

Stabilität und laterale Mobilität von porenüberspannenden Membranen auf porösen Siliziumsubstraten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Daniela Vera Weiskopf

aus Dettelbach

Göttingen, 2009

D 7

Referent: Prof. Dr. Ch. Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. C. Steinem

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2009

Meiner Mutter und meiner Schwester

Abstract

The aim of this study was to investigate the long term stability and lateral mobility of micro-BLMs (black lipid membrane) by means of impedance spectroscopy and fluorescence microscopy. Micro-BLMs are a novel hybrid system based on porous silicon that combines the advantages of solid supported membranes and freestanding lipid bilayers.

By means of fluorescence microscopy and impedance spectroscopy, it was shown that micro-BLMs rupture independently from each other, resulting in a continuous decrease in membrane resistance.

To determine the lateral mobility of the lipids in micro-BLMs, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was used. The diffusion coefficient of micro-BLMs, composed of a submonolayer of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTe), on which 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was painted, was determined to be $(9 \pm 5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ with an immobile fraction of $(24 \pm 5) \%$. Small amounts of solvent remain in the micro-BLMs, which contributes to the fluidity of the membrane system. This was deduced from the fact that pore suspending membranes prepared by spreading of giant unilamellar vesicles on porous silicon with the same pore diameter and also functionalized with DPPTe exhibit a diffusion coefficient that is by a factor of two smaller compared to the solvent-containing micro-BLMs. Diffusion measurements of the upper lipid monolayer demonstrated that only this monolayer contributes significantly to the lateral mobility. Finite-element-simulations elucidated that the measured diffusion coefficient is the sum of two individual diffusion constants, one that can be attributed to the free diffusion of the lipids in the pore suspending membrane area, while the other one is due to diffusion of the phospholipids on the pore rims.

The lateral diffusion of lipids in solvent free micro-BLMs prepared on the one hand on DPPTe and on the other hand on the spacer lipid (cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3) was compared. Compared to solvent-free micro-BLMs prepared on DPPTe functionalized substrates, the diffusion coefficient on CPEO3 functionalized substrates was by a factor of 1.8 larger, while the immobile fraction was by a factor 2 lower. This is caused by a lower surface coverage of CPEO3, which provides free space for the formation of mobile non immobilized lipid areas in the bottom lipid monolayer leading to an increased mobility of the lipids.

The insertion of diacetylene lipids (23:2 PC diyene) in the membrane and its polymerization by irradiation with UV-light resulted in a reduction of the lateral mobility of the membrane lipids.

In summary, the results demonstrate the strong influence of the boundary conditions (pore size, surface functionalization) on the lateral mobility of the lipids and the long term stability of the pore suspending membrane. It has been proven that micro-BLMs can serve as an adequate model system for biological membranes.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biomembranen.....	1
1.2	Artifizielle Membransysteme	3
1.3	Beweglichkeit von Lipiden innerhalb der Membran.....	10
2	ZIELSETZUNG	15
3	MATERIALIEN UND METHODEN	17
3.1	Impedanzspektroskopie	17
3.1.1	Physikalische Grundlagen	17
3.1.2	Versuchsaufbau	20
3.1.3	Auswertung.....	21
3.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
3.2.1	Fluoreszenz	24
3.2.2	Fluoreszenzmikroskop	28
3.2.3	Fluorescence Recovery After Photobleaching.....	29
3.3	Numerische Simulation der FRAP-Experimente auf den porösen Substraten anhand der <i>Finiten Elemente Methode</i>	38
3.4	Filmwaagetchnik	41
3.5	Präparative Methoden	44
3.5.1	Präparation festkörperunterstützter Membranen	44
3.5.1.1	Spreiten von Vesikeln	44

3.5.1.2	Langmuir-Blodgett-Technik	45
3.5.2	Präparation von unilamellaren Riesenvesikeln (GUV).....	46
3.5.3	Präparation von funktionalisierten porösen Substraten.....	49
3.5.4	Präparation von Black Lipid Membranes (BLM)	51
3.5.5	Präparation von porenüberspannenden Membranen	51
3.5.5.1	Präparation der mikro-BLMs	51
3.5.5.2	Spreiten der GUVs auf porösem Siliziumsubstrat	53
3.6	Photopolymerization von Lipiddoppelschichten aus Diacetylen.....	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Stabilitätsmessung der mikro-BLMs über Impedanzspektroskopie	55
4.2	Stabilitätsmessung von mikro-BLMs mittels Fluoreszenz-mikroskopie.....	60
4.2.1	Stabilitätsmessung der porösen DPPE-funktionalisierten Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von 7 μm	60
4.2.2	Stabilitätsmessung von porösen ODT funktionalisierten Silizium- substraten mit Porendurchmesser von 7 μm	64
4.2.3	Stabilitätsmessung von porösen DPPE funktionalisierten Silizium- substraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm	65
4.3	FRAP-Experimente an festkörperunterstützten Membranen	69
4.4	FRAP-Experimente an BLMs.....	74
4.5	FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPPE funktionalisierten Substraten ...	77
4.5.1	FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPPE funktionalisierten Substraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm	77
4.5.2	FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPPE funktionalisierten Substraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm	82
4.5.3	Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs	85

4.6	FRAP-Messungen an porenüberspannenden lösungsmittelfreien Membranen.....	86
4.6.1	Untersuchung des Spreitverhaltens von GUVs auf einem Glassubstrat	86
4.6.2	FRAP-Experimente an aus GUVs präparierten porenüberspannenden Membranen auf CPEO3 funktionalisierten Substraten	88
4.6.3	FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf DPSTE funktionalisierten porösen Substraten	94
4.6.4	FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf unfunktionalisiertem Siliziumsubstrat.....	98
4.6.5	Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelfreien mikro-BLMs.....	101
4.7	FRAP-Experimente an porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden.....	102
4.7.1	Charakterisierung von 23:2 PC Diyen mit Hilfe der Filmwaagetechnik.....	102
4.7.2	Langmuir-Blodgett-Überträge mit diacetylenhaltigen Lipidmischungen..	106
4.7.3	Polymerisationsversuche an porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden	107
4.7.4	FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden unter Temperaturveränderung.....	111
4.7.5	FRAP-Experimente an mikro-BLMs mit Diacetylenlipiden	115
4.7.6	Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der porenüberspannenden Membranen mit einem Anteil von Diacetylenlipiden	118
4.8	FRAP-Messung an der oberen Monoschicht der porenüberspannenden Membranen.....	119
4.9	FEM-Simulationen zu den mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 µm.....	126

5	DISKUSSION	143
5.1	Stabilitätsmessungen an mikro-BLMs mittels der Impedanzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.....	143
5.2	Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs	154
5.3	Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelfreien mikro-BLMs.....	164
5.4	Vergleich der Diffusionsmessungen von lösungsmittelfreien und lösungs- mittelhaltigen mikro-BLMs.....	171
5.5	Laterale Mobilitätsmessungen an mikro-BLMs mit Diacetylenlipiden.....	174
5.6	Charakterisierung des Membransystems der mikro-BLMs.....	178
6	ZUSAMMENFASSUNG	181
7	LITERATURVERZEICHNIS	183
A	ANHANG	193
A.1	Symbolverzeichnis.....	193
A.2	Abkürzungsverzeichnis.....	196
A.3	Chemikalien.....	198
A.4	Materialien	200
A.5	Geräte.....	201

1 EINLEITUNG

1.1 Biomembranen

Einer der wichtigsten Bestandteile einer lebenden Zelle ist die Plasmamembran, die eine Trennung zwischen dem Cytosol und der äußeren Umgebung ermöglicht. Gleichzeitig bietet die Membran die Möglichkeit des selektiven Austausches von Wasser, Ionen und Substraten, die für den Energiehaushalt unentbehrlich sind, zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle.

Des Weiteren besitzt eine solche Membran kapazitive Eigenschaften, die eine Potentialdifferenz zwischen dem intrazellulären und extrazellulären Raum der Zelle aufbauen. Diese Potentialdifferenz ermöglicht eine Signalübermittlung zwischen den Zellen untereinander sowie der Kommunikation zwischen dem extrazellulären Raum und dem Cytosol ¹.

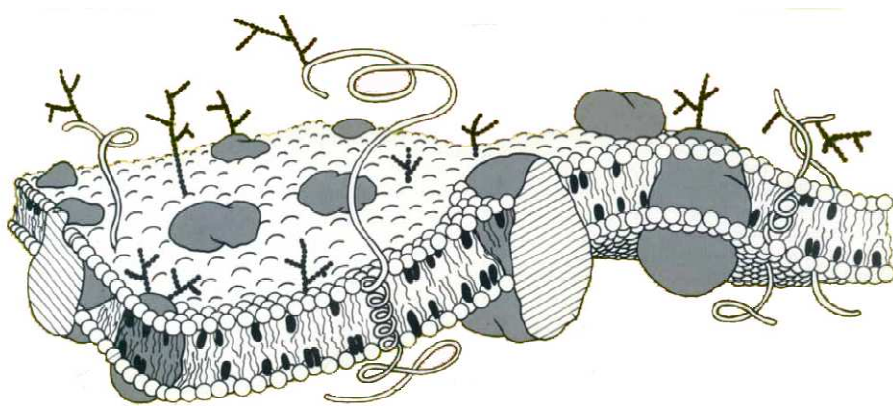


Abb. 1.1: *Fluid mosaic* Modell der Zellmembran nach Singer und Nicolson ². In die zweidimensionale fluide Matrix aus Lipiden und Cholesterin sind Proteine eingebettet ³

Der Hauptbestandteil biologischer Membranen sind Lipide, Proteine und bei tierischen Zellen Cholesterin. Demnach bilden Membranen ein komplexes Vielteilchensystem. 1972 wurde von Singer und Nicolson das *fluid mosaic* Modell postuliert ². Die Lipide bilden dabei eine zweidimensionale Matrix, in der sich die *integralen Proteine* frei bewegen können, sofern dies nicht durch spezifische Wechselwirkungen unterbunden wird (Abb. 1.1) ⁴. Fast alle *integralen Proteine* sind Transmembranproteine, die die Lipiddoppelschicht vollständig durchspannen. *Periphere Proteine* sind über polare Wechselwirkungen an die Membranaußenseite gebunden.

Unter den Lipiden, die einen der Hauptbestandteile der Membran bilden, versteht man circa 2,5 nm lange amphiphile Moleküle, d. h. sie bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil. Während der hydrophobe Teil durch zwei Fettsäureketten bestimmt wird, besteht der hydrophile Teil aus der polaren Kopfgruppe des Lipids. Die zwei Fettsäureketten sind mit den Hydroxygruppen am C1 und C2 des Glycerins verestert. Der gemeinsame charakteristische Bestandteil der Phospholipide ist ein Phosphorsäure-Rest. Dieser ist mit der Hydroxygruppe am C3 des Glycerins verestert. Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur besitzen die Lipidmoleküle die Tendenz, geordnete Aggregatstrukturen auszubilden, deren Ordnungsgrad von den Längen der Fettsäureketten und der Anzahl der Doppelbindungen abhängt. Im *fluid mosaic* Modell sind die meisten Membranlipide aufgrund des Entropiegewinns im Wasser und ihrer Geometrie bestrebt, Lipiddoppelschichten auszubilden. Die hydrophilen Kopfgruppen bilden hierbei die Grenzfläche zum wässrigen Medium der Zelle und die hydrophoben Fettsäureketten ragen in die Membran hinein.

Die einzelnen Membrantypen einer Zelle unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. Die biologischen Eigenschaften werden vorwiegend durch die Art der in der Membran befindlichen Proteine bestimmt, wohingegen die physikalischen und chemischen Eigenschaften durch die Lipidzusammensetzung beeinflusst werden ⁵.

1.2 Artificielle Membransysteme

Native Membranen bilden ein komplexes Vielteilchensystem, so dass es zum Teil schwierig ist einzelne Prozesse innerhalb einer Membran, wie z. B. Transportmechanismen durch eine Membran oder Wechselwirkungen zwischen Membrankomponenten, detailliert zu untersuchen. Daher bedient man sich gerne artifizierlicher Membransysteme, die eine definierte Zusammensetzung der gewünschten Lipide aufweisen. Über diese Zusammensetzung lassen sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran einstellen, mit dem Wunsch, eine gute Übereinstimmung zu denen einer Zellmembran zu erhalten. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist unter anderem die Fluidität des artifizierlichen Membransystems sowie die mechanische Stabilität. Je nach Präparationsmethoden können so verschiedene Membransysteme hergestellt werden, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen.

Das einfachste Modellsystem ist eine Lipidmonoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche, die sich spontan ausbildet, wenn amphiphile Lipidmoleküle auf die Oberfläche einer wässrigen Phase aufgebracht werden. Die Untersuchung solcher Lipidmonoschichten erfolgt auf einer Langmuir-Filmwaage. Diese ermöglicht es, die den Lipiden zur Verfügung stehende Fläche zu variieren. Die Kompression der Lipide schränkt die Beweglichkeit der Fettsäureketten ein und es kann zu einem Phasenübergang bzw. auch zur Domänenbildung der Lipide innerhalb der Monoschicht kommen⁶.

Festkörperunterstützte Membransysteme: Ein weiteres Modellsystem ist die festkörperunterstützte Membran (*solid supported membrane*, SSM) (vgl. Abb. 1.2). Hierbei wird ein Substrat mit einer Lipiddoppelschicht oder -monoschicht belegt. Dieses Membransystem besitzt eine hohe Stabilität und bietet die Möglichkeit oberflächensensitive Methoden, wie Oberflächenplasmonenresonanz⁷, Ellipsometrie⁸, Rasterkraftmikroskopie⁹ oder Quarzmikrowaagetechnik¹⁰ zur Untersuchung zu verwenden.

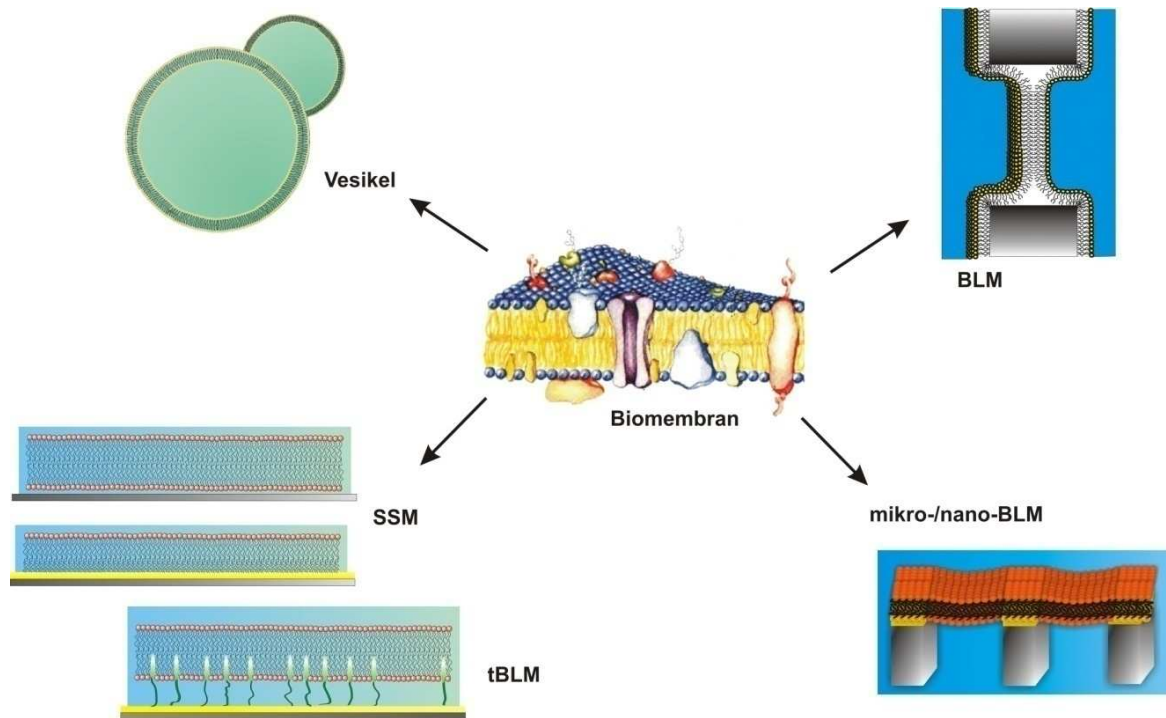


Abb. 1.2: Vier grundlegende Modellsysteme für künstliche Membranen: Vesikuläre Membranen (Liposomen), freistehende Membranen (*black lipid membrane*, BLM), porenüberspannende Membranen (nano-/mikro-BLM) und festkörperunterstützte und *tethered* Membranen (SSM, tBLM).

Die einfachste Methode zur Präparation von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten (SSM) ist das Spreiten von unilamellaren Vesikeln¹¹. Für die Vesikelbildung quellen Lipidfilme zunächst in einer wässrigen Lösung. Es bilden sich unilamellare oder multilamellare Vesikel, je nach verwendetem Lipid, aus, die aus sphärisch angeordneten Lipiddoppelschichten bestehen. Diese multilamellaren Vesikel können z. B. über die Beschallung mit Ultraschall¹², der Extrusionsmethode nach MacDonald¹³ oder der Dialyse von Detergenz-Lipid-Gemischen¹⁴ in unilamellare Vesikel überführt werden. Diese so erzeugten unilamellaren Vesikel werden auf Festkörperoberflächen gespreitet¹⁵. Eine weitere Methode um festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten zu erzeugen, ist die Langmuir-Blodgett-Technik^{16, 17}. Hierbei werden die Lipide auf einer Wasseroberfläche gespreitet. Anschließend wird ein hydrophiles Substrat bei gleichbleibendem Oberflächendruck aus der Subphase der Wasseroberfläche bewegt. Die Lipide werden dabei auf das Substrat übertragen, wobei die hydrophilen Kopfgruppen mit dem Substrat wechselwirken. Auf dieser hydrophoben Oberfläche kann durch ein erneutes Eintauchen eine zweite Monoschicht abgeschieden

werden. Bei diesem Präparationsschritt lagern sich die Lipide mit ihren hydrophoben Alkylketten an die erste Monoschicht. Es liegt somit eine Lipiddoppelschicht vor.

Eine andere Methode zur Ausbildung einer ersten hydrophoben Monoschicht auf einem Festkörper findet sich in der Chemisorption oder Selbstorganisation von Alkanthiolen^{18, 19} oder Thiolipiden²⁰ auf Goldoberflächen (Abb. 1.2). Die Bildung der zweiten Monoschicht erfolgt entweder über Vesikelspreiten²¹ oder über das Aufbringen einer Lipidlösung in *n*-Dekan auf die Substratoberfläche²². Diese sogenannten *painted supported membranes* (PSM) bilden spontan durch Zugabe einer wässrigen Lösung eine Lipiddoppelschicht aus.

