergibt. Vielmehr ist in diesem Frequenzbereich in Analogie zu dem in Abb. 5-10 dargestellten Impedanzspektrum (1 mM NaCl) zu erkennen, dass die Datenpunkte einen Winkel von weniger als 45° mit der reellen Achse Z^{Re} einschließen. Im Vergleich dazu zeigt die Impedanz nach Zugabe von 10 mM KCl zur *cis*-Seite der Membran über das gesamte Frequenzfenster hinweg eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Kurvenanpassung und Datenverlauf. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der Gesamtwiderstand R_a nach Zugabe von 10 mM KCl zum *cis*-Kompartiment durch die Aktivität von Gramicidin D etwa um einen Faktor von vier unter dem Wert liegt, der nach Zugabe zum gegenüberliegenden Kompartiment erhalten wurde. Nach diesen Beobachtungen resultierte die Applikation von 10 mM KCl zum *trans*-Kompartiment in ΔG = 42 µS und damit in einer um 63 % geringeren Leitfähigkeitszunahme als bei 10 mM KCl auf der *cis*-Seite mit ΔG = 113 µS. Es ist anzunehmen, dass die KCl-Konzentration an der Membranoberfläche der *trans*-Seite unter dem Wert der ursprünglich eingesetzten Konzentration von 10 mM liegt.

Dass die Einstellung von 10 mM KCl im jeweiligen Messkammerkompartiment in einem unterschiedlichen Impedanzverhalten resultiert, wurde auch in zeitaufgelösten Messungen des Gesamtwiderstands direkt nach der Zugabe von KCl deutlich. Während nach Einstellen von 10 mM KCl auf der *cis*-Seite ein unmittelbarer Abfall von R_a auf seinen Endwert erfolgte, war die Änderung in R_a nach Zugabe von 10 mM KCl zur *trans*-Seite sehr viel langsamer und konnte deshalb impedanzspektroskopisch verfolgt werden.

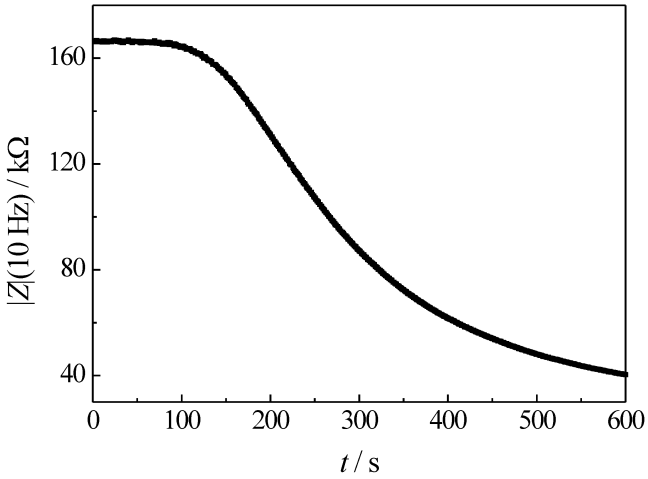


Abb. 5-12: Zeitlicher Verlauf des Impedanzbetrags $|Z|$ einer Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (flächenbegrenzte Siebstruktur, 60 nm Porendurchmesser) bei einer Frequenz von 10 Hz. Zum Zeitpunkt t = -120 s wurde die Lösung im *trans*-Kompartiment auf 10 mM KCl eingestellt. Die Messung wurde zum Zeitpunkt t = 0 gestartet. Während der gesamten Aufnahme wurde die Lösung gerührt. Puffer: 100 mM TMA, 10 mM TRIS/HCl, pH 8,6.

Abb. 5-12 zeigt das entsprechende Experiment, bei dem die Änderung des Betrags der Impedanz $|Z|$ 2 min nach Zugabe von 10 mM KCl zum *trans*-Kompartiment bei einer Messfrequenz f von 10 Hz detektiert wurde. Die Frequenz wurde dabei entsprechend der in Kap. 4.4.3.6 erläuterten Vorgehensweise so gewählt, dass ausschließlich das Ohmsche Verhalten des Gesamtwiderstands R_a erfasst wurde. Erst 90 Sekunden nach Beginn der Messung, d. h. etwa 200 s nach Zugabe von KCl wird ein Abfall der Impedanz detektiert, welche bei 600 s gegen einen Sättigungswert strebt. Aus Impedanzspektren direkt vor und nach KCl-Zugabe wird eine Leitfähigkeitsänderung von 25 µS errechnet, die nach einer weiteren Stunde den oben erwähnten Endwert von 42 µS erreichte.

Um an die *trans*-Membranseite zu gelangen, müssen die Ionen zunächst durch die etwa 200 µm langen Kanäle des Aluminats (Abb. 5-13) diffundieren. Um die dazu benötigte

Zeit zu berechnen, wurde Gl. 5-7 herangezogen, welche die zurückgelegte Wegstrecke x bei einer eindimensionalen Diffusion von Ionen in Abhängigkeit der Zeit t beschreibt:

$$\sqrt{x^2} = \sqrt{2Dt} \tag{5-7}$$

Gl. 5-7 wurde aus dem 2. Fick'schen Gesetz unter Berücksichtigung folgender Randbedingung abgeleitet: Zum Zeitpunkt $t = 0$ liegt bei $x = 0$ die Konzentration c_0 vor, am Ende der Wegstrecke gilt $c = 0$ (Jackson, 2006). Mit dem Diffusionskoeffizienten D für 10 mM KCl von etwa $1{,}9 \cdot 10^{-5}$ cm^2 s^{-1} (Lobo et al., 1998) ergibt sich, dass die Kaliumionen in 10 s eine Wegstrecke von etwa 200 µm zurücklegen.

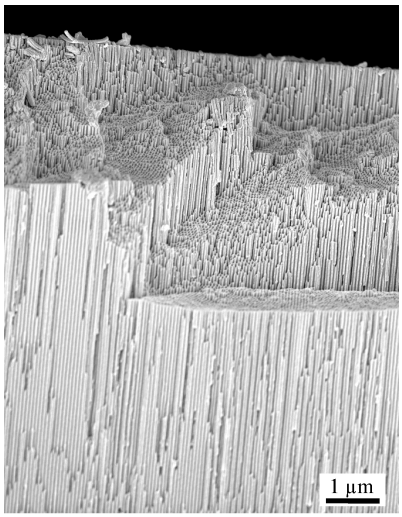


Abb. 5-13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Struktur eines porösen Aluminats mit Poren eines Durchmessers von 60 nm im Längsschnitt.

Damit liegt die theoretisch berechnete Zeit, welche die Ionen benötigen, die *trans*-Seite der Membran zu erreichen, um den Faktor 20 unter dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen, experimentell ermittelten Wert. Dies lässt den Schluss zu, dass das Modell der eindimensionalen Diffusion die tatsächlichen Gegebenheiten nur unzureichend beschreibt. Deshalb wird in einem zweiten Ansatz die Röhrenstruktur des Substrats berücksichtigt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit von Elektrolyten in Nanoröhren von Durchmessern bis 100 nm dann nicht mehr linear von der Konzentration abhängt, wenn diese $< 10^{-2}$ M wird (Schoch et al., 2005; Stein et al., 2004).

Dies wird auf den zunehmenden Einfluss der Oberflächenladungsdichte des Materials zurückgeführt. Die in den elektrolytgefüllten Röhren anwesenden Ionen wechselwirken mit der Oberfläche derart, dass eine elektrische Doppelschicht (Stern-Schicht) ausgebildet wird, die in eine diffuse Gouy-Chapman-Schicht übergeht. In Fall einer negativ geladenen Aluminatoberfläche (Chen und Yuan, 2005) führt dies zu einer elektrostatischen Wechselwirkung mit den Kationen der Lösung, wodurch zwischen der Wand der Aluminatröhren und der Elektrolytlösung in deren Mitte ein Potential aufgebaut wird. Dieses Potential bewirkt, dass der Fluss J von Kaliumionen durch die Aluminatröhren neben dem Konzentrationsgradienten durch einen sog. elektroosmotischen Effekt beeinflusst wird. Chien et al. (2007) haben in Simulationen zeigen können, dass dies auch für die Diffusion von Ionen in porösen Aluminaten gilt. In einer experimentellen Studie an porösen Aluminaten wurde der Effekt der Elektroosmose auf den Fluss von Ionen durch das Substrat in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter beleuchtet (Chen und Yuan, 2005). Interessanterweise spielen bereits die Anodisierungsparameter sowie der verwendete Puffer bezüglich des elektroosmotischen Flusses eine große Rolle. So werden während der Anodisierung unter Verwendung von Oxalsäure deren Anionen in die Aluminatstruktur eingebaut, wodurch die negative Oberflächenladung der Porenwände steigt. Je nach Pufferzusammensetzung wird diese Ladung verändert – unter Einsatz von Phosphatpuffer wird sie noch negativer – und moduliert damit die Elektroosmose. Durch Einstellung eines definierten pH-Werts kann das System soweit modifiziert werden, dass der elektroosmotische Fluss der Diffusion der geladenen Spezies entgegengerichtet ist. Nicht zuletzt spielt die Konzentration der Ionen eine entscheidende Rolle hinsichtlich des beschriebenen Effekts. Es ist vorstellbar, dass die in Abb. 5-12 nach Zugabe von KCl zu deren *trans*-Seite beobachtete verzögerte Leitfähigkeitsänderung einer Gramicidin D-dotierten Membran durch den Ladungstransport zu dieser begrenzt wird. In der nach Gl. 5-7 erfolgten Berechnung konnte gezeigt werden, dass nicht allein die Diffusion einen Betrag dazu leistet und womöglich weitere Effekte den Transport der Ionen beeinflussen.

Anhand dieser Ausführungen konnte gezeigt werden, dass das elektrische Verhalten des Systems der porenüberspannenden Membranen dann durch das poröse Aluminat beeinflusst wird, wenn die Zugabe kleiner Elektrolytkonzentrationen ($< 10^{-2}$ M) zur *trans*-Membranseite erfolgt. Die beiden Membranoberflächen sind damit als nicht-äquivalent zu betrachten.

5.3 Diskussion

Durch den Transfer von Gramicidin D aus Proteoliposomen in porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminaten mit partiell geöffneten Porenböden wurden hohe Ionenkanaldichten erhalten. Die Aktivität der Ionenkanäle in porenüberspannenden Membranen wurde mittels Impedanzspektroskopie untersucht. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Gramicidin D wird in DOPC-Vesikel in seiner Kanalform integriert.

- In porenüberspannende Membranen integriertes Gramicidin D zeigt die in der Literatur bekannte Selektivität für Alkalikationen in der Reihenfolge $K^+ > Na^+ > Li^+$. In Anwesenheit von Ca^{2+} ist die Kanalleitfähigkeit verringert. Das für dieses Membransystem entwickelte Ersatzschaltbild erlaubt die exakte Bestimmung der Leitfähigkeitsänderungen.

- Die Untersuchung von Gramicidin D in porenüberspannenden Membranen ermöglicht die Beobachtung eines Massentransports, der durch ein von de Levie abgeleitetes Modell theoretisch quantifiziert werden kann.

Wie auch in einer Vielzahl von anderen Studien wurde Gramicidin D in dieser Arbeit als Modellionenkanal genutzt. Das Peptid wurde an freitragenden Membranen (BLMs) vor allem auf Einzelkanalebene untersucht (Bamberg et al., 1976). Mit den weitaus stabileren festkörperunterstützten Lipidmembranen konnte die konzertierte Ionenkanalaktivität einer Vielzahl von Kanälen impedanzspektroskopisch ermittelt werden. Aufgrund der Kapazität des unterliegenden Festkörpers war der Membranwiderstand R_m, dessen Änderung die Ionenkanalaktivität anzeigt, nur schwer zu extrahieren (Steinem et al., 1997b). Die in dieser Arbeit präparierten porenüberspannenden Membranen dagegen ermöglichten es, R_m eindeutig zu bestimmen und Gramicidin D durch die integrale Messung vieler Ionenkanäle hinsichtlich seiner Selektivität für Alkalikationen und der Blockade durch Ca^{2+} zu untersuchen. Zudem konnte der diffusionslimitierte Massentransport der monovalenten Kationen zur Membran aufgelöst werden.

Zunächst wurden die zum Transfer von Gramicidin D in porenüberspannende Membranen eingesetzten Proteoliposomen mittels CD-Spektroskopie dahingehend untersucht, ob das Peptid in seiner ionenleitenden Kanalform vorliegt. Es stellte sich heraus, dass Gramicidin D nur in DPhPC-freien Liposomen als leitendes Kopf an Kopf Dimer nachgewiesen werden konnte. Vermutlich schaffen die aus 16 C-Atomen aufgebauten Phytanoylsäureketten des DPhPC mit ihren Methylresten eine wenig flexible und sperrige Lipidmatrix, in welche die 2,17 nm langen Peptide nicht insertieren (Greathouse et al., 1994). Demgegenüber stehen Einzelkanalstudien, in denen die Funktionalität von Gramicidin D in lösungsmittelhaltigen Lipidmembranen aus DPhPC gezeigt werden konnte (Borisenko et al., 2003; Römer und Steinem, 2004). Es ist bekannt, dass Gramicidin nur dann einen funktionellen Ionenkanal bildet, wenn die Lipidmembran flexibel genug ist und unter Annahme einer komprimierten Lipidstruktur ihre hydrophobe Region der Kanalform und –länge anpassen kann (Lundbaek et al., 2004). So ist es denkbar, dass eine DPhPC-Matrix in sphärischer Form weniger flexibel ist, um den Einbau von Gramicidin-Molekülen zu ermöglichen. Es muss allerdings beachtet werden, dass für Einzelkanalmessungen ein einziger aktiver Kanal ausreichend ist, um das gewünschte Signal zu erhalten, während für CD-spektroskopische Messungen eine Vielzahl von Molekülen in der Kanalform vorliegen muss, um ein Signal detektieren zu können. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Gramicidin D in Liposomen aus DOPC bis zu einem Molanteil von 3 % in seiner Kanalform integriert ist. Bei weiterer Konzentrationssteigerung ist Gramicidin D auch in seiner Nicht-Kanalform vorhanden. Der Anteil der leitenden Kopf an Kopf Dimere dagegen wurde kleiner, bis bei einem Molanteil von 10 % keine Vesikelbildung mehr beobachtet werden konnte. In einer CD-spektroskopischen Studie an Gramicidin-haltigen Dimyristoylphosphocholin (DMPC)-Liposomen wurde gezeigt, dass ein Peptid-Lipid-Verhältnis von 1:15 nicht überschritten werden darf, um die funktionelle Einbettung in die hydrophobe Region der Lipidmembran zu gewährleisten (Wallace et al., 1981). Der maximal mögliche Peptidgehalt hängt vor allem vom verwendeten Lipid und äußeren Faktoren wie etwa der Temperatur ab (Greathouse et al., 1994; Wallace et al., 1981)

Die in der Kanalform in DOPC-Vesikel eingebauten Gramicidin D-Moleküle wurden funktionell in porenüberspannende Membranen transferiert, wie in einer impedanzspektroskopischen Untersuchung zur Kanalaktivität eindeutig gezeigt werden konnte. Es wurde die in der Literatur angegebene Selektivität in der Reihe $K^+ > Na^+ > Li^+$ erhalten (Finkelstein und Andersen, 1981) sowie die Kanalblockade durch Ca^{2+} gezeigt (Bamberg

und Läugner, 1977). Mit Hilfe des entwickelten Ersatzschaltbildes *RR*CPEZ_W (Abb. 5-3) konnte R_a und damit die Leitfähigkeitsänderung genau bestimmt werden. Um einen Vergleich zu Studien an anderen Membransystemen anstellen zu können, sind folgende Aspekte interessant:

1.) Wie genau kann die durch Gramicidin D bedingte Leitfähigkeitsänderung in den verschiedenen Membransystemen bestimmt werden?

2.) Kann der vorgeschlagene Ersatzschaltkreis das Impedanzverhalten des Massentransports an Gramicidin D-dotierten Lipidmembranen beschreiben?

Bezüglich der ersten Problemstellung werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse Studien an festkörperunterstützten Membranen gegenübergestellt, in denen die Gramicidin D-Aktivität ebenfalls mittels Impedanzspektroskopie untersucht wurde. Purruker et al. (2001) rekonstituierten ethanolisch gelöstes Gramicidin D in Lipidmembranen auf Siliziumdioxid und detektierten bei einer Ionenstärke von 100 mM NaCl Leitfähigkeitsänderungen von 11 µS cm^{-2} gegenüber einer alkalikationenfreien Präparation. Ein ähnliches Ergebnis wurde an Lipidmembranen erzielt, die auf mikrostrukturierten CPEO3-Monoschichten durch das Spreiten von Proteoliposomen aus Gramicidin D und Ei-PC erhalten wurden (Jenkins et al., 1999). Höhere Ionenkanaldichten und damit größere Leitfähigkeitsänderungen von 0,4 mS cm^{-2} bei 4 mM NaCl wurden durch die Fusion von Vesikeln mit 1 mol % Gramicidin D auf Indium-Zinn-Oxid Elektroden erreicht (Gritsch et al., 1998). Womöglich kann durch das Spreiten von Proteoliposomen eine größere Anzahl von Molekülen in die auf dem Festkörper immobilisierten Membranen eingebracht werden, als durch die Zugabe von ethanolisch gelöstem Gramicidin D zu einer bereits gebildeten Membran, wie im Fall von Purrucker et al. (2001) gezeigt. An Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membranen wurde bei 5 mM NaCl eine Änderung der Leitfähigkeit von etwa 8 mS cm^{-2} gegenüber der Messung in alkalikationenfreiem Puffer erzielt, die damit gegenüber dem System von Gritsch et al. (1998) um einen Faktor von 20 größer ist.

Die gegenübergestellten Ergebnisse zeigen, dass die ermittelten Leitfähigkeitsänderungen nach Alkalikationenzugabe zu Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membranen am größten sind. Da die ermittelten Leitfähigkeitsänderungen aber stark von der Anzahl der inkorporierten Gramicidin-Moleküle, der gewählten Ionenstärke und der Art des Kations abhängen, ist ein Vergleich der Werte nicht möglich. Krishna et al. (2003)

beschäftigten sich mit der Sensitivität von festkörperunterstützten Membranen auf Basis von *Spacer*-Lipiden (*tethered membranes*) zur Detektion von Ionenkanalaktivität. Es wurde berichtet, dass darin integrierte Gramicidin A-Dimere eine apparente Leitfähigkeit zeigen, die um den Faktor sieben unter dem Wert liegt, der an freitragenden Membranen ermittelt wurde. In dieser detaillierten Studie der elektrischen Eigenschaften des wässrigen Reservoirs zwischen Festkörper und Lipidmembran wurde festgestellt, dass neben der Anzahl der aktiven Dimere noch ein weiterer Effekt hinzukommt, der die ermittelten Leitfähigkeitsänderungen bestimmt. Impedanzspektroskopischen Untersuchungen zur Folge ist das wässrige Reservoir bei hohen Ionenstärken weitaus weniger gut leitend für Ionen als es der Konzentration des eingesetzten Elektrolyten nach zu erwarten wäre. Dies wurde damit erklärt, dass die Dielektrizitätskonstante des Reservoirs, in Abhängigkeit vom verwendeten Abstandshalter, bei 27 - 54 und damit unter der von Wasser (ca. 80) liegt (Krishna et al., 2001). Anhand von Impedanzdaten konnte eine verringerte Mobilität der Ionen zwischen Festkörper und Lipidmembran ermittelt werden, was auf die Bildung von Ionenpaaren zurückgeführt wurde. Dies reduziert die Zahl der effektiven Ladungsträger. Krishna et al. (2003) zur Folge gleicht das ionische Reservoir damit eher einem hydratisierten Gel als einem wässrigen Kompartiment, weshalb in elektrischen Messungen nicht die tatsächliche Leitfähigkeit von Ionenkanälen wiedergegeben wird. Dies konnte auch in einer impedanzspektroskopischen Untersuchung der Kanalaktivität von α-Hämolysin an *tethered membranes* auf Gold mit unterschiedlichen Abstandshaltern gezeigt werden (Vockenroth et al., 2008). Unter Verwendung von *Spacer*-Lipiden mit niedriger Packungsdichte wurden in Anwesenheit von α-Hämolysin weitaus größere Leitfähigkeitsdifferenzen ermittelt als mit Abstandshaltern, die eine kompaktere Monoschicht ausbilden.

Im Gegensatz zu der von Krishna et al. (2003) bestimmten apparenten Leitfähigkeit von Gramicidin D in Membranen mit einem angrenzenden ionischen Reservoir konnte in Einzelkanalmessungen an lösungsmittelhaltigen Lipidmembranen auf porösen Aluminaten (nano-BLMs) die tatsächliche Leitfähigkeit des peptidischen Kanals aufgezeichnet werden (Römer und Steinem, 2004). Auch unter Verwendung anderer Modellkanäle wie Alamethicin oder OmpF (Schmitt et al., 2006) konnten die erwarteten Kanalleitfähigkeiten bestimmt werden. Dies deutete darauf hin, dass die elektrolytgefüllten Poren keine Barriere für den Ionenfluss darstellen und demnach wie bei freistehenden Membranen ein echtes, zweites wässriges Kompartiment bilden. In den genannten Untersuchungen an Membranen auf porösen Aluminaten wurde mit hohen Ionenstärken von 0,5 bis 1 M gearbeitet. Im Gegen-

satz dazu wurden an den Gramicidin D-haltigen porenüberspannenden Membranen im Rahmen dieser Arbeit geringe Konzentrationen monovalenter Kationen von 1 bis 10 mM eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Kanäle des porösen Substrats die Leitfähigkeit von Gramicidin D dann begrenzen, wenn der Elektrolyt von der *trans*-Membranseite zugegeben wurde (Abb. 5-11, Abb. 5-12). Die ermittelte Leitfähigkeitsänderung nach Zugabe von 10 mM KCl zur *trans*-Membranseite ist um einen Faktor drei geringer als bei gleicher Konzentration auf der *cis*-Seite. Dies lässt vermuten, dass die tatsächlich an der Membranunterseite vorliegende Alkalikationenkonzentration weit unter der im *trans*-Kompartiment eingestellten Konzentration liegt (Abb. 5-14 B). Tatsache ist, dass die Ionen erst durch die etwa 200 µm langen Kanäle des porösen Aluminats diffundieren müssen, bevor sie an der Membranunterseite die aktiven Ionenkanäle erreichen.

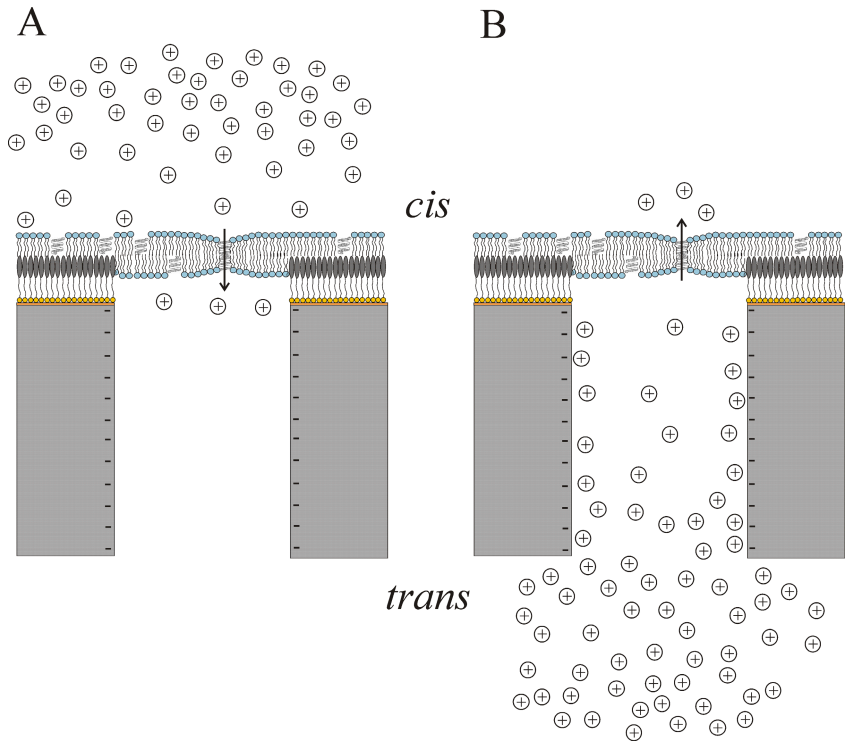


Abb. 5-14: Schematische Darstellung der Diffusion von Ionen zu einer Gramicidin D-dotierten porenüberspannenden Membran. Aus Gründen der Übersicht sind nur eine Pore sowie ein aktives Dimer eingezeichnet. **A** Die Zugabe von Alkalikationen zur *cis*-Membranseite resultiert in einer linearen Diffusion in Richtung der Membran. **B** Nach der Zugabe von Alkalikationen zum *trans*-Kompartiment müssen diese die Nanoröhren des Aluminats passieren, bevor sie die Membranunterseite erreichen. Dabei können Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Porenwänden auftreten.

In Kap. 5.2.5 wurde bereits erläutert, dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen der monovalenten Kationen mit den negativ geladenen Wänden der Aluminatnanoröhren kommen könnte. Dadurch könnte bei niedrigen Elektrolytkonzentrationen ein elektroosmotischer Effekt zum Tragen kommen, der den Ionenfluss in den Kanälen des Substrats begrenzt. Das poröse Substrat ist unter diesem Aspekt bei niedrigen Ionenkonzentrationen auf der *trans*-Membranseite als Barriere zu betrachten. Da die Dicke der Aluminate durch die Dauer des Anodisierungsprozesses bestimmt wird (Kap. 3.5.1), sind poröse Substrate mit unterschiedlich langen Nanoröhren zugänglich. Zur Aufklärung des postulierten elektroosmotischen Effekts wäre eine Untersuchung der Gramicidin D-Aktivität an unterschiedlich dicken, porösen Substraten von Interesse. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Verringerung der Schichtdicke auf Kosten der mechanischen Stabilität der Substrate erfolgt.

Es wurde gezeigt, dass die Leitfähigkeit $R_{m,o}^{-1}$ der porenüberspannenden Membranen anhand des Ersatzschaltbilds $RR\mathrm{CPE}Z_W$ genau bestimmt werden konnte. In einer zweiten Problemstellung wird die Gültigkeit des verwendeten Ersatzschaltbilds bezüglich des Massentransports diskutiert, der in Form des Warburg-Elements Z_W berücksichtigt wurde, wie es z. B. auch für den Massentransport in elektrochemischen Reaktionen an Oberflächen üblich ist (Hsu et al., 2005). McGillivray et al. (2007) nutzten zur Modellierung von Impedanzspektren mit einer Diffusionskomponente, die an defektbehafteten *tethered membranes* erstellt wurden, ebenfalls ein Warburg-Element zur Repräsentation des Beitrags des Ionentransports. Auch in de Levie's Modell zum diffusionskontrollierten Ionentransport über Lipidmembranen wird dieser durch ein Warburg–Element beschrieben (de Levie et al., 1974). Darauf basiert das von Steinem et al. (1997b) erstellte Modell zum Transport von Ionen an Gramicidin D-dotierten festkörperunterstützten Membranen, welches die lineare Diffusion der Ionen zur Membranoberfläche beinhaltet. Membranwiderstand $R_{m,o}$ und Warburg-Koeffizienten σ_W sind nach diesem Modell linear abhängig von der reziproken Konzentration der aktiven Ionenspezies. Im Rahmen dieser Arbeit war dies für NaCl und KCl im Bereich von 1 - 10 mM sowie für LiCl bei 2,5 - 10 mM gültig (Abb. 5-9), weshalb der Massentransport als lineare Diffusion zur Gramicidin D-dotierten Membran betrachtet werden kann. In Abb. 5-14 A ist der linear zur Membranoberfläche liegende Konzentrationsgradient, welcher die Diffusion bedingt, schematisch angedeutet. Dagegen war für 1 mM LiCl eine recht deutliche Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen σ_W und reziproker Ionenkonzentration zu erkennen. Eine Erklärung hierfür

ist in der nach dem *RR*CPEZ_W-Kreis erfolgten Datenanpassung zu finden, die den Verlauf der Impedanzspektren bei sehr kleinen Konzentrationen nur ungenau wiedergibt. Besonders groß war die Diskrepanz zwischen Daten und Anpassung dann, wenn die Ionen von der *trans*-Membranseite zugegeben wurden (Abb. 5-11). Es wird vermutet, dass der Ionentransport bei sehr kleinen Konzentrationen nicht nur durch eine Diffusionskomponente, wie sie von de Levie beschrieben wurde, beeinflusst wird, sondern noch durch einen weiteren Transportprozess. Dies wurde in Kap. 5.2.5 bereits erläutert und in erster Approximation auf den an der Membran vorherrschenden Konzentrationsgradienten zurückgeführt. Dieser ergibt nach Nernst eine Potentialdifferenz, die als treibende Kraft für den Ionenfluss wirken kann.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse an porenüberspannenden Membranen konnte Steinem (1997) in Experimenten an Gramicidin D-dotierten festkörperunterstützten Membranen keinen linearen Zusammenhang zwischen Warburg-Koeffizient σ_W und reziproker Alkalikationenkonzentration erkennen, der nach dem Modell zum Ionentransport gelten muss. Dies wurde unter anderem damit erklärt, dass der Anteil von leitenden Gramicidin D-Dimeren an der gesamten aktiven Fläche bei weniger als 0,2 % liegt, welches eher zu punktförmigen Diffusionsprofilen an den Kanalöffnungen als zu einer linearen Diffusion an der Gesamtfläche führen könnte. Da auch der Anteil von Ionenkanälen in den porenüberspannenden Membranen mit 0,001 % sehr niedrig ist, wird vermutet, dass dies nicht entscheidenden Einfluss auf die Diffusionseigenschaften nimmt. In einer zweiten Überlegung wurde angeführt, dass die Anzahl der Datenpunkte in den Impedanzspektren, die den Massentransport wiederspiegeln, sehr gering ist, welches zu einer ungenauen Bestimmung des Parameters σ_W führen könnte. Bei festkörperunterstützten Membranen auf einer nicht polarisierbaren Unterlage wie einer Goldelektrode besteht eher das Problem, dass sowohl das Warburg-Verhalten als auch die kapazitiven Eigenschaften der Elektrode in einem ähnlichen Frequenzbereich determiniert werden. Dies kann auch in anderen impedanzspektroskopischen Untersuchungen an Gramicidin D-dotierten festkörperunterstützten Membranen beobachtet werden. In einigen Arbeiten werden in Ersatzschaltbildern in Serie zu dem resistiven und kapazitiven Verhalten der Lipiddoppelschicht die elektrischen Eigenschaften der unterliegenden Elektrode berücksichtigt (Atanasov et al., 2005; Gritsch et al., 1998). In den Impedanzspektren war ein Massentransport kaum von der Elektrodenkapazität zu unterscheiden und wurde bei der Modellbetrachtung vernachlässigt. Gassull et al. (2008) nutzten zur Beschreibung des

Ionentransports an Membranen auf Gallium-Arsenid-Elektroden das gleiche Ersatzschaltbild und erweiterten es um ein Warburg-Element, welches ihren Angaben zur Folge zu einer höheren Genauigkeit der Datenanpassung führt. Vallejo und Gervasi (2002) zogen zur Auswertung von Impedanzdaten, die an Gramicidin D-haltigen Membranen auf Goldelektroden erhalten wurden, ein Netzwerk heran, das neben dem elektrischen Verhalten der Doppelschicht ein Warburg-Element enthält. Allerdings wurden für den Warburg-Koeffizienten σ_W Werte erhalten, die nicht den erwarteten Trend $Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$ zeigen. Aus diesem Grund ist die Gültigkeit des verwendeten Ersatzschaltbilds in diesem Fall als kritisch zu betrachten.

6 Funktionalität von Bacteriorhodopsin in den Modellmembranen

Die Protonenpumpe Bacteriorhodopsin wurde in dieser Arbeit genutzt, um zu zeigen, dass in die entwickelten Membransysteme durch die Fusion von Proteoliposomen eine Vielzahl von Transportermolekülen integriert werden kann. Hinsichtlich seiner Aktivität ist Bacteriorhodopsin in der Vergangenheit detailliert beschrieben worden (Longstaff und Rando, 1987; Miercke et al., 1991; Takei et al., 1994). Deshalb ist es besonders gut geeignet, anhand seiner bekannten Eigenschaften die Eignung der Membranen bezüglich der funktionalen Integration komplexer Proteine zu untersuchen. Ein weiterer Vorzug von Bacteriorhodopsin besteht darin, dass seine lichtinduzierte Aktivität mittels Photostrommessungen auf charakteristische Art und Weise nachgewiesen werden kann. Schließlich ist das Protein auch deshalb von Interesse, weil es als Transporter nur geringe *turn-over*-Raten besitzt und erst die konzertierte Aktivität vieler Moleküle ein detektierbares Signal liefert.