Der Vorteil der festkörperunterstützten Membransysteme liegt in ihrer langen Lebensdauer, die durch den tragenden Festkörper erreicht wird. Die Langzeitstabilität der festkörperunterstützten Lipidbilayer auf Glas, Silizium, Glimmer oder auch Metall beträgt mehrere Tage bis hin zu Wochen²³⁻²⁵. Nachteilig ist das System für die Integration von Membranproteinen und Peptiden. So kann durch den geringen Abstand zwischen der Unterseite der Lipiddoppelschicht und dem stützenden Substrat von circa 0,02 – 1 nm²⁶, der durch einen dünnen Wasserfilm gegeben ist, die Funktionsweise der Proteine beeinflusst oder sogar gestört werden. Daher wurden diese Membranen dahingehend weiterentwickelt, dass das Substrat durch ein Gel, z. B. ein Agarosegel, ersetzt wurde²⁷. Diese Membransysteme bieten durch das stark viskose Substrat zum einen eine ausreichende Stabilität, und zum anderen ermöglicht das Gel eine ungestörte Signalübermittlung²⁸. Solche planaren Membransysteme werden als *salt bridged black lipid membranes* oder kurz sBLMs bezeichnet

Eine anderer Ansatz, um den Abstand zwischen Substrat und der Lipiddoppelschicht kontrolliert zu vergrößern, findet sich in den sogenannten gebundenen (*tethered*) BLMs (tBLM) (Abb. 1.2). Größere Transmembranproteine können sich in einer Membran nur dann frei bewegen, wenn ein Minimalabstand von der Oberfläche von 5-10 nm gegeben ist²⁶. Dieser Abstand kann mit den sBLMs nicht erreicht werden, da erst die Verwendung von *Spacern* eine Entkopplung von Substrat und Lipiddoppelschicht mit sich bringt²⁹⁻³¹. Diese *Spacer* besitzen einen hydrophilen Teil, der über Chemisorption an die Festkörperfläche adsorbiert wird. Der gewonnene Zwischenraum dient als Ionenreservoir,

der von Bedeutung für den Einbau von Proteinen, die Ionen durch die Lipiddoppelschicht transportieren, ist ³². Der hydrophobe Teil des *Spacers* wird in die Lipiddoppelschicht inseriert und bindet diese somit an den Festkörper.

Freistehende Membran: Ein weiteres etabliertes Modellsystem sind die sogenannten *black lipid membranes* (BLM) (Abb. 1.2). Hierbei handelt es sich um eine freistehende Lipiddoppelschicht, die sich über ein kleines Loch in einem hydrophoben Plastik, z. B. Teflon oder Delrin, spannt. Die BLM stellt ein gutes experimentelles Modell bezüglich der Eigenschaften einer natürlichen biologischen Membran dar. Die freistehende Lipiddoppelschicht in einer Elektrolytlösung kann mit Ionenkanälen oder porenbildenden Proteinen modifiziert werden, was das Modell der biologischen Membran noch besser beschreibt, da eine Kontaktierung von beiden Seiten möglich ist. Daher werden BLMs besonders im Rahmen der Untersuchungen von Ionenkanälen und Ionenpumpen durch Einzelkanalmessungen ³³, beziehungsweise in der Impedanzspektroskopie ³⁴, verwendet

Zur Herstellung von BLMs haben sich zwei unterschiedliche Methoden etabliert. Diese sind die Müller-Rudin ³⁵ und die Montal-Müller-Technik ³⁶. Müller und Rudin wurden 1962 durch die Selbstorganisation von Seifentensiden, die den Phospholipiden ähnlich sind, dazu veranlasst, das Verhalten der Phospholipide in einem wässrigen Medium zu untersuchen. Die Phospholipide bilden, abhängig von ihrer Konzentration, in einem wässrigen Medium eine Lipiddoppelschicht aus. Bei der Müller-Rudin-Methode wird daher das Lipid in einem organischen Lösungsmittel, z. B. *n*-Dekan, gelöst und über ein Loch in einem hydrophoben Substrat, das zwei wässrige Kompartimente voneinander trennt, aufgespritzt. Das organische Lösungsmittel diffundiert mit der Zeit aus dem Lipid-Lösungsmittel-Tropfen heraus in das wässrige Medium und in den Randbereich des Loches, der sogenannten Plateau-Gibbs-Grenze (Abb. 1.3). Über Selbstorganisation der amphiphilen Moleküle bildet sich so eine Lipiddoppelschicht aus, die das Loch überspannt. Die Bildung der BLM kann optisch mit einem Auflichtmikroskop verfolgt werden. Kurz nach Aufbringen des Lipid-Lösungsmittel-Tropfens beginnt die Membran auszudünnen, d. h. das Lösungsmittel diffundiert nach außen. Während des Ausdünnprozesses kann man beobachten, dass genau wie bei Seifenblasen Bereiche verschiedener Farben durch die entstehende Membran ziehen ^{37, 38}.

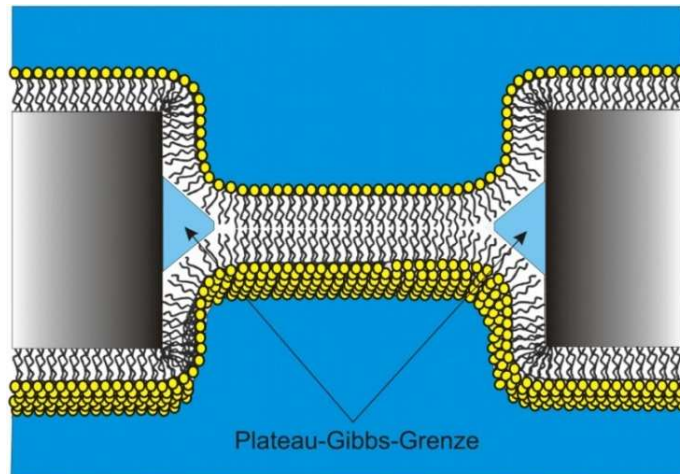


Abb. 1.3: Schematische Zeichnung einer BLM, die nach der Müller-Rudin-Technik hergestellt wurde. An einem hydrophoben Substrat in wässriger Umgebung orientieren sich die amphiphilen Lipidmoleküle zu einer Lipiddoppelschicht. Die organischen Lösungsmittelreste sammeln sich bevorzugt in der Plateau-Gibbs-Grenze an.

Nach Bildung der Membran erscheint diese schwarz, da die Schichtdicke von 4-6 nm der Membran dafür sorgt, dass eine destruktive Interferenz im sichtbaren Bereich des Lichtes verursacht wird. Für die destruktive Differenz ist ein Phasensprung um $\pi/2$ bei der Reflexion eines Lichtstrahls an einem optisch dichteren Medium, in dem Fall die sich ausgebildete Membran, verantwortlich. Die vernachlässigbare Schichtdicke der Membran sorgt für keine weitere Phasendifferenz. Die Benennung der *black lipid membrane* (BLM) resultiert aus dem Effekt, dass sie nach Bildung schwarz erscheint.

Eine anderes Verfahren BLMs herzustellen bietet die Montal-Müller-Technik ³⁶. Diese Methode basiert darauf, dass auf die Oberfläche zweier wässriger Kompartimente eine Lipidlösung in einem leichtflüchtigen Lösungsmittel, z. B. Chloroform, gegeben wird. Dieses Lösungsmittel verdampft und zurück bleibt eine Lipidmonoschicht. Über die Regulation des Flüssigkeitsspiegels werden diese Monoschichten in den beiden Kammerkompartimenten über das Loch gespannt und vereinen sich zu einer Lipiddoppelschicht. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit asymmetrische Membranen herzustellen, wie man sie in allen Organismen findet ^{39, 40}. Der Vorteil gegenüber den BLMs nach Müller-Rudin resultiert daraus, dass kein Lösungsmittel in der Lipiddoppelschicht vorhanden ist und membranmodifizierende Proteine durch das restliche Lösungsmittel in der Membran unbeeinflusst bleiben. Bei den lösungsmittelhaltigen BLMs nach der Präparationsmethode von Müller-Rudin besteht

die Möglichkeit, dass membranmodifizierende Proteine denaturiert werden und somit in ihrer Aktivität gehemmt werden. BLMs sind deutlich weniger stabil als festkörperunterstützte Membransysteme.

Porenüberspannende Membranen: Ein Kompromiss aus den festkörperunterstützten und den freistehenden Membranen bieten die porenüberspannenden Membransysteme. Je nach Porendurchmesser der porösen Substrate, über die sich die Membranen spannen, werden diese als nano- oder mikro-BLMs bezeichnet (Abb. 1.2). Dieses Membransystem soll beide Vorteile der zuvor beschriebenen festkörperunterstützten und freistehenden planaren Membranen vereinen. Dies ist zum einen die Langzeitstabilität der festkörperunterstützten Membranen und zum anderen die Kontaktierungsmöglichkeit beider Membranseiten der BLMs. Die Idee hinter diesem System ist, dass die Gesamtfläche, die von einer BLM überspannt wird, soweit verringert wird, dass hieraus eine höhere Stabilität des Membransystems auf den porösen Substraten resultiert.

Zur Minimierung des Porendurchmessers benutzen Fertig *et al.* beispielsweise Glassubstrate, in die über die *single ion track*-Technik 1-10 μm große Löcher erzeugt wurden. Mittels einer DPhPC-Lösung in *n*-Dekan wurden die mikro-BLMs über den einzelnen Löchern im Glassubstrat erzeugt und lieferten für BLMs typische Werte der Membrankapazität ($0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$) und des Membranwiderstandes (1-100 $\text{G}\Omega$). Des Weiteren wiesen diese bereits eine größere Langzeitstabilität als die klassischen BLMs auf^{41, 42}.

Poröse Polycarbonatfolien mit einer Porendichte von 10^5 - 10^7 Poren cm^{-2} und einem Porendurchmesser von 1 μm wurden von Favero *et al.* zur Herstellung von porenüberspannenden Membranen verwendet. Die Polycarbonatfolien wurden vor der Membranpräparation zunächst mit Gold beschichtet und mit Octadecanthiol hydrophobisiert. Danach wurde eine Lipidlösung in *n*-Dekan aufgebracht. Favero *et al.* gelang es, einen ionotropen Glutamatrezeptor für die Detektion von Glutamat in die porenüberspannenden Membranen einzubauen. Des Weiteren wiesen die porenüberspannenden Membranen eine ausreichende Stabilität in einer

Durchflussskammer auf, so dass die Lösung auf beiden Membranseiten vollständig ersetzt werden konnte^{43, 44}.

Neben den Glassubstraten und Polycarbonatfolien findet sich auch bevorzugt Aluminium oder Silizium zur Herstellung der porösen Substrate. So verwendeten Steinem *et al.* nanoporöse Aluminate, die über einen Anodisierungsprozess des Aluminiums hergestellt wurden. Die Porengröße dieser siebartigen Struktur wurde über die Anodisierungsparameter eingestellt und liegt im Bereich von 60-280 nm⁴⁵⁻⁴⁷. Die Oberfläche des Aluminats wurde mit Gold beschichtet und über Chemisorption von Thiolipiden für die Membranpräparation funktionalisiert. Als Präparationsmethode der nano-BLMs wurde die Müller-Rudin-Methode verwendet. So war es möglich, diese Substrate für Einzelkanalmessungen zugänglich zu machen. Die nano-BLMs zeichnen sich durch hohe Membranwiderstände und Stabilitätszeiten von mehreren Tagen aus⁴⁸. Es konnte das Membranprotein OmpF aus *Escherichia coli* erfolgreich in diese nano-BLMs rekonstituiert werden und über Einzelkanalmessungen seine Kanalaktivität untersucht werden⁴⁹.

1.3 Beweglichkeit von Lipiden innerhalb der Membran

Eine hohe molekulare Beweglichkeit spielt eine wichtige Rolle für die Vielfalt der notwendigen Transportprozesse in Membranen. Drei mögliche Arten von Mobilität in einer Lipiddoppelschicht können unterschieden werden. Diese sind die Rotation der Lipide um die eigene Achse, die transversale und die laterale Diffusion in der Lipiddoppelschicht.

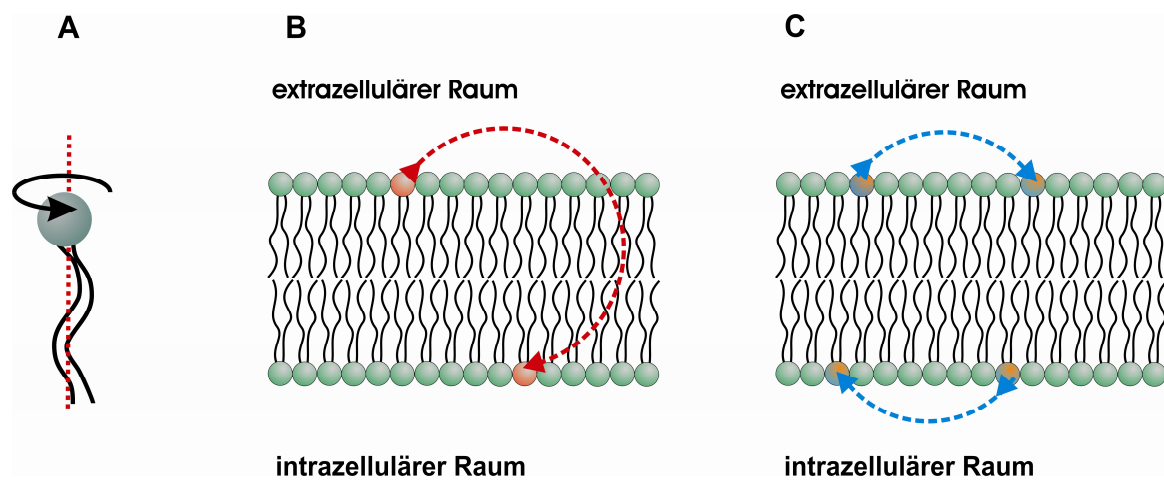


Abb. 1.4: Bewegungsarten von Lipiden in einer Lipiddoppelschicht. (A) Lipidrotation, (B) transversale Diffusion (Flip-Flop) und (C) laterale Diffusion.

Bei der Lipidrotation handelt es sich um eine schnelle anisotrope Rotationsdiffusion der Lipide um die bevorzugte Lipidorientierung (vgl. Abb. 1.4 (A)). So konnten z. B. von Klauda *et al.* aus $^{31}\text{P-NMR}$ *spin-lattice relaxation*-Messungen Rotationskorrelationszeiten von 5-10 ns bei einer fluiden Dipalmitoylphosphatidylcholin-Lipiddoppelschicht ermittelt werden⁵⁰.

Bei der transversalen Diffusion handelt es sich um den Wechsel eines Lipids von einer Membranseite zur anderen (vgl. Abb. 1.4 (B)). Dieser Vorgang wird auch als Flip-Flop bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass so ein Wechsel stattfindet, ist sehr gering. So konnte über die Elektronenspinresonanzmethode an Phospholipidmolekülen in Phosphatidylcholinvesikeln innerhalb von mehreren Stunden nur einmal ein solches

Ereignis detektiert werden. Die Dauer einer Diffusion durch eine 5 nm Membran ist somit 10^9 Mal länger als die Diffusion über 5 nm in lateraler Richtung⁴. Jedoch kann die Wahrscheinlichkeit eines solchen Flip-Flops enzymatisch katalysiert werden. Auf diese Weise ist es z. B. möglich, die Krümmung einer Membran aktiv zu bestimmen. Es ist auch möglich, dass der Einbau von neuen Lipiden zunächst ungleichmäßig passiert, jedoch später die Flip-Flops das Gleichgewicht wieder herstellen⁵¹.

Die zweidimensionale laterale Diffusion in der Membranebene ist von besonders großer Bedeutung für die Funktion biologischer Membranen (vgl. Abb. 1.4 (C)). Sie erlaubt einen sehr effektiven Transport der Moleküle zwischen verschiedenen Bereichen der Zelle. Des Weiteren liefert die Untersuchung der lateralen Diffusion wichtige Aufschlüsse über die Struktur künstlicher und biologischer Membranen. Ausgehend vom *fluid mosaic* Modell von Nicolson und Singer 1972², die die Membran als eine zweidimensionale Matrix beschreiben, existieren Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Phospholipiden in einer Lipiddoppelschicht. Je nach Höhe der Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Lipiden ist die Membran fluider oder starrer⁵². Die Beweglichkeit der Lipide in der lateralen Membranebene wird von mehreren Faktoren beeinflusst: Der Temperatur, dem Sättigungsgrad und der Kettenlänge der Fettsäuren und damit der Membranzusammensetzung sowie dem Vorhandensein von Cholesterin.

Einfluss der Temperatur. Einen großen Einfluss auf die Mobilität der Lipide in einer Membran übt die Umgebungstemperatur aus. Je höher die Umgebungstemperatur ist, desto höher ist auch die Brownsche Bewegung der Lipide in einer Membran. Unterhalb einer bestimmten Phasenumwandlungstemperatur liegt die Membran in einer Gelphase vor; hier existiert ein hochgeordneter Zustand der Lipide. Durch Wärmezufuhr kommt es zu einem Phasenübergang in die flüssig-kristalline Phase. Die Lipide liegen in einem ungeordneteren Zustand vor und die Mobilität ist wesentlich höher als in der Gelphase (vgl. Abb. 1.5)⁵³. Diese Mobilitätszunahme lässt sich durch das *Freie Volumenmodell der Diffusion* nach Cohen und Turnbull deuten. Aufgrund der Abnahme des Ordnungsgrades beim Übergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase finden sich in der ungeordneten flüssig-kristallinen Phase oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur Defekte in der Lipiddoppelschicht. Insbesondere gilt dies für das Zentrum der Membran, wo der Ordnungsgrad am stärksten abnimmt. Die wichtigste Konsequenz dieser Defekte

findet sich in der Bildung von freiem Volumen. Durch diese lateralen Dichteschwankungen kommt es zu der oben geschilderten Erhöhung der Beweglichkeit der Lipide in der Membran, da die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Lipiden bei steigender Temperatur abnehmen. Die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten ist somit eine Folge der lateralen thermischen Ausdehnung der Lipidschicht^{54, 55}.

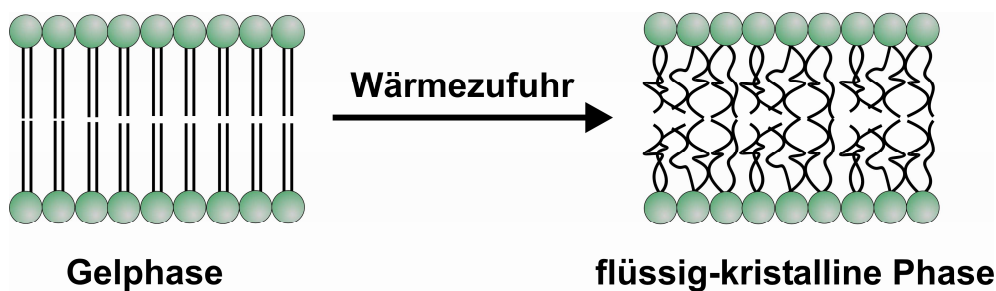


Abb. 1.5: Veränderung der Membranfluidität durch Wärmezufuhr. Bei Erhöhung der Umgebungstemperatur kann es zu einem Phasenübergang der Lipide kommen; hier ist der Übergang zwischen der Gelphase, in der die Lipide hochgeordnet vorliegen, in die mobilere flüssig-kristalline Phase bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur dargestellt.

Einfluss von Cholesterin: Cholesterin wirkt sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen als Fluiditätspuffer und gewährleistet die Stabilität der Membran bei thermischen Belastungen. Durch den Einbau von Cholesterin verändert sich die Membranstruktur. Cholesterin besteht aus einem voluminösen Steroidgerüst mit einer Hydroxylgruppe an einem Ende und einem beweglichen Kohlenwasserstoffrest am anderen Ende. Die Einlagerung in die Lipiddoppelschicht findet senkrecht zur Membranebene statt. Das Sterangerüst des Cholesterins bildet mit den Fettsäureketten der Phospholipide einen hydrophoben Kontakt aus. Durch spezifische Wechselwirkungen von Cholesterin mit einigen Phospholipiden kommt es zur Regulation der Membranfluidität. Bei Temperaturen unterhalb des Phasenübergangs von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase hält das Cholesterin die Membran im flüssigen Zustand. Cholesterin ist somit der Hauptregulator der Membranfluidität⁵⁶.

Einfluss der Kettenlänge und des Sättigungsgrades der Fettsäuren. Fettsäuren beeinflussen durch ihren Sättigungsgrad und ihrer Kettenlänge den Grad der lateralen Diffusion. Ungesättigte Fettsäuren bilden aufgrund der *cis*-Doppelbindungen einen Knick. Diese Knicke bewirken, dass die Ketten nicht mehr eng zusammenliegen, das heißt, der Raumbedarf ist für dieses Lipid größer.

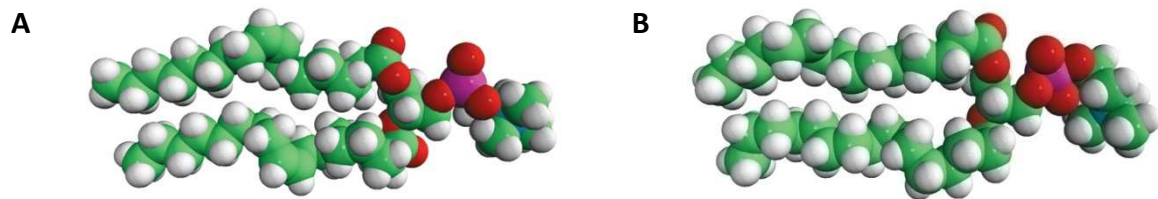


Abb. 1.6: Lipidstruktur von (A) 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und (B) 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) ⁵⁷.

Daher können weniger van-der-Waals-Kräfte zwischen den Lipiden in der Membran wirken und die Fluidität steigt. So benötigt z. B. das Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) mit jeweils einer *cis*-Doppelbindung in den Fettsäureketten mehr Raum als 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) ohne *cis*-Doppelbindung (vgl. Abb. 1.6). Die Kettenlänge besitzt anders als die *cis*-Doppelbindungen einen geringen Einfluss auf die Mobilität. So konnten ähnliche Diffusionskoeffizienten bei Lipiden ermittelt werden, deren Fettsäureketten sich um zwei C-Atome unterschieden ⁵⁶.

Die Messung der lateralen Mobilität von Lipiden in Membranen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die etablierteste Methode zur Zeit ist das *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP), das auch in dieser Arbeit zur Ermittlung der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide der porenüberspannenden Membranen herangezogen wurde ^{58, 59}. Aber auch *single particle tracking* (SPT) und *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) und die Excimer-Technik ⁶⁰ werden erfolgreich eingesetzt. Beim SPT wird der Weg von einzelnen fluoreszierenden Lipiden in der Membran über eine bestimmte Strecke beobachtet ⁶¹. FCS basiert auf Fluktuationen im Fluoreszenzsignal, die dadurch entstehen, dass einzelne Moleküle in der untersuchten Lösung diffundieren ^{62, 63}.

Der Diffusionskoeffizient für die laterale Mobilität von Lipiden in einer Membran liegt im Bereich von $0,1-10 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für festkörperunterstützte Modellmembranen⁶⁴.

2 ZIELSETZUNG

Porenüberspannende Membranen auf der Basis poröser Aluminate und von porösem Silizium bilden ein neuartiges Modellsystem für biologische Membranen, das die Vorteile der festkörperunterstützten und freistehenden Lipiddoppelschichten vereint. Dieses Hybridsystem besteht aus Lipiddoppelschichten, die sich über die Poren eines porösen Substrats spannen. D. h., die auf den Stegbereichen verankerten Membranen können als festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten angesehen werden, während die Lipidmembranen, die sich über die Poren spannen, denen der freistehender Membransysteme gleichen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, dieses neuartige porenüberspannende Membransystem hinsichtlich seiner physikalischen Eigenschaften, wie seine Langzeitstabilität und die laterale Beweglichkeit der Lipide zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Langzeitstabilität der Membran sollten integrale impedanzspektroskopische Messungen durchgeführt werden. Diese Impedanzmessungen sollten durch fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergänzt werden.

Um die laterale Mobilität der Lipide in den porenüberspannenden Membranen zu betrachten, sollte der Diffusionskoeffizient des Systems durch *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Messungen bestimmt werden. Hierzu sollte zunächst ein FRAP-Messaufbau am Fluoreszenzmikroskop realisiert werden. Mit Hilfe der FRAP-Methode sollte der Einfluss verschiedener Faktoren, wie die Art des Substrates, die Funktionalisierung der Substratoberfläche, die Probenpräparation und die Lipidzusammensetzung auf die laterale Beweglichkeit der Lipide untersucht werden.

Zusätzlich sollten Simulationen, die mit der Finiten Elemente Methode durchgeführt wurden, die Diffusionskoeffizienten und somit das Diffusionsverhalten des Hybridsystems der porenüberspannenden Membranen detaillierter beleuchten.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Impedanzspektroskopie

Bei der Impedanzspektroskopie handelt es sich um eine elektrochemische Messmethode, die zur Untersuchung klassischer Bauteile der Elektronik (Ohmsche Widerstände, Spulen und Kondensatoren) eingesetzt wird. Des Weiteren dient sie zur Untersuchung elektrochemischer Eigenschaften von Festkörpern, Flüssigkeiten und deren Grenzflächen. In der Biophysik findet sie daher Anwendung im Bereich der Charakterisierung von Lipiddoppelschichten, sowie bei der Untersuchung von leitfähigen Proteinen und Peptiden^{65, 66}. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Impedanzspektroskopie zur Kontrolle der Qualität von mikro-BLMs und festkörperunterstützter Membranen, sowie zur Messung der Langzeitstabilität von mikro-BLMs verwendet

3.1.1 Physikalische Grundlagen

Als elektrische Impedanz $Z(\omega)$ bezeichnet man in einem Wechselstromkreis den komplexen Widerstand, bei dem Spannung und Strom nicht in Phase sind. Die Impedanz wird in Abhängigkeit von einer Frequenz eines Erregersignals bestimmt. Als Erregersignal dient eine sinusförmige Wechselspannung mit einer geringen Amplitude, deren Frequenz über einen bestimmten Messbereich variiert wird. Die Impedanz in Polarkoordinaten ist in Anlehnung an das *Ohmsche Gesetz* definiert als:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0(\omega) e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = \frac{U_0}{I_0(\omega)} e^{i\varphi(\omega)} = |Z(\omega)| e^{i\varphi(\omega)} \quad (3.1)$$

Durch den komplexen Widerstand $Z(\omega)$ wird eine Phasenverschiebung $\varphi(\omega)$ zwischen Spannung U und Strom I bewirkt. ω ist die Kreisfrequenz der Sinusspannung und ergibt sich als $2\pi f$ (f : Frequenz). $|Z(\omega)|$ ist der Betrag der Impedanz und entspricht in der Darstellung der komplexen Ebene der Länge eines Vektors (Abb. 3.1).

In kartesischer Form ausgedrückt, erhält man für die Impedanz:

$$Z(\omega) = \Re(Z(\omega)) + i \Im(Z(\omega)) \quad (3.2)$$

mit dem Realteil $\Re(Z(\omega))$ der Impedanz (Wirkwiderstand) und dem Imaginärteil $\Im(Z(\omega))$ (Blindwiderstand).

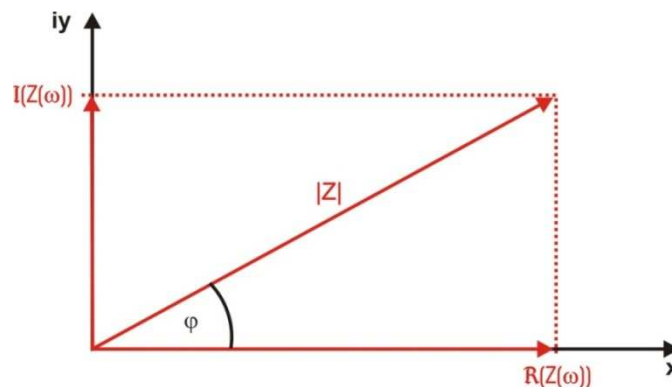


Abb. 3.1: Komplexe Darstellung des Gesamtwiderstandes $Z(\omega)$ als Zeigerdiagramm in der Gaußschen Zahlenebene.

Ein Impedanzspektrum beschreibt die Übertragungsfunktion des Systems und kann als *Bode*- oder *Nyquist*-Diagramm dargestellt werden. Beim *Bode*-Diagramm wird der Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ als Funktion von ω dargestellt (Abb. 3.2). Im *Nyquist*-Diagramm, auch *Ortskurve* genannt, wird der Imaginärteil der Impedanz $\Im(Z(\omega))$ gegen den Realteil der Impedanz $\Re(Z(\omega))$ aufgetragen. Die Analyse der erhaltenen Graphen erfolgt über ein Ersatzschaltbild, das dem Problem entsprechend formuliert wird.

In der Arbeit wurden zur Analyse der Impedanzspektren hauptsächlich *Bode*-Diagramme herangezogen. Deshalb soll an dieser Stelle anhand des in Abb. 3.2 (B) beschriebenen Ersatzschaltbildes genauer darauf eingegangen werden. Der Ersatzschaltkreis besteht aus einem Ohmschen Widerstand R_m , parallel geschaltet zu einem kapazitivem Widerstand C_m , die sich beide in Serie zu einem weiteren Ohmschen Widerstand R_e befinden.

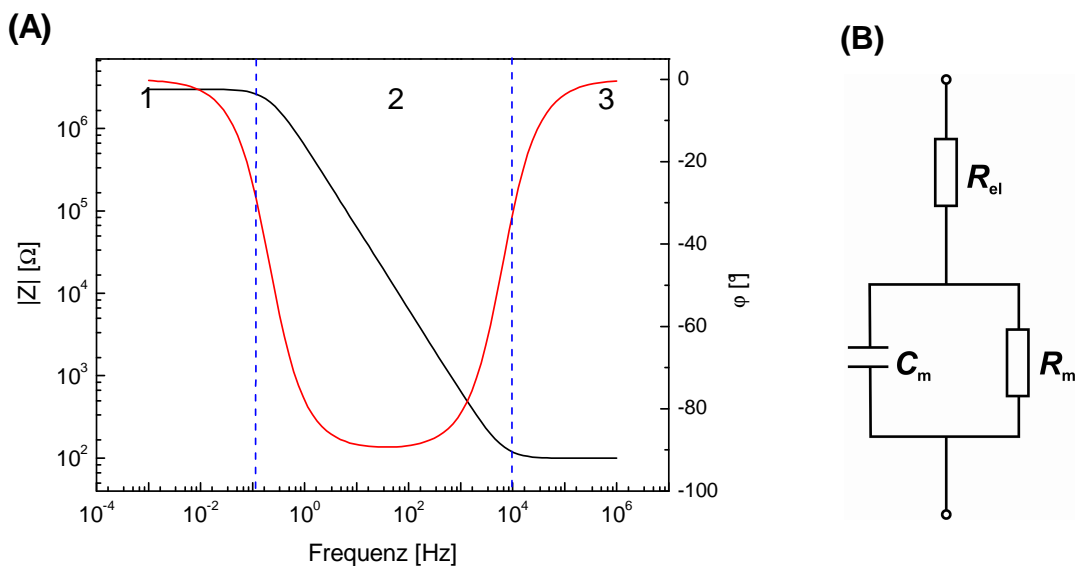


Abb. 3.2: (A) Bode-Diagramm des in (B) dargestellten Ersatzschaltbildes mit den Parametern $R_e = 100 \Omega$, $R_m = 3 \text{ G} \Omega$ und $C_m = 0.25 \mu\text{F}$.

In Abb. 3.2 (A) ist ein zum Ersatzschaltbild gehöriges simuliertes *Bode*-Diagramm abgebildet. Das Diagramm ist in drei Bereiche unterteilbar, aus denen man unterschiedliche Informationen bezüglich des Ersatzschaltbildes ableiten kann. Ein reiner Ohmscher Widerstand ist in der Impedanz frequenzunabhängig, da Spannung und Strom in Phase sind. Bei hohen Frequenzen im Bereich (3) ist R_e ablesbar und bei niedrigen Frequenzen im Bereich (1) die Summe aus den beiden Ohmschen Widerständen $R_e + R_m$ aus dem Diagramm zu entnehmen.

Aus Bereich (2) kann die Kapazität ermittelt werden. Hier liegt eine Phasenverschiebung von -90° vor und der Betrag der Impedanz $|Z|$ ist umgekehrt proportional zur Frequenz.

3.1.2 Versuchsaufbau

Für die Aufnahme der Impedanzspektren wurde ein Frequenzganganalysator der Firma Solartron Instruments (*Impedance Gain Phase Analyser SI 1260*, Farnborough, UK) verwendet. Dieses Gerät ermöglicht es, dass während einer Messung am System eine sinusförmige Wechselspannung mit definierter Amplitude und Frequenz anliegt. Aus der daraus resultierenden Stromantwort wird die Impedanz des Systems ermittelt. Die Ausgabe der Daten der Messung und die Ansteuerung des Frequenzganganalysators erfolgt über das Programm *ZPlot 2.8*. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Spannungsamplitude von 30 mV und einer diskreten Variation des Frequenzbereiches von 10^{-1} bis 10^6 Hz. Bei hohen Membranwiderständen im Frequenzbereich 10^{-3} bis 10^{-1} Hz wird ein zusätzliches Gerät verwendet (*Dielectric Interface 1296*, Solartron Instruments), das über das Programm *Solartron Impedance Measurement Version 3.5.0* bedient wird.

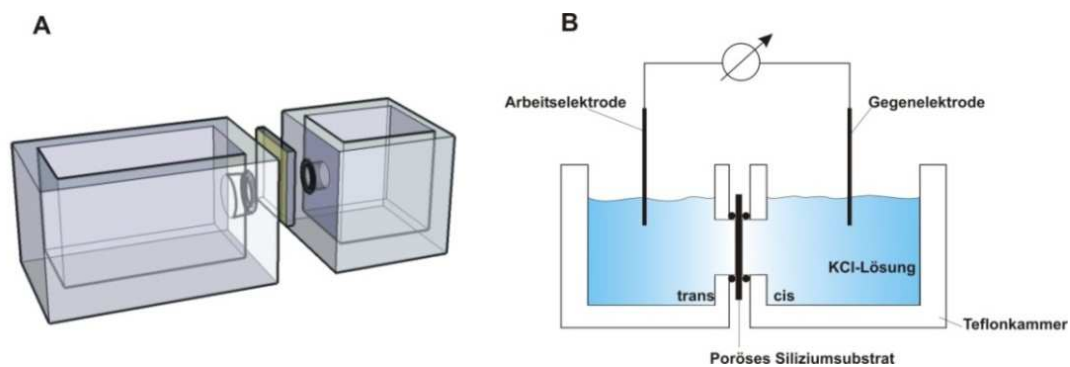


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der verwendeten Kammer für die Impedanzmessungen in (A) und die Anordnung der Messapparatur zur Aufnahme der Impedanzspektren in (B).

Der Ausdünnungsprozess bei den mikro-BLMs wird bei einer Frequenz von 10^6 Hz mit einer Amplitude von 30 mV verfolgt. Hierbei wird die Veränderung des Phasenwinkels φ in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen. Nach erfolgreichem Ausdünnen liegt eine Lipiddoppelschicht vor, d. h., der Betrag der Impedanz $|Z|$ entspricht bei einer Frequenz von 10^6 Hz dem Elektrolytwiderstand und weist bei entsprechendem Ohmschen Widerstand keine Phasenverschiebung auf.

Die für die Messung verwendeten Kammern sind in Abb. 3.3 schematisch dargestellt. Der poröse Probenträger wird zwischen die beiden Kammerelemente eingebaut. Somit wird eine Kontaktierung beider Membranseiten über die Zwei-Elektroden-Anordnung ermöglicht. Gemessen wird in einer 0,5 M KCl-Lösung.

3.1.3 Auswertung

Die Auswertung eines Impedanzspektrums, wie es in Abb. 3.2 (A) zu sehen ist, erfolgt nach dem in Abb. 3.4 aufgeführten Schema. Um ein elektrochemisches System zu beschreiben, muss zunächst ein für das Impedanz-Experiment passendes Ersatzschaltbild aufgestellt werden, das die physikalischen Eigenschaften bezüglich der im System erhaltenen Impedanzelemente sinnvoll beschreibt. Aus der erhaltenen Impedanz-Frequenz-Charakteristik können über eine nichtlineare Kurvenanpassung (*nonlinear least square fit*) die systemspezifischen Parameter bestimmt werden.

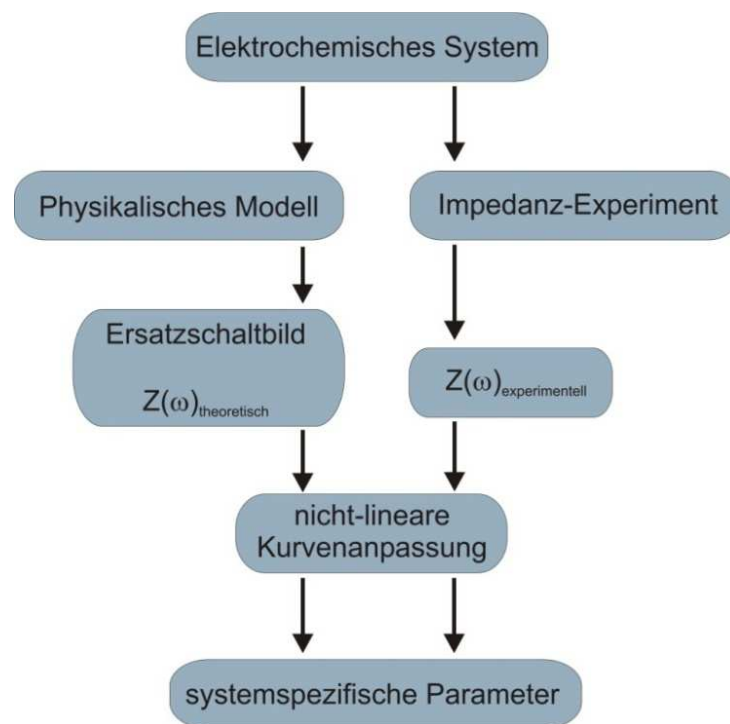


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Auswertung von Impedanzspektren.⁶⁷

Das vereinfachte Ersatzschaltbild, das eine porenüberspannende Membran in dieser Arbeit beschreibt, ist in Abb. 3.5 dargestellt. Die elektrischen Eigenschaften einer Membran werden durch eine Parallelschaltung, bestehend aus einem Ohmschen Widerstand R_m und einem Kondensator C_m , beschrieben. R_m entspricht dem Membranwiderstand und C_m dem kapazitivem Widerstand einer Lipiddoppelschicht. Des Weiteren muss der Elektrolytwiderstand R_{el} im Schaltbild berücksichtigt werden, der in Serie zum Membranwiderstand und der Membrankapazität geschaltet ist.

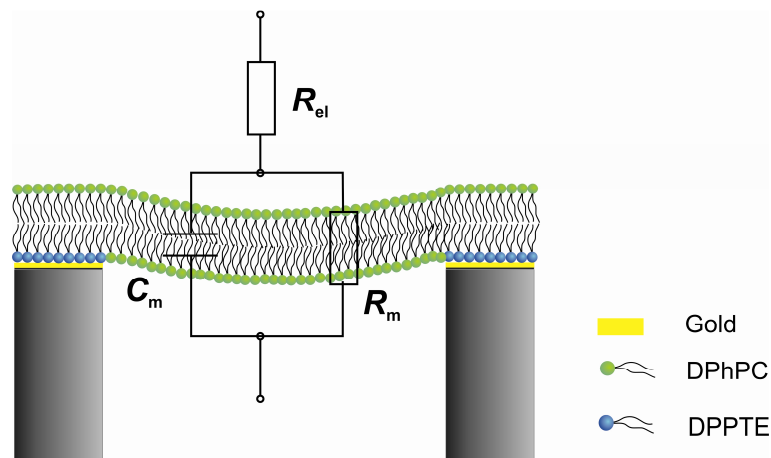


Abb. 3.5: Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran mit zugehörigem Ersatzschaltbild. R_{el} ist der Elektrolytwiderstand, R_m der Membranwiderstand und C_m die Membrankapazität.

Die Beschreibung bezüglich der Phasenverschiebung und dem Verhalten in der Impedanz für die idealen elektronischen Bauelemente, wie der Ohmsche Widerstand R und die Kapazität C , sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Impedanz und Phasenverschiebung einzelner elektrischer Bauteile.