In einer fluoreszenzmikroskopischen Studie an Bacteriorhodopsin-haltigen Membranen konnten diese visualisiert und somit den Ergebnissen an proteinfreien Systemen gegenübergestellt werden. In einem weiteren Teil dieses Kapitels wurde die lichtinduzierte Aktivität von Bacteriorhodopsin in Simulationen basierend auf elektrischen Modellen betrachtet. So konnten theoretische Strom-Zeit-Kurven simuliert werden, die dann den experimentell erhaltenen Photostromkurven gegenübergestellt wurden.

6.1 Visualisierung BR-haltiger porenüberspannender Membranen

Zur Visualisierung Bacteriorhodopsin (BR)-dotierter porenüberspannender Membranen wurde analog zu den in Kap. 4.2 beschriebenen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen vorgegangen. Es wurden *giant unilamellar vesicles* (GUVs) mit einem BR-Gehalt von 1 mol % sowie 0,1 mol % des fluoreszenzmarkierten Lipids Texas Red-DHPE nach der in Kap. 3.5.8.3 beschriebenen Methode hergestellt und auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium fusioniert. Zuvor wurde der funktionelle Einbau der BR-Moleküle in GUVs anhand der lichtinduzierten Aktivität validiert, indem Photostromexperimente an den auf festkörperunterstützten Lipidmembranen immobilisierten Vesikeln durchgeführt

wurden. In Abb. 6-1 ist repräsentativ für das Ergebnis einer Präparation von porenüberspannenden Membranen ein Fluoreszenzbild dargestellt, das Domänen unterschiedlicher Intensität zeigt.

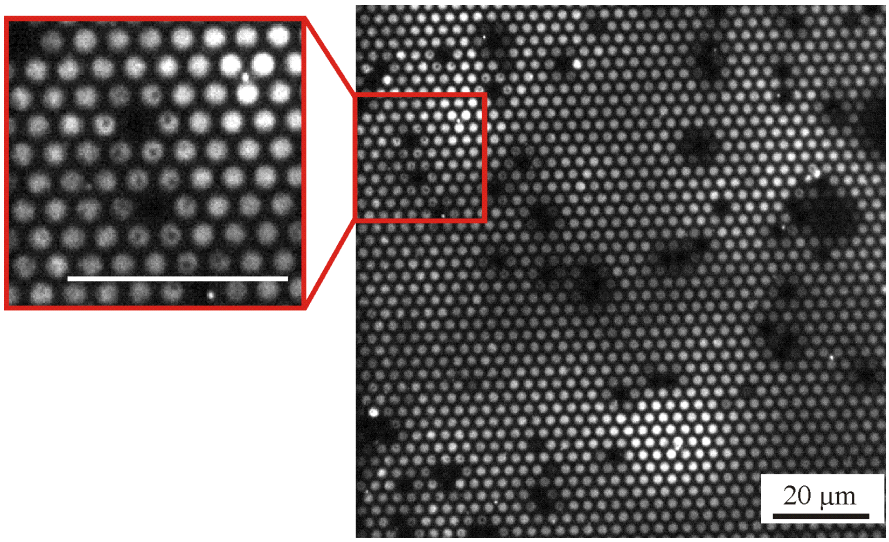


Abb. 6-1: Fluoreszenzaufnahme einer porenüberspannenden Membran präpariert durch Fusion von GUVs (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mol % BR, 0,1 mol % Texas Red DHPE) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium mit Poren eines Durchmessers von 2 µm. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. Der Maßstabsbalken im vergrößerten Ausschnitt beträgt 20 µm.

An dem vergrößerten Ausschnitt ist neben dem Helligkeitsunterschied der Domänen zu erkennen, dass auch die Fluoreszenzintensität innerhalb der einzelnen, 2 µm großen Poren variiert. Dieses Phänomen konnte für BR-freie porenüberspannende Membranen (Abb. 4-3) nicht beobachtet werden. Während in dem gezeigten Fluoreszenzbild ein Großteil der Poren von Membranen überspannt ist, konnten auch nichtbedeckte Bereiche visualisiert werden, die im Fluoreszenzbild schwarz erschienen und im Vergleich zu BR-freien Präparationen deutlich größer waren.

Unter Verwendung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem BR sollte die Verteilung der Proteine in der Membran untersucht werden. Jedoch erwies sich die Fluoreszenzintensität der markierten BR-Moleküle als zu schwach, um mit Hilfe des verwendeten Weitfeldmikroskops detektiert werden zu können. Da dies auf eine Fluoreszenzlöschung vermittelt durch die unterliegende Goldschicht zurückgeführt werden kann (Perez-Luna et al., 2002), wurden Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Membranen gleicher Lipidkomposition mit variierendem BR-Gehalt auf hydrophilisierten Glasträgern durchgeführt. Hierbei konnte mit steigendem BR-Anteil eine Zunahme domänenartiger

Strukturen beobachtet werden. Unter Verwendung FITC-markierter BR-Moleküle konnte gezeigt werden, dass das Protein in den Bereichen angereichert ist (Abb. 6-2 A), die in der Fluoreszenz der Texas Red DHPE-dotierten Membran dunkel erscheinen (Abb. 6-2 B). Dies spricht dafür, dass die Beobachtung domänenartiger Strukturen in BR-haltigen porenüberspannenden Membranen womöglich auf eine inhomogene Verteilung der Proteine zurückzuführen ist.

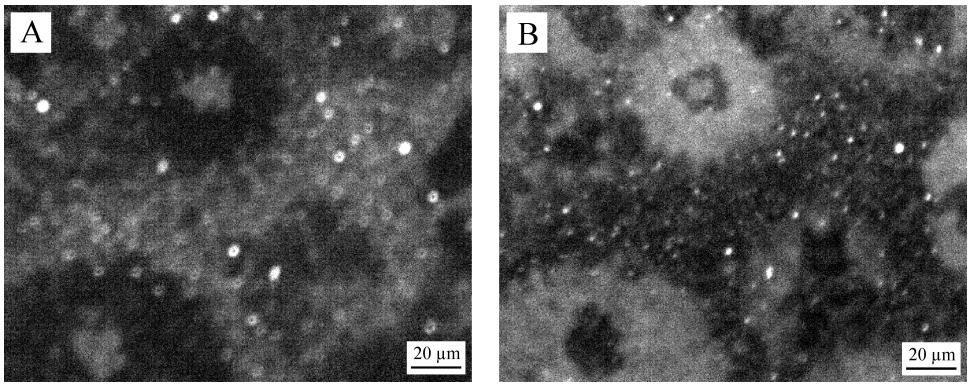


Abb. 6-2: Fluoreszenz einer auf einem hydrophilisierten Glasträger immobilisierten Membran (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mol % FITC-markiertes BR, 0,1 mol % Texas Red DHPE) durch Spreiten von LUVs. **A** Fluoreszenz der FITC-markierten BR-Moleküle. **B** Fluoreszenz der Texas-Red DHPE-Moleküle. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

Ein weiteres Indiz für die Hypothese von unterschiedlich beschaffenen Membranbereichen in porenüberspannenden Membranen mit einem BR-Gehalt von 1 mol % lieferte eine FRAP-Studie. In diesen Untersuchungen zur Fluoreszenzregenerierung der mit 0,5 mol % Bodipy-PC dotierten Membranen konnten zwei verschiedene mittlere effektive Diffusionskoeffizienten D_{eff} ermittelt werden. Neben einem Diffusionskoeffizienten $D_{eff,1} = (4{,}4 \pm 0{,}6)\ \mu m^2\ s^{-1}$ wurde der Wert $D_{eff,2} = (2{,}3 \pm 0{,}4)\ \mu m^2\ s^{-1}$erhalten. Eine verringerte laterale Mobilität der Lipide ist auch am dazugehörigen Wert des immobilen Anteils zu erkennen. In Membranbereichen mit dem Diffusionskoeffizienten $D_{eff,1}$ beträgt der immobile Anteil (20 ± 6) %, für den Bereich geringerer lateraler Mobilität (37 ± 7) %. Da die mit Bodipy-PC dotierten Membranen weniger kontrastreich waren als Texas Red DHPE-haltige, konnte keine Zuordnung der lateralen Mobilität zu Bereichen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität erfolgen. Dennoch zeigt die FRAP-Studie anhand der variierenden lateralen Mobilität recht deutlich das Vorhandensein unterschiedlicher Membranbereiche und korreliert damit mit der in Abb. 6-1 dargestellten Fluoreszenzaufnahme.

Tab. 6-1: Mittlere effektive Diffusionskoeffizienten D_{eff} und immobile Anteile von porenüberspannenden Membranen (DPhPC/DOPC 6:4, 1 mol % BR, 0,5 mol % Bodipy-PC) auf CPEO3-funktionalisiertem porösen Silizium mit einem Porendurchmesser von 2 µm. Die Lipidmembranen wurden durch Spreiten von GUVs erhalten.

	D_{eff} / µm^2 s^{-1}	immobiler Anteil / %	n
1	4,4 ± 0,6	20 ± 6	8
2	2,3 ± 0,4	37 ± 7	15

Im Rahmen dieser Arbeit war es aus methodischen Gründen nicht möglich, die laterale Mobilität der BR-Moleküle in porenüberspannenden Membranen mittels FRAP zu untersuchen, da mit dem verwendeten experimentellen Aufbau theoretisch ein effektiver Diffusionskoeffizient von minimal 1,5 µm^2 s^{-1} ermittelt werden kann. Literaturangaben zur Folge liegt dieser Wert je nach Membransystem und verwendeter Lipidkomposition bei 0,8 – 1,2 µm^2 s^{-1} und erfordert somit andere Messbedingungen (Kahya et al., 2001; Schram et al., 1994).

6.2 Theoretische Betrachtung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin in Modellsystemen

Zur theoretischen Beschreibung lichtinduzierter Protonenströme wurden zunächst Modelle entwickelt, die drei denkbare Messsysteme elektrisch darstellen. Das von Herrmann und Rayfield (1978) entwickelte Modell zur Quantifizierung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin (BR) in artifiziellen Membranen wurde auf diese Systeme entsprechend angepasst. Zu den erstellten Netzwerken wurden Gleichungen formuliert, welche die Protonenströme nach dem Ein- bzw. Ausschalten der Strahlungsquelle beschreiben. Basierend auf diesen Gleichungen konnten Simulationen durchgeführt werden, in denen die Netzwerkparameter in Größenordnungen berücksichtigt werden, die für diese Arbeit von Relevanz sind. Im Folgenden werden drei verschiedene Modelle vorgestellt.

6.2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Modellbetrachtung

Bevor die Modelle im Detail beschrieben und die durchgeführten Simulationen gezeigt werden, ist es notwendig, zunächst die Grundlagen der Modellbetrachtung zu erörtern. In Abb. 6-3 A ist schematisch dargestellt, worauf der Grundgedanke der theoretischen Betrachtung fußt:

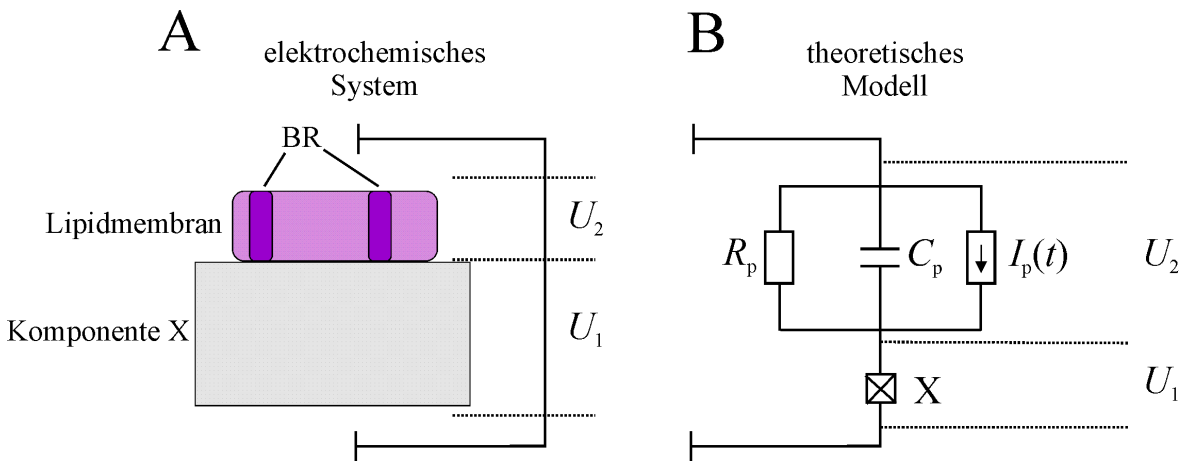


Abb. 6-3: A Elektrochemisches System aus BR-haltigen Membranen und einer weiteren Systemkomponente X. Durch die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität wird an den Grenzflächen eine Potentialdifferenz U generiert. **B** Theoretisches Modell des in A gezeigten Systems. Das Netzwerk enthält die Elemente R_p und C_p zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht. Parallel dazu wird die Protonenpumpaktivität der BR-Moleküle in Form der Stromquelle $I_p(t)$ berücksichtigt. X ist ein Platzhalter für ein beliebiges Element.

BR-haltige Lipidmembranen bilden zusammen mit mindestens einer weiteren Komponente X ein elektrochemisches System, an dem die Protonenpumpaktivität der Moleküle in Form der Potentialdifferenz U_p detektiert wird. Wird das elektrochemische System in ein theoretisches Modell (Abb. 6-3 B) überführt, sind die BR-haltigen Lipidmembranen stets als Parallelschaltung aus den kapazitiven (C_p) und resistiven (R_p) Eigenschaften der Membran dargestellt. Dabei wird die Protonenpumpaktivität der BR-Moleküle als Stromquelle $I_p(t)$ berücksichtigt. Eine weitere, hier nicht näher definierte Komponente ist in Serie dazu geschaltet und wird als Platzhalter X angegeben. Durch die Protonenpumpaktivität der BR-Moleküle wird an den Grenzflächen des Systems eine Potentialdifferenz U_p generiert, die über den Maschen U_1 und U_2 abfällt. Unter Kurzschlussbedingungen gilt der Zusammenhang $U_1 = U_2 = U_p$. Dies vereinfacht die theoretische Betrachtung und es gilt der von Herrmann und Rayfield (1978) postulierte Zusammenhang zwischen der Potentialdifferenz U_p und dem Protonenpumpstrom $I_p(t)$ (Gl. 6-1):

$$I_p(t) = I_{p,0}(t)\left(1 - \frac{U_p}{U^*}\right) \tag{6-1}$$

$I_{p,0}$ bezeichnet in Gl. 6-1 den Pumpstrom bei einer Spannung von $U_p = 0$. U^* ist eine Konstante, die, um die Linearität der Gleichung zu erfüllen, sehr viel größer sein muss als U_p.

Auf diesen Vorüberlegungen basieren die im Folgenden entwickelten Modelle zur Protonenpumpaktivität von BR in unterschiedlichen elektrochemischen Systemen.

6.2.2 Modell 1: Protonenpumpströme in Anwesenheit eines begrenzenden Kondensators

In Modell 1 wird angenommen, dass neben der BR-dotierten Membran ein zusätzlicher Kondensator mit der Kapazität C Bestandteil des elektrochemischen Systems ist (Abb. 6-4).

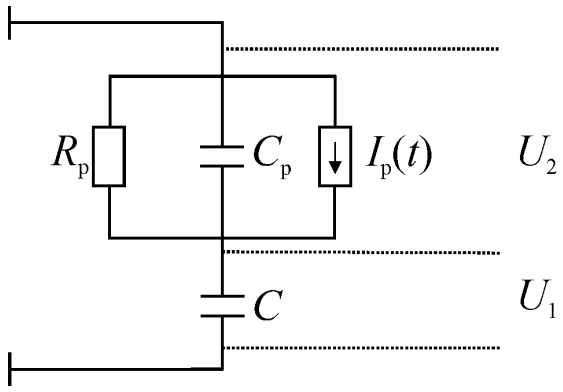


Abb. 6-4: In **Modell 1** ist die BR-haltige Lipidmembran mit den Netzwerkelementen R_p, C_p und $I_p(t)$ sowie in Serie dazu eine Kapazität C repräsentiert. Es gelten Kurzschlussbedingungen und somit $U_1 = U_2$.

Die durch die Protonenpumpaktivität aufgebaute Potentialdifferenz U_p fällt über beiden Maschen gleichermaßen ab. Damit ist der tatsächlich detektierte Protonenpumpstrom $I(t)$ unter Berücksichtigung der Potentialdifferenz U_p und der Kapazität C wie folgt definiert:

$$I(t) = \dot{U}_p C \tag{6-2}$$

Um $I(t)$ durch die in Modell 1 angegebenen Elemente beschreiben zu können, wurde die Theorie von Herrmann und Rayfield (1978) verwendet. Die Durchführung einer Knotenanalyse zeigt unter Verwendung von Gl. 6-2 den Zusammenhang des Pumpstroms $I_p(t)$ mit den im Netzwerk enthaltenen elektrischen Parametern (Gl. 6-3). In den folgenden Gleichungen werden die Ohmschen Eigenschaften in Form von Leitfähigkeiten gemäß des Zusammenhangs $G = R^{-1}$ notiert.

$$I_{p,0}(t)\left(1 - \frac{U_p}{U^*}\right) = U_p G_p + \dot{U}_p C_p + \dot{U}_p C \tag{6-3}$$

Strom nach Einschalten der Strahlungsquelle. Die Lösung dieser Differenzialgleichung beschreibt den zeitlichen Verlauf des Potentials $U_p(t)$ während des Pumpprozesses. Durch Zusammenführung der Lösung der Differenzialgleichung mit Gl. 6-1 wird ein Ausdruck erhalten, der den Strom nach Anschalten der Strahlungsquelle bei $t \geq t_{an}$ definiert:

$$I(t) = I_{an,max} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{an}}\right) \tag{6-4}$$

mit dem maximalen Einschaltstrom:

$$I_{an,max} = I_{p,0} \frac{C}{C + C_p} \tag{6-5}$$

und der Zeitkonstanten:

$$\tau_{an} = \frac{C + C_p}{\frac{I_{p,0}}{U^*} + G_p} \tag{6-6}$$

Strom nach Ausschalten der Strahlungsquelle. Durch das Beenden der Belichtungszeit versiegt der Protonenpumpstrom, der Parameter $I_{p,0}$ wird null. Für die dadurch veränderte Differenzialgleichung (Gl. 6-3) wird für $t \geq t_{aus}$ folgende Lösung erhalten:

$$I(t) = -I_{aus,max} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{aus}}\right) \tag{6-7}$$

mit dem Maximalstrom beim Ausschalten der Lichtquelle:

$$I_{aus,max} = \frac{I_{p,0} G_p C_p}{\left(G_p + \frac{I_{p,0}}{U^*}\right)\left(C + C_p\right)} \tag{6-8}$$

und der Zeitkonstanten:

$$\tau_{\text{aus}} = \frac{C + C_{\text{p}}}{G_{\text{p}}} \tag{6-9}$$

Der Vorzeichenwechsel im Ausdruck für $I(t)$ kennzeichnet, dass der Protonenfluss beim Ausschaltprozess in umgekehrter Richtung erfolgt. Die über der Membran aufgebaute Potentialdifferenz U_{aus} enspricht dem Wert zum Zeitpunkt $t = t_{\text{aus}}$ und ist wie folgt definiert:

$$U_{\text{aus}} = \frac{I_{\text{p,0}}}{G_{\text{p}} + \frac{I_{\text{p,0}}}{U^*}} \tag{6-10}$$

Für geringe Leitfähigkeiten G_{p} erreicht die Potentialdifferenz den durch die Konstante U^* vorgegebenen, maximalen Wert. Wird G_{p} groß, wird der Betrag von U_{aus} klein.

Simulationen. Basierend auf den Gln. 6-4 und 6-9 konnten die Stromantworten des An- und Ausschaltvorgangs simuliert werden. Um die Simulationen nach den verschiedenen Modellen untereinander vergleichen zu können, werden sie wie folgt nach Nummern benannt: 1-1, 1-2, 2-1 usw. Die erste Ziffer bezeichnet das Modell, die zweite ist die Laufnummer der durchgeführten Variationen. In Abb. 6-5 sind die aus den Simulationen resultierenden Strom-Zeit-Kurven dargestellt. Die durchgezogene Linie präsentiert den Verlauf unter Annahme sehr kleiner Membranleitfähigkeiten G_{p} (Simulation 1-1). Während beim Einschaltvorgang deutlich ein transienter Strom zu erkennen ist, kann der Strom des Auschaltprozesses nicht von der Nulllinie unterschieden werden.

Von besonderem Interesse ist im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer Leitfähigkeitsänderung auf die Photostromantwort, da dieser Parameter experimentell leicht modifiziert werden kann. So wurde in den Simulationen 1-2 und 1-3 die Leitfähigkeit G_{p} von $1 \cdot 10^{-12}$ S um sechs bzw. sieben Größenordnungen erhöht.

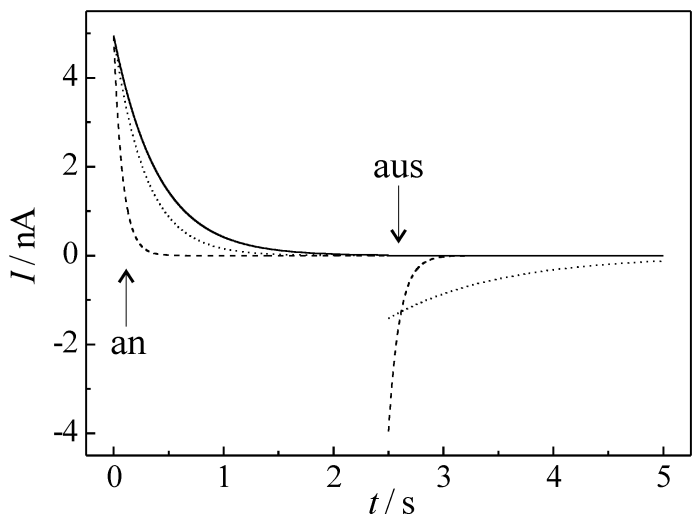


Abb. 6-5: Simulationen nach **Modell 1** unter Verwendung folgender Werte, wobei $R = G^{-1}$ gilt: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 5\cdot10^{-7}$ A, $C_p = 1\cdot10^{-6}$ F, $C = 1\cdot10^{-8}$ F, (—) **Simulation 1-1:** $G_p = 1\cdot10^{-12}$ S, (····) **Simulation 1-2:** $G_p = 1\cdot10^{-6}$ S, (---) **Simulation 1-3:** $G_p = 1\cdot10^{-5}$ S.

Die daraus resultierenden Kurven sind in Abb. 6-5 als gepunktete bzw. unterbrochene Linie dargestellt. Wie nach Gl. 6-5 zu erwarten, ist der maximale Einschaltstrom unabhängig von einer Änderung in G_p. Dagegen ist der maximale Ausschaltstrom, wie in Gl. 6-8 angegeben, eine Funktion der Membranleitfähigkeit. In der Photostromantwort wird dies durch einen Peak bei negativen Werten sichtbar, der mit zunehmender Leitfähigkeit G_p immer größere Maximalwerte annimmt. Zudem ist in den Simulationen 1-1 bis 1-3 zu erkennen, dass der transiente Strom des An– und Ausschaltvorgangs für höhere Leitfähigkeiten schneller gegen Null strebt. Werden die Beträge der Zeitkonstanten dieser Prozesse zueinander ins Verhältnis gesetzt, so zeigt sich, dass dieser Quotient für große G_p einen Wert von 1 annimmt.

6.2.3 Modell 2: Protonenpumpströme in Anwesenheit eines begrenzenden Ohmschen Widerstands

Ausgehend von dem in Kap. 6.2.1 dargestellten elektrochemischen System wurde ein weiteres Modell entwickelt, in dem ein Ohmscher Widerstand R als zusätzliche Komponente in Serie zu der BR-haltigen Lipidmembran berücksichtigt wird (Abb. 6-6).

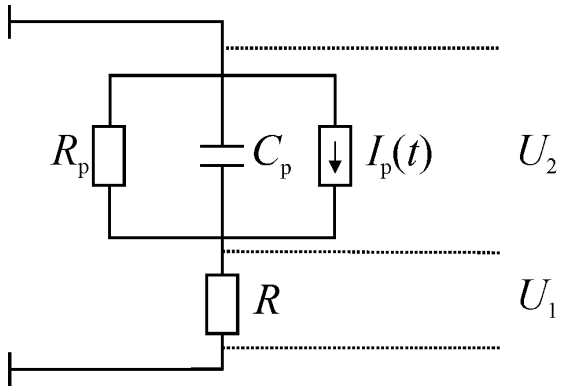


Abb. 6-6: : In **Modell 2** ist die BR-haltige Lipidmembran mit den Netzwerkelementen R_p, C_p und $I_p(t)$ sowie in Serie dazu ein Ohmscher Widerstand repräsentiert. Es gelten Kurzschlussbedingungen und somit $U_1 = U_2$.

Nach diesem Modell kann der tatsächlich detektierte Messstrom $I(t)$ in Abhängigkeit von $R = G^{-1}$ und die durch die Protonenpumpaktivität aufgebauten Potentialdifferenz U_p wie folgt formuliert werden:

$$I(t) = U_p G \tag{6-11}$$

Mit dem in Gl. 6-1 definierten Zusammenhang kann nach einer Knotenanalyse des in Abb. 6-6 gezeigten Netzwerks eine Differenzialgleichung formuliert werden, die alle Netzwerkparameter einschließt:

$$I_{p,0}\left(1-\frac{U_p}{U^*}\right) = U_p G_p + U_p G + \dot{U}_p C_p \tag{6-12}$$

Stromantwort nach Einschalten der Strahlungsquelle. Unter Berücksichtigung der Gln. 6-11 und 6-12 wird für $t \geq t_{\mathrm{an}}$ nach Anschalten der Lichtquelle folgender Strom detektiert:

$$I(t) = I_{\mathrm{an,max}} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{an}}} \right) \right) \tag{6-13}$$

mit dem maximalen Einschaltstrom:

$$I_{\mathrm{an,max}} = \frac{G I_{\mathrm{p,0}}}{G + G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{6-14}$$

und der Zeitkonstanten:

$$\tau_{\mathrm{an}} = \frac{C_{\mathrm{p}}}{G_{\mathrm{p}} + G + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{6-15}$$

Stromantwort nach Ausschalten der Strahlungsquelle: Für den Ausschaltvorgang mit $I_{\mathrm{p,0}} = 0$ wurde nach Lösen der Differenzialgleichung folgender Ausdruck erhalten:

$$I(t) = I_{\mathrm{aus,max}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{aus}}} \right) \tag{6-16}$$

mit dem maximalen Ausschaltstrom:

$$I_{\mathrm{aus,max}} = \frac{G I_{\mathrm{p,0}}}{G + G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{6-17}$$

und der Zeitkonstanten:

$$\tau_{\mathrm{aus}} = \frac{C_{\mathrm{p}}}{G_{\mathrm{p}} + G} \tag{6-18}$$

Simulationen. Unter Verwendung der in den Gln. 6-13 – 6-18 gezeigten Zusammenhänge konnte eine Simulation des Ein- und Ausschaltvorgangs nach Modell 2 durchgeführt werden. Dabei wurden den Parametern Werte zugewiesen, deren Größenordnungen bezüglich der in dieser Arbeit behandelten elektrochemischen Systeme relevant sind. Nachfolgend wird Modell 2 unter dem Aspekt betrachtet, dass der Widerstand R einen sehr geringen Wert von 1000 Ω besitzt, der nicht moduliert werden kann.

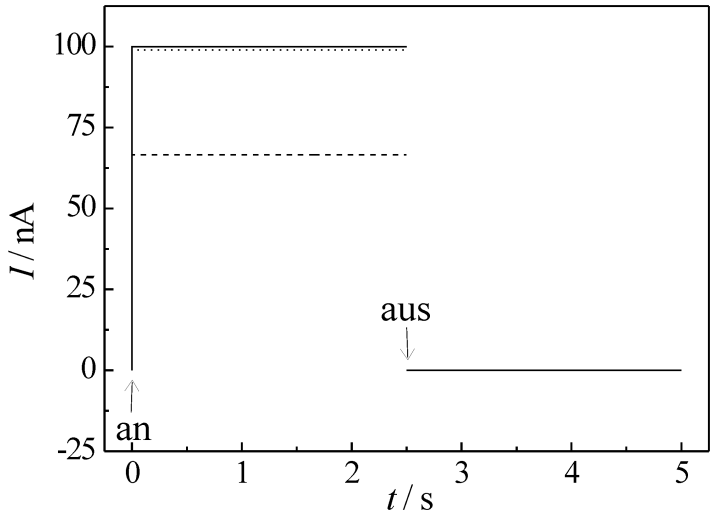


Abb. 6-7: Simulationen nach **Modell 2** unter Verwendung folgender Werte, wobei $R = G^{-1}$ gilt: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 1\cdot10^{-7}$ A, $G = 1\cdot10^{-3}$ S, $C_p = 1\cdot10^{-8}$ F, (—) **Simulation 2-1:** $G_p = 1\cdot10^{-12}$ S, (····) **Simulation 2-2:** $G_p = 1\cdot10^{-5}$ S, (---) **Simulation 2-3:** $G_p = 5\cdot10^{-4}$ S.

In Simulation 2-1 ist der Stromverlauf unter der Annahme einer geringen Leitfähigkeit G_p von $1\cdot10^{-12}$ S berechnet worden (Abb. 6-7, durchgezogene Linie). Darin ist der Anschaltprozess durch einen wenige Millisekunden dauernden Anstieg des Stroms auf einen konstanten Wert charakterisiert. Durch eine Erhöhung der Leitfähigkeit um sieben Größenordnungen (Simulation 2-2, gepunktete Linie) auf $G_p = 1\cdot10^{-5}$ S wird die Stromantwort im Vergleich zu derjenigen aus Simulation 2-1 kaum modifiziert. Erst nach einer weiteren Erhöhung auf $G_p = 5\cdot10^{-4}$ S (Simulation 2-3, unterbrochene Linie) kann ein signifikanter Unterschied in Form eines niedrigeren Einschaltstroms festgestellt werden. Damit kann festgehalten werden, dass der Strom des Anschaltprozesses erst dann stark variiert, wenn G_p in der Größenordnung von G liegt. Hinsichtlich des Ausschaltstroms zeigt sich in allen drei durchgeführten Simulationsvarianten ein äquivalenter Verlauf bei einem Wert von Null.

6.2.4 Modell 3: Protonenpumpströme in Anwesenheit einer begrenzenden Parallelschaltung aus Kondensator und Ohmschem Widerstand

In einer dritten Variante des in Abb. 6-3 allgemeingültig dargestellten elektrochemischen Systems wird eine Parallelschaltung aus Ohmschem Widerstand R und Kondensator C in das Netzwerk eingefügt.

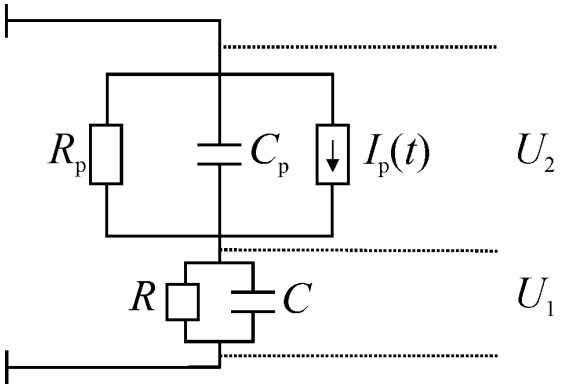


Abb. 6-8: In dem als **Modell 3** bezeichneten Netzwerk ist in Serie zu der BR-haltigen Lipidmembran mit den Netzwerkelementen R_p, C_p und $I_p(t)$ eine Parallelschaltung aus einem Ohmschen Widerstand R und einem Kondesator C geschaltet. Es gelten Kurzschlussbedingungen und somit $U_1 = U_2$.

Unter Berücksichtigung der Potentialdifferenz U_p wird der Messstrom $I(t)$ nach Modell 3 durch die elektrischen Eigenschaften der Elemente R und C begrenzt und ist wie folgt definiert:

$$I(t) = \dot{U}_p C + U_p G \tag{6-19}$$

Nach einer Knotenanalyse kann in Verbindung mit Gl. 6-1 folgende Differenzialgleichung formuliert werden, die alle im Netzwerk aufgeführten Parameter enthält:

$$I_{p,0}\left(1 - \frac{U_p}{U^*}\right) = U_p G + U_p G_p + \dot{U}_p C + \dot{U}_p C_p \tag{6-20}$$

Stromantwort nach Einschalten der Strahlungsquelle. Die Lösung der Differentialgleichung liefert in Verbindung mit Gl. 6-19 für den Strom zum Zeitpunkt $t \geq t_{\mathrm{an}}$ folgendes Ergebnis:

$$I(t) = I_{\mathrm{stat}} + \left(I_{\mathrm{an,max}} - I_{\mathrm{stat}}\right)\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{an}}}\right) \tag{6-21}$$

mit dem Maximalstrom $I_{\mathrm{an,max}}$ beim Einschalten der Lichtquelle und dem stationären Strom I_{stat} während der Belichtungszeit:

$$I_{\mathrm{an,max}} = I_{\mathrm{p,0}} \frac{C}{C + C_{\mathrm{p}}} \tag{6-22}$$

$$I_{\mathrm{stat}} = I_{\mathrm{p,0}} \frac{G}{G + G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{6-23}$$

sowie der Zeitkonstante:

$$\tau_{\mathrm{an}} = \frac{C + C_{\mathrm{p}}}{G + G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{6-24}$$

Der stationäre Strom in diesem Modell ist eine Größe, die neben $I_{\mathrm{an,max}}$ und τ_{an} den Einschaltstrom im Vergleich zu den vorherigen Betrachtungen zusätzlich modifiziert. Dies kann damit erklärt werden, dass in Modell 3 im Gegensatz zu den vorherigen Modellen die Leitfähigkeit G den Messstrom direkt beeinflusst (Gl. 6-19).