Impedanzelement	Bezeichnung	Impedanz Z	Phasenverschiebung
Ohmscher Widerstand	R	R	0
Kapazität	C	$\frac{1}{i\omega C}$	-90°
Constant Phase Element	CPE	$\frac{1}{A(i\omega)^{-\alpha}}$	$-90^\circ < \phi < +90^\circ$

Da ein reales Membransystem unter Umständen nicht ausreichend durch die in der Tabelle aufgeführten Bauelemente beschrieben wird, z. B. aufgrund von Oberflächeninhomogenitäten^{68, 69} und Lösungsmiteleinflüssen, die die Präparation der Membranen mit sich bringt⁷⁰, soll kurz auf das *CPE*-Element (*constant phase element*) eingegangen werden⁷¹. Das *CPE*-Element ist definiert als:

$$Z(\omega) = \frac{1}{A(i\omega)^{-\alpha}} \quad (3.3)$$

wobei der Parameter A bei einem Wert von $\alpha=1$ der Kapazität C und für $\alpha=0$ dem reziproken Ohmschen Widerstand R^{-1} entspricht. Der Parameter α ist ein Maß für die Abweichung von den realen Parametern der idealen Bauteile ($0 < \alpha < 1$). Das *CPE*-Element kann als ein verzweigtes Netzwerk von Kapazitäten und Ohmschen Widerständen betrachtet werden⁷². Somit ist es möglich, die Abweichung einer Lipiddoppelschicht vom idealen kapazitiven Verhalten einer Membran zu ermitteln.

3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, das gut für die Beobachtung der molekularen Bewegung innerhalb einer Membran geeignet ist. Des Weiteren kann diese Methode herangezogen werden, um die Bedeckung von porösen Substraten zu kontrollieren. Ferner ist es möglich, die Entstehung der Membran während des Ausdünnungsvorganges zu beobachten.

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Mechanismus, dass bestimmte Moleküle, Fluorophore genannt, das von ihnen absorbierte Licht in Form von langwelliger Strahlung wieder abgeben. Während in der Hellfeldmikroskopie das Bild der Probe durch Lichtabsorption, beziehungsweise durch Beugung, dem menschlichen Auge dargestellt wird, erscheint in einem Fluoreszenzmikroskop das Bild in erster Linie dunkel. Nur an den Stellen, an denen Fluorophore vorliegen, wird Licht emittiert. Bei biologischer Anwendung sind dies unter anderem gelabelte Membranbausteine wie Lipide oder Proteine ⁷³. Einer der Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass Strukturen visualisiert werden können, die unter normalen Bedingungen unterhalb der Auflösungsgrenze liegen.

3.2.1 Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen lichtemittierenden Prozess, der durch die Bestrahlung von fluoreszierenden Molekülen (Fluorophore) mit Licht einer charakteristischen Wellenlänge ausgelöst wird.

Ein wichtiges Merkmal der Fluorophore ist das aromatische Ringsystem. Die delokalisierten Elektronen in den bindenden π -Orbitalen der Ringsysteme sind für die Entstehung der Fluoreszenz notwendig. In diesen bindenden Orbitalen liegen Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor; eine Anordnung, die die sogenannten Singulettzustände charakterisiert. Bei der Absorption eines Photons $h\nu_A$ geht ein Elektron in ein höheres Energieniveau über (Abb. 3.6).

Der Prozess der Fluoreszenzentstehung kann anhand des Jablonski-Diagramms in Abb. 3.6 erklärt werden. Das Jablonski-Diagramm ist eine Darstellung der Energieübergänge der Elektronen, wie sie bei lichtabsorbierenden und -emittierenden Vorgängen in einem Fluorophor auftreten können. In den bindenden π -Orbitalen liegen Elektronen mit antiparallelen Spins vor, die Singulett-Zustände S_0 , S_1 und S_2 .

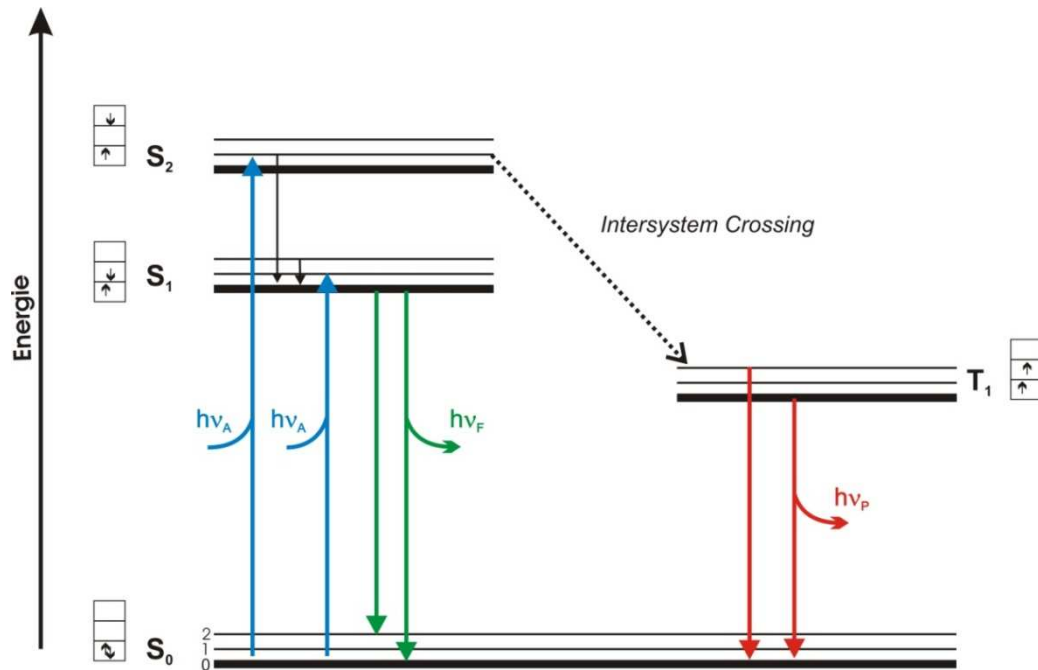


Abb. 3.6: Jablonski-Diagramm der Teilprozesse bei der Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Bei der Absorption eines Anregungsphotons mit der Energie $h\nu_A$ wird ein Elektron vom Grundzustand S_0 in einen der angeregten Zustände S_1 oder S_2 innerhalb von 10^{-15} s angehoben (blauer Pfeil). Übergänge aus den oberen angeregten Zuständen direkt in den Zustand S_1 sind möglich, ohne dass ein Photon dabei emittiert wird. Auch bei Übergängen innerhalb des Zustandes S_1 wird kein Photon emittiert. Die dort freigesetzte Energie wird direkt in Wärme umgewandelt. Nur bei einem Übergang von dem angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 wird die Energie in Form eines Photons mit der Energie $h\nu_F$ emittiert; das bei diesem Vorgang entstehende Licht wird als Fluoreszenz (grüner Pfeil) bezeichnet

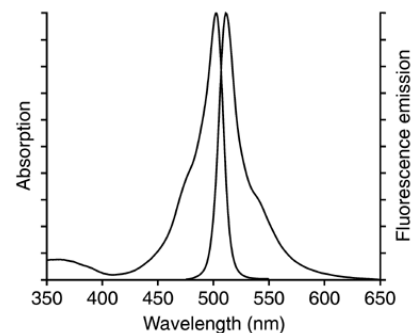
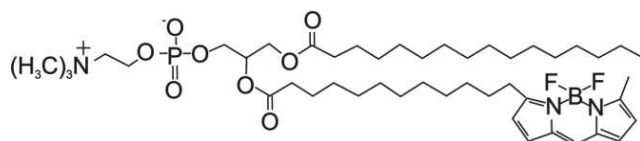
Die mittlere Verweildauer im Zustand S_1 beträgt etwa 10 ns⁷⁴. Die Energiedifferenz zwischen den Energieniveaus S_1 und S_2 , sowie die strahlungslosen Übergänge innerhalb von S_1 , sind unter anderem der Grund dafür, dass das emittierte Photon eine geringere Energie besitzt als das absorbierte Photon. Das Phänomen dieser Verschiebung von kurzwelligem zu langwelligem Licht nennt man *Stokes shift*.

Bei einigen Verbindungen ist es auch möglich, dass es zu einem Übergang von einem angeregten Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand T_1 kommt. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Intersystem crossing*, bei dem eine Spinumkehr des angeregten Elektrons erfolgt. Bei einem Übergang von T_1 nach S_0 ist wieder eine Spinumkehr notwendig. Da solche Übergänge eher eine geringe Wahrscheinlichkeit aufweisen, ist daher auch ihre Emissionsrate sehr klein, das mitunter der Grund für ein sehr langsames Abklingen der Phosphoreszenz ist.

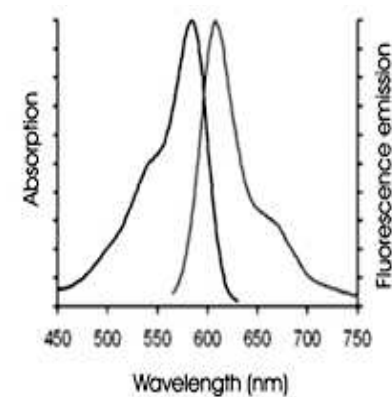
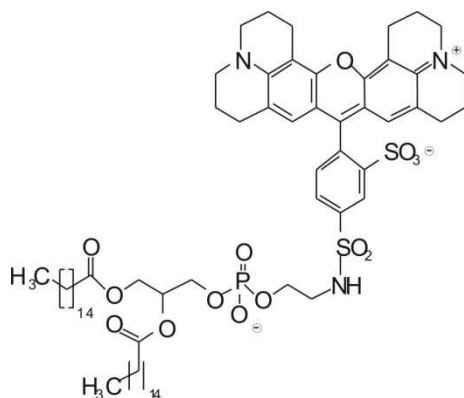
Fluorophore: Um mit Fluoreszenzmikroskopie an artifiziellen Membransystemen zu arbeiten, ist die richtige Auswahl der Fluorophore wichtig. Entscheidend dabei sind unter anderem die Quantenausbeute, Stabilität des Fluorophors und die Lage der Emissions- und Absorptionsmaxima.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore mit ihren Absorptions- und Emissionsspektren sind Abb. 3.7 zu entnehmen. Für die Stabilitätsmessungen der mikro-BLMs auf porösen Substraten mit 7 μm und 2 μm Porendurchmesser wurde die Membran mit dem Fluorophor Texas Red DHPE (Invitrogen, USA) (Abb. 3.7 (B)) gelabelt; das Absorptionsmaximum liegt bei 583 nm und das Emissionsmaximum bei 601 nm. Bei den in Kapitel 3.2.3 beschriebenen FRAP-Messungen wird das Fluorophor BODIPY 500/510 HPC (Invitrogen, USA) (Abb. 3.7 (A)), mit einem Absorptionsmaximum bei 509 nm und dem Emissionsmaximum von 513 nm, benutzt. Die Quenchemperimente wurden mit dem Fluorophor NBD-PE (Invitrogen, USA) (Abb. 3.7 (C)) durchgeführt; die Maxima liegen bei 463 nm für die Absorption und 536 nm für die Emission.

(A)



(B)



(C)

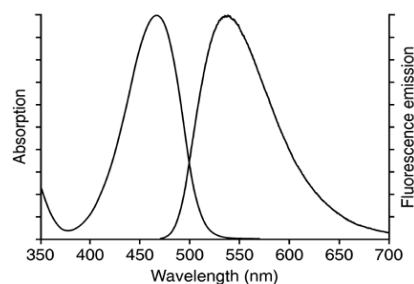
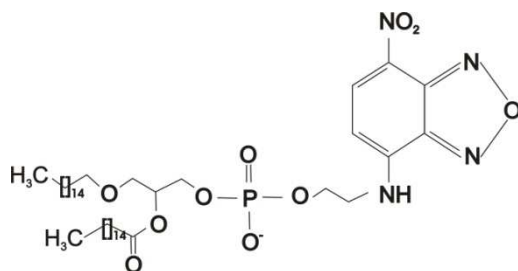


Abb. 3.7: Strukturformeln von Fluorophoren mit den zugehörigen Absorptions- und Emissionsspektren. (A) BODIPY 500/510 HPC(2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodekanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin), Absorptionsmaximum bei 509 nm und Emissionsmaximum bei 513 nm. (B) Texas Red DHPE (1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz), Absorptionsmaximum bei 583 nm und Emissionsmaximum bei 601 nm. (C) NBD-PE (N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz), Absorptionsmaximum bei 463 nm und Emissionsmaximum bei 536 nm.⁷⁵

Photobleaching: Als *Photobleaching* oder Bleichen bezeichnet man den permanenten Verlust der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors bei dauerhafter Bestrahlung mit einem Anregungslicht. Die Fluorophore werden hierbei irreversibel zerstört, beziehungsweise es kommt zu einer chemischen Veränderung der Farbstoffe, bei dem die Moleküle ihre Fähigkeit zu fluoreszieren verlieren. Der Grad des Bleichens ist von der Intensitätsstärke des einstrahlenden Lichtes und dem Grad der Absorption abhängig⁷⁶.

Quenching: Das sogenannte *Quenching* (Fluoreszenzlöschung) bildet eine weitere Ursache für Intensitätsverluste des Fluoreszenzlichts. Beim Quenchen handelt es sich um Vorgänge, die entweder verhindern, dass das fluoreszierende Molekül in den angeregten Zustand übergehen kann oder den angeregten Zustand des Fluorophors ohne Emission eines Photons in den Grundzustand überführen. Der Effekt des Quenchens kann z. B. über Komplexbildung ⁷⁷, interne Konversion ⁷⁸ oder Energieübertragung auf andere Moleküle, den sogenannten Quenchern (z. B. Kobaltchlorid) ⁷⁹ erfolgen. Die Quencheffekte können im Gegensatz zum *Photobleaching* reversibel sein.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskop

Für die mikroskopischen Untersuchungen der Membranen wurde das Fluoreszenzmikroskop AxioTech Vario von Zeiss (Deutschland) verwendet. Bei diesem Mikroskop handelt es sich um ein typisches Epifluoreszenzmikroskop. Der schematische Aufbau des Fluoreszenzmikroskops ist in Abb. 3.8 zu finden.

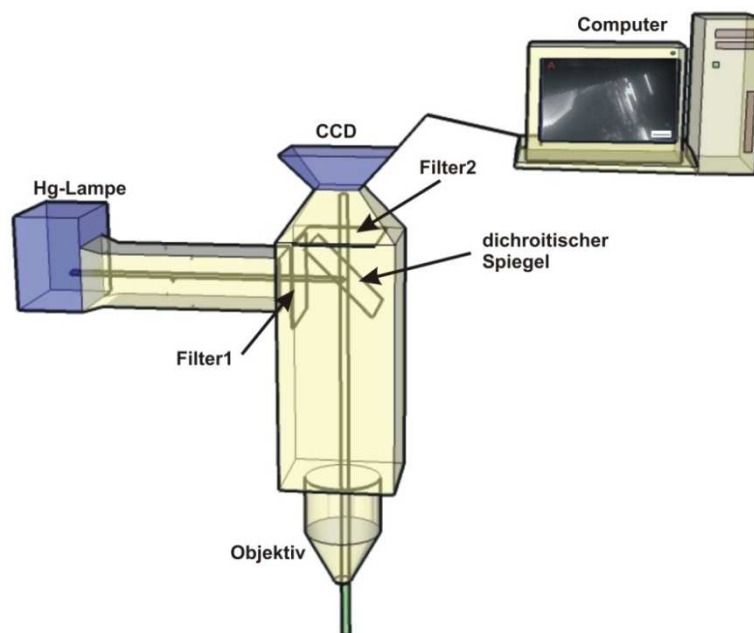


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskops mit Strahlengang.

Als Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung dient eine Quecksilberdampflampe. Ein Absorptionsfilter (Filter 1) filtert aus dem kontinuierlichen Lampenspektrum die zur Anregung des verwendeten Fluorophors entsprechende charakteristische Wellenlänge heraus. Das Absorptionslicht wird über einen dichroitischen Teilspiegel des Filtersatzes auf die Probe gelenkt und regt dort die fluoreszierenden Moleküle an. Das von der Probe emittierte Licht geht danach durch den dichroitischen Spiegel und gelangt durch den Filter 2 entweder zum Okular oder zur CCD-Kamera, wo das Bild durch die Software AxioVision 4.4 (Zeiss) ausgegeben wird. Der dichroitische Spiegel ist wellenlängenselektiv, d. h., nur das langwelligere Emissionslicht wird von ihm durchgelassen. Der Filter 2 ist ein Bandpassfilter, der nur für einen diskreten Wellenlängenbereich durchlässig ist. Damit wird sichergestellt, dass nur das gewünschte Emissionslicht von der CCD-Kamera detektiert wird.

Der Filtersatz Nummer 44 von Zeiss besitzt für das Absorptionslicht einen Bandpassfilter 475/40 nm und für die Emission liegt der Bandpassfilter bei 530/50 nm. Die Durchlässigkeit des Strahlteilers liegt bei einer Wellenlänge von 500 nm. Er ist für die Fluorophore NBD-PE und BODIPY 500/510 HPC geeignet. Für Texas Red DHPE wurde der Filtersatz 45 von Zeiss mit dem Bandpass für die Absorption bei 560/40 nm, einem Strahlteiler mit einer Durchlässigkeit ab 585 nm und einen Bandpass für die Emission bei 630/75 nm verwendet

3.2.3 Fluorescence Recovery After Photobleaching

Die *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Technik ist eine Messmethode, die unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der lateralen Beweglichkeit der sich in einer Membran befindlichen Lipide oder auch Proteine dient⁸⁰. Um das oben erwähnte Mikroskop für diese Messungen benutzen zu können, wird für die Dauer der Experimente ein Argon-Ionen Laser (UniPhase, USA), dessen Wellenlänge bei 488 nm liegt, in den Strahlengang des Mikroskops über einen herausnehmbaren Spiegel gekoppelt (Abb. 3.9). Mit diesem Laser wird ein kurzer intensiver Bleichpuls auf eine ausgewählte Stelle der Probe, dem *region of interest* (ROI), appliziert.

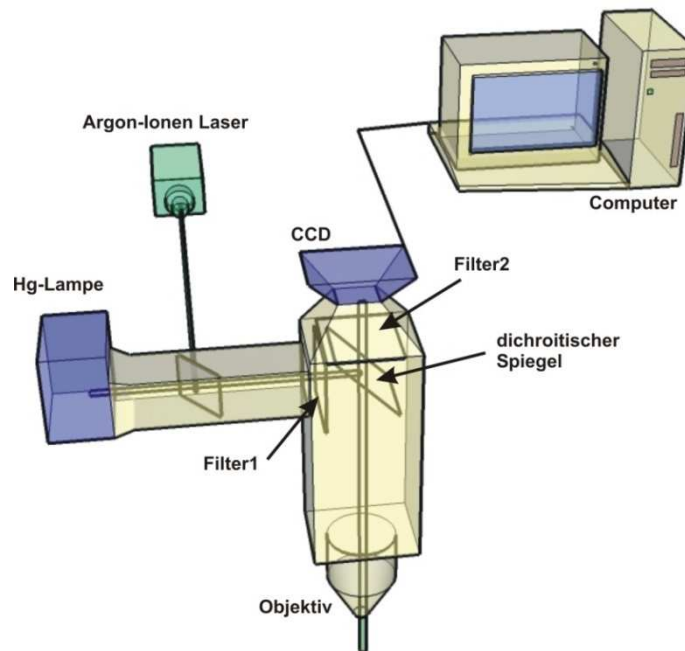


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskops mit Lasereinkopplung in den Strahlengang.

Vor Beginn einer Messung wird ein Bild als Referenz der Ausgangsintensität aufgenommen. Erst danach wird der Spiegel für den Laser in dem Strahlengang platziert. Die Länge des Laserpulses wird über einen Trigger gesteuert. Damit wird eine definierte Bleichzeit garantiert. Für festkörperunterstützte Membranen beträgt die Bleichzeit zwischen 500 ms und 1 s. Bei den lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien mikro-BLMs (BLM: *black lipid membrane*) liegt die Bleichzeit zwischen 1 s und 3 s. Nach dem erfolgten Bleichpuls wird der Spiegel zügig aus dem Strahlengang entfernt und die Lampe bei schwacher Intensität zur Beobachtung des *Recoverys* (Wiederherstellung) der Fluoreszenzintensität benutzt. Zur Aufzeichnung des *Recoverys* wird die Software AxioVision 4.4 © (Zeiss) verwendet. Hierzu wird eine Serie mit 100 Bildern mit einem Abstand von 1 s aufgenommen. Zu beachten ist hierbei, dass die Belichtungszeit für die einzelnen Aufnahmen der Bildserie nicht über 100 ms liegt. Dadurch wird gewährleistet, dass der Abstand zwischen den einzelnen Bildern möglichst groß ist.

Mathematischer Hintergrund der FRAP-Experimente

Die theoretische Basis zur Auswertung der FRAP-Messungen bilden die Veröffentlichungen von Axelrod *et al.* 1976⁵⁸, Koppel *et al.* 1976⁸¹ und Soumpasis 1983⁵⁹ und soll im Folgenden näher erläutert werden.

Vor dem erfolgten Bleichpuls wird von einer homogenen Verteilung der Fluorophore innerhalb der Probe ausgegangen. Daraus erhält man die Anfangsbedingung für die Verteilung der Konzentration $c(r, t)$ der Fluorophore an dem Ort r und zum Zeitpunkt $t < 0$:

$$c(r, t < 0) = c_0 \quad (3.4)$$

c_0 ist die gegebene Anfangskonzentration der Fluorophore vor dem Bleichen. Aufgrund der Kreissymmetrie wird im Folgenden in Polarkoordinaten in zwei Dimensionen gerechnet. Aus Symmetriegründen entfällt die Winkelabhängigkeit φ . Die einzige Ortsvariable ist r .

Zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgt der kurze Laserpuls mit der Dauer T . Ausgegangen wird von einem gaußförmigen Profil des Laserstrahles. Hieraus ergibt sich das gaußförmige Intensitätsprofil $I(r)$, das während des Bleichvorgangs auf der Probe abgebildet wird (Abb. 3.10, rote Gaußkurve).

$$I(r) = I_0 e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} \quad (3.5)$$

$I(r)$ ist die Intensität an einem Punkt r vom Mittelpunkt des auftreffenden Laserstrahls auf der Probenfläche aus gesehen. Die diskrete durch den Laser gebleichte Fläche wird als *region of interest* (ROI) bezeichnet. I_0 ist die Intensität des Lasers im Mittelpunkt seines Strahls und ω die Halbwertsbreite der Gaußkurve beziehungsweise der Radius, bei dem die Gaußfunktion des Laserprofils auf den Wert e^{-2} -tel abgefallen ist.

Die gesamte Laserleistung P , die zum Bleichen aufgewendet wird, kann definiert werden als:

$$P = \int_0^{\infty} I(r) 2\pi r dr = \frac{1}{2} \pi I_0 \omega^2 \quad (3.6)$$

Die detektierte Signalstärke $S(t)$ der beobachteten Fluoreszenz über die gesamte Probenfläche ist proportional zum Produkt der Anregungsintensität und Konzentration $c(r,t)$, integriert über die Gesamtfläche und kann allgemein beschrieben werden als:

$$S(t) = q \int_0^{\infty} c(r,t) I(r) 2\pi r dr = 2\pi I_0 q \int_0^{\infty} c(r,t) e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} r dr \quad (3.7)$$

Die Proportionalitätskonstante q beinhaltet unter anderem die Quanteneffizienz der angeregten Fluorophore.

Das irreversible *Photobleaching* im ROI ist direkt proportional zur Intensität $I(r)$, zur vorhandenen Konzentration $c(r,t)$ und zu einer Ausbleichkonstante α . Diesen Vorgang kann man somit als eine zeitliche Veränderung der Konzentrationsverteilung $\frac{\partial c_{bleich}(r,t)}{\partial t}$ innerhalb der Probe sehen, besonders im ROI. Dieses Ausbleichen wird über die Differentialgleichung:

$$\frac{\partial c_{bleich}(r,t)}{\partial t} = -\alpha I(r) e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} = -\alpha I_{0,bleich} e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} c(r,t) \quad (3.8)$$

beschrieben, wobei eine eventuelle bereits stattfindende Diffusion der Fluorophore innerhalb der Probe vernachlässigt wird.

Die Lösung der Differentialgleichung (3.8) ergibt sich für die Konzentration $c_{\text{bleich}}(r,t)$ beim erfolgten Laserpuls zu:

$$c_{\text{bleich}}(r,t) = c_0 e^{-\alpha I_{0,\text{bleich}} t} e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} \quad (3.9)$$

und somit die Signalstärke zu:

$$S(t) = P q c_0 \frac{1 - e^{-\alpha I_{0,\text{bleich}} t}}{\alpha I_{0,\text{bleich}} t} \quad (3.10)$$

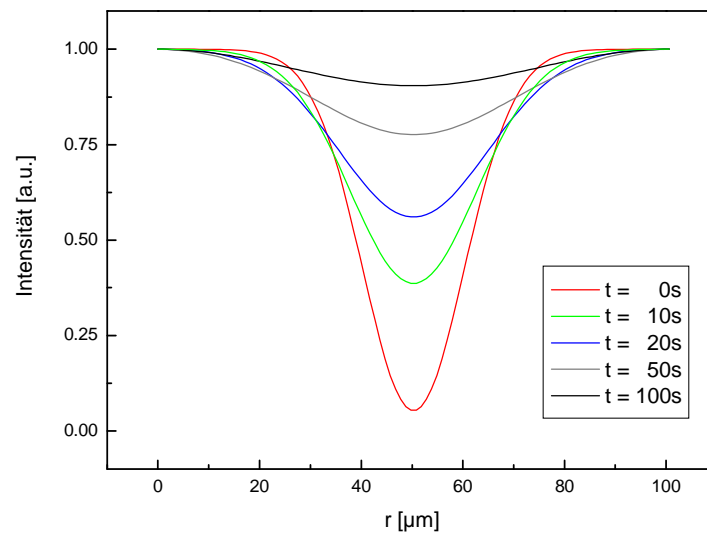


Abb. 3.10: Simuliertes Gaußprofil für verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls. Zeitpunkte: 0 s nach dem Bleichpuls (rot), 10 s nach dem Bleichpuls (grün), 20 s (blau), 50 s (grau) und 100 s nach dem erfolgten Bleichpuls (schwarz).

Nach dem kurzen Bleichpuls mit der Dauer T erfolgt die Beobachtung der Konzentrationsveränderung aufgrund der Diffusion im ROI. Da die Lampenintensität wesentlich schwächer ist als die Laserintensität, wird das weitere Bleichen der Fluorophore über die Gesamtfläche der Probe vernachlässigt. Diese Diffusion wird über das 2. Fick'sche Gesetz beschrieben:

$$\frac{\partial c_{diff}(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c(r, t) \quad (3.11)$$

mit D als Diffusionskoeffizienten, der das Maß für die Mobilität der Lipide oder Proteine innerhalb der Membran ist.

Die auftretende Diffusion kann anhand der zeitlichen Veränderung des Gaußprofils verdeutlichen werden. In Abb. 3.10 ist die Veränderung des Gaußprofils für verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichen abgebildet. Es ist erkennbar, dass sich die Gaußkurve, bei entsprechender Mobilität ($D = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), bereits wenige Sekunden nach dem Bleichen verbreitert und weniger stark ausgeprägt ist.

In zwei dimensionalen Polarkoordinaten unter Vernachlässigung der φ -Abhängigkeit ist es aufgrund der Zylindersymmetrie möglich, den Laplace-Operator $\Delta (= \nabla^2)$ durch r -Ableitungen ($c'(r, t)$: erste Ableitung der Konzentration nach dem Ort; $c''(r, t)$: zweite Ableitung der Konzentration nach dem Ort auszudrücken:

$$\frac{\partial c_{diff}(r, t)}{\partial t} = D \left(\frac{c'(r, t)}{r} - c''(r, t) \right) \quad (3.12)$$

Die Anfangsbedingung, die sich für die beginnende Diffusion nach dem Bleichen ergibt, ist Formel (3.13) zu entnehmen.

$$c(r, t = 0) = c_0 e^{-k e \frac{2r^2}{\omega^2}} \quad (3.13)$$

wobei der Parameter K wie folgt definiert ist:

$$K = \alpha T I_{0,bleich} \quad (3.14)$$

K fasst das Produkt aus der Ausbleichkonstanten α , der Dauer der Bleichzeit T und der Intensität nach dem Bleichen $I_{0,bleich}$ zusammen und ist ein Maß für die Stärke des Bleichens.

Die Lösung der Differentialgleichung (3.12) ergibt sich mit der Anfangsbedingung aus (3.13) zu:

$$c(r, t) = c_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} (-K)^n \frac{1}{1 + n \frac{Dt}{2\omega^2}} \exp\left(-\frac{n r^2}{\frac{1}{2} \omega^2 \left(1 + n \frac{Dt}{2\omega^2}\right)}\right) \quad (3.15)$$

Daraus resultiert die detektierte Signalstärke $S(t)$ der Fluoreszenz

$$S(t) = P q c_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} (-K)^n \frac{1}{1 + n \frac{Dt}{2\omega^2}} \quad (3.16)$$

mit $\omega^2 = 4 \tau_D D$. τ_D ist die charakteristische Diffusionszeit, bei der die Fluoreszenzintensität 50 % des Gesamtrecovery ausmacht. Zur Darstellung einer Diffusionskurve (vgl. Abb. 3.11) ist die fraktale Form der ansteigenden *Recovery*-Kurve üblich:

$$s(t) = \frac{S(t) - S(0)}{S(\infty) - S(0)} \quad (3.17)$$

$S(0)$ ist die Signalstärke zum Zeitpunkt $t = 0$ s nach dem Bleichpuls und $S(\infty)$ die detektierte Signalstärke nach der Zeit, in der die Fluoreszenzintensität asymptotisch in die Sättigung beim Kurvenverlauf geht.

Die in Abb. 3.11 simulierte Diffusionskurve für einen Diffusionskoeffizienten von $D = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ zeigt die charakteristischen Merkmale eines normierten Kurvenverlaufs, wie er bei den FRAP-Messungen auftritt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ s nimmt die Intensität von 1 auf nahe 0 ab; die Intensität dieser Abnahme ist durch den Parameter K definiert, was im Experiment von der Laserleistung und der Bleichdauer bestimmt wird. Nach dem Bleichen kommt es aufgrund der Beweglichkeit der Lipide innerhalb der Membran zum Anstieg der Fluorophorintensität. Anzumerken ist hierbei, dass es meist nie zu einer vollständigen Wiederherstellung der Anfangsfluoreszenzintensität kommt, da in einer Membran immer ein gewisser immobilierter Anteil zu finden ist, der nicht diffundiert. Ein weiterer wichtiger Punkt im Graphen liegt bei 50 % der Fluoreszenzwiederherstellung; hier kann die charakteristische Diffusionszeit τ_D abgelesen werden.

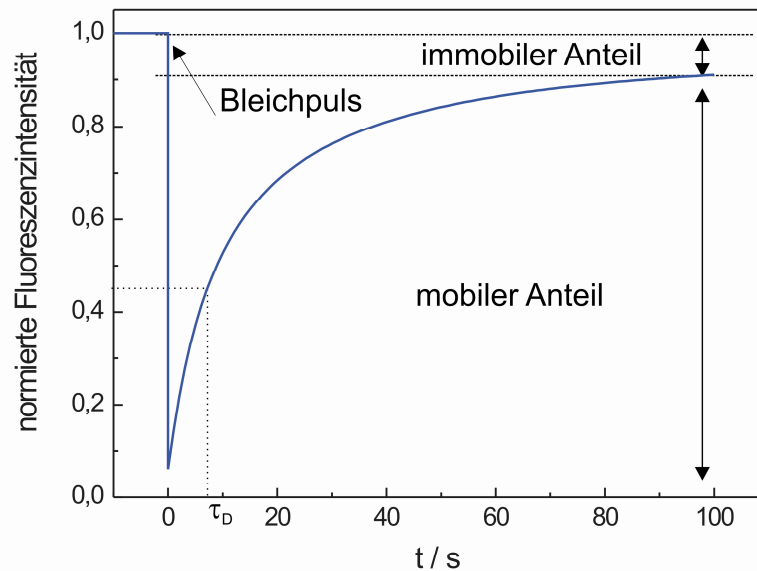


Abb. 3.11: Simulierter *Recovery*-Graph mit einem Diffusionskoeffizienten $D = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; aufgetragen ist hier die normierte Fluoreszenzintensität, die der normierten Signalstärke $S_{\text{norm}}(t)$ entspricht, über die Zeit t in Sekunden. Die charakteristischen Punkte einer typischen FRAP-Kurve sind gekennzeichnet τ_D ist die charakteristische Diffusionszeit.

Daraus ergibt sich für den Diffusionskoeffizienten D :

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_D} \quad (3.18)$$

Die Auswertung der FRAP-Bildserien wird mit dem Template der *Axelrod-Fitting-Prozedur* für das Programm IGOR 6.06[®] vorgenommen. Hierbei wird zunächst eine Kurve an einer Stelle des Bildes außerhalb des ROI aufgenommen. Diese dient als Referenz für das Nachbleichen während der Messung. Danach wird die Veränderung der Fluoreszenzintensität im ROI detektiert. Die vorher registrierte Referenz des Nachbleichens wird von der im ROI aufgenommenen Intensitätssteigerung subtrahiert.

3.3 Numerische Simulation der FRAP-Experimente auf den porösen Substraten anhand der *Finiten Elemente Methode*

Die partiellen Differentialgleichungen, die die stattfindende Diffusion während eines oben beschriebenen FRAP-Experimentes in einem Membransystem beschreiben, können für eine idealisierte Probengeometrie nur analytisch gelöst werden. Um die realen Bedingungen der FRAP-Experimente auf den porösen Substraten darstellen zu können, ist eine numerische Lösung notwendig, da eine analytische Lösung nicht möglich ist. Eine geeignete Methode hierfür ist die *Finite Elemente Methode* (FEM). Diese numerische Methode ermöglicht es, die partiellen Differentialgleichungen eines komplexen Systems über einen Diskretisierungsprozess zu lösen.

Die *Finite Elemente Methode* (FEM) lässt sich in vier Schritte aufteilen. Zunächst muss eine passende Variationsaufgabe zu der vorgegebenen Randwertaufgabe formuliert werden. In dem Fall der FRAP-Experimente ist dies passend für die Diffusion in einem Membransystem auf einem porösen Substrat zu formulieren. Danach wird das zu integrierende Gebiet in einfache Teilgebiete zerlegt; hier spricht man von Triangulation, da das Integrationsgebiet mit kleinen Dreiecken so überdeckt wird, dass einander angrenzende Dreiecke eine ganze Seite oder auch nur einen Eckpunkt gemeinsam haben. In jedem dieser Dreiecke wird für die gesuchte Funktion, die das System numerisch lösen soll, ein entsprechender Ansatz gemacht. Ein solches Dreieck mit dem zugehörigen Ansatz wird als finites Element bezeichnet. Als vierter und letzter Schritt werden die entsprechenden Ansatzkoeffizienten berechnet und somit die Variationsaufgabe numerisch in jedem finiten Element gelöst.

Die FE-Methode wird mittels eines Programmes *FRAPSim* von Müller⁸² für das Programm MATLAB® und der dazugehörigen *PDE-toolbox*, das zur Untersuchung von Proteindiffusion und Reaktionsdynamik benutzt wurde, verwendet. Das Programm *FRAPSim* wird in dieser Arbeit dazu benutzt, die FRAP-Kurven für zwei Diffusionskoeffizienten für das Membransystem auf porösen Substraten zu simulieren.

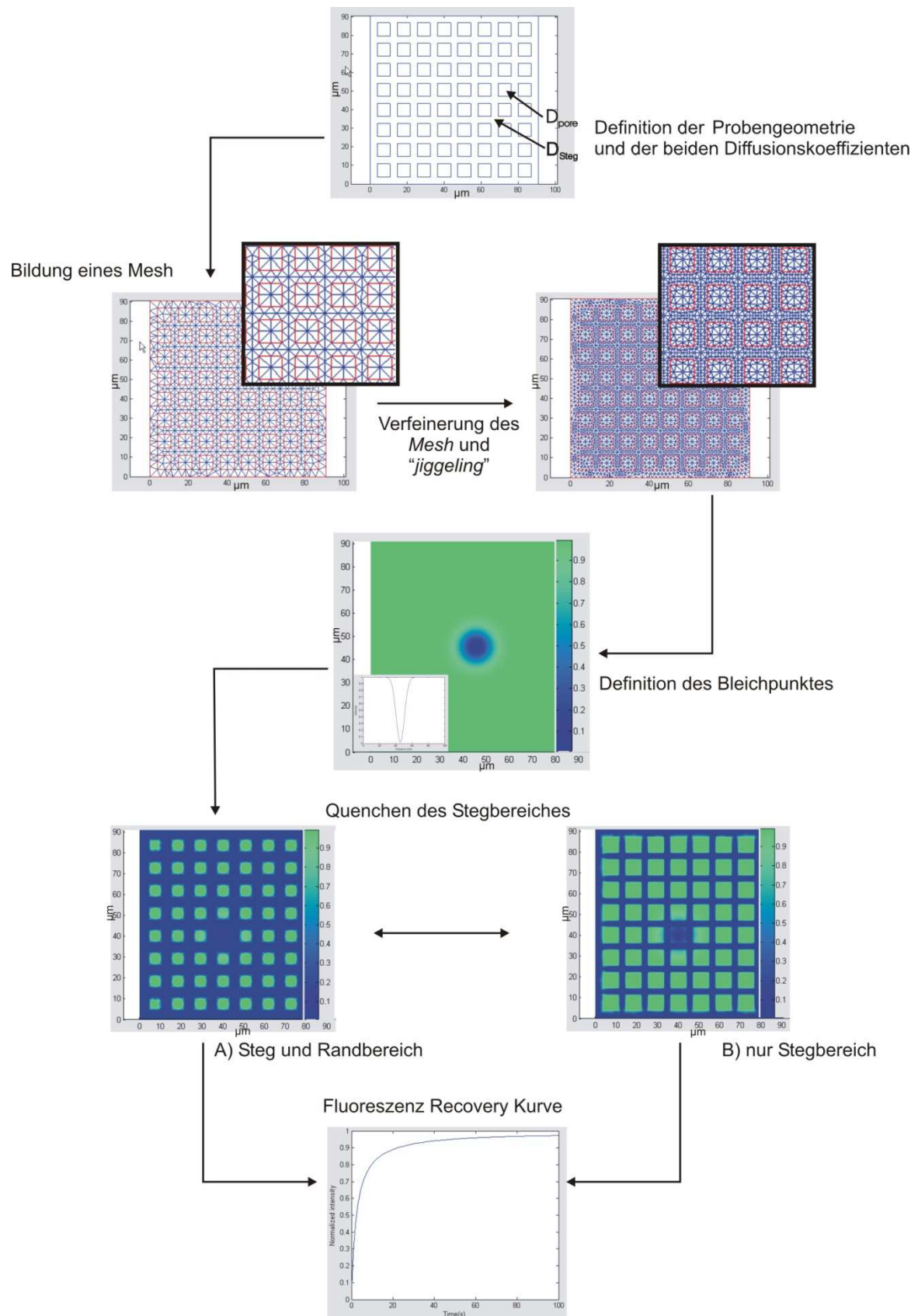


Abb. 3.12: Schematische Darstellung eines Simulationsablaufes der numerischen Simulation eines FRAP-Experimentes auf porösem Siliziumsubstrat mit dem Programm FRAPSim von Müller⁸² für MATLAB®.