Stromantwort nach Abschalten der Strahlungsquelle. Analog kann der Strom zum Zeitpunkt $t \geq t_{\mathrm{aus}}$ definiert werden:

$$I(t) = -I_{\mathrm{aus,max}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{aus}}}\right) \tag{6-25}$$

Der maximale Ausschaltstrom $I_{\mathrm{aus,max}}$ und die Zeitkonstante τ_{aus} werden wie folgt beschrieben:

$$I_{\mathrm{aus,max}} = \frac{I_{\mathrm{p,0}}\left(G+G_{\mathrm{p}}\right)}{G+G_{\mathrm{p}}+\frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^{*}}}\left(\frac{G}{G+G_{\mathrm{p}}}-\frac{C}{C+C_{\mathrm{p}}}\right) \tag{6-26}$$

$$\tau_{\mathrm{aus}} = \frac{C+C_{\mathrm{p}}}{G+G_{\mathrm{p}}} \tag{6-27}$$

In den Gln. 6-21 – 6-27 sind sechs Parameter variierbar, welches eine Vielzahl von Kombinationen möglich macht. Für diese Arbeit sind insbesondere der Einfluss der Leitfähigkeiten G und G_{p} auf die Stromantwort von Interesse. Deshalb wird das Modell in den folgenden Simulationen zum einen unter dem Aspekt von unterschiedlich modulierbaren und zum anderen im Hinblick auf sich gleichartig verhaltende Leitfähigkeiten G und G_{p} betrachtet. Diese Unterscheidung wurde gewählt, da diese Art der Parametervariation für die in Kap. 6.3 durchgeführte Gegenüberstellung von experimentellem Ergebnis und theoretischem Modell relevant ist.

Simulationen unter der Annahme von unterschiedlich variierbarem G und G_{p}. Mit den Gln. 6-21 und 6-25 für den An- und Ausschaltprozess nach Modell 3 wurde die Stromantwort des Systems zunächst unter der Annahme $G_{\mathrm{p}} = G = 1\cdot10^{-12}$ S (Simulation 3-1) simuliert. Der dazugehörige Graph ist in Abb. 6-9 als durchgezogene Linie dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf dem von Simulation 1-1 entspricht. Da sich die Modelle 1 und 3 einzig in dem Parameter $R = G^{-1}$ unterscheiden und den übrigen Parametern in den Simulation 1-1 und 3-1 jeweils gleiche Werte zugewiesen wurden, kann geschlossen werden, dass G mit einem Wert von $1\cdot10^{-12}$ S keinen signifikannten Einfluss auf die Stromantwort nimmt.

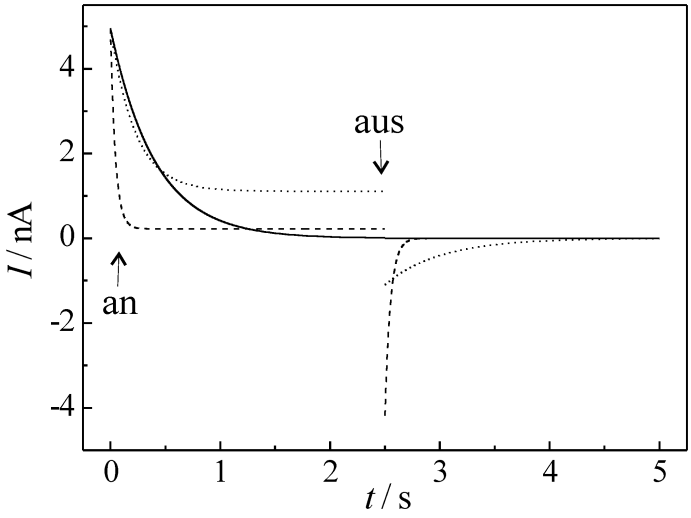


Abb. 6-9: Simulationen nach **Modell 3** unter Verwendung folgender Werte, wobei $R = G^{-1}$ gilt: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 5\cdot10^{-7}$ A, $C = 1\cdot10^{-8}$ F, $C_p = 1\cdot10^{-6}$ F, (—) **Simulation 3-1:** $G_p = G = 1\cdot10^{-12}$ S, (····) **Simulation 3-2:** $G_p = 2\cdot10^{-6}$ S und $G = 1\cdot10^{-8}$ S, (---) **Simulation 3-3:** $G_p = 2\cdot10^{-5}$ S und $G = 1\cdot10^{-8}$ S.

In Simulation 3-2 wurden unter der Annahme, dass G weniger stark modifizierbar ist als G_p, der erstgenannte Parameter um vier und G_p um sechs Größenordnungen erhöht. Es ist zu erkennen (Abb. 6-9, gepunktete Linie), dass der Einschaltstrom dadurch neben einem, im Vergleich zu Simulation 3-1 etwas steileren, transienten Strom einen von Null verschiedenen stationären Strom zeigt. Wird der Parameter G_p in Simulation 3-3 nochmals um eine Größenordnung erhöht, so resultiert dies in einem noch steileren Verlauf des Transienten. Dagegen zeigt sich nach Simulation 3-3 (Abb. 6-9, unterbrochene Linie) ein stationärer Strom, dessen Betrag kleiner ist als nach Simulation 3-2. Im Gegensatz dazu modifiziert eine Leitfähigkeitserhöhung den Ausschaltstrom in der Weise, dass bezüglich des Maximums und des transienten Verlaufs des Stroms ein einheitlicher Trend zu erkennen ist. Wie auch schon in den Simulationen 1-1 bis 1-3 gesehen, tritt im Ausschaltvorgang für $G_p > 1\cdot10^{-8}$ S ein prominenter transienter Strom mit negativem Vorzeichen auf, dessen Zeitkonstante mit steigendem G_p abnimmt.

Um zu klären, welchen Einfluss eine Änderung der Leitfähigkeiten G und G_p auf den stationären Strom hat, soll dieser in Gl. 6-23 definierte Parameter genauer betrachtet werden. An den Parametern der Simulationen 3-2 und 3-3 ist zu erkennen, dass sich G und G_p um einen Faktor f von 1000 unterscheiden. Unter Verwendung der in Simulation 3-2 zugewiesenen Werte für $I_{p,0}$, U^* und G wurde I_{stat} in Abhängigkeit von dem Parameter G_p, der über mehrere Größenordnungen von 10^{-4} - 10^{-9} S variiert wurde, nach Gl. 6-23 berech-

net (Abb. 6-10). Es ist zu erkennen, dass I_{stat} bei einem festen Wert von G maximal wird für $G_p << G$, und gegen Null geht, wenn gilt $G_p >> G$. Dagegen ist die Änderung von I_{stat} für G_p im Bereich von 10^{-5} - 10^{-6} S am signifikantesten. In der hier durchgeführten Berechnung entspricht dies der Größenordnung des Quotienten aus $I_{p,0}$ und U^*.

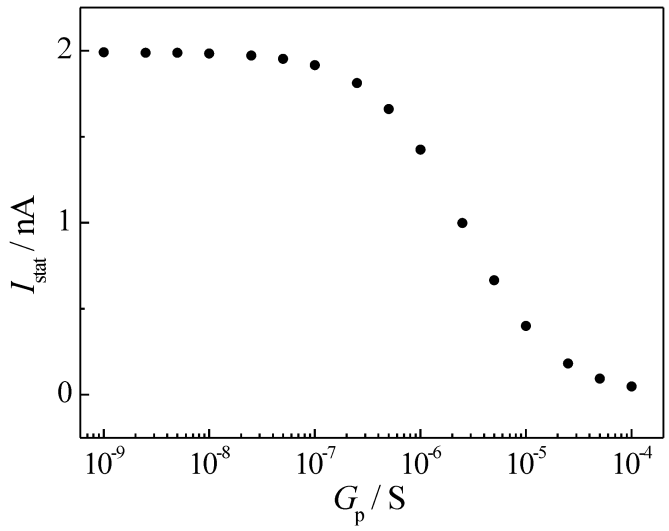


Abb. 6-10: Berechnung des stationären Stroms I_{stat} basierend auf Gl. 6-23 unter Verwendung der folgenden Parameter: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 5 \cdot 10^{-7}$ A und $G = 1 \cdot 10^{-8}$ S.

Aus dieser Betrachtung kann gefolgert werden, dass I_{stat} dann stark zwischen Null und einem durch G determinierten Wert I variiert, wenn G_p in einem Größenbereich moduliert wird, der vom Quotienten aus $I_{p,0}$ und U^* festgelegt ist.

Simulationen unter der Annahme von gleichförmig variierbarem G und G_p. Es wird in Simulation 3-4 mit $C = 1 \cdot 10^{-8}$ F und $C_p = 1 \cdot 10^{-9}$ F zunächst von sehr kleinen Leitfähigkeiten $G = G_p = 1 \cdot 10^{-12}$ S ausgegangen (Abb. 6-11, durchgezogene Linie). Statt die beiden Leitfähigkeitsparameter nun unterschiedlich stark zu variieren, wurden ihre Werte für die Simulation 3-5 bei $G = G_p = 5 \cdot 10^{-9}$ S festgehalten. In Analogie zu den Simulationen 3-2 und 3-3 ist unter Erhöhung der Leitfähigkeit im Einschaltvorgang nun ein stationärer Strom zu erkennen. Dagegen ändert sich der Wert der Zeitkonstante τ_{an} (Gl. 6-24) von Simulation 3-4 zu 3-5 nicht, da der Quotient aus $I_{p,0}$ und U^* groß ist gegenüber G und G_p. Werden G und G_p auf $5 \cdot 10^{-8}$ S (Simulation 3-6) erhöht, setzt sich der Trend bezüglich der Zunahme von I_{stat} und $I_{aus,max}$ mit steigenden Leitfähigkeiten fort (Abb. 6-11, unterbrochene Linie). Im Vergleich zu den im vorangegangenen Abschnitt

durchgeführten Simulationen bleibt der Faktor f = G_p/G nach Änderung der Leitfähigkeit hier konstant. Dies ist entscheidend für eine kontinuierliche Steigerung der Betrags von I_{stat} in Abhängigkeit einer Erhöhung der Parameter G und G_p.

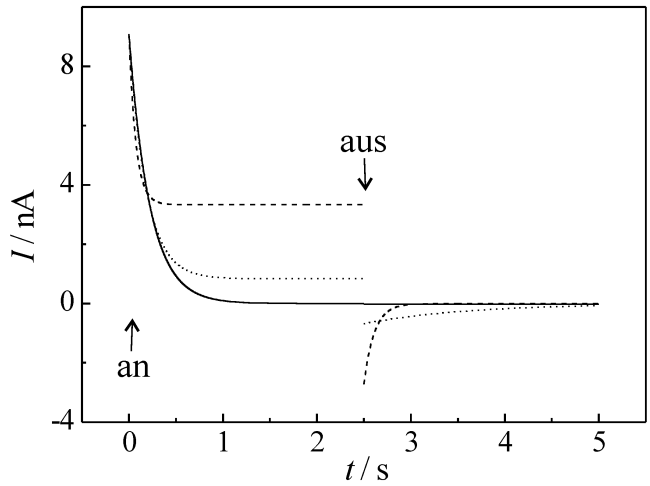


Abb. 6-11: Simulationen nach **Modell 3** unter Verwendung folgender Werte, wobei $R = G^{-1}$ gilt: $U^* = 0{,}2$ V und $I_{p,0} = 1\cdot10^{-8}$ A. $C = 1\cdot10^{-8}$ F, $C_p = 1\cdot10^{-9}$ F (—) **Simulation 3-4:** $G_p = G = 1\cdot10^{-12}$ S, (---) **Simulation 3-5:** $G_p = G = 5\cdot10^{-9}$ S**,** (····) **Simulation 3-5:** $G_p = G = 5\cdot10^{-8}$ S.

6.2.5 Simulation des Einflusses eines Dämpfungsglieds auf die Photostromantwort

Die bisher berechneten Protonenpumpströme stellen die theoretische Antwort eines mit BR-dotierten Messsystems auf einen Belichtungspuls dar. In der Praxis wird die durch den lichtinduzierten Ladungstransport generierte Potentialdifferenz mittels eines Strom-Spannungs-Wandlers mit integriertem Dämpfungsglied detektiert. Das Dämpfungsglied bzw. der Filter erlaubt die Aufzeichnung des Messsignals unter Verringerung des Signalrauschens. Dabei wird aber auch, je nach Größenordnung der Zeitkonstante τ_d des Dämpfungsglieds, das zu detektierende Signal modifiziert. Um dies zu veranschaulichen, wurde der Photostrom des Einschaltvorgangs nach Modell 1 unter Einfluss eines Filters berechnet. Der Einfluss eines Dämpfungsglieds auf eine Spannung U ist in Gl. 3-10 angegeben. Im Folgenden wird die durch den Filter modifizierte Protonenpumpaktivität U_p mit dem Parameter U_p' bezeichnet. Wird in Gl. 6-3 U_p durch U_p' ersetzt und eine Lösung für die Differenzialgleichung gefunden, kann ein Ausdruck des modifizierten Proto-

nenpumpstroms formuliert werden (Gl. 10-1). In Abb. 6-12 sind in Form der schwarzen Kurven die Simulationen 1-4 und 1-5 mit $G_p = 1 \cdot 10^{-8}$ S dargestellt. Die unterbrochene Linie kennzeichnet den Verlauf in Abwesenheit eines Dämpfungsglieds. Durch die Berücksichtigung eines Dämpfungsglieds mit einer Zeitkonstante von 100 ms wird der Protonenpumpstrom in zweifacher Hinsicht moduliert. Zum einen kann die Amplitude des maximalen Einschaltstroms nicht vollständig dargestellt werden, zum anderen wird die Zeitkonstante des transienten Stroms in den ersten 500 ms des Anschaltprozesses moduliert. Daneben ist in Abb. 6-12 in Form der roten Graphen die Stromantwort nach einer Leitfähigkeitserhöhung auf $G = 1 \cdot 10^{-6}$ S dargestellt. In Simulation 1-7 wird der maximale Einschaltstrom unter Einfluss des Filters mit einer noch größeren Abweichung vom dem Wert in Abwesenheit des Dämpfungsglieds wiedergegeben als in Simulation 1-5. Zudem wird der transiente Strom durch den Filter modifiziert, welches an einer Abnahme der Zeitkonstanten τ_{an} zu erkennen ist.

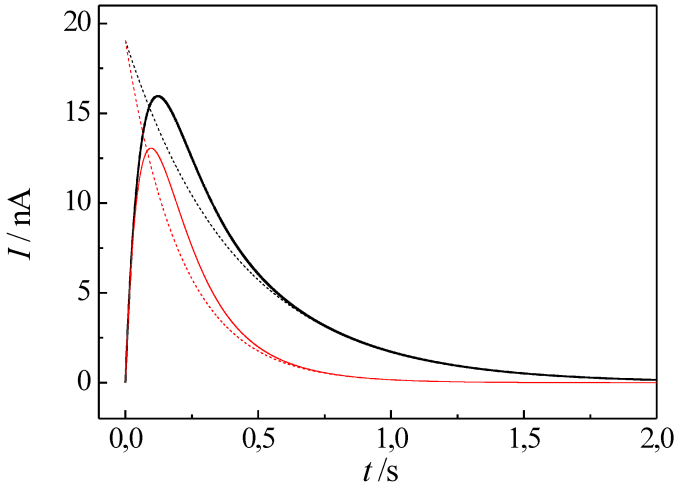


Abb. 6-12: Simulierte Photostromantworten basierend auf **Modell 1** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}02$ V, $I_{p,0} = 2 \cdot 10^{-8}$ A, $C = 4 \cdot 10^{-7}$ F, $C_p = 2 \cdot 10^{-8}$ F; (schwarze Kurven): $G_p = 1 \cdot 10^{-8}$ S; (rote Kurven) $G_p = 1 \cdot 10^{-6}$ S. Stromantworten in Abwesenheit eines Dämpfungsglieds: (····) **Simulation 1-4:** $\tau_{an} = 0{,}35$ s, (····) **Simulation 1-5:** $\tau_{an} = 0{,}29$ s. Stromantworten in Anwesenheit eines Dämpfungsglieds mit einer Zeitkonstante von 100 ms: (—) **Simulation 1-6:** $\tau_{an} = 0{,}20$ s, (—) **Simulation 1-7**: $\tau_{an} = 0{,}18$ s. Die Zeitkonstanten wurden in einem Intervall von 0 – 500 ms ermittelt.

6.3 Untersuchung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin an Modellmembranen

In diesem Abschnitt wird zunächst die Protonenpumpaktivität von BR-haltigen Membranen in Form von Purpurmembran (PM)-Fragmenten bzw. Proteoliposomen dargestellt, die an lösungsmittelhaltigen Membranen (*painted membranes*) auf Gold adsorbiert waren. Ähnliche Systeme sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Seifert et al., 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit dienten diese Untersuchungen dazu, zunächst die Aktivität der eingesetzten BR-Moleküle an einer bekannten Messanordnung zu verifizieren. Des Weiteren galt es, unter Berücksichtigung der theoretischen Modelle ein Verständnis für die elektrischen Eigenschaften einzelner Systemkomponenten zu entwickeln. Der Fokus lag dabei insbesondere auf der Untersuchung der unterschiedlichen Membrantypen sowie der Funktion des Thiols CPEO3 als *Spacer*-Lipid.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse konnten dazu beitragen, die Ergebnisse der Aktivität von Bacteriorhodopsin (BR), das durch die Fusion von Proteoliposomen in festkörperunterstützte und porenüberspannende Membranen integriert wurde, einzuordnen. Dabei war es das Ziel, das Protein in hoher Dichte zu integrieren, um die beiden Systeme bezüglich der beobachteten Protonenpumpaktivität vergleichen zu können. Die Ergebnisse der Photostrommessungen sind in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen kann anhand der BR-Aktivität die Eignung der hier etablierten Systeme bezüglich der Integration komplexer Proteine verifiziert werden. Zum anderen können die Membranen neben der Impedanzspektroskopie mit einer weiteren Methode elektrochemisch charakterisiert werden, was zur Aufklärung einzelner Strukturen beitragen soll. BR ist dazu besonders geeignet, da anhand dessen charakteristischer Protonenpumpaktivität kapazitiv angekoppelte und membranintegrierte Proteine voneinander unterschieden werden können. Zudem wurde auch der membranlösliche Protonencarrier CCCP eingesetzt, der die Lipidmembran derart modifiziert, dass sie durchlässiger für Protonen wird (Kasianowicz et al., 1984). Die Photostromantworten wurden zusammen mit Simulationen basierend auf einem geeigneten theoretischen Modell und experimentell ermittelten Impedanzdaten dazu genutzt, schematische Modelle der elektrochemischen Systeme zu entwickeln.

6.3.1 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen Membranen adsorbiert an *painted membranes* auf Goldelektroden

Im Folgenden werden Untersuchungen von BR-haltigen Membranen an lösungsmittelhaltigen Lipiddoppelschichten auf Goldelektroden vorgestellt. Nach kurzen Ausführungen zur Impedanzanalyse der *painted membranes* wird im Einzelnen genauer auf die Photostrommessungen eingegangen, die an Membranen mit immobilisierten PM-Fragmenten bzw. BR-haltigen Vesikeln erstellt wurden. Dabei wurde eine detaillierte Studie zur Abhängigkeit der Protonenpumpströme von der Konzentration des Protonencarriers CCCP durchgeführt. Zudem wurde die Stromantwort von aktivem BR in Simulationen nach geeigneten Modellen nachgestellt.

Impedanzverhalten von *painted membranes*. Zur Herstellung von Lipiddoppelschichten mit Hilfe der *painting*–Methode wurden die Lipide DPhPC/DOPC in einem molaren Verhältnis von 6:4 in *n*-Dekan gelöst. Um die Adsorption der negativ geladenen PM-Fragmente bzw BR-haltigen Vesikel zu forcieren, wurden 0,1 mol % der kationischen Verbindung ODA beigemischt. Zur Gewinnung einer hydrophoben Goldelektrode wurde diese für 12 h mit dem Thiol CPEO3 inkubiert. Mit Hilfe der *painting*-Methode (Kap. 3.5.9) sollte auf dem Substrat eine zweite Lipidmonoschicht generiert werden. Nach Zugabe des Lipid-Lösungsmittel-Gemischs zu der impedanzspektroskopisch charakterisierten, CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode (Abb. 6-13, offene Quadrate) und anschließendem intensiven Spülen mit Pufferlösung konnte das in Abb. 6-13 (offene Kreise) gezeigte Impedanzspektrum erhalten werden. Die Auswertung der Impedanzspektren basierte auf einem *RC*-Kreis, der den Widerstand des Elektrolyten R_Ω in Serie zu der Kapazität der Grenzschicht C_m repräsentiert. Die Kurvenanpassung liefert in guter Übereinstimmung mit dem Verlauf der Datenpunkte für die CPEO3-Monoschicht eine Kapazität von $C_m = 6{,}4 \cdot 10^{-8}$ F. Dies entspricht unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche $A = 0{,}0452$ cm^2 einer spezifischen Kapazität von 1,4 µF cm^{-2}. Die Anpassung eines *RC*-Kreises an das Impedanzspektrum nach Anwendung der *painting*-Methode stimmt nicht ganz mit dem Datenverlauf überein, welches auf nicht ideal kapazitives Verhalten der Grenzschicht hindeuted. Dies könnte auf eine ungleichmäßige Ausbildung der zweiten Lipidmonoschicht unter Verbleib von Lösungsmittel im System hinweisen.

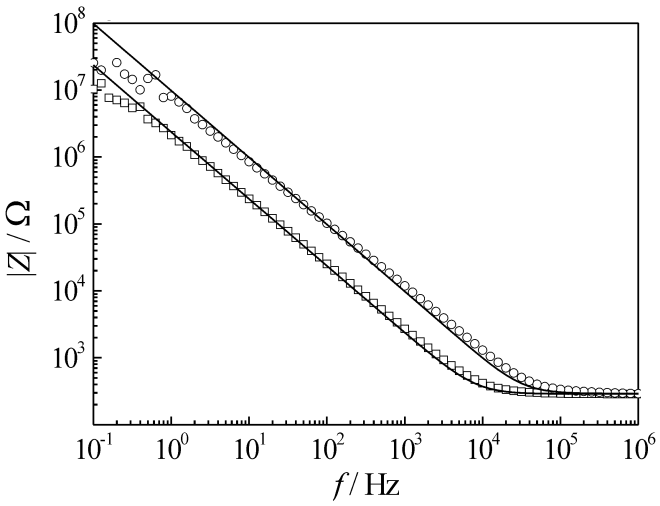


Abb. 6-13: Impedanzspektren (□) einer CPEO3-Monoschicht und (○) einer Lipiddoppelschicht präpariert nach der *painting*-Methode mit DPhPC und DOPC 6:4, 0,1 mol % ODA. Als Basis für die Datenanpassung diente ein *RC*-Kreis (Abb. 4-5 C2): (□) R_Ω = 300 Ω und C_m = 6,4·10^{-8} F, (○) R_Ω = 305 Ω und C_m = 1,6·10^{-8} F. Puffer: 10 mM TRIS/HCl, 100 mM KCl, pH 7,4.

In anderen Messungen wurde dies teilweise noch ausgeprägter beobachtet. Die Kapazität der Doppelschicht C_m wurde für das in Abb. 6-13 gezeigte Beispiel zu 1,6·10^{-8} F bestimmt. In Abhängigkeit von der Elektrodenfläche ergibt sich eine spezifische Kapazität $C_{m,sp}$ = 0,35 µF cm^{-2}. Aus sechs unabhängigen Experimenten wurde ein Mittelwert von $C_{m,sp}$ = (0,4 ± 0,1) µF cm^{-2} erhalten. Anhand dieser Daten wurde unter Berücksichtigung der Kirchhoff'schen Regel für Kondensatoren in Serienschaltung die Kapazität der zweiten Lipidmonoschicht berechnet (vgl. Gl. 4-2) und Werte zwischen 0,3 und 0,7 µF cm^{-2} erhalten. Verglichen mit den in dieser Arbeit hergestellten Präparationen ist für *painted membranes*, die auf Alkanthiolmonoschichten präpariert wurden, ein nahezu ideales, durch einen *RC*-Kreis vorgegebenes Verhalten beobachtet worden (Höfer, 2007). Für die zweite, ausschließlich aus DPhPC bestehende Lipidmonoschicht in den von Höfer durchgeführten Experimenten wurden Werte von 0,8 bis 1,1 µF cm^{-2} angegeben. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit DPhPC-Schichten nach der *painting*-Methode von Horn (2005) auf DPPTE-funktionalisierten Goldelektroden erhalten.

Es stellt sich die Frage, weshalb die zweite Lipidmonoschicht in dem hier untersuchten System kleinere Werte besitzt als in den genannten Vergleichssystemen. Ein signifikanter Unterschied besteht darin, dass in dieser Arbeit neben DPhPC das Lipid DOPC in einem Anteil von 40 % beigemischt war. Es ist denkbar, dass die ungesättigten Fettsäureketten des DOPC in dem eher dichten Gefüge der DPhPC-Moleküle die Membranstruktur auf-

weiten und so die Einlagerung größerer Lösungsmittelmengen ermöglichen. Daneben ist auch in Betracht zu ziehen, dass organisches Lösungsmittel in Lücken von nicht ideal ausgebildeten CPEO3-Schichten oder in deren Ethoxybereich angereichert wird.

Abschließend wird festgehalten, dass aus dem elektrischen Verhalten der *painted membranes* noch auf einen gewissen Anteil von *n*-Dekan geschlossen wird, wodurch die Dielektrizitätskonstante und damit die Kapazität der Grenzschicht sinken. Dies wird in der weiteren Betrachtung des Systems berücksichtigt werden.

Photostrommessungen an immobilisierten PM-Fragmenten und Simulationen. Eine lösungsmittelhaltige Membran, präpariert auf einer Goldelektrode, wurde mit einer wässrigen Suspension von PM-Fragmenten inkubiert. In Photostrommessungen wurde die Immobilisierung der PM-Fragmente nach einer Inkubationsdauer von 60 min anhand der Aktivität der darin integrierten BR-Moleküle verifiziert.

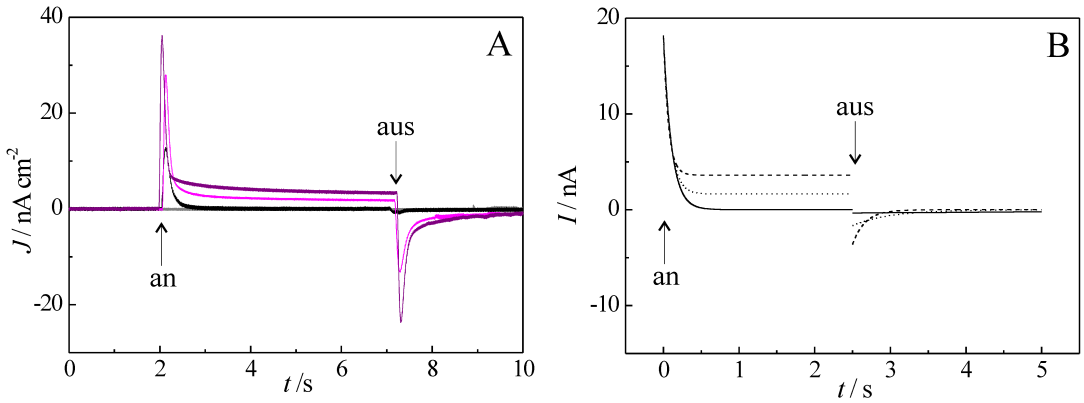


Abb. 6-14: A Protonenpumpströme induziert durch Belichtung von PM-Fragmenten, adsorbiert an eine *painted membrane* (2 % DPhPC/DOPC 6:4, 0,1 mol % ODA) auf CPEO3-funktionalisiertem Gold (▬) in Abwesenheit und in Gegenwart von (▬) 5 µM CCCP bzw. (▬) 15 µM CCCP. Die Pfeile markieren Start und Ende des Belichtungsprozesses. (▬) markiert die Messung in Abwesenheit von BR. Dämpfungsglied: 100 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **B** Simulationen basierend auf **Modell 3** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 1\cdot10^{-7}$ A, $C_p = 4{,}5\cdot10^{-8}$ F und $C = 1\cdot10^{-8}$ F, (—) $G_p = 1\cdot10^{-8}$ S und $G = 1\cdot10^{-10}$ S, (····) $G_p = 1\cdot10^{-7}$ S und $G = 1\cdot10^{-8}$ S sowie (---) $G_p = 3\cdot10^{-7}$ S und $G = 3\cdot10^{-8}$ S.

In Abb. 6-14 A sind die Photostromantworten des Systems unter verschiedenen Versuchsbedingungen gezeigt. Die schwarze Kurve markiert den Protonenpumpstrom in Abwesenheit des Protonencarriers CCCP. Neben einem deutlichen transienten Strom nach dem Anschalten der Lichtquelle, der innerhalb von 0,5 s gegen Null strebt, ist ein nur kaum von der Nulllinie diskriminierbarer Ausschaltstrom zu erkennen. In Anwesenheit von CCCP

wird die Stromantwort signifikant modifiziert. So werden durch die graduelle Erhöhung der Konzentration c_{CCCP} zum einen ein erhöhter stationärer Strom J_{stat} und zum anderen eine Zunahme der Maximalsstromdichten J_{max} im An- und Ausschaltprozess aufgezeichnet. Um das Messsystem anhand eines elektrochemischen Modells diskutieren zu können, wurden die Beobachtungen aus Abb. 6-14 A mit den Stromkurven verglichen, die in Kap. 6.2 beispielhaft für drei theoretische Modelle simuliert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass alleinig mit Modell 3 das gleichzeitige Auftreten eines transienten und stationären Stroms erklärt werden kann. Somit ergibt sich daraus der in Abb. 6-15 schematisch dargestellte Modellvorschlag für die untersuchte Messanordnung, wobei das Netzwerk nach Modell 3 zur Veranschaulichung der Überlegungen eingezeichnet ist. Während mit der ersten Masche des Netzwerks die kapazitiven und resistiven Eigenschaften der PM-Fragmente zusammen mit den aktiven BR-Molekülen in Form einer Stromquelle berücksichtigt werden, symbolisiert die zweite Masche die Lipiddoppelschicht auf Gold.

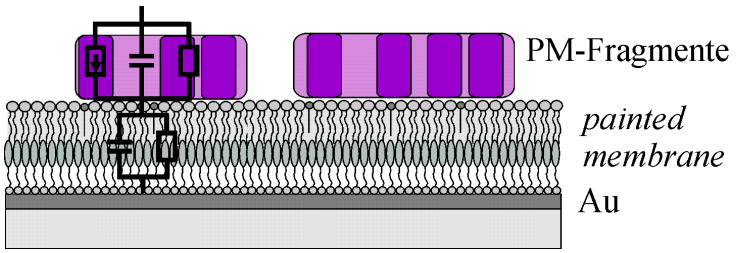


Abb. 6-15: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Modells zur Messanordnung von immobilisierten PM-Fragmenten auf einer *painted membrane*. Das eingezeichnete Netzwerk entspricht Modell 3 (Kap. 6.2.4).

Damit konnten basierend auf Modell 3 Simulationen durchgeführt werden, in welche die impedanzspektroskopischen Erkenntnisse zur Kapazität der *painted membrane* mit $C = 1 \cdot 10^{-8}$ F einflossen. Der Wert liegt um mehr als eine Größenordnung unter der Kapazität C_{au} einer Goldelektrode. Damit begrenzt die metallische Grenzschicht den Ladungsfluss weniger stark und hat somit in erster Näherung keinen entscheidenden Einfluss auf die Stromantwort, welches eine Vernachlässigung von C_{au} im theoretischen Modell erlaubt. Im Gegensatz dazu steht für die Kapazität der PM-Fragmente C_p kein experimentell ermittelter Wert zur Verfügung. Deshalb wird auf die bekannte spezifische Kapazität der PM-Fragmenten von etwa 1 µF cm^{-2} (Seifert et al., 1993) Bezug genommen. Unter der Annahme einer vollständigen Belegung wird mit der Elektrodenfläche $A_{au} = 0{,}0452$ cm^2 C_p mit $4{,}5 \cdot 10^{-8}$ F in den Simulationen berücksichtigt.