In Abb. 3.12 sind die Schritte eines Simulationsablaufes mit FRAPSim bezüglich des graphischen Interfaces schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wird die Probengeometrie definiert. In den Simulationen ist dies ein Array von 8 x 8 Poren mit jeweils einer Kantenlänge von 7 μm . Die Stegbreite zwischen den einzelnen Poren beträgt 3.87 μm . Danach wird ein Gitter (*Mesh*) im Zuge der Triangulation über dieses Array gelegt und im Anschluss daran noch etwas feiner unterteilt. Damit es keine Artefakte in der Simulation aufgrund der Gleichmäßigkeit des *Mesh* gibt, werden die einzelnen finiten Elemente per Zufall durchmischt („jiggeling“). Es wird jeweils ein Diffusionskoeffizient für die Diffusion in den Poren D_{pore} und die Diffusion auf den Stegen D_{steg} definiert. Nun muss Lage, Größe und Aussehen der Gaußkurve des Bleichpunktes auf der Probe definiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Halbwertsbreite ω des Gaußprofils durch $\omega = 2\sigma\sqrt{2 \ln 2}$ in dem Programm ersetzt ist. σ ist die Standardabweichung des Gaußprofils. Des Weiteren kann die Intensität des Bleichens über die Bleichtiefe zwischen 0 für komplettes Bleichen und 1 für kein Bleichen definiert werden. Die Dauer des FRAP-Experimentes wird im Anschluss daran noch mit der gewünschten Zeitauflösung festgelegt. In den Simulationen beträgt die Dauer meist 100 s, ähnlich der in den FRAP-Experimenten.

Mit diesen eingegebenen Parametern werden die partiellen Differentialgleichungen für das Modell numerisch über die Simulation gelöst. Als Lösung wird von dem Programm eine FRAP-Kurve mit den entsprechenden Parametern ausgegeben.

3.4 Filmwaagetechnik

Mit einer Filmwaage (Abb. 3.13) lassen sich die Eigenschaften eines dünnen, auf die Wasseroberfläche aufgebracht Films aus amphiphilen Molekülen untersuchen⁸³. Die Filmwaage besteht aus einem wassergefüllten Teflontrog, der an zwei gegenüberliegenden beweglichen Barrieren abgeschlossen ist.

Eine bekannte Menge dieser Moleküle wird in Chloroform gelöst. Einige Mikroliter davon werden über eine Mikrospritze auf die Subphase der Wasseroberfläche gegeben. Das Lösungsmittel verdunstet und eine definierte Menge an Molekülen bleibt auf der Oberfläche zurück. Dadurch wird eine bestimmte Fläche pro Molekül definiert, wobei die Fläche der Filmwaage über die beweglichen Barrieren kontinuierlich verändert werden kann.

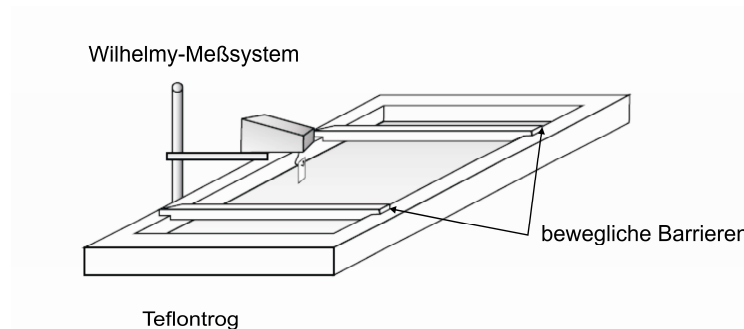


Abb. 3.13: Schematische Darstellung einer Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem.⁸⁴

Die einfachste Messgröße ist die Oberflächenspannung γ . Diese ist direkt proportional zu der Kraft, mit der ein Filterpapierstückchen in das Wasser gezogen wird. Das Meßsystem, an dem das Filterpapier befestigt ist, nennt man Wilhelmy-Meßsystem. Dieses reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen bezüglich der Oberflächenspannung.

Bei der Zugabe von oberflächenaktiven Molekülen, wie z. B. Lipiden, verringert sich die Oberflächenspannung. Die Differenz aus der Oberflächenspannung einer reinen

Wasseroberfläche und der durch die Zugabe der veränderten Oberflächenspannung wird lateraler Druck Π genannt.

$$\Pi = \gamma_{Wasser} - \gamma \quad (3.19)$$

Die Repulsion der amphiphilen Moleküle führt bei Verringerung der Fläche zur Herabsetzung der Oberflächenspannung. Nach Gleichung (3.19) führt dies zu einer Zunahme des lateralen Drucks. Daraus resultieren die Isothermen in einem Druck-Flächen-Diagramm, wie es in Abb. 3.14 zu sehen ist.

In der Isotherme sind die Bereiche, bei denen ein konstanter Druck vorliegt, gleichzusetzen mit Phasenänderungen des Systems, wie sie z. B. bei Kettenordnungsübergängen bei Lipiden gegeben sind. Ein Phasenübergang, bei dem die Koexistenz von zwei Phasen vorliegt, ist als Knick in der Isotherme zu finden. Daher trägt eine solche aufgenommene Isotherme grundlegend zur Charakterisierung der Systeme bei.

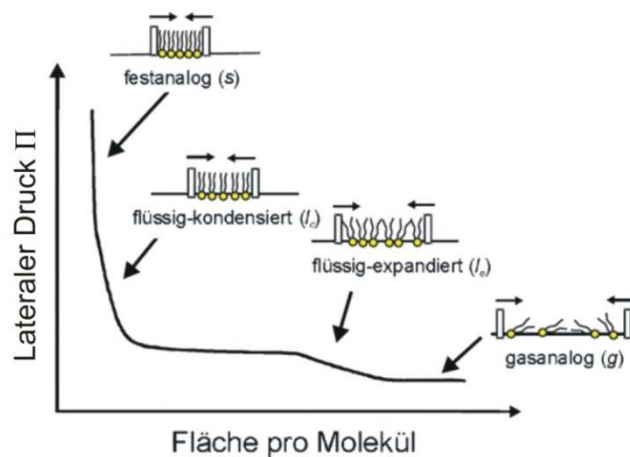


Abb. 3.14: Kompressionsisotherme einer DPPC-Monoschicht mit charakteristischen Zustandsphasen. ⁸⁴

In dieser Arbeit wurde die Filmwaagetechnik verwendet, um das Phasenverhalten des polymerisierbaren Lipids 1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (23:2 Diyen PC) (Avanti Polar Lipids) genauer zu charakterisieren.

3.5 Präparative Methoden

3.5.1 Präparation festkörperunterstützter Membranen

3.5.1.1 Spreiten von Vesikeln

Eine mögliche Methode, um festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten herzustellen, ist über die Technik des Vesikelspreitens auf einem planaren Substrat, wie z. B. Glas, Glimmer oder Silizium-Wafer zu erreichen. Hierbei werden unilamellare Vesikel über die *Extrusionsmethode*¹³ hergestellt und auf einen Festkörper gegeben. Der spontane Spreitvorgang der unilamellaren Vesikel findet oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur statt. Die Präparation der Vesikel erfolgt über *Extrusion* durch eine Polycarbonatmembran mit mittlerer Porengröße von 50 nm bis 1000 nm in einem Miniextruder. Von Vorteil für das Spreiten ist eine attraktive Wechselwirkung zwischen den Vesikeln und der Oberfläche des Festkörpers¹¹.

Für diese Methode müssen die verwendeten Substrate eine gute Hydrophilie aufweisen. Daher wurden die in dieser Arbeit verwendeten Silizium-Wafer (Si-Mat, Landsberg/Lech), die bereits eine 100 nm Oxidschicht aufweisen, hydrophilisiert. Deshalb erhielten die Silizium-Wafer für 15 bis 20 min ein „Hydro-Bad“ ($\text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O}_2 = 5:1:1$) bei einer Temperatur von 75 °C. Danach wurden die Siliziumsubstrate bis zur Verwendung unter Wasser gelagert.

Membranpräparation: In dieser Arbeit wurden Lipidfilme aus 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) mit 0,2 mol% des Fluorophors BODIPY 500/510 HPC und aus DPhPC und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) im Stoffmengenverhältnis 6 zu 4, ebenfalls mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC verwendet. Zur Herstellung der Lipidfilme wurden zunächst Stammlösungen der Lipide in Chloroform mit einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} angesetzt. Um eine Gesamtlipidmenge von 0,5 mg pro Film zu erhalten, wurden im Anschluss daran entsprechende Volumina der Stammlösungen in Reagenzgläser pipettiert und mit Stickstoff bei 38 °C vollständig verblasen, wodurch sich ein dünner Lipidfilm auf dem

Boden des Reagenzglases bildete. Zur vollständigen Entfernung der Lösungsmittelreste kam der an der Glaswand angelagerte dünne Lipidfilm für 3 h bei 35 °C in einen Vakuumtrockenschrank. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lipidfilme bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung der Vesikel wurde der Lipidfilm mit 1 mL eines 1 mM CaCl₂-Puffers (20 mM TRIS, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4) für 10 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Lipidfilm dreimal im Abstand von 5 min für 30 s mit dem Vortexer (Vortexer REAX, Heidolph) geschüttelt, damit eine Suspension von multilamellaren Vesikeln vorlag. Für die Herstellung von unilamellaren Vesikeln wurde diese Suspension 31 mal durch einen Miniextruder (*Liposofast*[®], Avestin, Kanada) durch eine Polycarbonatmembran mit einem mittleren Porendurchmesser von 100 nm gedrückt. Die unilamellaren Vesikel wurden auf das Siliziumsubstrat gegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben gründlich mit Puffer gespült.

3.5.1.2 Langmuir-Blodgett-Technik

Eine andere Präparationsmethode, um festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten herzustellen, ist der Langmuir-Blodgett (LB) Übertrag mit Hilfe der Filmwaage¹⁶. Diese Methode setzt sich aus einem hydrophilen und hydrophoben Übertrag zusammen. Zunächst werden die Lipide auf einer Wasseroberfläche gespreitet. Im Anschluss daran wird ein hydrophiles Substrat bei gleichbleibendem Oberflächendruck aus der Subphase der Wasseroberfläche bewegt. Bei diesem Vorgang adsorbieren die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide auf die Substratoberfläche und die hydrophoben Fettsäureketten ragen in die Luft. Der zweite hydrophobe Übertrag ermöglicht die Herstellung einer Lipiddoppelschicht. Dabei wird ein zuvor mit der hydrophoben Monoschicht präparierter Träger von oben bei konstantem Oberflächendruck in die Subphase getaucht. Hierbei lagern sich die Lipide mit ihren hydrophoben Alkylketten durch die hydrophoben Wechselwirkungen an die erste Monoschicht auf dem Substrat an. Es liegt somit eine Lipiddoppelschicht vor.

Die LB-Überträge wurden mit der Filmwaage und dem zugehörigen Filmlift der Firma Riegler & Kirstein (Mainz) durchgeführt. Der hydrophobe Träger wurde durch den Übertrag von DPPC bei hohem Oberflächendruck auf einem Glassubstrat hergestellt. Der hydrophobe Übertrag erfolgte mit einer Barrierengeschwindigkeit von $4,8 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ und einem lateralen Druck von $\Pi = 45 \text{ mN m}^{-1}$. Die Geschwindigkeit, mit der das Glassubstrat aus der Subphase gezogen wurde, lag bei $0,2 \text{ mm min}^{-1}$. Der Oberflächendruck wurde während des Übertrags durch eine automatische Regelung der Filmwaage auf 45 mN m^{-1} gehalten. Die Träger wurden über Nacht getrocknet, bevor die zweite Lipidschicht übertragen wurde. Nach dem Spreiten der in Chloroform gelösten Lipidmischung DPhPC: 23:2 PC Diyen (Verhältnis: 3:1) (23:2 PC Diyen: 1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin), Kompression auf $\Pi = 45 \text{ mN m}^{-1}$ und 30 minütigem Äquilibrieren, wurde der hydrophobe Träger mit einer Geschwindigkeit von 5 mm min^{-1} in die Subphase abgesenkt. Die so hergestellten Lipiddoppelschichten wurden permanent unter Flüssigkeit gehalten.

3.5.2 Präparation von unilamellaren Riesenvesikeln (GUV)

Die Verwendung von riesigen unilamellaren Vesikeln (GUV: *giant unilamellar vesicles*) in biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die Gründe hierfür sind deren vielseitige Einsetzbarkeit und auch neue experimentelle Techniken zu ihrer Untersuchung^{85, 86}.

Aufgrund ihrer Größe, der Durchmesser liegt abhängig von der verwendeten Lipidmischung im Durchschnitt zwischen 10 und 150 μm , lassen sich GUVs sehr gut für lichtmikroskopische, beziehungsweise fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen heranziehen. Die Präparation der GUVs erfolgt über Elektroformation (*Elektroswelling*). Die Hydratisierung der Lipidfilme in wässriger Lösung erfolgt in einem elektrischen Feld. Diese Methode wurde 1986 von Angelova und Dimitrow für eine planparallele sowie für eine zylindrische Kammergeometrie veröffentlicht⁸⁷⁻⁹⁰. Als elektrisches Feld kann sowohl Wechselspannung als auch Gleichspannung verwendet werden.

Der Aufbau eines Elektroformationsexperiments besteht aus einer Kammer und einer Spannungsquelle. Über die Parameter des elektrischen Feldes, der Frequenz und der Spannung, wird das Vesikelwachstum kontrolliert.

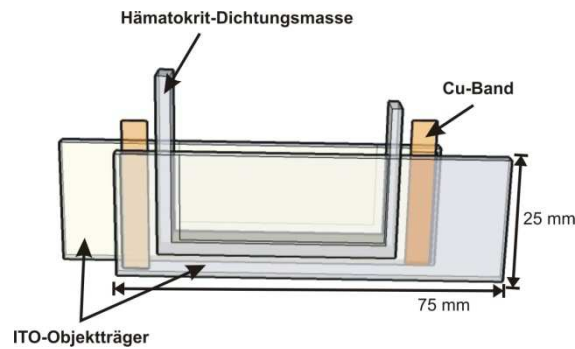


Abb. 3.15: Schematische Darstellung einer Kammer zur GUH-Herstellung mittels Elektroformation.

Die verwendete Kammer besteht aus zwei Indium-Titanoxid (ITO)-beschichteten Objektträgern (PGO, Iserlohn, Deutschland). Auf jedem Objektträger befindet sich zur Kontaktierung mit dem Potentialfeld ein Stück Kupferband (PGO, Iserlohn, Deutschland). Das Hämatokritwachs (Schütt, Göttingen, Deutschland) dient zur Abdichtung der Kammer. Der Aufbau einer solchen Kammer ist in Abb. 3.15 dargestellt.

Auf die Objektträger wurden 25 bis 30 μL der 2 (w/V)-% Lipidmischung in Chloroform mit 0,05 mol% Fluorophoranteil aufgebracht und für etwa 12 h in den Trockenschrank gelegt. Die Temperatur wurde oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der verwendeten Lipide gehalten. Danach wurde die Kammer, wie in Abb. 3.15 gezeigt, zusammengebaut und das Innere mit bidestilliertem Wasser befüllt. An die Kupferfolie wurde mittels eines Funktionsgenerators (Agilent 33220A, Böblingen, Deutschland) eine sinusförmige Wechselspannung von 1,6 V bei 12 Hz für 3 h angelegt. Nach dieser Zeit wurde für 10 min bei gleichbleibendem Potential zur 5 Hz Rechteckspannung gewechselt. Das Anlegen der Rechteckspannung beim verwendeten Aufbau für die Präparation der GUVs am Ende soll das Lösen der GUVs von der Elektrodenoberfläche forcieren.

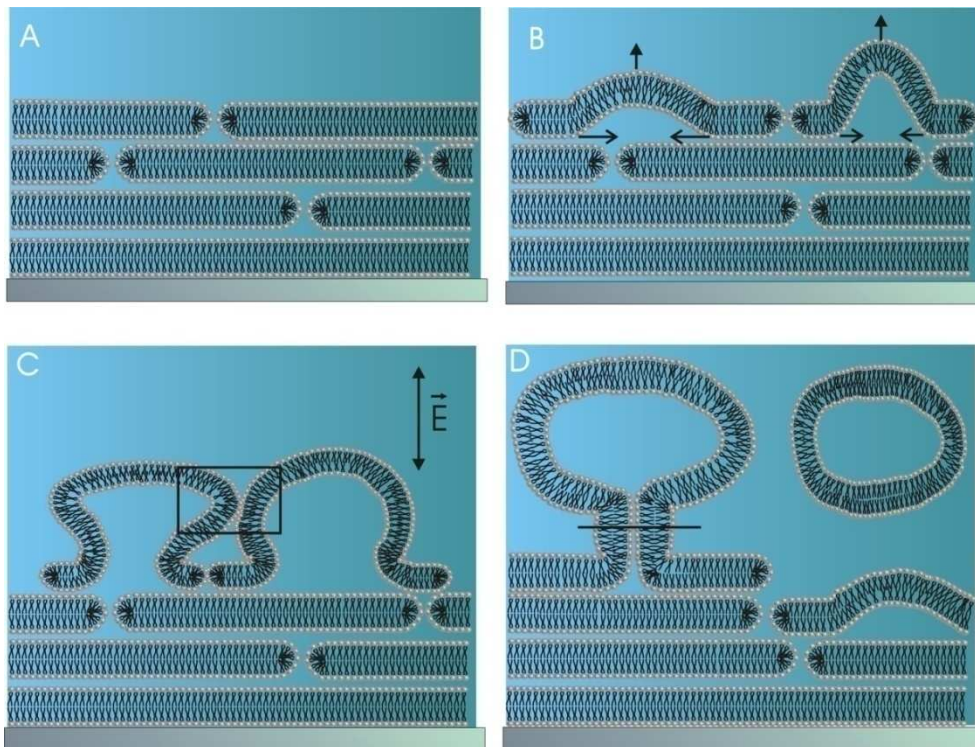


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Präparation von GUVs nach der Elektroformationsmethode. \vec{E} zeigt die Richtung des externen elektrischen Feldes an. (A) Hydratisierter Lipidfilm in wässriger Lösung ohne externes elektrisches Feld auf der Elektrodenoberfläche. (B) Durch ein externes elektrisches Feld wird eine periodische Schwingung senkrecht zur Elektrodenfläche erzeugt. Die lamellaren Lipidschichten separieren sich und beginnen sogenannte „Pilzstrukturen“ zu bilden. (C) Bedingt durch das externe elektrische Feld wachsen diese „Pilzstrukturen“ weiter bis sich diese untereinander berühren. (D) Die Kontaktfläche der pilzähnlichen Strukturen vergrößert sich, bis es durch das externe elektrische Feld zur Fusion einer größeren pilzähnlichen Struktur kommt und als sphärischer Vesikel sich von der Elektrodenoberfläche ablöst.