Die Leitfähigkeit G der *painted membrane* wird zunächst mit einem Wert von $1 \cdot 10^{-10}$ S festgelegt, der berücksichtigt, dass der Widerstand lösungsmittelhaltiger Membranen im Gigaohmbereich liegt. Dies konnte in Impedanzanalysen unter Verwendung eines geeigneten Frequenzfensters gezeigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Dagegen stehen für die elektrischen Eigenschaften der an die *painted membrane* adsorbierten PM-Fragmente keine Daten zur Verfügung. Es wird angenommen, dass die PM-Fragmente keine isolierende Schicht bilden, was zu einem Ausgleich des aufgebauten Protonengradienten und damit zu hoher Leitfähigkeit G_p führen würde. Steinem (1997) dagegen postulierte, dass dies nur die Randbereiche der PM-Fragmente betrifft und die BR-Moleküle im Inneren dieser eine hochohmige Ankopplung an die unterliegende Membran besitzen. Zudem ist bekannt, dass PM-Fragmente eine hochgeordnete Lipid-Protein-Struktur (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971) besitzen, weshalb ihnen hier eine vergleichweise geringe Leitfähigkeit $G_p = 1 \cdot 10^{-8}$ S zugewiesen wird. Die Konstanten U^* und $I_{p,0}$ flossen mit 0,2 V bzw. $1 \cdot 10^{-7}$ A in die Berechnungen ein.

Mit den gewählten Parametern konnte die in Abb. 6-14 B als durchgezogene Linie dargestellte Stromantwort simuliert werden, die wie das Experiment einen prominenten transienten Einschaltstrom und einen Ausschaltpeak von nur geringer Amplitude zeigt. Um den Einfluss von CCCP auf das Membransystem nachzustellen, wurden die Leitfähigkeiten erhöht. Die Strukturformel des Protonencarriers ist in Abb. 6-16 dargestellt. Selbst in der deprotonierten Form bleibt CCCP membranlöslich, da die Ladung über das gesamte Molekül delokalisiert ist.

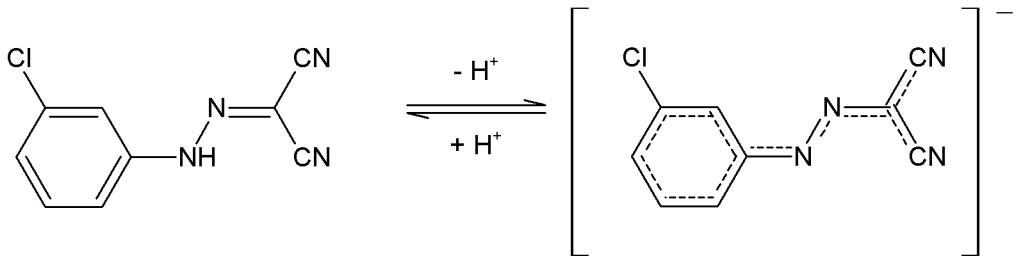


Abb. 6-16: Strukturformel und Funktionsweise des membranlöslichen Protonencarriers CCCP.

Kasianowicz et al. (1984) konnten zeigen, dass der Einfluss von CCCP auf Membranen mit kleineren Dielektrizitätskonstanten ε_r geringer ist als auf solche mit größeren. Hinsichtlich des Impedanzverhaltens der *painted membrane*, das auf einen gewissen Lösungsmittelanteil und damit eher auf einen niedrigen Wert für ε_r hinweist, wurde in den

Simulationen eine geringere Leitfähigkeitsänderung für die Lipiddoppelschicht mit $G = 1 \cdot 10^{-8}$ S bzw. $G = 3 \cdot 10^{-8}$ S berücksichtigt als für die PM-Fragmente mit $G_p = 1 \cdot 10^{-7}$ S bzw. $G_p = 3 \cdot 10^{-7}$ S. Das Verhältnis der beiden Parameter zueinander bleibt damit gleich, weshalb nach Gl. 6-23 eine konstante Zunahme von J_{stat} erwartet und, wie in Abb. 6-14 B zu sehen, berechnet wurde. Daneben wird deutlich, dass in den Simulationen die im Experiment beobachtete Zunahme der maximalen Ausschaltstromdichte dargestellt werden kann. Auch die Tatsache, dass sich mit dieser Leitfähigkeitserhöhung die Zeitkonstanten τ des transienten Einschaltstroms kaum verändern werden, bestätigt die Beobachtungen der Photostrommessungen. Die Gegenüberstellung von Experiment und Simulation zeigt also, dass die an diesem Messaufbau detektierte Protonenpumpaktivität mit dem gewählten theoretischen Modell 3 gut beschrieben werden kann. Um diese Feststellung detaillierter in Bezug zu einzelnen Komponenten des elektrochemischen Systems stellen zu können, werden einige Charakteristika der experimentell ermittelten Strom-Zeit-Kurven, wie etwa J_{stat} und J_{max} quantitativ analysiert.

Zunächst sei erwähnt, dass hinsichtlich der Zeitkonstanten der transienten Ströme τ_{an} und τ_{aus} keine Quantifizierung erfolgen kann, da diese in einem Zeitintervall liegen, das maßgeblich durch die Zeitkonstante des Filters τ_d = 100 ms bestimmt wird. Daneben nimmt das Dämpfungsglied in gewissem Maße Einfluss auf die Maximalstromdichten J_{max} nach dem An- und Ausschalten der Lichtquelle (siehe Kap. 6.2.5). Dennoch ist, wie in Abb. 6-17 zu sehen, mit Erhöhung der CCCP-Konzentration ein deutlicher Trend von J_{max} zu größeren Amplituden im Ein- und Ausschaltprozess zu erkennen. Die Zunahme des Betrags von $J_{aus,max}$ kann mit dem CCCP-vermittelten und dadurch schnelleren Abbau des Protonengradienten am Ende der Belichtungszeit begründet werden. Die Simulationen in Abb. 6-14 B zeigen, dass diese Beobachtung mit dem gewählten, theoretischen Modell nachvollzogen werden kann. Dagegen ist die Zunahme von $J_{an,max}$ mit c_{CCCP} durch das hier aufgestellte elektrische Modell nicht erklärbar. In dieser Arbeit wurden in Abwesenheit von CCCP maximale Stromdichten von 10 – 30 nA cm^{-2} erhalten.

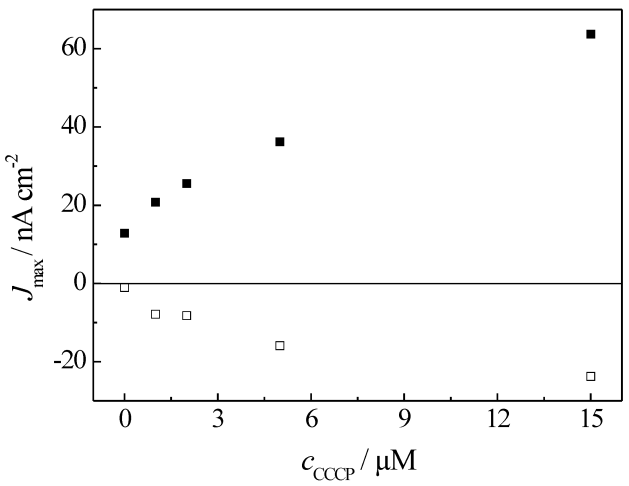


Abb. 6-17: Auftragung des Betrags der maximalen Stromdichten J_{max} nach Anschalten (■) und Abschalten (□) der Lichtquelle in Abhängigkeit von der CCCP-Konzentration. Dämpfungsglied: τ_d = 100 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

Neben den Maximalstromdichten wurde der stationäre Strom als Funktion von c_{CCCP} ermittelt (Abb. 6-18). Aus Gl. 6-23 wird ersichtlich, dass der stationäre Strom unter anderem von der Leitfähigkeit G der Lipiddoppelschicht abhängt. Le Blanc (1971) konnte in Experimenten an lösungsmittelhaltigen, freitragenden Membranen den in Gl. 6-28 angegebenen linearen Zusammenhang zwischen Protonencarrierkonzentration und Membranleitfähigkeit ermitteln:

$$G = G_0 + \mathrm{s} \cdot c_{CCCP} \tag{6-28}$$

wobei G_0 die Leitfähigkeit bei unendlich niedriger CCCP-Konzentration c_{CCCP} angibt. Der Parameter s ist eine systemspezifische Konstante mit der Einheit S µM^{-1}. Gl. 6-28 gilt allerdings nur bis zu CCCP-Konzentrationen in einer Größenordnung von 10^{-5} µM, darüber hinaus ist der Zusammenhang zwischen G und c_{CCCP} nicht mehr linear. Durch Zusammenführung der Gln. 6-23 und 6-28 wird folgender Ausdruck für den stationären Strom J_{stat} erhalten (Gl. 6-29):

$$J_{stat} = J_{p,0} \frac{G_0 + \mathrm{s} \cdot c_{CCCP}}{\left(G_0 + \mathrm{s} \cdot c_{CCCP}\right) + G_p + \frac{J_{p,0}}{U^*}} \tag{6-29}$$

Darin wird zunächst nur eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit G der *painted membrane* von c_{CCCP} angenommen. Basierend auf Gl. 6-29 wurde an den Daten eine Kurvenanpassung durchgeführt. Die Membranleitfähigkeiten G und G_p wurden dafür mit den Werten als nicht variabel festgelegt, die so auch in den Simulationen (Abb. 6-14 B) gewählt wurden. Unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche wurden die Parameter als spezifische Größen G_{sp} = 2 nS cm^{-2} sowie $G_{p,sp}$ = 221 nS cm^{-2} eingesetzt.

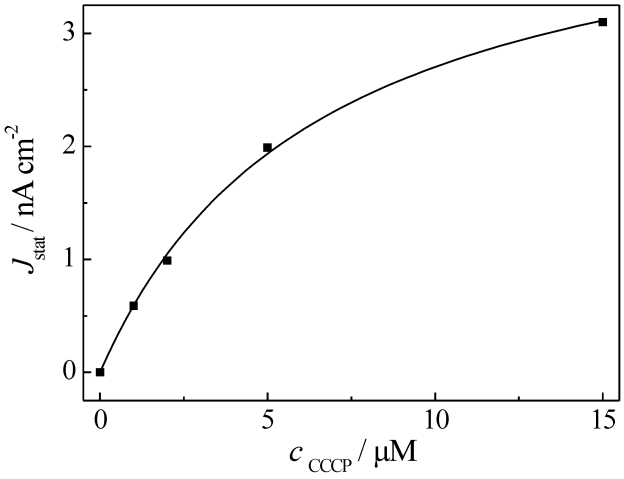


Abb. 6-18: Auftragung der stationären Stromdichte J_{stat}, die am Ende der Belichtungszeit von 5 s erreicht wurde, als Funktion der CCCP-Konzentration: Die Kurvenanpassung (—) basierend auf Gl. 6-29 liefert unter Verwendung der Werte $G_{0,sp}$ = 2 nS cm^{-2}, $G_{p,sp}$ = 221 nS cm^{-2} und U^* = 4,4 V folgendes Ergebnis: $J_{p,0}$ = (4,5 ± 0,2) nA cm^{-2} und s = (32 ± 3) nS cm^{-2} µM^{-1}. Dämpfungsglied: 100 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

Die Konstante U^* wurde abgeleitet von dem Wert 0,2 V (Abb. 6-14 B) während der Kurvenanpassung mit 4,4 V festgehalten. Unter Erhalt der Werte $J_{p,0}$ = (4,5 ± 0,2) nA cm^{-2} und s = (32 ± 3) nS cm^{-2} µM^{-1} wird eine gute Übereinstimmung zwischen Daten und Kurvenanpassung beobachtet. Dagegen wurden für den Fall, dass in Gl. 6-29 auch eine CCCP-Abhängigkeit von G_p berücksichtigt wird, keine sinnvollen Anpassungen erhalten. Hendler et al. (2000) konnten jedoch zeigen, dass CCCP auch in die kristallinartigen PM-Fragmente partitioniert und deren Leitfähigkeit beeinflusst. Der in Gl. 6-29 gezeigte Zusammenhang ist somit nur in erster Näherung für die hier untersuchte Messanordnung gültig.

Photostrommessungen an immobilisierten BR-haltigen Vesikeln und Simulationen. Analog zu den Experimenten mit PM-Fragmenten konnten BR-haltige Vesikel auf lösungsmittelhaltigen, festkörperunterstützten Membranen immobilisiert werden. Die Proteoliposomen wurden nach der in Kap. 3.5.8.2 erläuterten *reverse phase*-Methode präpariert. Die Protonenpumpaktivität des Proteins nach Adsorption der Vesikel an die Membran ist in Abb. 6-19 A in Abhängigkeit von der Zeit *t* dargestellt.

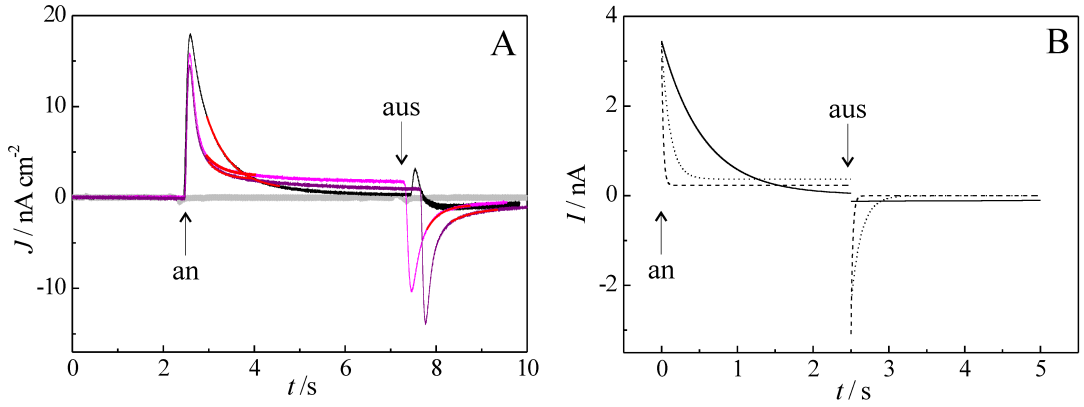


Abb. 6-19: A Protonenpumpströme von BR rekonstituiert in Vesikel (DPhPC/DOPC/DPPA 6:3:1, 1 mol % BR), immobilisiert auf einer *painted membrane* (2 % DPhPC, 0,1 mol % ODA) basierend auf einer CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode. Die Pfeile kennzeichnen den An- und Ausschaltvorgang. Das System wurde (▬) in Abwesenheit sowie in Gegenwart von (▬) 1 µM CCCP bzw. (▬) 20 µM CCCP untersucht. (▬) markiert die Messung in Abwesenheit von BR. Der Verlauf des transienten Stroms bei t_{an} bzw. $t_{au} > 500$ ms konnte durch Ermittlung von Zeitkonstanten τ mit einer Anpassung einer Exponentialfunktion 1. Ordnung (▬) an die Daten quantifiziert werden. Dämpfungsglied: 100 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **B** Simulationen nach **Modell 3** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 5\cdot10^{-9}$ A, $C_p = 4{,}5\cdot10^{-9}$ F, $C = 1\cdot10^{-8}$ F, (—) $G = 1\cdot10^{-10}$ S und $G_p = 1\cdot10^{-9}$ S, (---) $G = 1\cdot10^{-8}$ S und $G_p = 1\cdot10^{-7}$ S bzw. (····) $G = 3\cdot10^{-8}$ S und $G_p = 6\cdot10^{-7}$ S.

In Abwesenheit des Protonencarriers CCCP wird der Kurvenverlauf durch einen deutlich sichtbaren, transienten Strom im Einschaltvorgang und einen Peak von geringer Amplitude nach Abschalten der Strahlungsquelle bestimmt. Das Maximum in positiver Stromrichtung am Ende der Belichtung ist dabei als Messartefakt zu betrachten. Nach Zugabe von CCCP wird ein Protonenpumpstrom detektiert, der in seinem Verlauf signifikant verändert ist. Wie auf Grund der Funktion von CCCP als Protonencarrier zu erwarten, nehmen die Amplituden der Ausschaltstromdichten $J_{aus,max}$ mit der graduellen Erhöhung der Konzentration zu. Dagegen fällt die maximale Einschaltstromdichte $J_{an,max}$ mit zunehmender CCCP-Konzentration auf kleinere Werte ab. Bezüglich des stationären Stroms J_{stat} kann kein eindeutiger Trend in Abhängigkeit des Protonencarriers beobachtet werden.

Zur Erläuterung der beschriebenen Phänomene wurde zunächst ein elektrochemisches Modell vorgeschlagen (Abb. 6-20). Die Modellanordnung beinhaltet, dass Proteoliposomen auf der *painted membrane* adsorbiert vorliegen und deren Lipiddoppelschichten getrennt voneinander durch je eine Masche des Netzwerks zu betrachten sind. Für theoretische Simulationen der experimentell beobachteten Protonenpumpströme kann somit das in der Schemazeichnung ebenfalls berücksichtigte Netzwerk des Modells 3 (siehe Kap. 6.2.4) herangezogen werden.

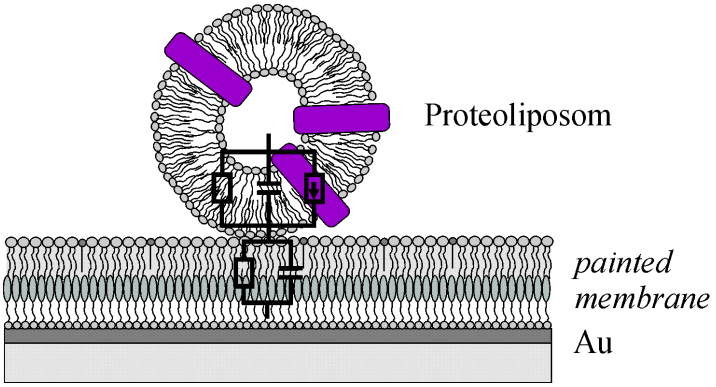


Abb. 6-20: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Modells zur Messanordnung von immobilisierten BR-haltigen Vesikeln auf einer *painted membrane*. Das eingezeichnete Netzwerk entspricht Modell 3 (Kap. 6.2.4).

Zur Durchführung von Simulationen für das postulierte elektrochemische System werden der *painted membrane*, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, die impedanzspektroskopisch ermittelten Werte $C = 1\cdot10^{-8}$ F und $G = 1\cdot10^{-10}$ S zugewiesen. Dagegen sind die elektrischen Parameter der Vesikel C_p und G_p experimentell nicht zugänglich. Mit der Hypothese, dass allein die Ladungstrennung an der Kontaktfläche zwischen den sphärischen Vesikeln und der Membran das detektierte Signal bestimmt, sollten die Parameter C_p und G_p kleiner sein als im Fall von PM-Fragmenten, die mit ihrer ganzen Fläche angekoppelt sind. Somit gingen C_p mit $4{,}5\cdot10^{-9}$ F und G_p mit $1\cdot10^{-9}$ S in die Berechnungen ein, wodurch der in Abb. 6-19 B als durchgehende Linie gezeigte Kurvenverlauf erhalten wurde. Des Weiteren wurde die Anwesenheit eines Protonencarriers simuliert und die Membranleitfähigkeit in zwei Schritten gesenkt. Um den stationären Strom so darstellen zu können, dass er von einer ersten Erhöhung mit $G = 1\cdot10^{-8}$ S und $G_p = 1\cdot10^{-7}$ S gegenüber einer zweiten mit $G = 3\cdot10^{-8}$ S und $G_p = 6\cdot10^{-7}$ S sinkt, musste zusätzlich das Verhältnis der Parameter zueinander variiert werden (vgl. Kap. 6.2.4). Die Zahlenwerte zeigen, dass sich der Quotient G_p/G mit dem ersten Wertepaar zu 10 und mit dem zweiten Paar zu 20

berechnet. Mit diesen Parameterwerten stimmt der Kurvenverlauf der Simulationen gut mit dem der Experimente überein. Dass diese Annahmen durchaus berechtigt sind, kann damit begründet werden, dass Lipidmembranen mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante, wie etwa *painted membranes* weitaus weniger durch CCCP modifiziert werden als solche mit höherer, wie z. B. Liposomen (Kasianowicz et al., 1984).

Um das Messsystem noch etwas genauer zu beleuchten, wurden die experimentell ermittelten Stromkurven quantitativ analysiert. So wurden der stationäre Strom J_{stat} und die maximalen Einschaltstromdichten J_{max} als Funktion der CCCP-Konzentration dargestellt (Abb. 6-21). Sowohl für J_{stat} als auch für $J_{an,max}$ ist bei 1 µM CCCP schon der in dieser Messreihe erhaltene Maximalwert zu verzeichnen, mit zunehmender CCCP-Konzentration werden beide Größen wieder etwas kleiner. Dagegen wird für $J_{aus,max}$ erst bei 5 µM CCCP die höchste Amplitude erreicht, die sich durch weitere Konzentrationserhöhung nicht mehr verändert.

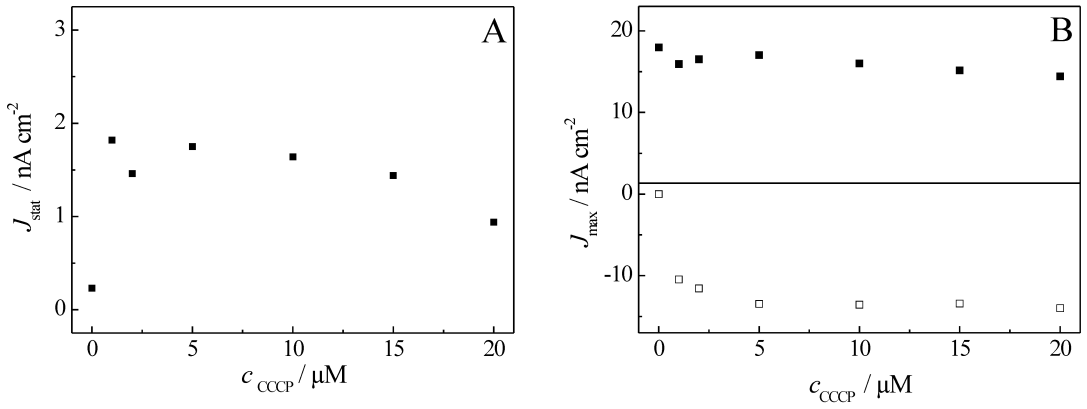


Abb. 6-21 A Stationärer Strom J_{stat} als Funktion der CCCP-Konzentration**. B** Maximale Stromdichten J_{max} der lichtinduzierten Photostromantwort von BR in Vesikeln, adsorbiert an eine *painted membrane* nach (■) Einschalten und (□) Ausschalten der Strahlungsquelle in Abhängigkeit von der CCCP-Konzentration. Dämpfungsglied: τ_d = 100 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

Eine Quantifizierung der transienten Ströme kann nicht nur hinsichtlich der Maximalstromdichten, sondern auch bezüglich der Krümmung der Messkurve nach Start und Ende der Belichtung durchgeführt werden. Dafür wurde eine Exponentialfunktion 1. Ordnung an die entsprechenden Datenpunkte angepasst, die nach t_{an} bzw. t_{aus} > 500 ms und somit außerhalb des Zeitintervalls liegen, das durch das Dämpfungsglied dominiert wird. In Abb. 6-19 A ist die Anpassung als rote Linie eingezeichnet. Die daraus erhaltenen Zeitkonstanten τ_{an} und τ_{aus} sind in Tab. 6-2 zusammengefasst.

Tab. 6-2: Zeitkonstanten τ_{an} und τ_{aus}, ermittelt in einer Kurvenanpassung basierend auf einer Exponentialfunktion 1. Ordnung an $J(t)$ (Abb. 6-19 A) von BR-haltigen Vesikeln immobilisiert an festkörperunterstützten Membranen auf Gold.

c_{CCCP} / µM	τ_{an}/ s	τ_{aus}/ s	$\frac{\tau_{an}}{\tau_{aus}}$
0	0,54	--	--
1	0,36	0,53	0,68
20	0,29	0,30	0,97

In Abwesenheit von CCCP konnte nach Einschalten der Lichtquelle die Zeitkonstante τ_{an} = 0,54 s bestimmt werden. Nach Zugabe des Protonencarriers erfolgt der Abfall der Stromdichte schneller, welches durch die Werte τ_{an} = 0,36 s für 1 µM und τ_{an} = 0,29 s für 20 µM CCCP quantifiziert wird. Die Zeitkonstanten τ_{aus} für den Ausschaltprozess wurden entprechend durch eine Kurvenanpassung bestimmt. So konnten für 1 µM CCCP ein Wert von τ_{an} = 0,53 s und für 20 µM CCCP τ_{an} = 0,30 s ermittelt werden. Für das Verhältnis der Zeitkonstanten τ_{an}/τ_{aus} ergibt sich damit bei 1 µM CCCP ein Wert von 0,68, bei 20 µM CCCP ein Wert von 0,97. $J(t)$ zeigt nach Abschalten der Lichtquelle in Abwesenheit des Protonencarriers einen Messartefakt, welches die Zuweisung eines Intervalls für die Kurvenanpassung erschwert, da die ersten Datenpunkte nach Löschen des Lichts maßgeblich die Krümmung der Messkurve vorgeben. Auf die Analyse dieses Datenbereichs wurde deshalb verzichtet.

Die Analyse der Zeitkonstanten zeigt, dass mit zunehmender CCCP-Konzentration τ_{an}/τ_{aus} nahezu 1 wird. Nach den in den Gln. 6-24 und 6-27 angegebenen Zusammenhängen ergibt sich für den Quotienten aus τ_{an} und τ_{aus} folgender Ausdruck:

$$\frac{\tau_{an}}{\tau_{aus}} = \frac{G + G_p}{G + G_p + \frac{I_{p,0}}{U^*}} \tag{6-30}$$

Nach Gl. 6-30 geht der Quotient aus τ_{an} und τ_{aus} dann gegen 1, wenn die Leitfähigkeiten G und G_p die Größenordnung des durch die Systemkonstanten vorgegebenen Quotienten $I_{p,0}/U^*$ erreichen. Dabei besteht zum einen die Möglichkeit, dass dieser Quotient sehr klein ist und deshalb nur geringe Leitfähigkeitsänderungen notwendig sind, um $\tau_{an}/\tau_{aus} \approx 1$ zu

erreichen. Zum anderen ist es denkbar, dass bei einem größeren Quotienten $I_{p,0}/U^*$ entsprechend große Änderungen in G und G_p stattgefunden haben.

6.3.2 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen festkörperunterstützten Membranen

Es wurde angestrebt, BR-Moleküle in eine durch eine Goldelektrode unterstützte Lipiddoppelschicht zu integrieren, um daraufhin ihre Protonenpumpaktivität zu untersuchen. Dieses Experiment ist dahingehend von Interesse, dass der Einfluss des auf einer Membranseite vorliegenden Festkörpers auf die Aktivität des Proteins beleuchtet wird. Um möglichst detaillierte Erkenntnisse über das System zu gewinnen, wurden die Methode der Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an derselben Präparation angewandt. Nur so können die Ergebnisse miteinander korreliert werden.

Zu diesem Zweck wurden Membranen etabliert, die durch die Fusion von Proteoliposomen auf einer mit dem Thiolipid CPEO3 funktionalisierten Goldelektrode aufgebaut werden. Um einen Einbau transmembranständiger BR-Moleküle zu erlauben, wurde eine mit Lücken behaftete CPEO3-Funktionalisierung der Goldelektroden angestrebt. Dies konnte über eine kurze Inkubationszeit (10 min) der Goldelektroden mit der Thiollösung gesteuert werden. Die Untersuchung der so modifizierten Substrate erfolgte mittels Impedanzspektroskopie. Zur Datenanpassung geeignete Modelle wurden ausführlich in Kap. 4.3.1 behandelt. Sie berücksichtigen neben dem Elektrolytwiderstand R_Ω die elektrischen Eigenschaften der untersuchten Grenzschicht. Wenn deren Ohmsche Eigenschaften R im gewählten Frequenzfenster detektiert werden können, erfolgt die Anpassung mittels eines *RRC*-Kreises. Wird dagegen nur die Kapazität der Schicht erfasst, erfolgt die Anpassung der Daten nach einem *RC*-Kreis. Immer dann, wenn nicht ideales kapazitives Verhalten beobachtet wird, wird die Kapazität durch ein *constant phase element* (CPE) ersetzt. Der das CPE charakterisierende Parameter α mit $0 < \alpha < 1$ gibt an, wie stark das System vom Verhalten eines idealen Kondesator mit $\alpha = 1$ abweicht.

Impedanzverhalten. Unter den oben aufgeführten Gesichtspunkten erfolgte die Analyse der in Abb. 6-22 präsentierten Impedanzdaten einer CPEO3-Schicht, die durch 10-minütige Inkubation einer Thiollösung mit einer Goldelektrode erzeugt wurde. Es ist zu erkennen, dass durch die CPEO3-Funktionalisierung eine isolierende Schicht entstanden ist, deren Widerstand in einer Größenordnung liegt, die im verwendeten Frequenzfenster

noch aufgelöst werden kann (Abb. 6-22, offene Kreise). Unter Anwendung eines *RR*CPE-Ersatzschaltkreises wurde der Widerstand zu einem Wert von $9{,}9 \cdot 10^6\ \Omega$ bestimmt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass keine vollständig ausgebildete CPEO3-Schicht vorliegt, da, wie in Kap. 4.3.2 gezeigt, dieser Widerstand nach längeren Inkubationszeiten unter gleichen Messbedingungen nicht mehr detektiert werden konnte. Da der verwendete *RR*CPE-Kreis nicht ideales kapazitives Verhalten berücksichtigt, konnte für die Thiolfunktionalisierung kein Kapazitätswert ermittelt werden, der eine Abschätzung des Belegungsgrads der Goldelektrode mit CPEO3 zulässt.

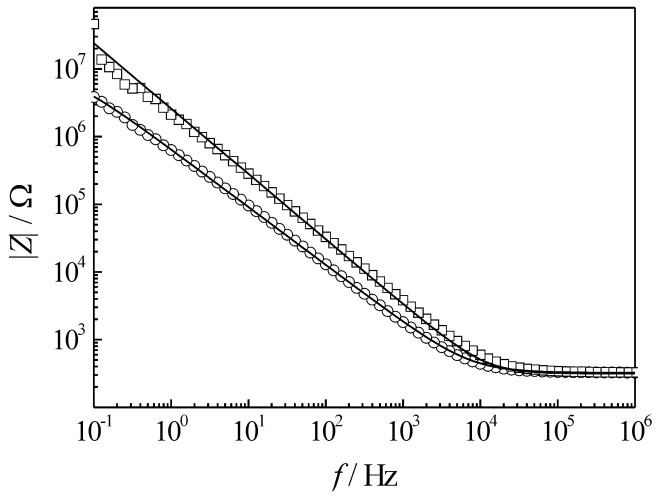


Abb. 6-22: Impedanzspektren (○) nach kurzer Inkubation (10 min) mit einer 0,1 mM *n*-propanolischen CPEO3-Lösung und (□) nach Inkubation mit BR-haltigen Liposomen (DPhPC/DOPC/DPPA 6:3:1, 1 mol % BR) generiert nach der *reverse phase*–Methode. Die auf einem *RR*CPE-Kreis basierende Datenanpassung an die CPEO3 Monoschicht liefert: $R_\Omega = 320\ \Omega$, $R_m = 9{,}9 \cdot 10^6\ \Omega$, $A = 3{,}16 \cdot 10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}86$. Die Anpassung an die Messdaten nach Vesikelfusion basierend auf einem *R*CPE-Kreis ergibt: $R_\Omega = 300\ \Omega$, $A = 0{,}65 \cdot 10^{-7}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}97$. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4.

Nach Inkubation mit BR-haltigen Vesikeln ist die Impedanzantwort des Systems dahingehend verändert, dass kein hochohmiger Widerstand mehr detektiert werden konnte. Nach Anpassung eines *R*CPE-Kreises konnten die Parameter $A = 0{,}65 \cdot 10^{-7}\ F$ und $\alpha = 0{,}97$ ermittelt werden. Der Betrag von α deutet auf fast ideales kapazitives Verhalten hin, welches die Substitution von A durch die Kapazität C erlaubt. Damit ergibt sich für die Grenzschicht unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche $A = 0{,}0452\ cm^2$ eine spezifische Kapazität von $1{,}44\ \mu F\ cm^{-2}$. Dieser Wert weicht deutlich von demjenigen ab, der nach Fusion von BR-freien Vesikeln mit CPEO3-Monoschichten zu $(0{,}92 \pm 0{,}09)\ \mu F\ cm^{-2}$ bestimmt wurde (siehe Kap. 4.3.3). Im Gegensatz zu den BR-freien Präparationen wurde in

Anwesenheit des Proteins neben DPhPC und DOPC das negativ geladene Lipid DPPA in einem Anteil von 10 mol % verwendet. Zusammen mit den negativ geladenen Lipiden der PM-Fragmente, die durch die Präparationstechnik der *reverse phase*-Methode in die Proteoliposomen gelangen, tragen die Lipiddoppelschichten eine negative Ladung von mindestens 10 mol %. Durch die Ladung der Lipidkopfgruppen könnte es zu einer stärkeren Hydratisierung der Lipidschicht und damit zu einer erhöhten Dielektrizitätskonstante ε_r kommen. Ein höherer Wassergehalt wurde schon in früheren Arbeiten als Argument für erhöhte Kapazitäten von Lipiddoppelschichten auf Gold angeführt (Steinem et al., 1996).

Protonenpumpaktivität der BR-Moleküle. Anhand der spezifischen, lichtinduzierten Aktivität des Proteins kann mit einem Photostromexperiment geklärt werden, ob BR funktionell in eine festkörperunterstützte Membran eingebaut wurde. In Abb. 6-23 A (schwarze Kurve) ist die Stromantwort nach Belichtung des Systems zu sehen. Es zeigt sich, dass nach Anschalten der Lichtquelle ein positiver transienter Strom auftritt. Dies ist das Ergebnis eines Ladungsflusses in Richtung der Goldelektrode, der auf die Protonenpumpaktivität von BR-Molekülen zurückzuführen ist. Nach dem Abschalten der Lichtquelle wird ein Peak in negativer Stromrichtung und damit der Rückfluss der zuvor gepumpten Ladungsträger beobachtet. Allerdings unterscheiden sich die beiden Prozesse bezüglich der Maximalstromdichten, die bei Werten von $J_{an,max}$ = 1,4 nA cm^{-2} und $J_{aus,max}$ = -0,3 nA cm^{-2} liegen. Um Stromdichten von weniger als 0,5 nA cm^{-2} vom Signalrauschen diskriminieren zu können, wurden zur Messung der Ströme ein Dämpfungsglied mit einer Zeitkonstante von τ_d = 100 ms gewählt. Das bessere Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf Kosten der korrekten Wiedergabe der transienten Ströme erhalten. In diesem Fall ist die Bestimmung von τ_{an} nicht möglich, da der transiente Strom des Anschaltprozesses in einem Zeitintervall liegt, das kleiner als 500 ms ist und somit, wie in Kap. 6.2.5 gezeigt wurde, durch das Dämpfungsglied modifiziert wird. Die Ermittlung von τ_{aus} erweist sich deshalb als schwierig, weil die Amplitude des Signals im relevanten Kurvenabschnitt nur wenig vom Rauschen differenziert werden kann. Werden die Daten linearisiert, zeigt sich, dass neben der Zeitkonstante des Dämpfungsglieds τ_d noch weitere Zeitkonstanten den Verlauf des transienten Stroms beeinflussen. Eine Diskriminierung dieser anhand der linearisierten Daten war jedoch nicht möglich.

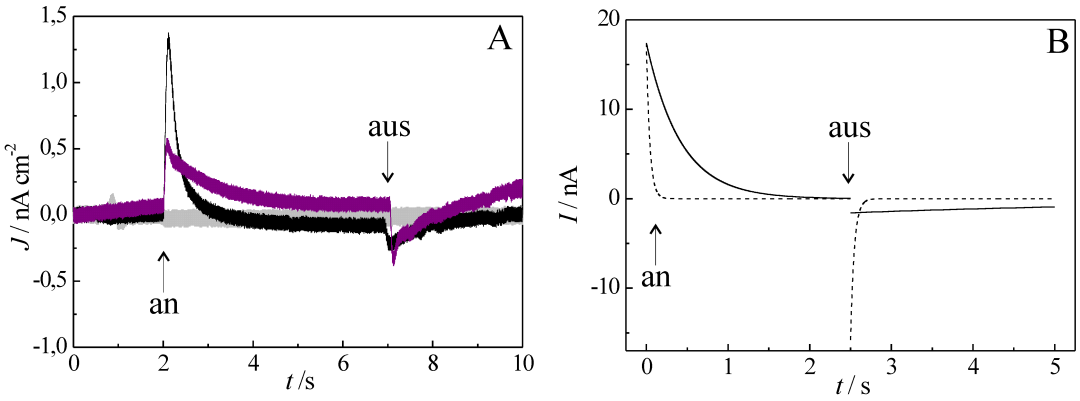


Abb. 6-23: A Photostromantwort von BR rekonstituiert in eine Lipiddoppelschicht durch Fusion von Proteoliposomen (DPhPC/DOPC DPPA 6:3:1, 1 mol % BR) auf CPEO3-funktionalisiertem Gold (▬) in Abwesenheit und (▬) in Gegenwart von 10 µM CCCP. (▬) markiert die Messung in Abwesenheit von BR. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des An- und Abschaltens der Lichtquelle Dämpfungsglied: $\tau_d = 100$ ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **B** Berechnete Stromantworten zu **Modell 1** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}02$ V, $I_{p,0} = 2\cdot10^{-8}$ A, $C = 4\cdot10^{-7}$ F, $C_p = 6\cdot10^{-8}$ F, (—) $G_p = 1\cdot10^{-7}$ S, (····) $G_p = 1\cdot10^{-5}$ S.

Um das System unter dem Aspekt erhöhter Membranleitfähigkeiten zu betrachten, wurde der Protonencarrier CCCP zugesetzt. Wie in Abb. 6-23 A zu sehen, verringert die Zugabe von 10 µM CCCP die Asymmetrie der transienten Ströme nach An- und Ausschalten der Lichtquelle drastisch, wie durch die Werte $J_{an,max} = 0{,}6$ nA cm^{-2} und $J_{aus,max} = -0{,}4$ nA cm^{-2} gezeigt wird. Ein quantitativer Vergleich der Maximalstromdichten bei unterschiedlichem CCCP-Gehalt ist deshalb nicht sinnvoll, weil sie in den ersten 500 ms der Prozesse unterschiedlich stark durch das Dämpfungsglied modifiziert werden. Zudem ist im Gegensatz zum Protonencarrier-freien Experiment während der Belichtungszeit in Anwesenheit von 10 µM CCCP ein stationärer Strom von 0,1 nA cm^{-2} sowie vor und nach der Belichtung eine Drift der Stromdichte zu erkennen. Nach Belichtung einer Lipiddoppelschicht in Abwesenheit von BR ist in der entsprechenden Strom-Zeit-Kurve (Abb. 6-23 A, graue Kurve) kein Photoartefakt zu erkennen

Anhand der in Kap. 6.2 vorgestellten, theoretischen Modelle zur Protonenpumpaktivität von BR sollen den experimentell ermittelten Stromantworten Simulationen gegenübergestellt werden. Es wurde Modell 1 herangezogen und das in Abb. 6-24 elektrochemische System vorgeschlagen.

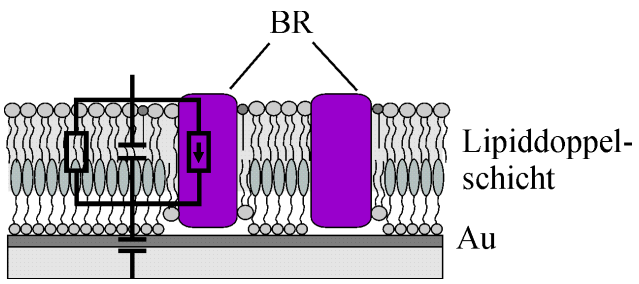


Abb. 6-24: Schematische Darstellung des Systems nach Fusion von BR-haltigen Vesikeln auf einer mit Lücken behafteten, CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode. Das Netzwerk präsentiert Modell 1 (Kap. 6.2.2).

Zur Berechnung von Photoströmen nach Modell 1 müssen Werte für die elektrischen Parameter G_p und C_p der BR-dotierten Lipiddoppelschicht sowie für die Goldelektrode zugewiesen werden. Es wurden dazu die impedanzspektroskopischen Daten herangezogen, um in den Simulationen die experimentellen Bedingungen möglichst genau nachzustellen. Die Leitfähigkeit der Membran G_p wird auf einen Wert von $1 \cdot 10^{-7}$ S, die Kapazität C_p unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche auf $6 \cdot 10^{-8}$ F festgelegt. Die Kapazität einer nicht funktionalisierten Goldelektrode wurde durch Impedanzanalyse zu etwa 30 µF cm^{-2} bestimmt. Ist die Elektrode unvollständig mit einem Thiol funktionalisiert, werden impedanzspektroskopisch zwei Dispersionen detektiert, wobei diejenige bei niedrigeren Frequenzen mit einem spezifischen Kapazitätswert C_{sp} von 8 – 10 µF cm^{-2} der Goldschicht zugewiesen werden kann (Ergebnisse nicht dargestellt). Der zur Simulation der lichtinduzierten BR-Aktivität herangezogene Wert für C von $4 \cdot 10^{-7}$ F liegt unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche (A = 0,0452 cm^2) im Bereich von C_{sp}.

Die Parameter U^* = 0,02 V und $I_{p,0} = 2 \cdot 10^{-8}$ A wurden so gewählt, dass die simulierten Stromantworten in dem experimentell beobachteten Zeitfenster verlaufen. Die mit den angegebenen Werten durchgeführten Simulationen für den Ein- und Ausschaltstrom sind in Abb. 6-23 B als durchgezogene Linie dargestellt. Während beim Einschaltprozess ein deutlicher Peak zu erkennen ist, kann der Ausschaltvorgang kaum von der Nulllinie unterschieden werden. Es wurde die Geschwindigkeit der beiden Prozesse wurde zu τ_{an} = 0,42 s und τ_{aus} = 4,6 s berechnet. Werden die Daten aus der Simulation linearisiert, wird eine perfekte Gerade erhalten und damit ersichtlich, dass τ_{an} und τ_{aus} alleinig Einfluss auf den transienten Stromverlauf nehmen. Dies steht in Diskrepanz zur Linearisierung der experimentellen Ergebnisse, in denen mehr als eine Zeitkonstante zu erkennen ist. In einer zweiten Simulation wurde die Anwesenheit von CCCP mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit der BR-haltigen Lipidschicht auf einen Wert von $G_p = 1 \cdot 10^{-5}$ S nachgestellt.

Nach Le Blanc (1971) gilt, dass Protonencarrier den Membranwiderstand, nicht aber die Membrankapazität modulieren, weshalb die anderen Parameter nicht variiert wurden. Es wurden in dieser Simulation, im Vergleich zu vorangegangenen, transiente Ströme mit kleineren Zeitkonstanten von τ_{an} = 0,04 s und τ_{aus} = 0,05 s erhalten.

Werden die Photostrommessungen und die theoretischen Betrachtungen vergleichend gegenübergestellt, so ist zu erkennen, dass die erhaltenen Stromkurven in Abwesenheit und Gegenwart von CCCP eine gute Übereinstimmung zu den durchgeführten Simulationen unter Annahme unterschiedlich großer Leitfähigkeiten G_p liefern. In beiden Fällen ist mit zunehmender Permeabilität der Lipidschicht eine Abnahme der Asymmetrie der transienten Ströme festzustellen. Zudem wird anhand der in den Simulationen erhaltenen Werte der Zeitkonstanten τ_{an} beider Varianten sowie τ_{aus} im Fall niedriger G_p deutlich, dass für diese Prozesse Geschwindigkeiten erwartet werden, die wegen des zur Messung verwendeten Filters mit τ_d = 100 ms nicht mehr aufgelöst werden können. Auch dies konnte in den experimentell durchgeführten Photostrommessungen beobachtet werden.

Es kann gefolgert werden, dass das untersuchte System hinsichtlich der genannten Beobachtungen gut durch Modell 1 beschrieben wird, in dem die Leitfähigkeit der Membran, welche die BR-Moleküle enthält und in Serie zu einem Kondensator liegt, modifizierbar ist. Demnach ist das in Abb. 6-24 vorgeschlagene Modell eine Möglichkeit, das elektrochemische System zu beschreiben. Die Tatsache, dass die detektierten Ströme sehr klein sind, ist ein Hinweis darauf, dass die isolierenden Eigenschaften der Lipidschicht möglicherweise nicht ausreichend hoch sind, um den Aufbau eines signifikanten Protonengradienten zu erlauben. Simulation und Experiment stimmten dann gut überein, wenn von eher niedrigen Membranwiderständen im Bereich von 10 MΩ ausgegangen wurde. Vorstellbar wäre auch ein zweiter Fall, in dem die Proteoliposomen ledlich auf der CPEO3-funktionalisierten Goldelektrode hemifusioniert bzw. adsorbiert sind.

Abschließend stellt sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten Stromantwort in Anwesenheit von CCCP (Abb. 6-23 A) tatsächlich um einen echten stationären Strom handelt, wie er nach Modell 3 simuliert werden kann. Dieses Modell beinhaltet die Überlegung, dass eine Komponente bestehend aus einem Kondensator und einem modulierbaren Ohmschen Widerstand den Protonenpumpstrom begrenzt. Auf das in Abb. 6-24 vorgeschlagene elektrochemische System ist Modell 3 jedoch nicht anwendbar, da es sich bei der Grenzschicht um einen Festkörper handelt, der nur auf einer Seite an ein wässriges Kompartiment angrenzt, weshalb eine Betrachtung der resistiven Eigenschaften

der Goldelektrode nicht sinnvoll ist. Angesichts der in Abb. 6-23 A erkennbaren Drift in Anwesenheit von 10 µM CCCP ist es denkbar, dass diese den gegen die Nulllinie strebenden transienten Strom kompensiert und so der beobachtete Verlauf zu Stande kommt.

6.3.3 Impedanzspektroskopie und Photostrommessungen an BR-haltigen porenüberspannenden Membranen

Das in dieser Arbeit entwickelte System der porenüberspannenden Membranen sollte dahingehend angewendet werden, Proteine in hoher Dichte zu integrieren. Von Interesse war dabei insbesondere die Frage, ob und in welcher Form die Protonenpumpaktivität von transmembranständigem BR im System der porenüberspannenden Lipiddoppelschichten beobachtet werden kann. Auch hier wurden, wenn möglich, impedanzspektroskopische Analysen und Photostrommessungen an derselben Präparation durchgeführt und die Ergebnisse anschließend zusammengeführt.

Dabei wurde die gleiche Strategie verfolgt wie im Fall der in Kap. 6.3.2 beschriebenen festkörperunterstützten Membranen. Ebendiese Strategie beinhaltet, dass BR durch Fusion von Proteoliposomen in das Membransystem eingebracht wird. In Kap. 4.4.3.2 konnte gezeigt werden, dass sich der Membranbildungsprozess, in dem die Vesikel graduell auf dem porösen Substrat fusionieren, über einen Zeitraum von bis zu 30 h erstreckt. Um die Funktionalität möglichst vieler Proteine zu erhalten, wurde zunächst in Abwesenheit von BR mit Vesikeln einer Mischung aus DPhPC und DOPC 6:4 eine porenüberspannende Membran aufgebaut, welche die kationische Verbindung Octadecylamin (ODA) in einem Anteil von 0,1 mol % enthält. Durch die Beimischung von ODA sollte die Anbindung der anschließend zugegebenen Proteoliposomen forciert werden, die das mit einer negativ geladenen Kopfgruppe ausgestattete Lipid DPPA in einem Anteil von 10 % sowie die negativ geladenen Lipide der Purpurmembranfragmente enthalten.

Im Folgenden werden Impedanzspektren und Photostrommessungen aus zwei verschiedenen Präparationen (Präparation A und B) gegenübergestellt, die trotz gleicher Präparationsmethode ein unterschiedliches elektrochemisches Verhalten zeigten. Beide Fälle können mit Modellen beschrieben werden, die das System der porenüberspannenden Membranen repräsentieren.

Impedanzverhalten von Präparation A und B. Nach der in Kap. 3.5.11 beschriebenen Methode der Fusion von Vesikeln auf porösem Aluminat wurden porenüberspannende Membranen präpariert. Dabei wurde der Aufbau der Membran impedanzspektroskopisch verfolgt, wie in Kap. 4.4.3.2 beschrieben. 2,5 h nach Präparationsbeginn wurde ein Impedanzspektrum aufgezeichnet (Abb. 6-25 A, offene Dreiecke), in dem zwei Dispersionen aufgelöst werden konnten. Für die elektrische Beschreibung dieser Daten wurde in Kap. 4.4.3.1 ein *RRCRC*-Ersatzschaltkreis vorgeschlagen, der neben dem Elektrolytwiderstand den kapazitiven und resistiven Anteil der Komponenten berücksichtigt, die in Form der zwei Dispersionen detektiert wurden. Der Gesamtwiderstand R_2 von Präparation A lag zu diesem Zeitpunkt bei einem Wert von $2{,}6 \cdot 10^5\ \Omega$. In Kap 4 wurde diskutiert, dass die zwei Dispersionen darauf zurückzuführen sind, dass zu Beginn der Präparation neben porenüberspannenden Lipiddoppelschichten hemifusionierte Vesikel die Impedanz des Systems bestimmen. Ist dies der Fall, so wird davon ausgegangen, dass bei Präparation B, deren Impedanzanalyse in Abb. 6-25 B präsentiert ist, keine oder eine nur unvollständige Vesikelfusion auf dem porösen Substrat stattgefunden hat. An dem Graphen 24 h nach Präparationsbeginn (offene Kreise) sind, wie auch in den Impedanzspektren vor diesem Zeitpunkt, deutlich zwei Dispersionen zu erkennen. Der Gesamtwiderstand nach 24 h, der zwischenzeitlich bei einer Größenordnung von $10^8\ \Omega$ lag, wurde in der Kurvenanpassung nach einem *RRCRC*-Kreis zu $2{,}6 \cdot 10^6\ \Omega$ bestimmt.

Aus Abb. 6-25 A wird ersichtlich, dass sich das Impedanzverhalten von Präparation A über einen Zeitraum von 7 h hinweg dahingehend veränderte, dass am Ende nur noch eine Dispersion zu erkennen ist. Zur Berücksichtigung des nicht idealen, kapazitiven Verhaltens wurde zur Datenanpassung ein *RR*CPE-Kreis gewählt und basierend darauf ein Membranwiderstand R_m von $4{,}3 \cdot 10^5\ \Omega$ bestimmt. Dies zeigt, dass im Membranbildungsprozess neben dem Verschwinden der Dispersion bei höheren Frequenzen ein erhöhter Gesamtwiderstand detektiert wird. Beide Phänomene werden mit der Fusion von adsorbierten Vesikeln zu porenüberspannenden Membranen erklärt. Um eine Aussage zum kapazitiven Verhalten der Lipiddoppelschicht treffen zu können, werden die in der Datenanpassung erhaltenen Parameter $A = 2{,}4 \cdot 10^{-8}\ F\ s^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}77$ mit Hilfe von Gl. 3 8 umgerechnet. Mit der Frequenz $\omega_{max}'' = 310{,}6$ Hz, bei welcher der Betrag des Imaginärteils der Impedanz Z^{Im} maximal wird, liefert die Umrechnung eine Kapazität $C = 6{,}4 \cdot 10^{-9}$ F. Dies entspricht unter Berücksichtigung einer aktiven Fläche von $0{,}0104\ cm^2$ einer spezifischen Kapazität von $C_{sp} = 0{,}6\ \mu F\ cm^{-2}$. C_{sp} liegt damit in dem

Bereich der mittleren, spezifischen Kapazität von (0,5 ± 0,1) µF cm^{-2}, die für dieses Membransystem in dieser Arbeit ermittelt wurde (Kap. 4.4.1).

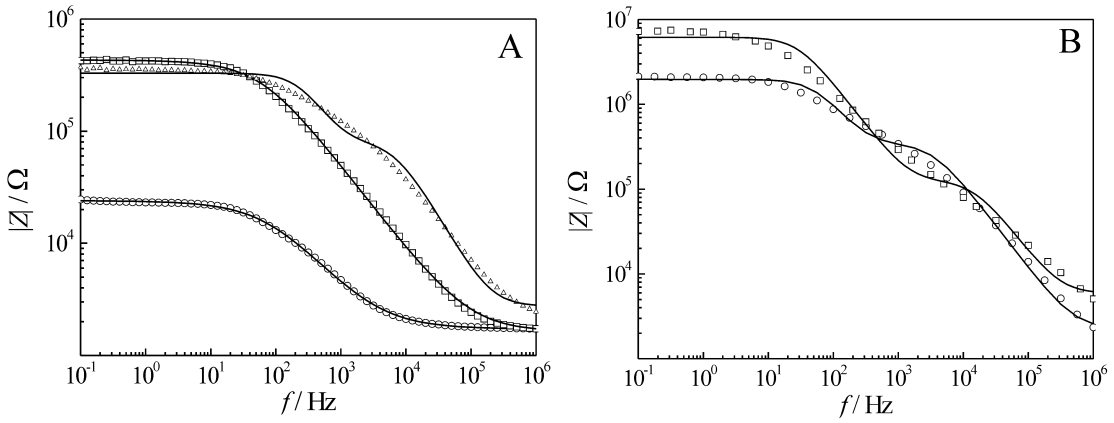


Abb. 6-25: Impedanzanalyse nach der Zugabe BR-freier (DPhPC/DOPC 6:4, 0,1 mol % ODA) bzw. mit BR-haltigen Vesikel (DPhPC/DOPC/DPPA (6:3:1), 1 mol % BR) zu CPEO3-funktionalisiertem Aluminat (Porendurchmesser 60 nm). Dichtringdurchmesser: 2 mm. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **A Präparation A**: (Δ) 2,5 h und (□) 7,5 h nach Präparationsbeginn, (○) 12 h nach Inkubation mit Proteoliposomen. **B Präparation B**: (□) 24 h nach Präparationsbeginn, (○) 14 h nach Inkubation mit Proteoliposomen**.** Kurvenanpassung: **A** Basierend auf einem *RRCRC*-Kreis: (Δ) $R_\Omega = 2750\ \Omega$, $R_1 = 6{,}7\cdot10^4\ \Omega$, $C_1 = 0{,}3\cdot10^{-9}$ F, $R_2 = 2{,}6\cdot10^8\ \Omega$ und $C_2 = 2{,}6\cdot10^{-9}$ F. Basierend auf einem *RR*CPE-Netzwerk: (□) $R_\Omega = 1{,}7\cdot10^3\ \Omega$, $R_m = 4{,}3\cdot10^5\ \Omega$, $A = 2{,}4\cdot10^{-8}$ F s$^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}77$; (○) $R_\Omega = 1{,}7\cdot10^3\ \Omega$, $R_m = 2{,}2\cdot10^4\ \Omega$, $A = 1{,}7\cdot10^{-7}$ F s$^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}71$. **B** Basierend auf einem *RRCRC*-Kreis: (□) $R_\Omega = 5890\ \Omega$, $R_1 = 1{,}1\cdot10^5\ \Omega$, $C_1 = 0{,}10\cdot10^{-9}$ F, $R_2 = 6{,}1\cdot10^6\ \Omega$ und $C_2 = 0{,}9\cdot10^{-9}$ F; (■) $R_\Omega = 2290\ \Omega$, $R_1 = 3{,}1\cdot10^5\ \Omega$, $C_1 = 0{,}15\cdot10^{-9}$ F, $R_2 = 1{,}7\cdot10^6\ \Omega$ und $C_2 = 1{,}81\cdot10^{-9}$ F.

Des Weiteren sind in Abb. 6-25 A und B (offene Kreise) die Impedanzspektren nach Inkubation mit BR-haltigen Vesikeln gezeigt. Eine zeitaufgelöste Studie mit Spektren in definierten zeitlichen Abständen wurde in diesem Fall nicht durchgeführt. Für Präparation A konnte durch Datenanpassung basierend auf einem *RR*CPE-Kreis der Membranwiderstand zu einem Wert von $R_m = 2{,}2\cdot10^4\ \Omega$ bestimmt werden. Er liegt damit eine Größenordnung unter dem vor Zugabe der Proteoliposomen. Dieser starke Abfall des Membranwiderstands deutet auf ein Reißen der porenüberspannenden Membran während des Fusionsprozesses hin. Die Kapazität von $3{,}2\cdot10^{-8}$ F, die unter Berücksichtigung der aktiven Fläche einem spezifischen Wert von 3,1 µF cm^{-2} entspricht, ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass die Poren nur noch teilweise von einer Lipiddoppelschicht überspannt werden. C_{sp} wurde aus den Parametern $A = 1{,}7\cdot10^{-7}$ F s$^{\alpha-1}$ und $\alpha = 0{,}71$ der Kurvenanpassung unter Berücksichtigung von $\omega_{max}'' = 314{,}8$ Hz mit Gl. 3-8 berechnet. Im Fall von Präparation B sind im Impedanzspektrum auch 14 h nach Beginn der Zugabe von Proteo-

liposomen noch zwei Dispersionen zu erkennen. Der Gesamtwiderstand ist im Vergleich zu Präparation A nur wenig auf $R_2 = 1{,}7 \cdot 10^6\ \Omega$ abgefallen.

Die Frage, ob bei den impedanzspektroskopisch charakterisierten Messanordnungen porenüberspannende Membranen vorliegen, in denen die Vesikel weitestgehend fusioniert oder hemifusioniert an der Oberfläche vorliegen, sollte anhand der Stromantwort der BR-Moleküle beantwortet werden. Dazu werden die beiden Präparationen getrennt voneinander betrachtet.

Photostromexperimente an Präparation A und Simulationen. In Abb. 6-26 A ist der detektierten Protonenpumpstrom nach Inkubation einer porenüberspannenden Membran (Abb. 6-25 A) mit BR-haltigen Vesikeln dargestellt. An der Stromantwort ist zu erkennen, dass das Signal etwa 2 s nach Anschalten der Lichtquelle eine maximale Stromdichte von 160 nA cm^{-2} erreicht, die während der gesamten Belichtung konstant auf diesem Niveau bleibt. Am Ende der Belichtungszeit strebt der Strom gegen 0 nA cm^{-2}. In dieser Messung wurde zur Filterung des Signalrauschens ein Dämpfungsglied mit einer Zeitkonstante $\tau_d = 300$ ms eingesetzt.

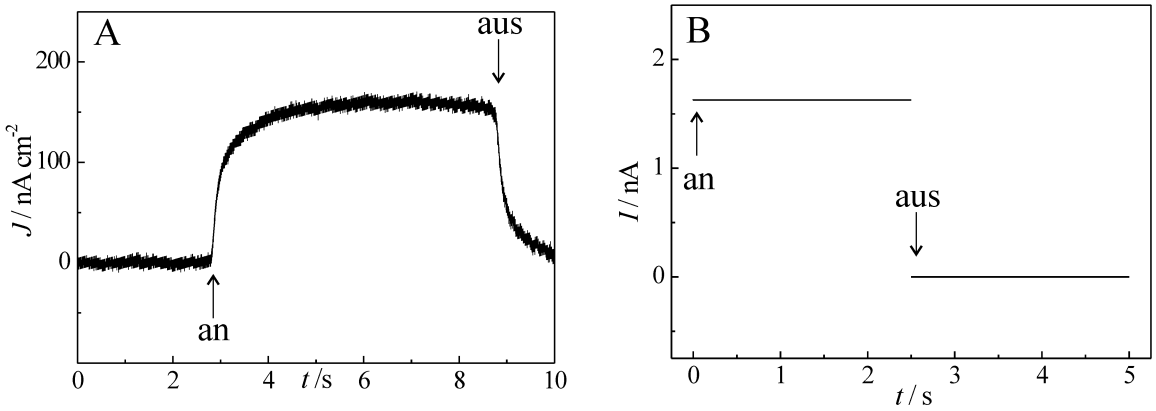


Abb. 6-26: Präparation A **A** Photostromantwort von BR an CPEO3-funktionalisiertem porösen Aluminat (Porendurchmesser 60 nm), das nach dem Aufbau einer porenüberspannenden Membran (DPhPC/DOPC 6:4, 0,1 mol % ODA) für 12 h mit Proteoliposomen (DPhPC/DOPC/DPPA 6:3:1, 1 mol % BR) inkubiert wurde. Das An- und Ausschalten der Lichtquelle ist durch Pfeile markiert. Das Messsignal erreicht während der Belichtung einen Maximalstrom von 160 nA cm^{-2} und strebt nach Löschen der Strahlungsquelle gegen 0 nA cm^{-2}. Dämpfungsglied: $\tau_d = 300$ ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **B** Simulation nach **Modell 2** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 1{,}7 \cdot 10^{-9}$ A, $G = 1 \cdot 10^{-3}$ S, $C_p = 3{,}2 \cdot 10^{-8}$ F, $G_p = 4{,}5 \cdot 10^{-5}$ S.

Nach den in Kap. 3.2.1.1 durchgeführten Simulationen zum Einfluss eines Dämpfungsglieds auf ein Potential U modifiziert ein Filter mit $\tau_d = 300$ ms das Signal in der ersten Sekunde der Messung. Dies ist am Verlauf des in Abb. 6-26 A dargestellten Protonenpumpstroms deutlich zu erkennen. Da das untersuchte System den impedanzspektroskopischen Untersuchungen zur Folge bereits einen sehr geringen Gesamtwiderstand aufweist, wurde auf Experimente in Anwesenheit von CCCP verzichtet. Um anhand der Ergebnisse zusammen mit den Impedanzdaten ein Modell zum System der porenüberspannenden Membranen erstellen zu können, wurde die Protonenpumpaktivität zusätzlich in Simulationen nachgestellt. Im Fall von Präparation A wurde auf das in Kap. 6.2.3 vorgestellte Modell 2 zurückgegriffen, da der Verlauf der danach simulierten Stromantwort mit dem Experiment (Abb. 6-26 A) qualitativ am besten übereinstimmt. Basierend auf Modell 2 wird das in Abb. 6-27 dargestellte elektrochemische System vorgeschlagen. Dabei entspricht die in Modell 2 mit einem Ohmschen Widerstand und einer Kapazität berücksichtigte BR-dotierte Lipiddoppelschicht der porenüberspannenden Membran, wie in Abb. 6-27 mittels eines Netzwerks angedeutet.

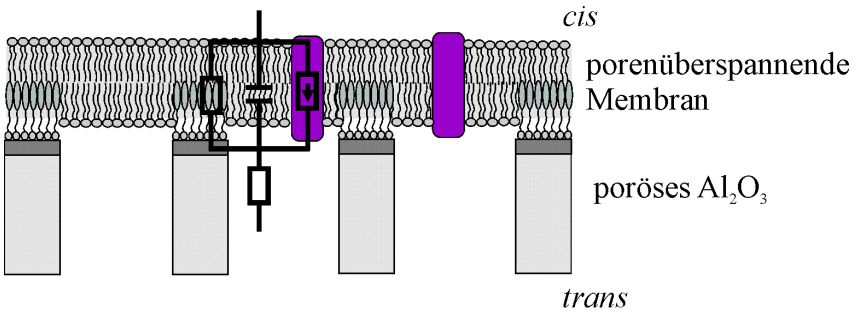


Abb. 6-27: Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran gebildet durch Vesikelfusion. Die Zugabe von BR-haltigen Vesikeln resultiert in der Integration der BR-Moleküle in die porenüberspannende Membran. Das Netzwerk entspricht Modell 2 (Kap. 6.2.3).

Der Ohmsche Widerstand in Serie dazu repräsentiert die Eigenschaften der Elektrolyten. Für die Simulationen nach Modell 2 wurden zur Festlegung der Parametergrößen die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen Charakterisierung der Membran (Abb. 6-25 A) herangezogen und C_p auf $3{,}2 \cdot 10^{-8}$ F sowie G_p auf $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ S festgelegt. Des Weiteren ging die Leitfähigkeit des Elektrolyten mit $G = 1 \cdot 10^{-3}$ S in die Berechnung ein. Den Konstanten U^* und $I_{p,0}$ wurden Werte von 0,2 V bzw. $1{,}7 \cdot 10^{-9}$ A zugewiesen, um den tatsächlich gemessenen Protonenpumpstrom möglichst genau zu simulieren. In Abb. 6-26 B ist an der resultierenden Stromantwort zu erkennen, dass für den Einschaltvorgang ein konstanter

Strom von 1,6 nA erhalten wird. Nach dieser Simulation werden 94 % des maximal möglichen Werts, der durch den Initialpumpstrom $I_{p,0}$ von 1,7 nA vorgegeben ist, erreicht. Dies ist in Übereinstimmung mit den von Mureyuki et al. (1993) beschriebenen Beobachtungen zur Protonenpumpaktivität von transmembranständigem BR, worin gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch CCCP kaum Einfluss auf den Betrag des stationären Stroms hat. Nach Abschalten der Lichtquelle ist ein schneller Abfall des Stroms auf 0 nA zu erkennen.

Eine Gegenüberstellung der oben beschriebenen Simulation mit dem Photostromexperiment in Abb. 6-26 A zeigt übereinstimmend, dass der Kurvenverlauf in beiden Fällen nach Anschalten der Lichtquelle von einem stationären Strom bestimmt wird, der am Ende der Belichtung schnell auf Null abfällt. Hinsichtlich dieses Ergebnisses wird postuliert, dass das elektrochemische Modell, nach dem die BR-Moleküle funktionell in die porenüberspannende Membran integriert wurden, Gültigkeit hat.