Der exakte Mechanismus dieser Art der Vesikelbildung in einem elektrischen Feld ist bisher noch nicht genau geklärt. Fest steht, dass nur Liposomen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur gebildet werden und während der Formation der Liposomen Flüssigkeiten oder auch größere Partikel eingeschlossen werden können. Des Weiteren ist die Elektroformationsmethode auf Ionenstärken unterhalb von 10 mM NaCl beschränkt, da ein höherer Anteil die Vesikelbildung verhindert. Ein möglicher Ablauf, der während der Elektroformation zur Bildung von GUVs führt, ist in Abb. 3.16 dargestellt⁹¹. Es liegt ein externes elektrisches Feld mit einer definierten Frequenz an. Die periodischen Schwingungen sind senkrecht zur Elektrodenoberfläche gerichtet, auf der sich der Lipidfilm befindet (Abb. 3.16 (A)). Wie in Abb. 3.16 (B) zu sehen ist, werden die lamellaren Schichten separiert und wachsen zu sogenannten „Pilzstrukturen“. Die Größe, die dabei von diesen Strukturen erreicht werden kann, liegt bei etwa 10-20 μm ,

das entspricht in etwa der Größe spontan quellender Lipidfilme. Durch das Wachstum der pilzähnlichen Strukturen berühren sich diese untereinander (Abb. 3.16 (C)). Die Kontaktfläche vergrößert sich, bis schließlich durch die Schwingung des elektrischen Feldes die Fläche destabilisiert wird und es, wie in Abb. 3.16 (D), zu einer Fusion zweier Vesikel zu einem größeren Vesikel kommt. Nach ein paar Minuten wird aus der „Pilzstruktur“ ein sphärischer Vesikel, der sich von der Elektrodenoberfläche löst.

3.5.3 Präparation von funktionalisierten porösen Substraten

Die in dieser Arbeit verwendeten porösen Siliziumsubstrate sind in Abb. 3.17 zu sehen. Aufgrund der Probengeometrie eignen sich für die Impedanzspektroskopie lediglich die Siliziumsubstrate mit der Porenkantenlänge von $7\ \mu\text{m}$ (Infineon, München) (Abb. 3.17 (A)).

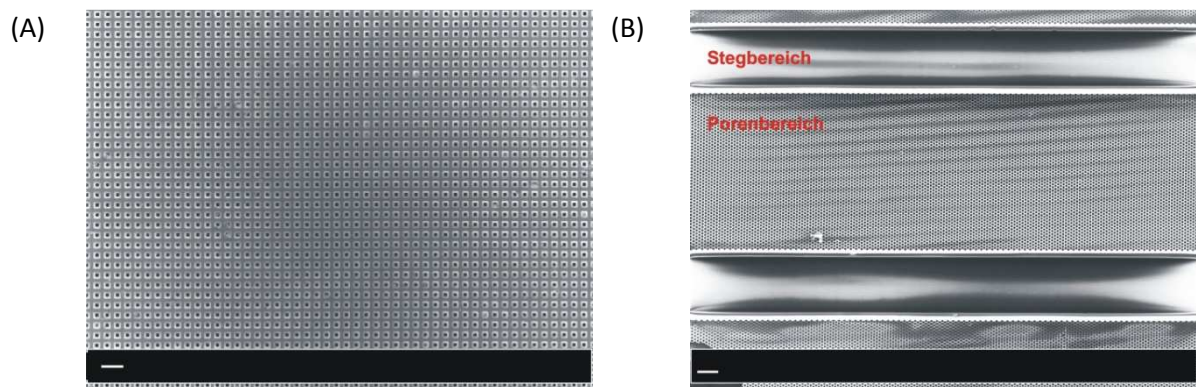


Abb. 3.17: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der porösen Siliziumstrukturen. (A) Übersichtsaufnahme des porösen Siliziumsubstrates mit $7\ \mu\text{m}$ Kantenlänge der Poren. Die Porosität der Gesamtfläche beträgt 53 %. (B) Übersichtsaufnahme des porösen Siliziumsubstrates mit $2\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser. Die Porosität beträgt 48 % der Gesamtfläche. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht $20\ \mu\text{m}$.

Diese Substrate sind durchgängig mit Poren bedeckt und weisen keine für die Impedanz störenden Festkörperbereiche auf und wurden ebenfalls für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen verwendet. Hingegen sind die Substrate mit einem Porendurchmesser von $2\ \mu\text{m}$ (Fluxion, Eindhoven, Niederlande) nur für die optische Methode der Fluoreszenzmikroskopie geeignet (Abb. 3.17 (B)), da sie eine

alternierende Struktur von definierten Poren- und Festkörperbereichen aufweisen. Die poröse Struktur dieser Substrate wurde über photolithographische Methoden hergestellt⁹²⁻⁹⁵. Um diese Substrate für die weitere Membranpräparation verwenden zu können, wurden diese mit einer Lipidmonoschicht funktionalisiert. Hierfür wurde die Affinität von Thiolen zu Gold genutzt¹⁸.

Funktionalisierung mit Dipalmitoylphosphatidylthioethanol (DPPE): Die porösen Siliziumsubstrate wurden zunächst für 5 min im Argonplasma (*Plasma Cleaner* PDC 32G-2, Harrick, USA) gereinigt. Anschließend wurde das Silizium mit einer 2,5 nm Titanschicht besputtert (*Sputter Coater 108 auto*, Cressington, UK). Die Titanschicht dient als Haftvermittler für die anschließend aufgetragene Goldschicht. Im Fall der porösen Siliziumsubstrate mit 2 µm Porendurchmesser wurden 60 nm Gold und bei den porösen Substraten mit 7 µm Porendurchmesser wurden 180 nm Gold aufgetragen. Die Substrate wurden über Nacht mit einer ethanolischen 0,5 mM DPPE-Lösung bei 4 °C inkubiert. Auf den Porenstegen wurde über den *self assembly*-Prozess eine Lipidmonoschicht gebildet. Nach der erfolgreichen Funktionalisierung wurde das Substrat für 30 min in Ethanol gereinigt und vor dem Einbau in die Messkammer im Stickstoffstrom getrocknet.

Funktionalisierung mit Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3): Lediglich das poröse Substrat mit dem Porendurchmesser von 2 µm wurde mit CPEO3 funktionalisiert. Die Behandlung des Substrates war bis zum Aufbringen der 60 nm Goldschicht der Präparation des Substrates mit DPPE ähnlich. Anstelle der Funktionalisierung mit DPPE wurden die Substrate mit 0,1 mM CPEO3 in *n*-Propanol über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert⁹⁶. Es bildete sich über *self assembly* eine Lipidmonoschicht aus. Vor der Verwendung wurden die Substrate für 30 min in Ethanol p. A. gespült und danach für 1 h in eine 0,1 M NaCl-Lösung zum Quellen des CPEO3 gelegt. Nach Austausch der NaCl-Lösung gegen einen TRIS-Puffer (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4) ohne CaCl₂ konnten die Substrate weiterverwendet werden. Die Substrate mit CPEO3-Funktionalisierung wurden ausschließlich für die Präparation der porenüberspannenden Membranen unter Verwendung von GUVs benutzt.

3.5.4 Präparation von Black Lipid Membranes (BLM)

Die Erzeugung von *black lipid membrane* (BLM) wurde über die sogenannte Müller-Rudin Technik durchgeführt. Hierzu wurde auf einem unfunktionalisierten Siliziumträger, in dessen Mitte sich ein circa 1 mm großes Loch befand, eine Lipidlösung, bestehend aus 2 (w/V)-% DPhPC in *n*-Dekan gelöst und dotiert mit 0,2 mol% des Fluorophores BODIPY 500/510 HPC, mit einem stark ausgedünnten Pinsel aufgestrichen. Nach dem Ausdünnungsprozess lag eine Lipiddoppelschicht vor.

3.5.5 Präparation von porenüberspannenden Membranen

3.5.5.1 Präparation der mikro-BLMs

Die mikro-BLMs wurden sowohl impedanzspektroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Impedanzspektroskopie: Für die impedanzspektroskopischen Messungen wurden die vorher mit DPTE funktionalisierten Substrate zwischen zwei Teflonkammern fixiert (Abb. 3.3). Die Kammern wurden mit einer 0,5 M KCl-Lösung befüllt. Nach Einbau des Substrates wurden 8,5 μ L einer 2 (w/V)-% DPhPC-Lösung in *n*-Dekan auf das Substrat pipettiert und der Ausdünnprozess aufgezeichnet

Fluoreszenzmikroskopie: Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die mit DPTE funktionalisierten Substrate in den in Abb. 3.18 schematisch dargestellten Probenhalter eingebaut. Die Kammer wurde wahlweise mit einer 0,5 M KCl-Lösung oder dem oben beschriebenen 1 mM CaCl_2 /TRIS-Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4) befüllt. Anschließend wurde eine 2 (w/V)-% Lipidlösung mit Fluorophor mit Hilfe eines stark ausgedünnten Pinsels auf die poröse Struktur aufgebracht und der Probe 30-60 min Zeit zum Ausdünnen gegeben, damit sich eine Lipiddoppelschicht über den Poren bilden kann.

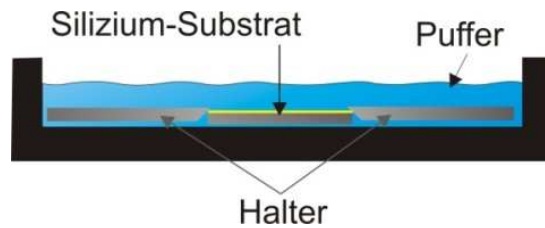


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der bei den Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten verwendeten Probenhalters.

Die verwendeten Lipid-Fluorophormischungen sind:

Tabelle 3.2: Lipid-Fluorophor-Lösungen für die Fluoreszenz-Messungen

Lipid	Fluorophor	Lösungsmittel
DPhPC 2 (w/V)-%	BODIPY 500/510 HPC 0,2 mol%	<i>n</i> -Dekan
DPhPC 2 (w/V)-%	Texas Red DHPE 0,1 mol%	<i>n</i> -Dekan
DPhPC 2 (w/V)-%	NBD-PE 0,5 mol%	<i>n</i> -Dekan
DPhPC : 23:2 Diyen PC 19:1	BODIPY 500/510 HPC 0,2 mol%	<i>n</i> -Dekan : Chloroform 1:1

Die Lipid-Fluorophormischung DPhPC mit NBD-PE wurde für die *Quenching*-Versuche verwendet, da das NBD-PE mit dem verwendeten Quencher Kobalt(II)chlorid reagiert, Texas Red DHPE und BODIPY 500/510 HPC dagegen nicht. Hierfür wurde das funktionalisierte Substrat in eine Zweikompartimentenkammer eingebaut, damit eine Zugangsmöglichkeit zur Unterseite des Substrates bestand.

3.5.5.2 Spreiten der GUVs auf porösem Siliziumsubstrat

Die mit CPEO3 funktionalisierten 2 µm porösen Substrate wurden nur für die Fluoreszenzmessungen verwendet. Hierbei konnte die Kammer aus Abb. 3.18 benutzt werden. Als Puffer fand zunächst ein TRIS-Puffer (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4) ohne CaCl₂ Verwendung. In die Kammer wurden 2,8 mL dieses Puffers und 200 µL der unverdünnten GUV-Lösung in bidestilliertem Wasser gegeben. Um die GUVs auf dem porösen Material zum Spreiten zu bringen, erfolgte eine Zugabe von entweder 80-100 mM CaCl₂ oder 33,33 mM einer Polyethylenglycol 6000-Lösung (PEG). Beim Spreiten mit CaCl₂ wurde die Probe 30 min inkubiert. Danach wurde mit 500 mL eines 1 mM CaCl₂-Puffer (1 mM CaCl₂, 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült. Bei der Verwendung von PEG als Spreithilfe blieb die Probe maximal 10 min stehen. Danach wurde die Probe mit 1000 mL des CaCl₂-Puffers (1 mM CaCl₂, 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült. Vor dem Spülen wurde bei beiden Präparationsarten der Bedeckungsgrad mit dem Fluoreszenzmikroskop geprüft.

3.6 Photopolymerization von Lipiddoppelschichten aus Diacetylen

Das polymerisierbare Lipid 1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (23:2 PC Diyen) enthält in beiden Alkylketten je zwei konjugierte Acetylengruppen (Abb. 3.19), die unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm polymerisieren können. Voraussetzung für die Polymerisation ist ein hochgeordneter Zustand, wie er z. B. in einem Langmuir-Blodgett-Übertrag in der kondensierten Phase vorliegt. Unter diesen Umständen werden die Alkylketten benachbarter Moleküle zu einem Netzwerk verknüpft. Die erfolgte Polymerisation ist visuell mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes nachweisbar, da das Polymer von rötlicher Farbe ist und Absorptionsmaxima bei 485 nm und 525 nm zeigt⁹⁷⁻⁹⁹.

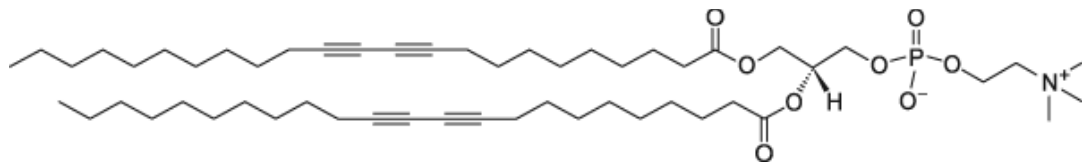


Abb. 3.19: 1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (23:2 PC Diyen).⁵⁷

Als Lichtquelle für die Polymerisation diente eine Niedrigdruck Quecksilberdampfampe (2 W, UPV, Pen-Ray, UK), die UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm emittiert. Die Durchführung der Polymerisation erfolgte nach Präparation der porenüberspannenden Membranen auf den porösen Siliziumsubstraten mit dem 2 µm Porendurchmesser. Vor der Polymerisation erfolgte der Austausch des Puffers gegen einen entgasten Puffer, da Sauerstoffspuren die Polymerisation verhindern, indem Tripletsauerstoff mit den Diacetylenradikalen unter Bildung von Peroxiden reagiert¹⁰⁰.

Der Abstand der UV-Lampe wurde über eine Stativhalterung auf etwa 5 cm vom Substrat festgelegt, damit eine definierte Leistung, die etwa 1 bis 2 mW cm⁻² entspricht, auf die Probenoberfläche trifft. Die Dauer der Beleuchtung mit UV-Licht betrug zwischen 5 und 10 min.

4 ERGEBNISSE

4.1 Stabilitätsmessung der mikro-BLMs über Impedanzspektroskopie

Poröse Substrate im Mikro- und Nanobereich bilden eine gute Voraussetzung für die Bildung von artifiziellen Membransystemen, die vielseitige Anwendungsmöglichkeiten bieten. So können diese z. B. bei der Untersuchung von Ionenkanälen genutzt werden, da sie von beiden Seiten kontaktierbar sind. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität und der Veränderung der elektrischen Eigenschaften über einen bestimmten Beobachtungszeitraum wurden in dieser Arbeit impedanzspektroskopische Messungen an mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten durchgeführt. Diese Impedanzexperimente an den mikro-BLMs sollten zusätzlich für einen direkten Vergleich zu den visuellen Beobachtungen aus Kapitel 4.2 herangezogen werden.

Die impedanzspektroskopischen Messungen wurden an mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC, durchgeführt. Als Substrat wurde poröses Silizium mit einem Porendurchmesser von $7\ \mu\text{m}$ verwendet. Dieses wurde, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, mit 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphothioethanol (DPPE) funktionalisiert und, wie in Kapitel 3.5.5.1 erläutert, präpariert.

Nach dem Ausdünnen der zugegebenen Lipidlösung, 2 (w/v)-% DPhPC in *n*-Dekan, erfolgte die Aufnahme von Impedanzspektren in einem Frequenzbereich von 10^{-3} - 10^6 Hz. Aus diesen Spektren konnten der jeweilige Membranwiderstand R_m und die Membrankapazität C_m mit Hilfe einer nichtlinearen Kurvenanpassung bestimmt werden. Als Grundlage für die Kurvenanpassung wurde das in Abb. 4.1 (B) gezeigte Ersatzschaltbild verwendet.

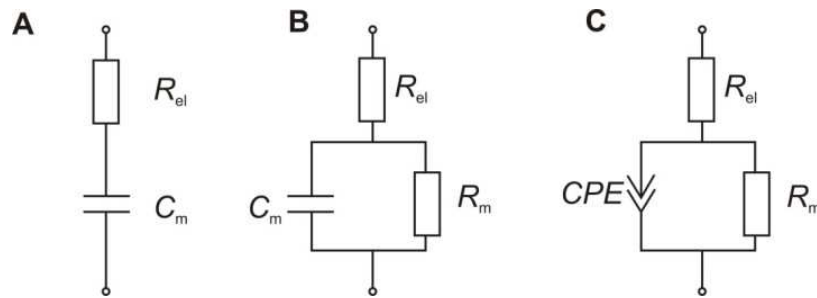


Abb. 4.1: Ersatzschaltkreise für die Kurvenanpassung der Impedanzspektroskopischen Daten. (A) Reihenschaltung des Elektrolytwiderstandes R_{el} und der Membrankapazität C_m . (B) Parallelschaltung der Membrankapazität C_m mit dem Membranwiderstand R_m in Serie zum Elektrolytwiderstand R_{el} . (C) Austausch der Membrankapazität C_m gegen ein *constant phase element* (CPE).

R_{el} bezeichnet hierbei den Elektrolytwiderstand. Membranwiderstände R_m größer als $3 \text{ G}\Omega$ können im beobachteten Frequenzbereich nicht bestimmt werden, sondern werden erst bei niedrigeren Frequenzen beobachtet, die mit dem verwendeten Impedanzgerät nicht erreicht werden können. Ein charakteristisches Impedanzspektrum ist in Abb. 4.2 gezeigt. Der absolute Wert der Impedanz $|Z|(f)$ ist in Abb. 4.2 (a) dargestellt, Abb. 4.2 (b) zeigt die Veränderung des Phasenwinkels $\phi(f)$ über den Frequenzbereich.

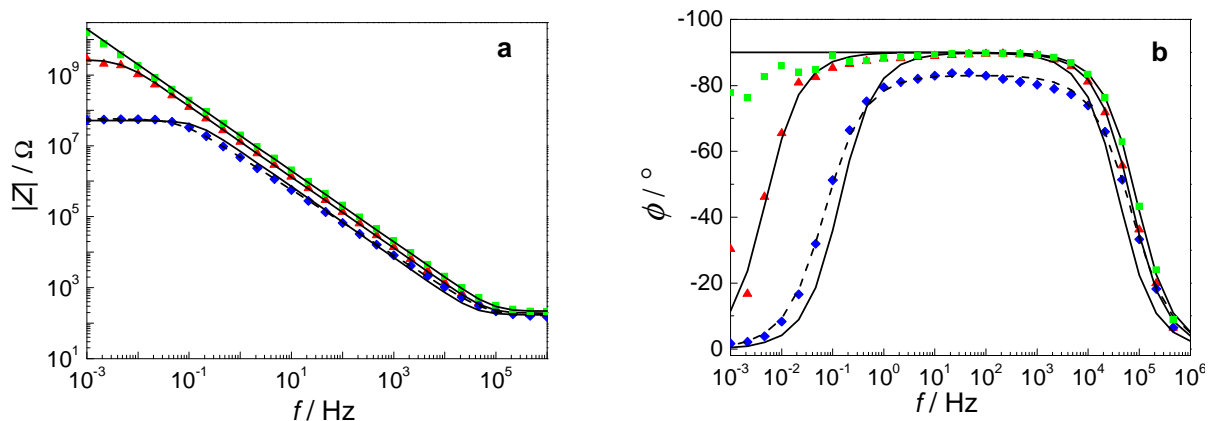


Abb. 4.2: Impedanzspektroskopische Analyse der mikro-BLMs bestehend aus DPhPC über den Siliziumporen ($\varnothing = 7 \mu\text{m}$) in $0,5 \text{ M KCl}$ -Lösung über eine Zeitperiode von $8,3 \text{ h}$. Der Absolute Wert der Impedanz $|Z|(f)$ (a) und der Phasenwinkel $\phi(f)$ (b) ist zu folgenden Zeitpunkten nach Ausbildung der Membran aufgetragen: (grün) $0,6 \text{ h}$, (rot) $2,2 \text{ h}$, (blau) $8,3 \text{ h}$. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer nichtlinearen Kurvanpassung mit dem RCR-Schaltbild (Abb. 4.1 (B)) mit den Parametern: (grün) $C_m = 0,008 \mu\text{F}$, $R_{el} = 220 \Omega$; (rot) $C_m = 0,012 \mu\text{F}$, $R_m = 2,7 \text{ G}\Omega$, $R_{el} = 190 \Omega$; (blau) $C_m = 0,022 \mu\text{F}$, $R_m = 51 \text{ M}\Omega$, $R_{el} = 172 \Omega$. Die gestrichelten Linien sind das Ergebnis eines Schaltkreises mit CPE (Abb. 4.1 (C)). Die Parameter hierfür lauten: $A = 0,034 \mu\text{F}$; $\alpha = 0,92$, $R_m = 57 \text{ M}\Omega$, $R_{el} = 160 \Omega$.