Photostromexperimente an Präparation B und Simulationen. Im Gegensatz dazu wurde für Präparation B ein sehr viel geringerer Protonenpumpstrom $J_{an,max}$ = 1,3 nA cm^{-2} mit einem Verlauf aufgezeichnet (Abb. 6-28 A), der sich von Präparation A dahingehend unterscheidet, dass er nach dem Anschalten der Lichtquelle transient gegen einen konstanten Wert von 0,2 nA cm^{-2} strebt.

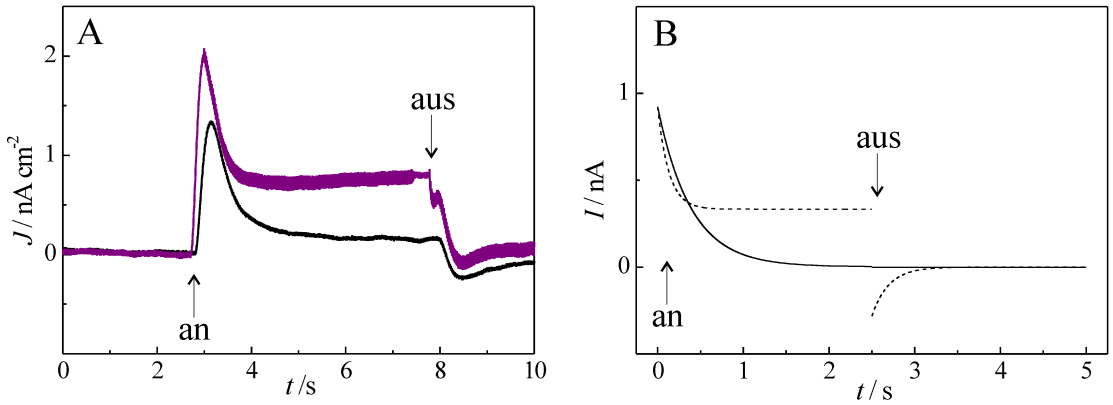


Abb. 6-28: Präparation B **A** Photostromantwort von BR nach Fusion von BR-haltigen Liposomen (DPhPC/DOPC/DPPA 6:3:1, 1 mol % BR) mit einer porenüberspannenden Membran auf porösem Al_2O_3 (Porendurchmesser 60 nm). Es wurde die lichtinduzierte Aktivität der Proteine in Abwesenheit (▬) sowie in Gegenwart von 2 µM CCCP untersucht (▬). Die Pfeile markieren Start und Ende der Belichtungszeit. Dämpfungsglied: 300 ms. Puffer: 100 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4. **B** Simulation nach **Modell 3** unter Verwendung folgender Werte: $U^* = 0{,}2$ V, $I_{p,0} = 1\cdot10^{-9}$ A, $C_p = 1{,}5\cdot10^{-10}$ F und $C = 1{,}8\cdot10^{-9}$ F, (—) $G = G_p = 1\cdot10^{-11}$ S und (····) $G = G_p = 5\cdot10^{-9}$ S.

Durch die Zugabe von 2 µM CCCP wird der Strom stark moduliert, neben einem erhöhten Einschaltstrom ist ein stationärer Strom von 0,8 nA cm^{-2} zu erkennen, der während des gesamten Belichtungsprozesses von 5 s auf diesem Wert verweilt (Abb. 6-28 A, lila Kurve). Der stationäre Strom blieb auch während einer Belichtungszeit von 15 s konstant auf einem Stromniveau. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Poren des Substrats keine Diffusionsbarriere für Protonen darstellen. Des Weiteren zeichnet sich an der Stromantwort in Anwesenheit von CCCP ein weniger deutlich zu erkennender Ausschaltvorgang ab.

Im Folgenden wird das Ergebnis aus Präparation B anhand von Simulationen basierend auf Modell 3 (Kap. 6.2.4) genauer beleuchtet. Dieses Modell wurde gewählt, da der Verlauf der experimentell erhaltenen Protonenströme in Abb. 6-28 A mit dessen theoretischen Stromantworten die größte Übereinstimmung zeigt. Nach Modell 3 wurde das in Abb. 6-29 gezeigte schematische Modell des Systems entworfen. Darin sind Proteoliposomen entweder adsorbiert oder, wie in der Schemazeichnung dargestellt, hemifusioniert. Im Unterschied zu dem für Präparation A entwickelten Modell stellt die porenüberspannende Membran hier lediglich eine isolierende Barriere dar, während die BR-Moleküle noch in die Lipidmatrix der Vesikel integriert sind.

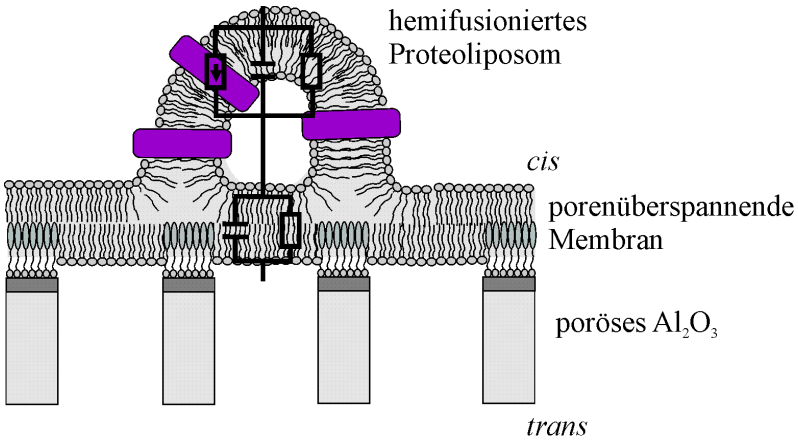


Abb. 6-29: : Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran gebildet durch Vesikelfusion. Die Zugabe von BR-haltigen Vesikeln resultiert in einer Hemifusion mit der porenüberspannenden Membran. Das Verhältnis von Porendurchmesser des porösen Aluminats und der Vesikel entspricht im Realsystem etwa 1:10. Das Netzwerk entspricht Modell 3 (Kap. 6.2.4).

Basierend auf Modell 3 wurden Simulationen durchgeführt, in denen die Photostromantwort der Präparation B (Abb. 6-28 A) nachgestellt werden sollte. Eine Zuordnung von Parameterwerten mit Daten aus der Impedanzanalyse (Abb. 6-25 B) ist in diesem Fall uneindeutig. Dies liegt darin begründet, dass zur Auswertung der Impedanzspektren mit zwei Dispersionen ein *RRCRC*-Kreis verwendet wurde, dessen Elemente, wie in Kap. 4.4.3.1 beschrieben, keinem elektrochemischen Modell zugeordnet werden konnten. Es wurde jedoch postuliert, dass die Dispersion mit der kleineren Zeitkonstante, sprich kleinerer Kapazität, noch adsorbierten oder hemifusionierten Vesikeln auf der Oberfläche der Membran zugewiesen werden könnte. Unter diesem Gesichtspunkt wird in den folgenden Simulationen die Kapazität der BR-dotierten Vesikel mit $C_p = 1{,}5 \cdot 10^{-10}$ F und die der porenüberspannenden Membran mit $C = 1{,}8 \cdot 10^{-9}$ F berücksichtigt. Wurde in die Simulation zudem die in der Impedanzanalyse bestimmte Gesamtleitfähigkeit von Präparation B mit $G = 5{,}9 \cdot 10^{-7}$ S einbezogen, konnte mit den Konstanten $U^* = 0{,}2$ V und $I_{p,0} = 1 \cdot 10^{-9}$ A keine Stromantwort ermittelt werden, die dem experimentellen Protonenpumpströmen entsprach. Erst durch die Wahl von Leitfähigkeiten in der Größenordnung von $G < 10^{-9}$ S wurden die in Abb. 6-28 B dargestellten Kurven erhalten. So wurde zum einen die Stromantwort mit $G = G_p = 1 \cdot 10^{-11}$ S simuliert, in der ein transienter Strom im Einschaltvorgang und ein kaum diskriminierbarer Ausschaltstrom zu erkennen sind, zum anderen wurde die Stromantwort hinsichtlich erhöhter Leitfähigkeit mit $G = G_p = 5 \cdot 10^{-9}$ S berechnet. Damit ergibt sich im Einschaltprozess ein stationärer Strom, im Ausschaltvorgang dagegen strebt der Strom mit transientem Verlauf gegen Null.

Werden die Simulationen nach Modell 3 und die in Abb. 6-28 A gezeigten Protonenpumpströme an Präparation B gegenübergestellt, so zeigt sich, dass diese in ihrem Verlauf hinsichtlich des Einschaltvorgangs gut übereinstimmen. Die Anwendung der Kapazitätswerte aus den korrelierenden Impedanzdaten in den Simulationen hat sich demnach als geeignet erwiesen. Dies unterstreicht die Hypothese von adsorbierten oder hemifusionierten Vesikeln auf porenüberspannenden Membranen. Die Angabe eines Werts, der den stationären Strom bezüglich des maximalen Einschaltstroms $I_{an,max}$ angibt und damit einen quantitativen Vergleich zwischen Simulation und Experiment erlaubt, ist allerdings nicht sinnvoll, da das zur Photostrommessung verwendete Dämpfungsglied u. a. den Parameter $I_{an,max}$ erheblich modifiziert (Kap. 6.2.5). Folgerichtig wird auch auf die Gegenüberstellung der Ausschaltprozesse von Experiment und Simulation verzichtet, da der Filter auf diese ebenso Einfluss nimmt.

Abschließend sei erwähnt, dass sich die Reproduzierbarkeit der Fusion von Proteoliposomen auf porösen Aluminaten als eher schwierig erwies. Meist lag der Membranwiderstand nach der Inkubation mit Proteoliposomen in einem Bereich von nur $10^4 – 10^5$ Ω. Dies führte dazu, dass bei der Aufzeichnung der Protonenpumpströme häufig eine starke Drift des Messsignals auftrat. Der Messbereich bei hohen Verstärkungsfaktoren reichte dann nicht aus, um den Stromverlauf zu erfassen. Wurden kleinere Verstärkungsfaktoren gewählt, konnte nur eine schlechte Auflösung des Signals erreicht werden. Mit der Verwendung von Ag/AgCl-Elektroden an Stelle von platinierten Pt-Elektroden konnte dieses Problem zum Teil gelöst werden, wie etwa bei der in Abb. 6-26 A gezeigten Messung.

6.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, Bacteriorhodopsin (BR) transmembranständig in hoher Dichte in Lipiddoppelschichten einzubringen. Die Strategie dabei war, lösungsmittelfreie festkörperunterstützte und porenüberspannende Membranen durch Fusion von Proteoliposomen auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden bzw. porösen Aluminaten zu gewinnen. Neben der Funktionalität von integriertem BR war die Untersuchung von BR-haltigen Vesikeln und Purpurmembran (PM)-Fragmenten von Interesse, die an festkörperunterstützten Membranen (*painted membranes*) adsorbiert waren. Dazu wurde das Impedanzverhalten der Membranen sowie die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität des BR mittels Photostrommessungen untersucht.

6.4.1 Immobilisierung BR-haltiger Membranen an *painted membranes*

Die Aktivität von BR-haltigen Vesikeln und PM-Fragmenten adsorbiert an lösungsmittelhaltige, festkörperunterstützte Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden wurde untersucht, um detaillierte Erkenntnisse zu den einzelnen Systembestandteilen zu gewinnen, anhand derer die Eigenschaften der lösungsmittelfreien Membranen eingeordnet werden können. Zudem wurden die erhaltenen Photostromkurven nach einem geeigneten theoretischen Modell simuliert. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Die experimentell ermittelten Protonenpumpströme konnten in beiden Fällen nach Modell 3 simuliert werden, das für BR-haltige Membranen adsorbiert an eine Lipiddoppelschicht mit modifizierbarem Widerstand gültig ist.

- Der Protonencarrier CCCP beeinflusste die detektierte Photostromantwort, wobei nach Immobilisierung von Proteoliposomen bzw. PM-Fragmenten Unterschiede bezüglich der maximalen Stromdichten sowie des stationären Stroms festzustellen waren.

Die Adsorption von BR-haltigen Membranen an Lipiddoppelschichten wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. So konnten Seifert et al. (1993) die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität von BR in PM-Fragmenten nachweisen, die an festkörpergestützten

painted membranes auf Hexa- oder Oktadekanthiol-funktionalisierten Goldelektroden immobilisiert waren. Ein ähnliches System wurde unter Verwendung von Quecksilber (Hg)-gestützten Lipidmembranen (Dolfi et al., 2002) etabliert. Horn und Steinem (2005) gelang die Immobilisierung von PM-Fragmenten an nano-BLMs, die festkörperunterstützte und freitragende Membrankomponenten besitzen. Dies sind nur einige Beispiele, die den Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit der Literatur erlauben. Im Folgenden wird insbesondere die Funktion des *Spacer*-Lipids CPEO3 beleuchtet.

Bereits in Kap. 4 wurde postuliert, dass das *Spacer*-Lipid CPEO3 die Funktion eines Abstandhalters hat, der, über eine hydrophile Kette aus drei Ethylenoxyeinheiten, Lipiddoppelschicht und Goldelektrode unter Ausbildung eines ionischen Reservoirs räumlich voneinander trennt. Die impedanzspektroskopischen Untersuchungen an CPEO3-funktionalisierten Goldelektroden (Kap. 4.3.2) wurden so interpretiert, dass die chemisorbierten Monoschichten bis zu einem gewissen Grad hydratisiert werden, welches auf eine Einlagerung von Wasser in der Region der hydrophilen Ethylenoxyeinheiten zurückgeführt wurde. Im Folgenden werden die Photostromexperimente hinsichtlich der Aspekte genauer betrachtet, welche die Hypothese der Existenz eines ionischen Reservoirs untermauern. Während der Belichtung von BR-haltigen Membranen adsorbiert an *painted membranes* auf Basis von CPEO3 wurde in Anwesenheit des Protonencarriers CCCP ein von Null verschiedener stationärer Strom beobachtet. Zur theoretischen Beschreibung der Protonenpumpströme wurde ein elektrisches Modell gewählt, das neben den elektrischen Eigenschaften der BR-haltigen Membran das resistive und kapazitive Verhalten der darunterliegenden Grenzschicht berücksichtigt. Dieses Modell wurde auch in anderen Arbeiten zur Beschreibung der Protonenpumpaktivität genutzt (Horn und Steinem, 2005). Nach diesem Modell kann eine Leitfähigkeitserhöhung der unterliegenden Lipidmembran die Stromantwort derart beeinflussen, dass während der Belichtungszeit dann ein stationärer Strom beobachtet wird, wenn ein Ladungstransport in ein wässriges Kompartiment auf der gegenüberliegenden (*trans*)-Membranseite möglich ist. So muss auch der in dieser Arbeit beobachtete stationäre Strom daraus resultieren, dass zwischen Goldelektrode und Lipidmembran ein wässriges Reservoir vorliegt, das einen Ladungstransport über die Lipiddoppelschicht erlaubt. Die Eigenschaften dieses Reservoirs werden durch eine Gegenüberstellung des stationären Stroms aus Photostrommessungen an PM Fragmenten adsorbiert an *painted membranes,* basierend auf CPEO3-beschichteten Goldelektroden, und bereits bekannten Membransystemen im Folgenden erörtert.

Für das System PM-Fragmente/*painted membrane* auf CPEO3-funktionalisiertem Gold wurde eine kontinuierliche Zunahme des stationären Stroms mit steigender CCCP-Konzentration beobachtet. Nach dem von Le Blanc (1971) postulierten linearen Zusammenhang zwischen Protonencarrierkonzentration und Membranleitfähigkeit wurde eine Leitfähigkeitsänderung von (32 ± 3) nS cm^{-2} μM^{-1} ermittelt. Dieser Wert ist um zwei Größenordnungen kleiner als derjenige, der an lösungsmittelhaltigen, freistehenden Membranen (BLMs) zu 6,6 µS cm^{-2} μM^{-1} bestimmt wurde. Dies zeigt, dass die unter Verwendung von CPEO3 etablierten festkörperunterstützten Membranen zwar ein zweites wässriges Reservoir besitzen, das aber verglichen mit dem zweiten Kompartiment von BLMs sehr viel kleinere Leitfähigkeitsänderungen erlaubt. Krishna et al. (2003) konnten selbst für ionische Reservoire, die im Vergleich zu CPEO3 von Abstandshaltern aufgespannt wurden, deren hydrophile Kette bis zu viermal so lange war, nur eine eingeschränkte Leitfähigkeit für Ionen beobachten. Diesen Erkenntnissen zufolge lassen sich auch die Unterschiede zu den in anderen Arbeiten beschriebenen Protonenpumpströmen unter Einfluss eines Protonencarriers einordnen. So konnten Muneyuki et al. (1993) zeigen, dass die Zugabe von Carbonylcyanid-p-trifluormethoxy-phenylhydrazon (FCCP) zu einem System PM-Fragmente/BLM einen signifikanten stationären Strom induziert. Auch die Belichtung von PM-Fragmenten, die an nano-BLMs adsorbiert waren, lieferte in Anwesenheit von CCCP einen sehr ausgeprägten stationären Strom (Horn und Steinem, 2005). Für letztgenanntes System wurde die Leitfähigkeitsänderung pro CCCP-Konzentrationseinheit zu 1 µS cm^{-2} μM^{-1} bestimmt, welches ein Hinweis darauf ist, dass die elektrolytgefüllten Poren des porösen Aluminats ein zweites wässriges Kompartiment anbieten und den Protonenfluss nicht begrenzen. Dagegen wurde in dem von Seifert et al. (1993) etablierten System PM-Fragmente/*painted membrane*, immobilisiert auf Oktadekanthiol-funktionalisiertem Gold, nach Zugabe von CCCP kein stationärer Strom erhalten. Gleiches wurde beobachtet, wenn statt eines Alkanthiols das Thiolipid DPPTE verwendet wurde, das mit seiner Kopfgruppe direkt auf der Goldoberfläche verankert ist (Horn, 2005). Mit den beiden letztgenannten Fällen können die in dieser Arbeit etablierten *painted membranes* basierend auf CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen gegen die im weiteren Sinne als „festkörperunterstützt“ definierten Membranen abgrenzt und eher in die Klasse der sog. *tethered membranes* eingeordnet werden, die sich durch ein wässriges Reservoir auf der dem Festkörper zugewandten Membranseite auszeichnen.

Im Folgenden werden die Unterschiede erörtert, die sich bei der Messung von Protonenpumpströmen an PM-Fragmenten bzw. BR-haltigen Vesikeln auf CPEO3-funktionalisiertem Gold ergaben. Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene lineare Zusammenhang zwischen CCCP-Konzentration und Membranleitfähigkeit für das System PM-Fragmente/*painted membrane* konnte in Messungen an immobilisierten Proteoliposomen nicht erhalten werden. Vielmehr erreichte der stationäre Strom bereits in Anwesenheit von 1 µM CCCP einen Sättigungswert und wurde für größere Konzentrationen CCCP sogar wieder geringer. Ein ähnlicher Effekt wurde von Bamberg et al. (1984) beobachtet. Sie konnten zeigen, dass durch die Zugabe von 0,1 µM CCCP zu lösungsmittelhaltigen BLMs, an welche BR-haltige Vesikel adsorbiert waren, der lichtaktivierte Protonenstrom einen stationären Strom aufwies. Bei weiterer Erhöhung der Protonencarrierkonzentration jedoch wurde der stationäre Strom reduziert. Dies wurde damit begründet, dass durch die erhöhte Permeabilität der adsorbierten Vesikel zunehmend dieser Weg für den Protonenfluss zur Verfügung steht und dieser vermehrt darüber läuft, statt über die freistehende Membran abgeleitet zu werden (*shunt*-Mechanismus, Abb. 6-30). So ist es möglich, dass bei zu hoher Konzentration eines Entkopplers trotz der Anwesenheit eines zweiten wässrigen Kompartiments kein signifikanter stationärer Strom detektiert wird.

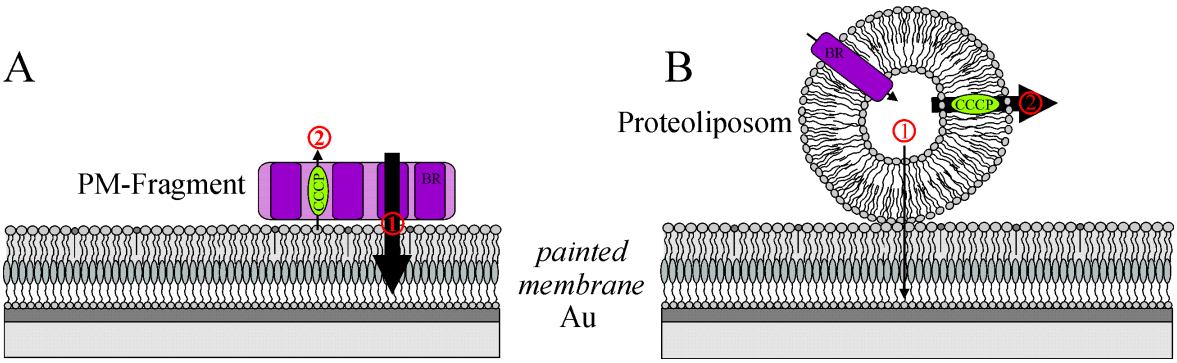


Abb. 6-30: Schematische Darstellung des *shunt*-Mechanismus. Die Pfeile repräsentieren den Protonenfluss, der dickere Pfeil symbolisiert den betragsmäßig größeren Strom. **A** CCCP lagert sich nur wenig in die PM-Fragmente ein, so kann ein Großteil der Protonen über Weg 1 in das ionische Reservoir fließen. **B** CCCP lagert sich gut in die Membran der Vesikel ein. Bei hohen CCCP-Konzentrationen wird der Protonenstrom über Weg 2 abgeleitet, über Weg 1 fließt nur ein kleiner Strom.

Nach Kasianowicz et al. (1984) ist eine signifikante Erhöhung der Permeabilität der lösungsmittelfreien Proteoliposomen gegenüber der *painted membrane* damit erklärbar, dass der Einfluss von CCCP umso größer ist, je höher die Dielektrizitätskonstante ε_r der Membran. Für PM-Fragmente ist auf Grund ihres hohen Proteinsgehalts ebenfalls eine erhöhte Dielektrizitätskonstante zu erwarten (McLaughlin und Dilger, 1980). Dass in Photostrommessungen an PM-Fragmenten der für BR-Vesikel postulierte *shunt*-Mechanismus nicht beobachtet wurde, wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass Purpurmembranen zu einem großen Teil aus zweidimensionalen Proteinkristallen aufgebaut sind, in die CCCP zwar partitioniert (Hendler et al., 2000), aber womöglich weitaus weniger als in Liposomen. Der Aspekt eines unterschiedlichen Einflusses von CCCP wurde auch bei den theoretischen Berechnungen der Protonenpumpströme nach Modell 3 berücksichtigt. Die erhaltenen Stromkurven wurden unter der Annahme niedriger bzw. höherer Leitfähigkeitsvariation für PM-Fragmente bzw. Proteoliposomen in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden simuliert.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Photostromantworten von immobilisierten BR-Molekülen in PM-Fragmenten bzw. Vesikeln ist hinsichtlich der maximalen Stromdichten und der Zeitkonstanten nach Ein- und Ausschalten der Lichtquelle zu verzeichnen. Während der Betrag der Ein- und Ausschaltstromdichten im Falle der PM-Fragmente kontinuierlich mit Zunahme der CCCP-Konzentration anstieg, wurde dies im Fall der adsorbierten BR-haltigen Vesikel nicht beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die adsorbierten Proteoliposomen, wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, bereits bei geringen CCCP-Konzentrationen eine sehr hohe Permeabilität aufweisen. Nach Bamberg et al. (1984) ist der in diesem Zusammenhang erwähnte *shunt*-Effekt dann besonders deutlich zu erkennen, wenn die BR-Konzentration und damit der Initialpumpstrom $I_{p,0}$ gering ist. Ein expertimenteller Hinweis auf eher niedrige BR-Konzentrationen der immobilisierten Proteoliposomen ist durch eine Betrachtung der ermittelten Zeitkonstanten des Ein- und Ausschaltprozesses zu finden, deren Quotient bereits bei 1 µM CCCP einen Wert von 0,67 ergab. Das Verhältnis dieser Größen zueinander geht nach Modell 3 dann gegen 1, wenn die durch CCCP modifizierten Membranleitfähigkeiten die Größenordnung des Quotienten aus Initialpumpstrom $I_{p,0}$ und intrinsischem Spannungsparameter U^* erreicht.

Abschließend sei erwähnt, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Modellbetrachtungen zur Protonenpumpaktivität aus Gründen der Vereinfachung der Aspekt des intrinsischen Protonentransportmechanismus der BR-Moleküle (Lanyi, 1997) vernach-

lässigt wurde. Es ist bekannt, dass die Protonen in einem sog. Photozyklus über mehrere Zwischenstufen über die Membran transportiert werden (Abb. 1-9), wobei die Zeitkonstanten τ_i dieser Prozesse nach Hendler et al. (2000) in einer Größenordnung von 4,5 bis 33 ms liegen. In einer Studie an auf Teflonfolien immobilisierten PM-Fragmenten unter Verwendung von CCCP konnte gezeigt werden, dass die durch die resistiven und kapazitiven Eigenschaften R und C der BR-haltigen Membran vorgegebene Zeitkonstante RC maßgeblich die detektierte Stromantwort beeinflusst. So wurde für Werte von RC, die kleiner waren als die intrinsische Zeitkonstante τ_i, eine Abnahme des detektierten Protonenpumpstroms beobachtet. Dagegen war mit Zeitkonstanten RC, die weit über τ_i lagen, eine Zunahme des Messsignals zu erkennen. Übertragen auf die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der maximalen Stromdichten bedeutet dies, dass die elektrischen Eigenschaften der PM-Fragmente durch CCCP weitaus weniger beeinflusst wurden als die der Proteoliposomen. Dies ist in Einklang mit den oben erfolgten Interpretationen zum Verlauf des stationären Stroms als Funktion der Protonencarrierkonzentration.

Anhand dieser Ausführungen wird deutlich, dass das detektierte Stromsignal der Protonenpumpaktivität von BR in PM-Fragmenten oder Proteoliposomen adsobiert an festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten auf Gold durch zahlreiche Systemparameter beeinflusst wird. Diese Messungen konnten dazu beitragen, die Existenz eines wässrigen Reservoirs und damit die Funktion von CPEO3 als Abstandhalter nachzuweisen. Des Weiteren wurde geschlossen, dass die lösungsmittelfreien Lipiddoppelschichten der Proteoliposomen weitaus empfindlicher gegenüber der Einlagerung des Ionophors CCCP sind als die PM-Fragmente bzw. die lösungsmittelhaltigen *painted membranes*. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um die Ergebnisse zu den durch Fusion von Liposomen bzw. Proteoliposomen hergestellten Lipidmembranen, deren Etablierung als Ziel dieser Arbeit formuliert wurde, einzuordnen.

6.4.2 Transfer von Bacteriorhodopsin aus Proteoliposomen in Modellmembranen

Integration von BR in festkörperunterstützte Membranen

Um BR in festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten zu integrieren, wurde die Strategie der Fusion von Proteoliposomen auf CPEO3-beschichteten Goldoberflächen verfolgt. Die erhaltenen Grenzschichten wurden sowohl impedanzspektroskopisch als auch mittels einer Apparatur zur Messung von Photoströmen untersucht. An festkörperunterstützten Membranen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Auf Basis der CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen wird eine Lipiddoppelschicht aufgebaut, wobei die Protonenpumpaktivität von BR erhalten bleibt.

- Der Protonencarrier CCCP partitioniert in die Lipiddoppelschicht und modifiziert die Stromantwort.

Zur Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten sind die Arbeiten von Puu et al. (1995) sowie die sehr ausführliche Studie von Steinem et al. (1997a) zu nennen, in der die Fusion von Proteoliposomen auf Thiolipid-funktionalisierten Goldelektroden beschrieben wird. Die Anzahl von Publikationen zur Rekonstitution von BR in festkörpergestützte Membransysteme ist vergleichweise gering. Häufig werden Ionenkanäle wie etwa Gramicidin oder auch der Actetylcholinrezeptor (AChR) (Vockenroth et al., 2007) genutzt, um den funktionellen Einbau transmembranständiger Proteine in neuartige Lipidmembranen, immobilisiert auf Festkörpern, zu verifizieren. Das größte Problem bei der Verwendung von BR in festkörperunterstützten Systemen liegt darin, dass die lichtaktivierte Protonenpumpaktivität nur dann zweifelsfrei nachgewiesen werden kann, wenn das unterliegende Material keinen Photoartefakt hervorruft. Bei den sehr häufig verwendeten Halbleitern oder metallischen Oberflächen kann es durch die Absorption von Photonen zur Ladungstrennung kommen, welches einen unspezifischen Stromfluss induziert.

Zur Diskussion der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Protonenpumpaktivität von BR in festkörperunterstützten Membranen werden die von Steinem et al. (1997a) erhaltenen Erkenntnisse herangezogen. Sie konnten zeigen, dass trotz des unterliegenden Festkörpers die Integration von BR unter Erhalt der Funktionalität möglich ist, auch dann,

wenn statt eines *Spacer*-Lipids ein Thiolipid ohne Abstandhalter verwendet wurde. Die dabei erhaltenen maximalen Einschaltstromdichten von 2 – 16 nA cm^{-2} sind bei gleicher Filterfrequenz (100 ms) ähnlich zu denen in dieser Arbeit erzielten Stromdichten von 1 - 2 nA cm^{-2}. Daraus wird geschlossen, dass der durch CPEO3 erzeugte Abstand zur Goldoberfläche ebenfalls groß genug ist, um die transmembranständige Integration von BR zu erlauben. Es stellte sich jedoch die Frage, inwieweit sich die Cholesterinfunktion von CPEO3 auf die Funktionalität von BR auswirkt. Dazu wurde die BR-Aktivität in Proteoliposomen aus DPhPC mit einem Cholesteringehalt von 30 mol %, die auf festkörpergestützten *painted membranes* immobilisiert wurden, untersucht. Im Vergleich zu Messungen an BR-haltigen Vesikeln bestehend aus einer Cholesterin-freien Lipidmatrix konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Protonenpumpaktivität beobachtet werden. Hinsichtlich der ausgebildeten Membranstrukturen schlugen Steinem et al. (1997a) ein Modell vor, das neben der vollständigen Fusion von Proteoliposomen zu einer Lipiddoppelschicht auch hemifusionierte Vesikel beinhaltet. Dies konnte mit keiner der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden explizit nachgewiesen werden, ist aber durchaus ein denkbares Szenario. Um genauere Erkenntnisse zur Struktur der Oberfläche nach Fusion der Vesikel zu erhalten, könnten für ein topographisches Bild der Oberfläche rasterkraftmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Mit Hilfe der dissipativen Quarzmikrowaage (QCM-D) Technik könnte die Fusion zeitabhängig unter Beobachtung der Dissipation, die eine Aussage zu den viskoelastischen Eigenschaften der Oberfläche erlaubt, aufgelöst werden.

Integration von BR in porenüberspannende Membranen

Die Integration von BR aus Proteoliposomen in porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminaten ergab nach impedanzspektroskopischen Untersuchungen und lichtinduzierten Photostrommessungen in zwei unabhängigen Präparationen A und B unterschiedliche Ergebnisse. Zudem wurden BR-haltige porenüberspannende Membranen auf porösem Silizium visualisiert:

- Die Integration von BR in porenüberspannende Membranen hat Einfluss auf die laterale Mobilität der Lipide und induziert domänenartige Strukturen.

- BR ist als *tool* zur Unterscheidung von kapazitiv angekoppelten und membranintegrierten Proteinen geeignet. Es wurden Modelle erstellt, nach denen BR entweder vermehrt in die porenüberspannenden Membranen transferiert wird oder aber in hemifusionierten Proteoliposomen verbleibt.

- Die porenüberspannenden Membranen besitzen eine hohe Sensitivität gegenüber der Insertion von CCCP.

Ein Blick in die Literatur zeigt, dass die meisten Studien zur Integration von BR in unterschiedliche artifizielle Membransysteme mehr als 10 Jahre zurückliegen. Dabei wurden u. a. Untersuchungen an transmembranständigem BR in BLMs durchgeführt, um mit BR als Modell-Transmembranprotein die Funktionalität in den Lipidmembranen (Bamberg et al., 1981) oder die Fusion von Proteoliposomen mit diesen (Mirsky et al., 1983) zu zeigen. Auch die Spannungsabhängigkeit der Protonenpumpaktivität konnte so untersucht werden (Braun et al., 1988).

Zur Einordnung der am porenüberspannenden Membransystem beobachteten Protonenpumpströme werden Arbeiten herangezogen, welche die an freitragenden Membranen ermittelte BR-Aktivität beschreiben. Bamberg et al. (1981) konnten zeigen, dass die Belichtung von transmembranständigen BR-Molekülen in einem von Null verschiedenen stationären Strom resultiert, während für Proteoliposomen, die an die Membranen adsorbiert waren, ein transienter, gegen Null abfallender Strom beobachtet wurde. Im Fall von gleichzeitig adsorbiertem und integriertem BR zeigten die Stromantworten beide Phänomene. Diese Ergebnisse stimmen qualitativ mit den an porenüberspannenden Membranen erfolgten Beobachtungen überein. Der in Abwesenheit von Entkopplern detektierte stationäre Strom kann damit zweifelsfrei auf die lichtinduzierte Aktivität von BR-Molekülen zurückgeführt werden, die in die porenüberspannenden Membranen transferiert wurden, wie in dem dazu postulierten Modell (Abb. 6-27) dargestellt. Da die Richtung des Protonentransports unidirektional ist und sich der Strom von entgegengesetzt eingebauten BR-Molekülen aufhebt, kann aus dem Wert des stationären Stroms kein Rückschluss auf die Anzahl der integrierten Proteine geführt werden. Eine Möglichkeit, die Einbaurichtung von BR in porenüberspannenden Membranen zu ermitteln, besteht darin, die Protonenpumpaktivität durch Zugabe von Lanthankationen zu blockieren. Diese Ionen

binden an das Carboxylende des Proteins und reduzieren drastisch die *turn over*-Rate für Protonen (Chang et al., 1985).

Mirsky et al. (1983) haben an BLMs den Stromverlauf nach der Fusion BR-haltiger Vesikel hinsichtlich einer vollständigen bzw. einer Hemifusion theoretisch beschrieben, welches in Einklang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur angestrebten Rekonstitution von BR in porenüberspannende Membranen ist. Während in der vorliegenden Arbeit die Fusion der Proteoliposomen impedanzspektroskopisch untersucht wurde, verfolgten Mirsky et al. (1983) diesen Prozess durch Messung der Photostromaktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Dabei konnte der erfolgreiche, transmembranständige Einbau von BR auf den zunehmenden, stationären Strom zurückgeführt werden. Die Durchführung einer solchen Untersuchung birgt auch für das System der porenüberspannenden Membranen die Möglichkeit, den Transfer von BR in die Lipiddoppelschicht zeitlich zu verfolgen. Interessant wird dieser zeitliche Parameter des Proteintransfers dann, wenn andere, komplexere Moleküle in die Membranen eingebracht werden sollen, die weniger robust sind als BR und zügige Präparationsmethoden erfordern, um ihre Funktionalität zu erhalten.

Die Bestimmung der Protonenpumpaktivität von BR in Anwesenheit des membranlöslichen Entkopplers CCCP ermöglichte es, den Einfluss einer erhöhten Membranleitfähigkeit auf das Photostromsignal zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bereits eher niedrige Konzentrationen CCCP ausreichend waren, um die detektierte Protonenpumpaktivität signifikant zu ändern. So wurde die Permeabilität der auf Gold immobilisierten Lipiddoppelschicht durch 10 µM CCCP, die einer porenüberspannenden Membran bereits durch 2 µM CCCP merklich beeinflusst, wie an dem Auftreten eines stationären Stroms ersichtlich wurde. Eine Steigerung der CCCP-Konzentration auf 3 µM erhöhte die Leitfähigkeit für Protonen so stark, dass keine stabile Stromnulllinie mehr aufgezeichnet werden konnte. Dagegen konnten an nano-BLMs bis zu 40 µM CCCP eingesetzt werden, ohne dass dies die Aufzeichnung des Signals störte (Horn und Steinem, 2005). *Painted membranes* auf Goldoberflächen konnten ebenfalls bis zu 20 µM CCCP zugesetzt werden, ohne dass auf Grund hoher Membranpermeabilität eine Elektrodenpolarisation in Form einer Drift detektiert wurde, wie im Fall von lösungsmittelfrei präparierten Lipidmembranen.

Die Gegenüberstellung der nach der *painting*-Methode präparierten und der durch Vesikelfusion erhaltenen Membransysteme lässt die erhöhte Sensitivität der in dieser Arbeit

etablierten, lösungsmittelfreien Lipidmembranen gegenüber CCCP erkennen. Zum einen ist es vorstellbar, dass sich das lipophile Molekül CCCP in Resten von organischem Lösungsmittel löst und so seine Funktion als Protonencarrier verliert, zum anderen kann dies nach Kasianowicz et al. (1984) aber auch auf Unterschiede bezüglich der Dielektrizitätskonstante zurückgeführt werden. Dass die lösungsmittelfreien, porenüberspannenden Membranen sehr sensitiv gegenüber Membranmodulatoren sind, konnte bereits in Kap. 4.4.3.6 anhand des Einflusses des Detergenz *o*-POE auf deren Permeabilität gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind an BR-dotierten porenüberspannenden Membranen neben elektrochemischen Untersuchungen auch Messungen mit der Methode des *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) durchgeführt worden. Erste Ergebnisse zeigten, dass die laterale Beweglichkeit der Lipide durch die Anwesenheit des Proteins eingeschränkt wurde, was vergleichbaren Studien an GUVs zur Folge erwartet wurde (Schram et al., 1994). Auch das Auftreten der beobachteten, domänenartigen Strukturen in Anwesenheit von Membranproteinen wird in der Literatur beschrieben und auf Effekte wie Proteinanteil, Protein-Lipid Wechselwirkungen oder äußere Temperatur zurückgeführt (Sperotto und Mourtisen, 1991). Eine genauere Aufklärung dieser Phänomene erfordert noch weitere Untersuchungen.

Die Ergebnisse aus beiden Membransystemen zeigen, dass durch die Fusion von Proteoliposomen BR in hoher Dichte in die porenüberspannenden Lipiddoppelschichten transferiert werden konnte. Unter Berücksichtigung der *turn-over*-Rate von BR mit 100 Protonen pro Sekunde (Bamberg et al., 1981) kann abgeschätzt werden, dass etwa $6 \cdot 10^7$ Moleküle einen Protonenpumpstrom der Größenordnung von 1 nA generieren. Diese Anzahl von BR-Molekülen mit einer Proteinquerschnittsfläche von 11,5 nm^2 würde einem Anteil von 0,06 % der aktiven Fläche von 0,0104 cm^2 entsprechen. Damit liegt dieser Wert weit unter dem Flächenanteil von 14,2 %, der bei einem vollständigen Proteintransfer aus Liposomen mit einem BR-Gehalt von 1 mol % erwartet werden würde. Die tatsächliche Anzahl integrierter BR-Moleküle muss allerdings größer sein, da der Protonentransport unidirektional vom C-Terminus zum N-Terminus ist und sich der Stromfluss von entgegengerichteten Proteinen aufhebt. Die Tatsache, dass mit der angewendeten Methode zur Rekonstitution von BR ein signifikanter Pumpstrom mit positivem Vorzeichen detektierte werden konnte, zeigt, dass die Proteine bevorzugt mit dem C-Terminus auf der Seite des *cis*-Kompartiments in der Membran vorliegen. Nach Rigaud et al. (1988) ist BR

in den nach der *reverse phase*-Methode präparierten Proteoliposomen mit dem C-Terminus nach außen integriert. Die Photostrommessungen würden dafür sprechen, dass diese Einbaurichtung auf die festkörperunterstützten und porenüberspannenden Membranen übertragen wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Vesikel, wie in Kap. 4 diskutiert, nach einem für hydrophobe Oberflächen postulierten Mechanismus spreiten, wonach die Lipidmonoschicht zum Vesikelinneren die Unterseite der artifiziellen Membran bildet (Jenkins et al., 2002).

7 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, für die Präparation von porenüberspannenden Membranen auf porösen Substraten einer Methode zu entwickeln, welche die Integration von Transmembranproteinen in hoher Dichte erlaubt. Als Substrate sollten goldbeschichtete poröse Aluminate sowie poröses Silizium verwendet werden, die mit dem *Spacer*-Lipid CPEO3 hydrophobisiert wurden. Die Membranen sollten elektrisch isolierend sein, um die Aktivität der darin rekonstituierten Ionenkanäle und Transporter mit elektrochemischen Methoden untersuchen zu können. Gramicidin D und Bacteriorhodopsin, deren Eigenschaften in der Literatur ausführlich beschrieben wurden, sollten als Modell-Transmembranproteine eingesetzt werden.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode der Fusion von Proteoliposomen zu isolierenden porenüberspannenden Membranen steht ein System zur Verfügung, mit dem hohe Proteindichten erhalten werden können. Die Integration einer Vielzahl von Molekülen erlaubt auch die elektrochemische Charakterisierung von Transportern mit sehr geringen *turn over*-Raten, die als einzelnes Molekül kein signifikantes elektrisches Signal liefern, wie am Beispiel der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin gezeigt wurde. Ferner ist die Rekonstitution von Transmembranproteinen auf Basis von Proteoliposomen dann von großem Interesse, wenn sehr sensitive Ionenkanäle eingesetzt werden, die in Anwesenheit solubilisierender Detergenzien ihre Konformation und damit ihre Funktionalität verlieren. Für die Untersuchung der Wechselwirkungen von Wirkstoffen mit einem Transmembranrezeptor steht häufig nicht die Aufklärung von Mechanismen an erster Stelle, was vor allem auf Einzelkanalebene erfolgt und aufwendige statistische Analysen erfordert, sondern Erkenntnisse darüber, ob der Wirkstoff prinzipiell Einfluss auf deren Aktivität nimmt. Dazu sind Experimente von Interesse, in denen durch eine Vielzahl von Molekülen ein integrales Signal erhalten wird, das die Wirkung von Substanzen in Form eines Positiv- oder Negativ-Nachweises anzeigt. Dieses Nachweisprinzip wurde an Gramicidin D-dotierten porenüberspannenden Membranen sowohl bezüglich der Ionenselektivität als auch mit dem Kanalblocker Ca^{2+} demonstriert. Neben der Eignung zur Integration von Ionenkanälen und Transportern wurde gezeigt, dass porenüberspannende Membranen eine hohe Insertionseffizienz gegenüber membranlöslichen Substanzen wie Detergenzien oder

Protonencarriern besitzen. Diese Eigenschaft könnte für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Lipidmembranen und pharmakologisch relevanten Membranmodulatoren wie etwa Anästhetika genutzt werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen, porenüberspannenden Membranen wurden hauptsächlich mittels Impedanzspektroskopie, also mit einer integralen Messmethode, untersucht. Daneben sind auch alternative Anwendungsgebiete denkbar. Auf Grund der Verwendung von Substraten mit hochgeordneten Porenstrukturen besteht die Möglichkeit, einzelne porenüberspannende Membranen individuell zu adressieren. Mit der Methode der *scanning ion conductance microscopy* (SICM) ist es möglich, die Leitfähigkeit einzelner membranüberspannter Poren zu erfassen. Damit könnten aktive Ionenkanäle in einzelnen porenüberspannenden Membranen lokalisiert und gezielt untersucht werden, was eine automatisierbare Alternative zu den klassischen freitragenden Membranen (BLMs) darstellt. Des Weiteren bieten porenüberspannende Membranen auf porösen Substraten ein *array* von unabhängigen Lipiddoppelschichten, welches es ermöglicht, in Abhängigkeit von Lipidkomposition oder Substratfunktionalisierung unter Einsatz eines Rasterkraftmikroskops Untersuchungen zur Membranmechanik an definierten Membranarealen durchzuführen. Dabei kann eine Vielzahl von Kraft-Indentations-Kurven mit der Methode des sog. *force mappings* anhand einer einzigen Präparation automatisch erfasst werden, wodurch in kürzester Zeit ausreichend Daten für statistische Analysen zur Verfügung stehen, wie in noch unveröffentlichten Arbeiten (Ingo Mey) bereits gezeigt werden konnte. Sind die einzelnen Poren mehr als 400 nm groß, können an porenüberspannenden Membranen auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit zum Einsatz fluoreszenzmarkierter Proteine, deren laterale Mobilität dann beispielsweise in Abhängigkeit von der Lipidumgebung verfolgt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es bereits, den Einfluss von Bacteriorhodopsin auf die Beweglichkeit der Lipide zu untersuchen. Eine weitere interessante Anwendung der porenüberspannenden Membranen besteht darin, diese über mikro-Kompartimenten zu etablieren, um das unter den Lipidmembranen liegende wässrige Kompariment als Reaktionsraum zu nutzen. Unter Verwendung von Bacteriorhodopsin könnte beispielsweise der Transport von Protonen über die Membran mit fluoreszierenden pH-Indikatoren beobachtet werden. Des Weiteren könnte der über den einzelnen Membranen aufgebaute Protonengradient genutzt werden, um Proteine wie ATPasen aus der Atmungskette zu aktivieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten impedanzspektroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass porenüberspannende Membranen großes Potential für einen Einsatz in analytischen *screening assays* an Transmembranproteinen besitzen. Zur Anwendung in der Biosensorik wäre eine Weiterentwicklung hin zu einem Durchflusssystem interessant, das durch die gezielte Zuleitung von Vesikeln und Analyten eine Automatisierung der Membranpräparation sowie der Untersuchung integrierter Proteine erlaubt. Die in dieser Arbeit gezeigte hohe Stabilität der porenüberspannenden Membranen sowie die Möglichkeit des „Membranrecyclings“ durch das Wiederverschließen von Defekten nach erneuter Vesikelzugabe tragen zusätzlich zur Attraktivität für biosensorische Anwendungen bei. Sie sind damit gegenüber den zu diesem Zweck entwickelten festkörperunterstützten Membranen, die trotz der Verwendung von *Spacer*-Lipiden kein echtes zweites wässriges Reservoir besitzen, eine hochpotente Alternative.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Präparation von porenüberspannenden Lipidmembranen entwickelt, nach der lösungsmittelfreie, hochohmige Lipiddoppelschichten erstmals durch die Fusion von Vesikeln auf einer porösen Oberfläche erhalten werden konnten. Dies eröffnete die Möglichkeit, durch den Einsatz von Proteoliposomen porenüberspannende Membranen mit hoher Proteindichte herzustellten.

Auf Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3)-funktionalisierten porösen Aluminaten mit Poren von 60 nm Durchmesser sowie ohne bzw. mit verbleibendem Barriereoxid in der Randregion konnten hochohmige Lipiddoppelschichten erhalten werden. Für die mittels Impedanzspektroskopie untersuchten Lipidmembranen konnten elektrische Modelle entwickelt werden, welche die genaue Beschreibung der Membraneigenschaften zuließen. Die porenüberspannenden Membranen waren über mehrere Tage stabil. Membrandefekte konnten durch die Zugabe von Vesikeln wieder aufgefüllt werden. Gegenüber hohen Ionenkonzentrationen waren die porenüberspannenden Membranen relativ dicht, konnten durch das Detergenz Octylpolyoxyethylen (*o*-POE) jedoch leicht, wenngleich reversibel, permeabilisiert werden. Das Porin OmpF konnte in hoher Dichte aus der Elektrolytlösung in die Membranen rekonstituiert werden. Porenüberspannende Membranen auf porösem Silizium mit Poren bis zu 2 µm konnten in rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopischen Experimenten visualisiert werden. In Kraft-Indentations- und *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Experimenten wurde gezeigt, dass die Membranen elastisch sind und die Lipide eine vergleichweise hohe laterale Mobilität besitzen. Lipidmembranen auf Goldelektroden dienten als Vergleichssystem, das insbesondere zur Aufklärung der Abstandhalterfunktion von CPEO3 beitrug.

Gramicidin D konnte aus Proteoliposomen in hoher Dichte in porenüberspannende Membranen transferiert werden. Es konnten charakteristische Eigenschaften wie die Selektivität für Alkalikationen und die Blockade durch Ca^{2+} in impedanzspektroskopischen Untersuchungen bestätigt werden. Zudem konnte der durch niedrige Elektrolytkonzentrationen bedingte Massentransport mittels eines elektrischen Modells erfasst werden.

Die Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin deutete auf eine funktionelle Integration des Proteins aus Proteoliposomen in die porenüberspannenden Membranen hin. Daneben lieferten eine Korrelation zwischen Impedanzdaten und Photostromexperimenten an porenüberspannenden und festkörpergestützten Membranen sowie simulierte Protonen-

pumpströme nach Membranmodellen Hinweise auf den Membranbildungsprozess. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der porenüberspannenden Membranen gegenüber dem membranlöslichen Protonencarrier Carbonyl-cyanid-m-chloro-phenylhydrazon (CCCP) sehr groß ist.

9 Literaturverzeichnis

A

Allen, T.W., O.S. Andersen & B. Roux. 2003. Structure of gramicidin a in a lipid bilayer environment determined using molecular dynamics simulations and solid-state NMR data. *J. Am. Chem. Soc.* 125(32):9868-9877.

Alonso-Romanowski, S., L.M. Gassa & J.R. Vilche. 1995. An investigation by EIS of gramicidin channels in bilayer lipid membranes. *Electrochim. Acta* 40(10):1561-1567.

Andersen, O.S. 1984. Gramicidin channels. *Ann. Rev. Physiol.* 46:531-548.

Atanasov, V., N. Knorr, R.S. Duran, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, W. Knoll & I. Koper. 2005. Membrane on a chip: a functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophys. J.* 89(3):1780-1788.

Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson & W.W. Webb. 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16(9):1055-1069.

B

Badura, A., B. Esper, K. Ataka, C. Grunwald, C. Wöll, J. Kuhlmann, J. Heberle & M. Rögner. 2006. Light-driven water splitting for (bio)-hydrogen production: Photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device. *Photochem. Photobiol.* 82:1385-1390.

Bamberg, E., H.-J. Appel, N.A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve & P. Läuger. 1979. Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar lipid bilayers. *Biophys. Struct. Mech.* 5:277-292.

Bamberg, E., N.A. Dencher, A. Fahr & M.P. Heyn. 1981. Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78(12):7502-7506.

Bamberg, E., P. Hegemann & D. Oesterhelt. 1984. The chromoprotein of halorhodopsin is the light-driven electrogenic chloride pump in Halobacterium halobium. *Biochemistry* 23(25):6216-6221.

Bamberg, E. & P. Läugner. 1977. Blocking of gramicidin channel by divalent cations. *J. Membr. Biol.* 35:351-375.

Bamberg, E., K. Noda, E. Gross & P. Lauger. 1976. Single-channel parameters of gramicidin A,B, and C. *Biochim. Biophys. Acta* 419(2):223-228.

Bard, A.J. & L.R. Faulkner. 2001. Electrochemical Methods. *John Wiley & Sons: New York*.

Bayrhuber, M., T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter & K. Zeth. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(40):15370-15375.

Becucci, L., M.V. Carbone, T. Biogiotti, M. D'Amico, M. Olivotto & R. Guidelli. 2008. Incorporation of the HERG potassium channel in a mecury supported lipid bilayer. *J. Phys. Chem. B* 112:1315-1319.

Benz, R., O. Fröhlich, P. Läuger & M. Montal. 1975. Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 394:323-334.

Blodgett, K. 1935. Films built by depositing successive monomolecular layers on solid surface. *J. Am. Chem. Soc.* 57:1007-1022.

Böcker, M., S. Muschter, E.K. Schmitt, C. Steinem & T.E. Schäffer. 2009. Imaging and patterning of suspended micro-BLMs with scanning ion conductance microscopy. *Langmuir* 5:3022-3028.

Boden, N., R.J. Bushby, S. Clarkson, S.D. Evans, P.F. Knowles & A. Marsh. 1997. The design and synthesis of simple molecular tethers for binding biomembranes to a gold surface. *Tetrahedron* 53(31):10939-10952.

Borisenko, V., T. Lougheed, J. Hesse, E. Fureder-Kitzmuller, N. Fertig, J.C. Behrends, G.A. Woolley & G.J. Schutz. 2003. Simultaneous optical and electrical recording of single gramicidin channels. *Biophys. J.* 84(1):612-622.

Braun, D., N.A. Dencher, A. Fahr, M. Lindau & M.P. Heyn. 1988. Nonlinear voltage dependence of the light-driven proton pump current of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 53:617-622.

Butler, T.Z., M. Pavlenok, I.M. Derrington, M. Niederweis & J.H. Gundlach. 2008. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(52):20647-20652.

C

Chang, C.-H., J.-G. Chen, R. Govindjee & T. Ebrey. 1985. Cation binding in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:396-400.

Chen, C.-P., A. Ganguly, C.-H. Wang, C.W. Hsu, S. Chattopadhyay, Y.-K. Hsu, Y.-C. Chang, K.-H. Chen & L.C. Chen. 2009. Label-free dual sensing of DNA molecules using GaN nanowires. *Anal. Chem.* 81(1):36-42.

Chen, W. & J.-H. Yuan. 2005. Characterization and manipulation of the electroosmotic flow in porous anodic alumina membranes. *Anal. Chem.* 77:8102-8108.

Cheng, Y., N. Boden, R.J. Bushby, S. Clarkson, S.D. Evans, P.F. Knowles, A. Marsh & R.E. Miles. 1998. Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopic characterization of fluid lipid bilayers tethered to solid supports. *Langmuir* 14:839-844.

Chien, M.-C., G.-J. Wang & W.C. Yu. 2007. Modeling ion diffusion current in nanochannel using infinitesimal distribution resistor-capacitor circuits. *Jap. J. Appl. Phys.* 46(11):7436-7440.

Chung, S.-H., O.S. Andersen & V. Krishnamurthy. 2007. Biological membrane ion channels. Dynamics, structure and applications. *Springer, New York.*

Cole, K.S. & R.H. Cole. 1941. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating current characteristics. *J. Chem. Phys.* 9:341-351.

Cornell, B.A., V. Braach-Maksvytis, L.G. King, P.D.J. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek & R.J. Pace. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* 387:580-583.

Coster, H.G.L. & J.R. Smith. 1974. The molecular organisation of biomolecular lipid membranes: A study of the low frequency Maxwell-Wagner impedance dispersion. *Biochim. Biophys. Acta* 373:151-164.

Cowan, S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius & J.P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358(6389):727-733.

Cremer, P.S. & S.G. Boxer. 1999. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J. Phys. Chem. B* 103:2554-2559.

D

Danelon, C., A. Suenaga, M. Winterhalter & I. Yamato. 2003. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophys. Chem.* 104(3):591-603.

Dawson, J.L. & D.G. John. 1980. Diffusion impedance - an extended general analysis. *J. Electroanal. Chem.* 110:37-47.

De Levie, R. & N.G. Seidah. 1974. Transport of ions of one kind through thin membranes. 3. Current-voltage curves for membrane-soluble ions. *J. Membr. Biol.* 16(1):1-16.

de Levie, R., N.G. Seidah & H. Moreira. 1974. Transport of ions of one kind through thin membranes. 4. Admittance for membrane-soluble ions. *J. Membr. Biol.* 16(1):17-42.

Degefa, T.H. & J. Kwak. 2008. Lable-free aptasensor for platelet-derived growth factor (PDGF protein). *Anal. Chim. Acta* 613(2):163-168.

Diao, P., D. Jiang, X. Cui, D. Gu, R. Tong & B. Zhong. 1999. Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and AC impedance. *J. Electroanal. Chem.* 464:61-67.

Dolfi, A., F. Tadini-Buoninsegni, M.R. Moncelli & R. Guidelli. 2002. Photocurrents generated by bacteriorhodopsin adsorbed on thiol/lipid bilayers supported by mercury. *Langmuir* 18(16):6345-6355.

Drexler, J. & C. Steinem. 2003. Pore-suspending lipid bilayers on porous alumina investigated by electrical impedance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 107:11245-11254.

E

Edelhoch, H. 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6(7):1948-1954.

Erbe, A., R.J. Bushby, S.D. Evans & L.J.C. Jeuken. 2007. Tethered bilayer lipid membranes studied by simultaneous attenuated total reflectance infrared spectroscopy and electrochemical impedance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 111:3515-3524.

Ernst, O.P., P.A. Sánchez Murcia, P. Daldrop, S.P. Tsunoda, S. Kateriya & P. Hegemann. 2008. Photoactivation of channelrhodopsin. *J. Biol. Chem.* 283(3):1637-1643.

F

Faham, S. & J.U. Bowie. 2002. Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J. Mol. Biol.* 316(1):1-6.

Fahey, P.F. & W.W. Webb. 1978. Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid crystals. *Biochemistry* 17(15):3046-3053.

Faiss, S., S. Schuy, D. Weiskopf, C. Steinem & A. Janshoff. 2007. Phase transition of individually addressable microstructured membranes visualized by imaging ellipsometry. *J. Phys. Chem. B* 111:13979-13986.

Favero, G., L. Campanella, S. Cavallo, A. D'Annibale, M. Perella, E. Mattei & T. Ferri. 2005. Glutamate receptor incorporated in a mixed hybrid bilayer lipid membrane array, as a sensing element of a biosensor working under flowing conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 127:8103-8111.

Finkelstein, A. & O.S. Andersen. 1981. The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport. *J. Membr. Biol.* 59(3):155-171.

Fletcher, S. 1994. Tables of degenerate electrical networks for use in the equivalent-circuit analysis of electrochemical systems. *J. Electrochem. Soc.* 141(7):1823-1826.

Florin, E.-L. & H.E. Gaub. 1993. Painted supported lipid membranes. *Biophys. J.* 64:375-383.

Fuoss, R.M. & J.G. Kirkwood. 1941. Electrical properties of solids. VIII. Dipole moments in polyvinyl chloride-diphenyl systems. *J. Am. Chem. Soc.* 63:385-394.

G

Galla, H.-J. 1988. Spektroskopische Methoden in der Biochemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.*

Gassull, D., A. Ulman, M. Grunze & M. Tanaka. 2008. Electrochemical sensing of membrane potential and enzyme function using gallium arsenide electrodes functionalized with supported membranes. *J. Phys. Chem. B* 112:5736-5741.

Girard, P., J. Pécréaux, G. Lenoir, P. Falson & J.-L. Rigaud. 2004. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 87:419-429.

Gomadam, P.M. & J.W. Weidner. 2005. Analysis of electrochemical impedance spectroscopy in proton exchange membrane fuel cells. *Int. J. Energy Res.* 29:1133-1151.

Greathouse, D.V., J.F. Hinton, K.S. Kim & R.E. Koeppe, 2nd. 1994. Gramicidin A/short-chain phospholipid dispersions: chain length dependence of gramicidin conformation and lipid organization. *Biochemistry* 33(14):4291-4299.

Gritsch, S., P. Nollert, F. Jähnig & E. Sackmann. 1998. Impedance spectroscopy of porin and gramicidin pores reconstituted into supported lipid bilayers on indium-tin-oxide electrodes. *Langmuir* 14:3118-3125.

Grottker, J. 2007. Untersuchung des spannungsabhängigen Verhaltens von OmpF und seiner LECE-Mutante in nano-BLMs. *Diplomarbeit, Georg-August Universität Göttingen*.

H

He, K., S.J. Ludtke, Y. Wu, H.W. Huang, O.S. Andersen, D. Greathouse & R.E. Koeppe, 2nd. 1994. Closed state of gramicidin channel detected by X-ray in-plane scattering. *Biophys. Chem.* 49(1):83-89.

Henderson, R. & P. Unwin. 1975. Three-dimensional model of the purpule membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257:28-32.

Hendler, R.W., L.A. Drachev, S. Bose & M.K. Joshi. 2000. On the kinetics of voltage formation in purple membranes of Halobacterium salinarium. *Eur. J. Biochem.* 267(19):5879-5890.

Hennesthal, C. & C. Steinem. 2000. Pore spanning lipid bilayers visualized by scanning force microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 122:8085-8086.

Herrig, A., M. Janke, J. Austermann, V. Gerke, A. Janshoff & C. Steinem. 2006. Cooperative adsorption of ezrin on PIP2-containing membranes. *Biochemistry* 45(43):13025-13034.

Herrmann, T.R. & G.W. Rayfield. 1978. The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes. *Biophys. J.* 21:111-125.

Höfer, I. 2007. Untersuchung des Einflusses der Oberflächenfunktionalisierung auf die Ausbildung und Stabilität von nano-BLMs. *Diplomarbeit, Georg-August Universität Göttingen*.

Hollemann, A.F. & E. Wiberg. 1995. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. *Walter de Gruyter, Berlin, New York* 101. Auflage.

Horn, C. 2005. Aktivität lichtaktivierter Proteine adsorbiert an funktionalisierten nanoporösen Materialien. *Dissertation, Universität Regensburg*.

Horn, C. & C. Steinem. 2005a. Photocurrents generated by bacteriorhodopsin adsorbed on nano-black lipid membranes. *Biophys. J.* 89(2):1046-1054.

Horn, C. & C. Steinem. 2005b. Photocurrents generated by bacteriorhodpsin adsorped on nano-black lipid membranes. *Biophys J* 89:1046-1054.

Hsu, R.W.-W., C.-C. Yang, C.A. Huang & Y.-S. Chen. 2005. Electrochemical corrosion studies on Co-Cr-Mo implant alloy in biological solutions. *Mater. Chem. Phys.* 93(2-3):531-538.

I

Im, W. & B. Roux. 2002. Ions and counterions in a biological channel: a molecular dynamics simulation of OmpF porin from Escherichia coli in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. *J. Mol. Biol.* 319(5):1177-1197.

J

Jackson, M.B. 2006. Molecular and cellular biophysics. *Cambridge University Press*.

Jenkins, A.T.A., N. Boden, R.J. Bushby, S.D. Evans, P.F. Knowles, R.E. Miles, S.D. Ogier, H. Schönherr & G.J. Vancso. 1999. Microcontact printing of lipophilic self assembled monolayers for the attachment of biomimetic lipid bilayers to surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 121:5274-5280.

Jenkins, A.T.A., R.J. Bushby, N. Boden, S.D. Evans, P.F. Knowles, Q. Liu, R.E. Miles & S.D. Ogier. 1998. Ion-selective lipid bilayers tethered to microcontact printed self-assembled monolayers containing cholesterol derivatives. *Langmuir* 14(17):4675-4678.

Jenkins, A.T.A., R.J. Bushby, EvansS.D., W. Knoll, A. Offenhäuser & S.D. Ogier. 2002. Lipid vesicle fusion on μCP patterned self-assembled monolayers: Effects of pattern geometry on bilayer formation. *Langmuir* 18:3176-3180.

Jessensky, O. 1997. Untersuchungen zum Porenwachstum in 6H-Siliziumkarbid und anodischem Aluminiumoxid. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle*.

Jessensky, O., F. Müller & U. Gösele. 1998. Self-organized formation of hexagonal pore structures in anodic alumina. *J. Electrochem. Soc.* 145:3735-3740.

Jeuken, L.J.C., S.D. Connell, P.J.F. Henderson, R.B. Gennis, S.D. Evans & R.J. Bushby. 2006. Redox enzymes in tethered membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 128:1711-1716.

Jeuken, L.J.C., N.N. Daskalakis, X. Han, K. Sheikh, A. Erbe, R.J. Bushby & S.D. Evans. 2007. Phase separation in mixed self-assembled monolayers and its effect on biomimetic membranes. *Sens. Actuators B* 124:501-509.

Jorcin, J.-B., M.E. Orazem, N. Pebere & B. Tribollet. 2006. CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* 51:1473-1479.

Jovic, V.D. 2003. Determination of the correct value of C_{dl} from the impedance results fitted by the commercially available software. *Research Solutions and Resources*.

K

K'Owino, I.O. & O.A. Sadik. 2005. Impedance spectroscopy: A powelful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. *Electroanalysis* 17(23):21001-22113.

Kahya, N., E.I. Pecheur, W.P. de Boeij, D.A. Wiersma & D. Hoekstra. 2001. Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.* 81(3):1464-1474.

Kalb, E., S. Frey & L.K. Tamm. 1992. Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1103(2):307-316.

Kasianowicz, J., R. Benz & S. McLaughlin. 1984. The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *J. Membr. Biol.* 82(2):179-190.

Katsaras, J., R.S. Prosser, R.H. Stinson & J.H. Davis. 1992. Constant helical pitch of the gramicidin channel in phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 61(3):827-830.

Kelkar, D.A. & A. Chattopadhyay. 2007. The gramicidin ion channel: A model membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:2011-2025.

Keller, C.A., K. Glasmästar, V.P. Zhdanov & B. Kasemo. 2000. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 84:5443-5446.

Kerner, Z. & T. Pajkossy. 1998. Impedance of rough capacitive electrodes: the role of surface disorder. *J. Electroanal. Chem.* 448:139-141.

Kleinekofort, W., J. Avdiev & B. Brutschy. 1996. A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 152(135-142).

Kloß, D., M. Fischer, A. Rothermel, J.C. Simon & A.A. Robitzki. 2008. Drug testing on 3D *in vitro* tissues trapped on a microcavity chip. *Lab on a Chip* 8:879-884.

Kratzke, M. 2008. Fusion von Vesikeln mit nano-BLMs zum Transfer von Membranproteinen. *Diplomarbeit, Georg-August Universität Göttingen*.

Krishna, G., J. Schulte, B.A. Cornell, R.J. Pace & P.D. Osman. 2003. Tethered bilayer membranes containing ionic reservoirs: Selectivity and conductance. *Langmuir* 19:2294-2305.

Krishna, G., J. Schulte, B.A. Cornell, R.J. Pace, L. Wieczorek & P.D. Osman. 2001. Tethered lipid bilayer membranes containing ionic reservoirs: The interfacial capacitance. *Langmuir* 17:4858-4866.

L

Ladha, S., A.R. Mackie, L.J. Harvey, D.C. Clark, E.J.A. Lea, M. Brullemans & H. Duclohier. 1996. Lateral Diffusion in planar lipid bilayers: A fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophys. J.* 71:1364-1373.

Langmuir, I. & V. Schäfer. 1938. Activities of urease and pepsin monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 60:1351-1360.

Lanyi, J.K. 1997. Mechanism of ion transport across membranes. Bacteriorhodopsin as a prototype for proton pumps. *J. Biol. Chem.* 272(50):31209-31212.

Lanyi, J.K. 2007. Proton transfer in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1757:1012-1018.

Lanzl, K. 2005. Lösungsmittelfreie Präparation porenüberspannender Membranen ausgehend von Vesikeln. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.

Lasch, J. 1995. Interaction of detergents with lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1241:269-292.

Le Blanc, O.H. 1971. Effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on bilayer membranes: Carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone. *J. Mem. Biol.* 4:227-251.

Levitt, D.G., S.R. Elias & J.M. Hautman. 1978. Number of water molecules coupled to the transport of sodium, potassium and hydrogen via gramicidin, nonactin and valinomycin. *Biochim. Biophys. Acta* 512:436-451.

Li, A., F. Müller, A. Birner, K. Nielsch & U. Gösele. 1998a. Hexagonal pore arrays with 50-420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina. *J. Appl .Phys.* 84:6023-6026.

Li, F., L. Zhang & R.M. Metzger. 1998b. On the growth of highly ordered pores in anodized aluminum oxide. *Chem. Mater.* 10:2470-2480.

Liberman, E.A. & V.P. Topaly. 1965. Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 163:126-136.

Lingler, S., I. Rubinstein, W. Knoll & A. Offenhäuser. 1997. Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold. *Langmuir* 13:7085-7091.

Lisdat, F. & D. Schäfer. 2008. The use of elechtochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:1555-1567.

Liu, H.-B., G. Plopper, S. Earley, Y. Chen, B. Ferguson & X.-C. Zhang. 2007. Sensing minute changes in biological cell monolayers with THz differential time-domain spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 22:1075-1080.

Lobo, V.M.M., A.C.F. Ribeiro & L.M.P. Verissimo. 1998. Diffusion coefficients in aqueous solutions of potassium chloride at high and low concentrations. *J. Mol. Liq.* 78:139-149.

LoGrasso, P.V., F. Moll, 3rd & T.A. Cross. 1988. Solvent history dependence of gramicidin A conformations in hydrated lipid bilayers. *Biophys. J.* 54(2):259-267.

Longstaff, C. & R.R. Rando. 1987. Deprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin is obligate in light-induced proton pumping. *Biochemistry* 26(19):6107-6113.

Lundbaek, J.A., P. Birn, A.J. Hansen, R. Sogaard, C. Nielsen, J. Girshman, M.J. Bruno, S.E. Tape, J. Egebjerg, D.V. Greathouse, G.L. Mattice, R.E. Koeppe, 2nd & O.S. Andersen. 2004. Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* 123(5):599-621.

M

Macdonald, D.D. 2006. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* 51:1276-1288.

Macdonald, J.R. 1987. Impedance spectroscopy. *John Wiley & Sons: New York*.

MacDonald, R.C., R.I. MacDonald, B.P. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao & L.R. Hu. 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061(2):297-303.

Malinin, V.S., P. Frederik & B.R. Lentz. 2002. Osmotic and curvature stress affect PEG-induced fusion of lipid vesicles but not mixing of their lipids. *Biophys. J.* 82(4):2090-2100.

Masuda, H. & K. Fukuda. 1998. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science* 268.

Matsuura, H. & T. Satawa. 1995. Anomalous conformational behaviour of short poly(oxyethylene) chains in water. An FT-IR spectroscopic study. *J. Mol. Liq.* 65/66:313-316.

McGillivray, D.J., G. Valincius, D.J. Vanderah, W. Febo-Ayala, J.T. Woodward, F. Heinrich, J.J. Kasianowicz & M. Lösche. 2007. Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases* 2(1):21-33.

McLaughlin, S.G. & J.P. Dilger. 1980. Transport of protons across membranes by weak acids. *Physiol. Rev.* 60(3):825-863.

Menke, M., V. Gerke & C. Steinem. 2005. Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44(46):15296-15303.

Miedema, H., A. Meter-Arkema, J. Wierenga, J. Tang, B. Eisenberg, W. Nonner, H. Hektor, D. Gillespie & W. Meijberg. 2004. Permeation properties of an engineered bacterial OmpF porin containing the EEEE-locus of Ca^{2+} channels. *Biophys. J.* 87(5):3137-3147.

Miercke, L.J., M.C. Betlach, A.K. Mitra, R.F. Shand, S.K. Fong & R.M. Stroud. 1991. Wild-type and mutant bacteriorhodopsins D85N, D96N, and R82Q: purification to homogeneity, pH dependence of pumping, and electron diffraction. *Biochemistry* 30(12):3088-3098.

Mirsky, V.M., V.S. Sokolov, T.V. Dyukova & E.I. Melnik. 1983. A study of bacteriorhodopsin-containing proteoliposome incorporation into bimolecular lipid membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11:327-346.

Montal, M. & P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:3561-3566.

Müller, P., H.T. Rudin, H.T. Tien & W.C. Wescott. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 67:534-535.

Muneyuki, E., M. Ikematsu, M. Iseki, Y. Sugiyama, A. Mizukami, K. Ohno, M. Yoshida & H. Hirata. 1993. Direct transmembraneous reconstitution of bacteriorhodopsin into planar phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1183:171-179.

Myers, V.B. & D.A. Haydon. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. *Biochim. Biophys. Acta* 274(2):313-322.

N

Nahir, T.M. & R.P. Buck. 1993. Steady-state-current impedance spectroscopy of plasticized PVC membranes containing neutral carriers. *Electrochim. Acta* 38(18):2691-2697.

Naumann, R., S.M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K.B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübben, K. Vasilev & W. Knoll. 2003. Tethered lipid bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* 19:5433-5443.

Needham, D. & R.S. Nunn. 1990. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* 58:997-1009.

Neher, E., J. Sandblom & G. Eisenman. 1978. Ionic selectivity, saturation and block in gramicidin A channels. *J. Membr. Biol.* 40:97-116.

Nestorovich, E.M., C. Danelon, M. Winterhalter & S.M. Bezrukov. 2002. Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S .A.* 99(15):9789-9794.

Nielsch, K., J. Choi, K. Schwirn, R.B. Wehrspohn & U. Gösele. 2002. Self-ordering regimes of porous alumina: The 10% porosity rule. *Nano Lett.* 2(7):677-680.

Nielsch, K., Müller, F., Li, A., Gösele, U. 2000. Uniform nickel deposition into ordered alumina pores by pulsed electrodeposition. *Adv. Mater.* 12:582-586.

O

Oesterhelt, D. & B. Hess. 1973. Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of Halobacterium halobium. *Eur. J. Biochem.* 37:316-326.

Oesterhelt, D. & W. Stoeckenius. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nat. New. Biol.* 233(39):149-152.

Ohki, S. 1970. Properties of lipid bilayer membranes: Membrane thickness. *J. Theor. Biol.* 26:277-287.

Okazaki, T., K. Morigaki & T. Taguchi. 2006. Phospholipid vesicle fusion of micropatterned polymeric bilayer substrates. *Biophys. J.* 91:1757-1766.

Ollila, F. & J.P. Slotte. 2002. Partitioning of Triton X-100, deoxycholate and $C_{10}EO_8$ into bilayers composed of native and hydrogenated egg yolk sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* 1564:281-288.

P

Pandey, P.C., B.C. Upadhyay, C.M.D. Pandey & H.C. Pathak. 1999. Electrochemical studies on D96N bacteriorhodopsin and its application in the development of photosensors. *Sens. Actuators B* 56:112-120.

Perez-Luna, V.H., S. Yang, E.M. Rabinovich, T. Buranda, L.A. Sklar, P.D. Hampton & G.P. Lopez. 2002. Fluorescence biosensing strategy based on energy transfer between fluorescently labeled receptors and metallic surface. *Biosens. Bioelectr.* 17:71-78.

Plant, A., L. 1993. Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold. *Langmuir* 9:2764-2767.

Plant, A.L. 1999. Supported hybrid bilayer membranes as rugged cell membrane mimics. *Langmuir* 15:5128-5135.

Poirier, G.E. & M.J. Tarlov. 1994. The C(4 x 2) superlattice of n-alkanethiol monolayers self-assembled on Au(111). *Langmuir* 10:2853-2856.

Ponce, M.A., P.R. Bueno, J. Varela, M.S. Castro & C.M. Aldao. 2008. Impedance spectroscopy analysis on SnO_2 thick-films gas sensors. *J. Mater. Sci. Mater. Electr.* 19:1169-1175.

Purrucker, O., H. Hillebrandt, K. Adlkofer & M. Tanaka. 2001. Deposition of highly resistive lipid biayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* 47:791-798.

Puu, G., I. Gustafson, E. Artursson & P.-A. Ohlsson. 1995. Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support *Biosens. Bioelectron.* 10:463-476.

Q

Qiu, Y., R. Liao & X. Zhang. 2008. Real-time monitoring primary cardiomyocyte adhesion based on electrochemical impedance spectroscopy and electrical cell-substrate impedance sensing. *Anal. Chem.* 80:990-996.

R

Raguse, B., V. Braach-Maksvytis, B.A. Cornell, L.G. King, P.D. Osman, R.J. Pace & L. Wieczorek. 1998. Tethered lipid bilayer membranes: Formation and ionic reservoir characterization. *Langmuir* 14:648-659.

Rairigh, D., A. Mason & C. Yang. 2006. Analysis of on-chip impedance spectroscopy methodologies for sensor arrays. *Sens. Lett.* 4:398-402.

Raisch, P., W. Haiss, R.J. Nichols & D.J. Schiffrin. 2001. Time domain impedance spectroscopy for probing the termination of silicon (100) surfaces in aqueous KOH. *J. Phys.Chem. B* 105:12508-12515.

Rigaud, J.-L., A. Bluzat & S. Buschlen. 1983. Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:373-382.

Rigaud, J.-L., M.T. Paternostre & A. Bluzat. 1988. Mechanism of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 27:2677-2688.

Roberts, G.G. 1990. Langmuir-Blodgett-films. *Plenum Press, New York.*

Römer, W. 2004. Impedance analysis and single channel recordings on pore-suspending lipid bilayers based on highly ordered pore arrays. *Dissertation, Universität Regensburg*.

Römer, W. & C. Steinem. 2004. Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina. *Biophys. J.* 86(2):955-965.

Rossi, C., E. Briand, P. Parot, M. Odorico & J. Chopineau. 2007. Surface response methodology for the the study of supported membrane formation. *J. Phys. Chem. B* 111:7567-7576.

Rostovtseva, T.K., E.M. Nestorovich & S.M. Bezrukov. 2002. Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin. *Biophys. J.* 82(1 Pt 1):160-169.

S

Sackmann, E. 1994. The seventh Datta Lecture. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Lett.* 346(1):3-16.

Samec, Z., A. Trojanek & E. Samcova. 1995. Ion and pore fluid transport properties of a Nafion membrane separating two electrolyte solutions. Part I: Kinetics of the proton and alkali metal cation transport. *J. Electroanal. Chem.* 389:1-11.

Sarges, R. & B. Witkop. 1965. Gramicidin V. The Structure of Valine- and Isoleucine-Gramicidin A. *J. Am. Chem. Soc.* 87:2011-2020.

Schiller, S.M., R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz & W. Knoll. 2003. Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42:208-211.

Schmitt, E.K. 2005. Charakterisierung von porenüberspannenden Membranen und Einzelkanalmessungen an OmpF insertiert in nano-BLMs. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.

Schmitt, E.K., M. Vrouenraets & C. Steinem. 2006. Channel activity of OmpF monitored in nano-BLMs. *Biophys. J.* 91:2163-2171.

Schoch, R.B., H. van Lintel & P. Renaud. 2005. Effect of the surface charge on ion transport through nanoslits. *Phys. Fluids* 17:100604 100601-100605.

Schram, V., J.F. Tocanne & A. Lopez. 1994. Influence of obstacles on lipid lateral diffusion: computer simulation of FRAP experiments and application to proteoliposomes and biomembranes. *Eur. Biophys. J.* 23(5):337-348.

Schulz, G.E. 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1565(2):308-317.

Seifert, K., K. Fendler & E. Bamberg. 1993. Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys. J.* 64(2):384-391.

Singer, S. & G. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.

Snatzke, G. 1981. Chiroptische Methode in der Stereochemie. *Chemie in unserer Zeit* 15:78-87.

Sondermann, M., M. George, N. Fertig & J.C. Behrends. 2006. High-resolution electrophysiology on a chip: Transient dynamics of alamethicin channel formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1758(4):545-551.

Sperotto, M.M. & O.G. Mourtisen. 1991. Mean-field and Monte-Carlo simulation studies of the lateral distribution of proteins in membranes. *Eur. Biophys. J.* 19:157-168.

Stein, D., M. Kruithof & C. Dekker. 2004. Surface-charge-governed ion transport in nanofluidic channels. *Phys. Rev. Lett.* 93(3):035901- 035901-035904.

Steinem, C. 1997. Ionentransport in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten. *Dissertation, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster.*

Steinem, C., A. Janshoff, F. Höhn, M. Sieber & H.-J. Galla. 1997a. Proton translocation across bacteriorhodopsin containing solid supported membranes. *Chem. Phys. Lipids* 89(2):141-152.

Steinem, C., A. Janshoff, W.-P. Ulrich, M. Sieber & H.-J. Galla. 1997b. Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42:213.

Steinem, C., A. Janshoff, W.P. Ulrich, M. Sieber & H.J. Galla. 1996. Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1279(2):169-180.

Steltenkamp, S., M.M. Müller, M. Deserno, C. Hennesthal, C. Steinem & A. Janshoff. 2006. Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 91:217-226.

T

Takei, H., Y. Gat, Z. Rothman, A. Lewis & M. Sheves. 1994. Active site lysine backbone undergoes conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Biol. Chem.* 269(10):7387-7389.

Tieleman, D.P. & H.J. Berendsen. 1998. A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoyloleoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys. J.* 74(6):2786-2801.

Trammell, S.A., I. Griva, A. Spano, S. Tsoi, L.M. Tender, J. Schnur & N. Lebedev. 2007. Effects of distance and driving force on photoinduced electron transfer between photosynthetic reaction centers and gold electodes. *J. Phys. Chem.* 111:17122-12130.

U

Ulman, A. 1996. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 96:1533-1554.

V

Vallejo, A.E. & C.A. Gervasi. 2002. Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels in supported lipid bilayers. *Bioelectrochemistry* 57:1-7.

Vockenroth, I.K., P.P. Atanasova, A.T.A. Jenkins & I. Köper. 2008. Incorporation of α-Hemolysin in different tethered bilayer lipid membrane architectures. *Langmuir* 24:496-502.

Vockenroth, I.K., P.P. Atanasova, J.R. Long, A.T.A. Jenkins, W. Knoll & I. Köper. 2007. Functional incorporation of the pore forming segment of AChR M2 into tethered bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:1114-1120.

W

Wallace, B.A. 2000. Common structural features in gramicidin and other ion channels. *BioEssays* 22:227-234.

Wallace, B.A., W.R. Veatch & E.R. Blout. 1981. Conformation of gramicidin A in phospholipid vesicles: circular dichroism studies of effects of ion binding, chemical modification, and lipid structure. *Biochemistry* 20(20):5754-5760.

Warburg, E. 1899. Über das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden. *Ann. Phys. Chem.* 67(3):493-499.

Weiskopf, D., E.K. Schmitt, M.H. Kluhr, S.K. Dertinger & C. Steinem. 2007. Micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates: rupture process and lateral mobility. *Langmuir* 23(18):9134-9139.

White, R.J., E.N. Ervin, T. Yang, X. Chen, S. Daniel, P.S. Cremer & H.S. White. 2007. Single ion-channel recordings using glass nanopore membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 129:11766-11775.

White, S.H. 1974. Temperature dependent structural changes in planar bilayer membranes: Solvent "freeze out". *Biochim. Biophys. Acta* 356:8-16.

Wiegand, G., N. Arribas-Layton, H. Hillebrandt, E. Sackmann & P. Wagner. 2002. Electrical properties of supported lipid bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B* 106:4245-4254.

Wiegand, G., R. Neumaier & E. Sackmann. 2000. Fast impedance spectroscopy: General aspects and performance study for single ion channel measurements. *Rev. Sci. Instrum.* 71(6):2309-2320.

Williams, L.M., S.D. Evans, T.M. Flynn, A. Marsh, P.F. Knowles, R.J. Bushby & N. Boden. 1997. Kinetics of the unrolling of small unilamellar phospholipid vesicles onto a self-assembled monolayer. *Langmuir* 13:751-757.

Woolley, G.A. & B.A. Wallace. 1992. Model ion channels: Gramicidin and Alamethicin. *J. Mem. Biol.* 129:109-136.

Z

Zhang, Y.L., J. Dunlop & J.E. Dalziel. 2007. Recombinant human voltage-gated skeletal muscle sodium channels are pharmacologically functional in planar lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* 22(6):1006-1012.

Zheng, L., X. Liao & Y.T. Zhu. 2006. Parametric study of carbon nanotube growth via cobalt-catalyzed ethanol decomposition. *Mater. Lett.* 60:1968-1972.

10 Anhang

10.1 Gleichung zur Beschreibung des Einschaltstroms unter Einfluss eines Dämpfungsglieds

$$I(t) = \frac{CI_{\mathrm{p,0}}}{C + C_{\mathrm{p}}}\left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{an}}}\right)\right) + \frac{CI_{\mathrm{p,0}}}{G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}}\left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\mathrm{d}}}\right) - \exp\left(-\frac{t(\tau_{\mathrm{d}} + \tau_{\mathrm{an}})}{\tau_{\mathrm{d}}\tau_{\mathrm{an}}}\right)\right) \tag{10-1}$$

mit den Zeitkonstanten:

$$\tau_{\mathrm{an}} = \frac{C + C_{\mathrm{p}}}{G_{\mathrm{p}} + \frac{I_{\mathrm{p,0}}}{U^*}} \tag{10-2}$$

$$\tau_{\mathrm{d}} = R_{\mathrm{d}} C_{\mathrm{d}} \tag{10-3}$$

10.2 Ersatzschaltbilder

Im Folgenden sind die Gleichungen zur Beschreibung der Impedanz $Z(\omega)$ der in dieser Arbeit verwendeten Ersatzschaltbilder zusammengestellt. Die Gleichungen für die Ersatzschaltbilder, welche ein CPE enthalten, sind nich aufgeführt.

***(i) RC*-Kreis**

$$Z(\omega) = R_{\Omega} - i\frac{1}{\omega C} \tag{10-4}$$

***(ii) RRC*-Kreis**

$$Z(\omega) = R_{\Omega} + \frac{R_{\mathrm{m}}}{1+\left(\omega C_{\mathrm{m}} R_{\mathrm{m}}\right)^2} - i\frac{\omega C_{\mathrm{m}} R_{\mathrm{m}}^2}{1+\left(\omega C_{\mathrm{m}} R_{\mathrm{m}}\right)^2} \tag{10-5}$$

Im Falle der untersuchten Barriereoxidschicht von porösen Aluminaten werden die elektrischen Parameter R_{ox} und C_{ox} angegeben.

***(iii)* Ersatzschaltkreis zur Analyse von Impedanzspektren auf porösen Aluminaten mit flächenbegrenzter Siebstruktur**

Real- und Imaginärteil werden getrennt angegeben:

$$Z^{\mathrm{Re}}(\omega) = \left(\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right) + \omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(-\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} - \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)\right) \tag{10-6}$$

$$\cdot \frac{\dfrac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \dfrac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \dfrac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}}{\left(\dfrac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \dfrac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \dfrac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2 - \left(\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \omega R_{\mathrm{ox}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2}$$

$$-\left(\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right) + \frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(-\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} - \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)\right)$$

$$\cdot \frac{\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \omega R_{\mathrm{ox}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}}{\left(\dfrac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \dfrac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \dfrac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2 - \left(\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}} + \omega R_{\mathrm{ox}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}} + \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \dfrac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2}$$

$$Z^{\mathrm{Im}}(\omega) = i\left[\begin{array}{l} \left(-\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)+\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(-\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}-\omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)\right) \\ \cdot \frac{\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}}{\left(\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2-\left(\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2} \\ +\left(\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)+\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}\left(-\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}-\omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)\right) \\ \cdot \frac{\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}}{\left(\frac{R_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\frac{R_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\frac{R_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2-\left(\omega R_{\mathrm{m,o}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,o}}}{\mathrm{a}}+\omega R_{\mathrm{ox}}^2 \frac{C_{\mathrm{ox}}}{\mathrm{b}}+\omega R_{\mathrm{m,c}}^2 \frac{C_{\mathrm{m,c}}}{\mathrm{c}}\right)^2} \end{array}\right] \quad (10\text{-}7)$$

.

$$\mathrm{a} = 1 + \omega R_{\mathrm{m,o}}^2 C_{\mathrm{m,o}}^2 \quad (10\text{-}8)$$

$$\mathrm{b} = 1 + \omega R_{\mathrm{ox}}^2 C_{\mathrm{ox}}^2 \quad (10\text{-}9)$$

$$\mathrm{c} = 1 + \omega R_{\mathrm{m,c}}^2 C_{\mathrm{m,c}}^2 \quad (10\text{-}10)$$

10.3 Symbolverzeichnis

A CPE-Parameter

A Fläche

C Kapazität

D Diffusionskoeffizient

G Leitfähigkeit

I Strom

J Stromdichte

K Gleichgewichtskonstante

M	Molare Masse
R	Widerstand
T	Transmission, Temperatur
Z	Impedanz, Warburg-Element
c	Konzentration
d	Dicke, Abstand
f	Frequenz
k	Ratenkonstante
m	Masse
s	Steigung
t	Zeit
v	Geschwindigkeit
w	Wichtungsfaktor
Θ	Bedeckungsgrad, Elliptizität
α	CPE-Parameter
ε	Dielektrizitätskonstante, molarer Extinktionskoeffizient, elektrische Feldkonstante
ϕ	Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung
λ	Wellenlänge
σ	Konzentrationsiwederstand
τ	Zeitkonstante
ω	Kreisfrequenz

10.4 Abkürzungsverzeichnis

A/D	Analog/Digital
AC	Wechselstrom (*alternating current*)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*)
BLM	schwarze Membran (*black lipid membrane*)
Bodipy-PC	β-Bodipy C_{12}-HPC
BR	Bacteriorhodopsin
CCCP	Carbonyl-cyanid-m-chloro-phenylhydrazon
CD	Circular-Dichroismus

cmc	kritische Mizellarkonzentration (*critical micellar concentration*)
CPE	*constant phase element*
CPEO3	Cholesterylpolyethylenoxythiol
DC	Gleichstrom (*direct current*)
DOPC	1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin
DPPA	1,2-Dipalmityl-*sn*-glycero-3-phosphatidsäure
E.coli	*Escherichia coli*
FRAP	*fluorescence recovery after photobleaching*
DPPTE	1,2-Dipalmityl-*sn*-glycero-3phospothioethanol
GUV	*giant unilamellar vesicles*
LUV	große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*)
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MRW	*mean residue weight*
OmpF	*Outer membrane protein* F
o-POE	*n*-Octylpolyoxyethylen
OT	Octanthiol
PM	Purpurmembran
POPC	1-Palmityl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin
TexasRed DHPE	1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3phospoethanol-amin, Triethylammoniumsalz
TMA	Tetramethylammoniumchlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar (*visible*)

10.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck (Darmstadt)
Argon	Linde (München)
Bodipy-PC	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Calciumchlorid Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Chloroform	VWR International (Darmstadt)

Chrom(VI)-Oxid	Merck (Darmstadt)
n-Dekan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPhPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPA	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Glasträger	Plano (Wetzlar)
Gramicidin D	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hämazytometerplättchen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Hämatokritpaste	Brand (Wertheim)
ITO-Glasträger	Präzisionsglas & Optik (Iserlohn)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Kalzium(II)-Chlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Lithiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Mucasol	Merck (Darmstadt)
n-Octylpolyoxyethylen	Bachem (Bubendorf)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Oxalsäure-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt)
ortho-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
Polycarbonatmembranen	Averstin, (Ottawa, Kanada)
Quecksilber(II)-Chlorid	Merck (Darmstadt)
Salpetersäure 65 %	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (1 M)	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure, 95-97 %	Merck (Darmstadt)
Stickstoff	Linde (München)
Texas Red DHPE	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TMA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trifluorethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck (Darmstadt)

10.6 Materialien

Aluminium (99,999 %)	Goodfellow (Huntington, UK)
Gold-Target	Elektronen Optik Service (Dortmund)
Kalrez® O-Ringe	DuPont Dow Elast (Newark, USA)
Pinsel Stärke 1	Pelikan (Hannover)
Platindraht	Goodfellow (Huntington, UK)
Poröses Silizium	fluXXion (Eindhoven, Niederlande)
Schleifpapier P100	AEG (Frankfurt/Main)
Schwingquarz-Kristall für MTM10	Elektronen Optik Service (Dortmund)
Silberdraht, Ø 1,0 mm, geglüht	Goodfellow (Huntington, UK)
Titan-Target	Elektronen Optik Service (Dortmund)

10.7 Geräte

Anlage zur Elektroformation von GUVs

Frequenzgenerator Modell 5100B	Krohn-Hite (Brockton, USA)

Ätzapparatur

2400 Source Meter	Keithley Instr. (Cleveland, USA)
PS 280 DC Power Supply	Tektronix Inc. (Beaverton, USA)

CD-Spektrometer

Spectropolarimeter J-810	Jasco (Groß-Umstadt)

Fluoreszenzmikroskop

Axiotech Vario	Carl Zeiss (Jena)
EC Achroplan (40×/n.A. 0,8 W)	Carl Zeiss (Jena)
Filtersatz 44 (BP 475/40, FT500, BP 530/50)	Carl Zeiss (Jena)
Filterset 45 (BP 560/40, FT585, BP 630/75)	Carl Zeiss (Jena)

Impedanzspektrometer

Impedance/Gain-Phase Analyser SI 1260	Solartron Instr. (Farnborough, UK)
1296 Dielectric Interface	Solartron Instr. (Farnborough, UK)

Reinstwasseranlage

Milli Q Gradient A10	Millipore (Eschborn)

Photostrommessapparatur

428 Current Amplifier	Keithley (Germering)
Halogenlampe KL 2500	Opto Sonderbedarf GmbH (München)

Sputter Anlage

Sputter Coater 108 auto	Cressington (Watfort, USA)
Thickness Controller mtm 20	Cressington (Watfort, USA)

UV/VIS-Spektrometer

Cary 50	Varian (Darmstadt)

Sonstige Geräte

Miniextruder	Avestin (Ottawa, Kanada)
Feinwaage	Pine Brook (New York, USA)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Plasma Cleaner	Harrick (New York, USA)
Ultraschallbad Sonorex RK 255 H	Bandelin (Berlin)

Danksagung

An dieser Stelle danke ich

Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die sehr gute Betreuung und fruchtbare Diskussionen im Rahmen eines sehr interessanten Themas. Besonderer Dank gilt dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, für drei Monate ein Kurzprojekt in Neuseeland zu bearbeiten.

Herrn Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die freundliche Übernahme des Korreferats.

dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Förderung meiner Promotion.

dem Boehringer Ingelheim Fonds für die finanzielle Förderung des Neuseelandaufenthalts.

dem Kooperationspartner Lars Jeuken (Universität Leeds) für die anfängliche Bereitstellung des CPEO3.

Ingo Mey und Matthias Böcker für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen der „Poren".

Julia und Daniel für die sehr gute Arbeit rund um poröse Aluminate, GUVs, OmpF und Bacteriorhodopsin – hat viel Spass gemacht mit Euch!

den technischen Angestellten, die soviel geleistet haben, dass ich gar nicht alles aufzählen kann. Besondere Anerkennung gilt Jutta für die tolle Leistung bei der Isolierung des Bacteriorhodopsin und Hans-Jörg, der unermüdlich vor dem Abzug stand und CPEO3 in rauen Mengen bereitstellte.

allen aktuellen Laborkollegen und Ehemaligen (besonders Christian Horn für die Einführung in die Welt der nano-BLMs) für die sehr gute Atmosphäre während der Arbeitszeit und die sehr abwechslungsreichen Pausen(gespräche).

meinen Studienfreunden in Regensburg Tobi, Markus, Fipsi, Fabian, Hans und Alex. Auch wenn sich unsere Wege schon vor drei Jahren getrennt haben, war eine sehr lustige Zeit mit Euch, an die ich gerne zurückdenke.

Der Bath-*Crew* Hester, Anna und Nora für die lustigen Entdeckungsreisen in England, Holland, München, Hamburg...

meinen Freundinnen Anja, Barbara und Ruth für viele lustige und einige unvergessliche Feiern (Westerland!). Darüber hinaus auch für die Unterstützung, es ist schön Euch als Freunde zu haben!

meiner besten Freundin Renate, danke dafür, dass Du mit mir durch dick und dünn gehst!

meiner Schwester Ju für die Unterstützung während des ganzen Studiums und die lustigen Besuche in Wü, Gö, Bath und NZ. Schön, dass es Dich gibt! Sigi, danke für die schöne Zeit und alles andere in Neuseeland. Und natürlich dem Rest der Familie, danke dafür, dass ich bei Euch immer willkommen bin!

meinen Eltern. Dafür, dass Ihr mich bedingungslos unterstützt habt, im Studium und darüber hinaus. DANKE!!!

Lebenslauf

Eva Katharina Schmitt

Geboren am 28. April 1980 in Schweinfurt

Schulbildung

09/1986 – 07/1990	Grundschule Üchtelhausen
09/1990 – 06/1999	Celtis-Gymnasium Schweinfurt
01 – 04/1995	*Secondary School* Navan, Irland
25. 06. 1999	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,4)

Au Pair

07/1999 – 08/2000	Wayland, MA, USA

Studium

10/2000 – 09/2005	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Regensburg
15. 10. 2002	Vordiplom im Fach Chemie (Note: 1,1)
09/2003 – 02/2004	Studium der Chemie an der Univerity of Bath, Großbritannien
01/2005 – 09/2005	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Claudia Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg Thema: *Charakterisierung von porenüberspannenden Membranen und Einzelkanalmessungen an OmpF intersertiert in nano-BLMs.*
29.09.2005	Diplom im Fach Chemie (Note: 1,1)

Dissertation

11/2005 – 03/2006	Beginn der Dissertation am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
Seit 04/2006	Dissertation am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen Betreuerin: Prof. Dr. Claudia Steinem
11/2007 – 02/2008	Forschungsaufenthalt bei *AgResearch*, Palmerston North, Neuseeland

Förderungen

06/2006 – 05/2008	Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie
11/2007 – 02/2008	Reisestipendium des Boehringer Ingelheim Fonds

Posterpräsentationen und Vorträge

August 2005	**International Biophysics Congress** Montpellier (Frankreich) *Posterpräsentation*: Activity of OmpF in nano-BLMs
März 2006	**International Workshop** "Dynamics of artificial and biological membranes", Gomadingen *Vortrag*: Fluorescence and impedance studies on micro-BLMs
September 2006	**Deutsche Biophysik Tagung** Mainz *Posterpräsentation*: Pore-spanning membranes: Characterization and applications
Juli 2007	**European Biophysics Congress** London (Großbritannien) *Posterpräsentation*: Pore-spanning membranes: Characterization and applications
September 2007	**TETHMEM 07** "Novel Model Systems for Biomolecular Lipid Membranes" Tegernsee *Posterpräsentation*: Impedance spectroscopy on pore-spanning membranes
Juli 2008	**Chemie-Forum** Göttingen *Vortrag*: Porenüberspannende Membranen: Neue Wege in Präparation und Anwendung

Publikationen

Böcker, M., Muschter, S., Schmitt, E.K., Steinem, C., Schäffer, T.E. Imaging and patterning of pore-suspending membranes with scanning ion conductance microscopy (**2009**) *Langmuir*, 25, 3022-3028

Schmitt, E.K., Nurnabi, M., Bushby, R.J., Steinem, C. Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading (**2008**) *Soft Matter*, 4, 250-254

Weiskopf, D., Schmitt, E.K., Kluehr, M.H., Dertinger, S.K., Steinem, C. Micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates: rupture process and lateral mobility (**2007**) *Langmuir*, 23, 9134-9139

Schmitt, E.K., Vrouenraets, M., Steinem, C. Channel activity of OmpF monitored in nano-BLMs (**2006**) *Biophysical Journal*, 91, 2163-2171