Beide Graphen beinhalten den Aspekt der zeitlichen Veränderung der Spektren. Direkt nach der Bildung der mikro-BLMs wird das Impedanzspektrum durch einen hohen Membranwiderstand, der nicht detektierbar ist, den Elektrolytwiderstand, der bei hohen Frequenzen liegt, und die Membrankapazität im Frequenzbereich unter 10^5 Hz (Abb. 4.2 (a)/(b), grüne Kurve) charakterisiert. Die Datenanpassung mit dem Ersatzschaltbild einer Serienschaltung von Elektrolytwiderstand und Membrankapazität (Abb. 4.1 (A)) liefert folgende Werte für den Elektrolytwiderstand $R_{el} = 220 \Omega$ und für die Membrankapazität $C_m = 0,008 \mu\text{F}$. Letzteres ergibt eine spezifische Membrankapazität $\frac{C_m}{F} = 0,66 \mu\text{F cm}^{-2}$ unter Berücksichtigung einer porösen Fläche von $F = 0,01 \text{ cm}^2$.

Über die Zeit sinkt der Membranwiderstand und wird im Impedanzspektrum ablesbar (Abb. 4.2 (a) und (b) roter und blauer Kurvenverlauf). Als Grundlage für die Kurvenanpassung wurde das Ersatzschaltbild aus Abb. 4.1 (B) verwendet. Für den roten Kurvenverlauf in beiden Graphen, 2,2 h nach Bildung der Membran, wird ein Membranwiderstand $R_m = 2,7 \text{ G}\Omega$ und eine Membrankapazität $C_m = 0,012 \mu\text{F}$, beziehungsweise eine spezifische Membrankapazität von $\frac{C_m}{F} = 1,00 \mu\text{F cm}^{-2}$, erhalten. Für den blauen Kurvenverlauf in Abb. 4.2, 8,3 h nach Membranbildung, liefert die Kurvenanpassung die Werte für den Membranwiderstand von $R_m = 51 \text{ M}\Omega$ und spezifische Membrankapazität von $\frac{C_m}{F} = 1,87 \mu\text{F cm}^{-2}$. Allerdings ist hier zu erkennen, dass die Daten (Abb. 4.2 (a) und (b), durchgezogene Linie) mit der Anpassung des Ersatzschaltbildes aus Abb. 4.1 (B) nicht mehr gut übereinstimmen, je weiter der Membranwiderstand sinkt. Das Verhalten einer Membran als idealer Kondensator ist bei diesem Impedanzspektrum nicht mehr gegeben. Um eine bessere Übereinstimmung zwischen Kurvenanpassung und Daten zu erhalten, wird ein alternatives Ersatzschaltbild herangezogen, in dem die Membrankapazität C_m durch ein *CPE* (*constant phase element*) ersetzt wird (Abb. 4.1 (C)). Ein *CPE* beschreibt ein verzweigtes Netzwerk von Ohmschen Widerständen und Kapazitäten⁷². Ein *CPE* wird in der Impedanzspektroskopie z. B. zur Beschreibung hoher Oberflächenrauigkeiten herangezogen. Zu früheren Zeitpunkten sind die elektrischen Eigenschaften der mikro-BLMs in den Impedanzspektren gut mit dem Ersatzschaltkreis Abb. 4.1 (B) zu beschreiben. Daher muss in den späteren Impedanzspektren eine Veränderung der Oberfläche vorliegen, die nach einer

Verwendung des *CPE* im Ersatzschaltbild für die Kurvenanpassung verlangt. Diese Verwendung des *CPE* bringt eine gute Übereinstimmung zwischen Daten und Kurvenanpassung (Abb. 4.2 (a) und (b), gestrichelte Linie). Die Abweichung von der idealen Kapazität ist durch den Parameter α gegeben. Im Falle eines Wertes von $\alpha = 1$ liegt eine ideale Kapazität vor. Dieser Parameter beträgt nach 8,3 h $\alpha = 0,92$, d. h., es liegt eine Membran mit einer geringen Abweichung vom idealen kapazitiven Verhalten vor.

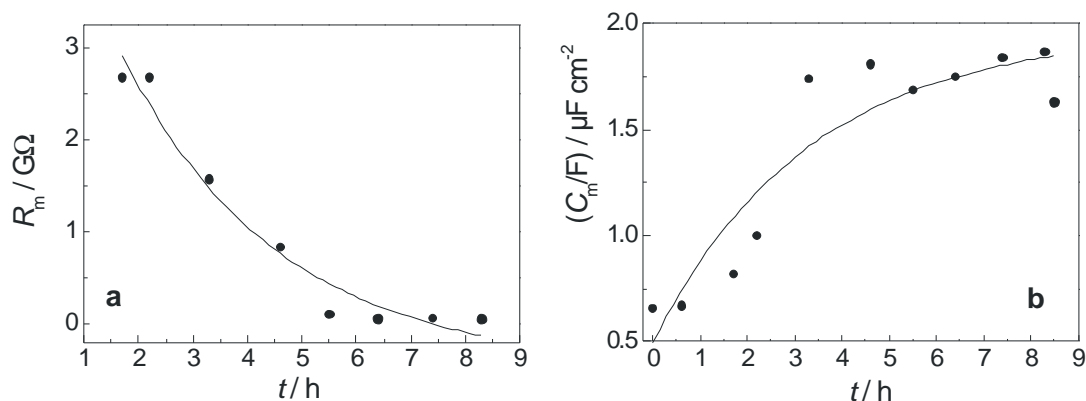


Abb. 4.3: (a) Veränderung des Membranwiderstands als Funktion der Zeit. (b) Zeitabhängige Veränderung der spezifischen Membrankapazität als Funktion der Zeit. Die Parameter wurden aus den Impedanzspektren ermittelt. Die Datenanpassung der einzelnen Impedanzspektren erfolgte mit Hilfe des RCR-Schaltbildes aus Abb. 4.1 (B). Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer Datenanpassung für (a) mit einer abfallenden Exponentialfunktion und für (b) mit einer ansteigenden Exponentialfunktion. Der jeweilige τ -Wert der Anpassung ist für (a) $\tau = (2,9 \pm 1,0) h^{-1}$ und für (b) $\tau = (3,3 \pm 1,6) h^{-1}$.

Die kontinuierliche Abnahme des Membranwiderstands und der Anstieg der spezifischen Membrankapazität über die Zeit sind graphisch in

Abb. 4.3 dokumentiert. Direkt nach Bildung der mikro-BLMs liegt der Membranwiderstand über $3 G\Omega$ und kann daher nicht bestimmt werden. Erst nach 1,7 h ist es möglich, den Membranwiderstand mit $2,7 G\Omega$ aus dem Impedanzspektrum zu ermitteln. Dieser fällt weiterhin bis auf $0,05 G\Omega$ nach 8,3 h ab. Aus der Kurvenanpassung mit einer abfallenden Exponentialfunktion erster Ordnung ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante von $\tau = (2,9 \pm 1,0) h^{-1}$ für den Abfall des Membranwiderstands. Aus

Abb. 4.3 (b) ist zu entnehmen, dass es im Gegensatz zum Abfall des Membranwiderstands in (a) zu einem Anstieg der spezifischen Membrankapazität über die Zeit kommt. Direkt nach der Bildung der mikro-BLMs beträgt der spezifische Widerstand $0,66 \mu\text{F cm}^{-2}$ und steigt nach 8,3 h auf $1,87 \mu\text{F cm}^{-2}$ an. Die Anpassung einer Exponentialfunktion erster. Ordnung liefert eine Geschwindigkeitskonstante für den Anstieg von $\tau = (3,3 \pm 1,6) \text{ h}^{-1}$. Entsprechend der Qualität der präparierten mikro-BLMs auf dem porösen Substrat mit $7 \mu\text{m}$ Porendurchmesser ergeben sich bei verschiedenen Experimenten unterschiedliche Stabilitätszeiten. Außerdem werden unterschiedliche Zeiten für den Abfall des Membranwiderstands und den Anstieg der spezifischen Membrankapazität gemessen. Die Zeit der Stabilität der mikro-BLMs hatte eine Spanne von 30 min bis hin zu mehreren Tagen.

Andere Siliziumsubstrate mit kleineren Porengrößen konnten nicht untersucht werden, da deren Probengeometrie für die Impedanzspektroskopie nicht geeignet ist. Wie in Abb. 3.17 an den Elektronenmikroskopaufnahmen zu sehen ist, wechselten sich bei den porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von $2 \mu\text{m}$ die porösen Flächen mit Festkörperbereichen ab. Diese Unterbrechung der porösen Fläche wirkte sich nachteilig für die Impedanzspektroskopie aus.

4.2 Stabilitätsmessung von mikro-BLMs mittels Fluoreszenz- mikroskopie

4.2.1 Stabilitätsmessung der porösen DPPTe-funktionalisierten Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von 7 μm

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, die mikro-BLMs visuell abzubilden. Dadurch konnte die zeitliche Veränderung der Oberfläche, die in der Impedanz durch den Abfall des Membranwiderstands beschrieben wurde, untersucht werden. Die Lipidlösung, 2 (w/v)-% DPhPC in *n*-Dekan, war mit 0,1 mol% des Fluorophors Texas Red DHPE dotiert und wurde mit einem stark ausgedünnten Pinsel auf das mit DPPTe funktionalisierte Siliziumsubstrat aufgebracht. Nach dem Ausdünnprozess lag eine homogene Fluoreszenz im Porenbereich vor (Abb. 4.4 (A)). Die Stege erscheinen in den Fluoreszenzbildern dunkel, da das aufgebrachte Gold die Fluoreszenz des Fluorophors löscht. Die mit mikro-BLMS bedeckten Poren hingegen sind als helle Rechtecke, beziehungsweise bei anderer Fokussierung auch als Rechtecke mit abgerundeten Ecken, erkennbar. Das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten über den Poren und auf den Stegen ist von Vorteil für die Messung, da hiermit eine klare Abgrenzung zwischen den mikro-BLMs und dem Stegbereich gegeben ist und die zeitliche Veränderung der einzelnen mikro-BLMs gut detektiert werden kann.

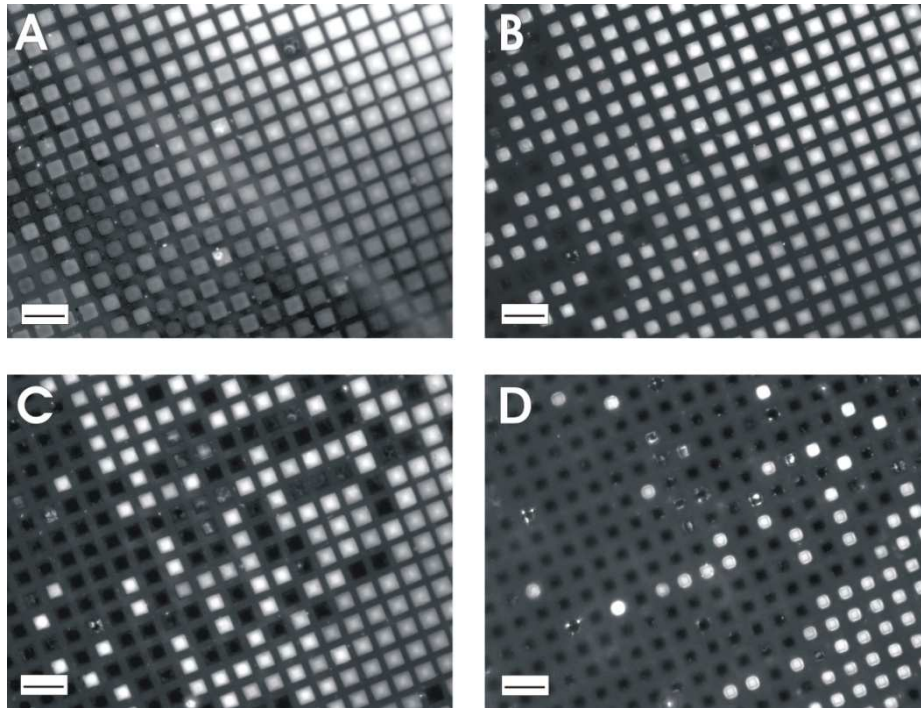


Abb. 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC, dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE, (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser, Funktionalisierung: DPPTe, 0,5 M KCl). Die Aufnahmen sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bildung der Membran aufgenommen und zeigen das Reißen der mikro-BLMs über den Porenbereichen über einen Zeitraum von vier Stunden. (A) $t = 0$ h, (B) $t = 0,8$ h, (C) $t = 2,5$ h und (D) $t = 4$ h nach Membranbildung. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

In Abb. 4.4 (A) bis (D) ist ein typischer Zeitverlauf einer Fluoreszenzmessung an mikro-BLMs über einen Bereich von vier Stunden dargestellt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h liegt eine homogene Fluoreszenz über fast allen Poren vor (Abb. 4.4 (A)). Bereits 0,8 h nach Membranbildung reißen einzelne mikro-BLMs. Zu beobachten ist dies in der unteren linken Ecke an den vereinzelt dunklen Rechtecken in Abb. 4.4 (B). Während der nächsten 3,5 h reißen immer mehr mikro-BLMs über den Poren unabhängig voneinander. Vier Stunden nach Bildung der Membran erscheinen nur noch vereinzelt Poren hell im Fluoreszenzmikroskop, das auf eine geringere Bedeckung mit mikro-BLMs als zu Beginn der Messung hindeutet (Abb. 4.4 (D)).

Zur zeitlichen Auswertung des Reißverhaltens der mikro-BLMs über den Poren wurde eine Pixelanalyse mit dem Programm SPIP[®] durchgeführt (Abb. 4.5). Für die Durchführung der Pixelanalyse wurde die Fluoreszenz des ersten Bildes (Abb. 4.4 (A)) auf 100 % gesetzt.

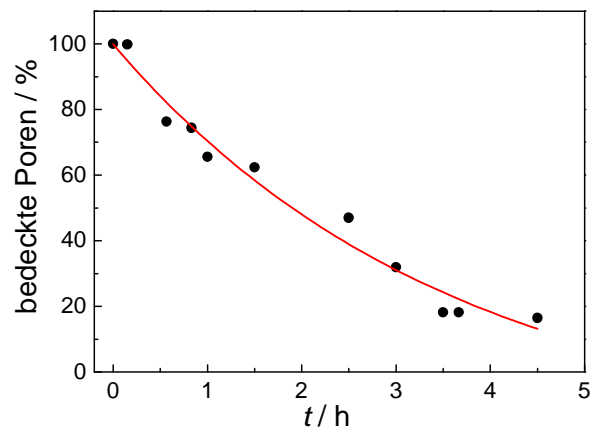


Abb. 4.5: Ergebnisse der Pixelanalyse (SPIP®) der in Abb. 4.4 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Bild (A) aus Abb. 4.4 wurde als 100 % Bedeckung angenommen und die folgenden Werte auf Bild (A) normiert. Bei der Kurvenanpassung (rote Linie) handelt es sich um einen exponentiellen Abfall 1. Ordnung, die Geschwindigkeitskonstante beträgt: $\tau = (3,6 \pm 1,4) \text{ h}^{-1}$.

Abb. 4.5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme der Porenbedeckung. Innerhalb der ersten drei Stunden sind bereits 70 % der mikro-BLMs, die die Poren bedecken, gerissen. Die exponentiell abfallende Kurvenanpassung liefert eine Geschwindigkeitskonstante von $\tau = (3,6 \pm 1,4) \text{ h}^{-1}$. Der Wert ist denen, die für die Geschwindigkeitskonstanten aus der Impedanzmessung für die zeitliche Veränderung des Membranwiderstands und der spezifischen Membrankapazität erhalten wurde, ähnlich. Allerdings ist zu beachten, dass bei der Impedanzmessung über die gesamte poröse Fläche gemessen wird, wohingegen bei der Fluoreszenzmikroskopie nur ein begrenztes Gebiet der porösen Fläche betrachtet werden kann. Für die Geschwindigkeitskonstante der Abnahme der Bedeckung bei den Fluoreszenzmessungen ließ sich ein Intervall von $1,4 - 4,2 \text{ h}^{-1}$ ermitteln.

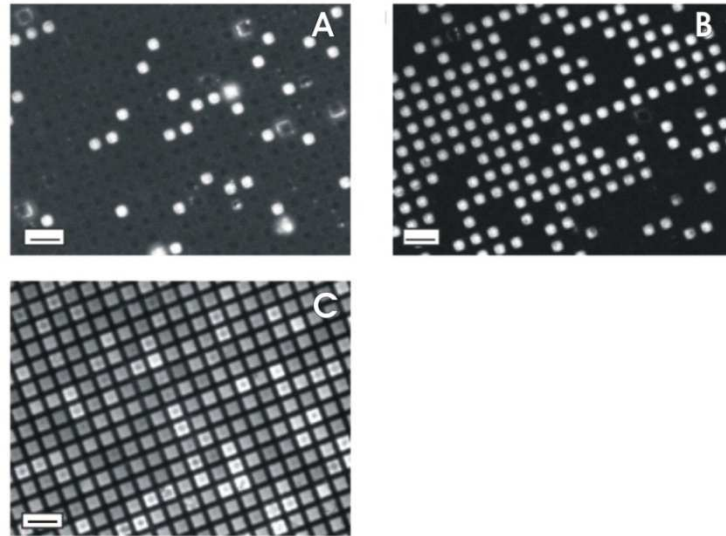


Abb. 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC, dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE (Substrat: poröses Silizium mit einem Porendurchmesser von 7 μm ; Funktionalisierung: DPTTE, 0,5 m KCl) 17 h nach der Präparation abhängig von dem beobachteten Gebiet sind die mikro-BLMs über den Poren (A) fast vollständig gerissen, (B) teilweise gerissen und (C) vollständig bedeckt. Der Maßstabsbalken in den Bildern beträgt 10 μm .

Da die Beobachtung der Stabilität der mikro-BLMs über den Poren lokal auf ein Gebiet der Probe begrenzt war, ließen sich auf den Proben zum Ende der Messung unterschiedliche Bedeckungszustände bezüglich der mikro-BLMs über den Poren finden. Um diese Unterschiede in der Bedeckung in den Fluoreszenzmessungen zu verdeutlichen, sind in Abb. 4.6 drei mögliche Fälle der Bedeckung dargestellt, die nach 17 Stunden fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden konnten. In Abb. 4.6 (A) sind nur noch vereinzelt Poren von mikro-BLMs bedeckt. In Bild (B) hingegen waren mehr als die Hälfte der Poren von mikro-BLMs überdeckt. Auf der Fluoreszenzaufnahme (C) ist keine einzige mikro-BLM gerissen. Es liegt in diesem Bereich eine 100%-ige Bedeckung vor. Es ist somit ein entscheidender Punkt für die Geschwindigkeitskonstante τ , die sich anhand der Pixelanalyse ergibt, an welcher Stelle der Probe die Stabilitätsmessung durchgeführt wurde.

4.2.2 Stabilitätsmessung von porösen ODT funktionalisierten Siliziumsubstraten mit Porendurchmesser von 7 μm

Zur Überprüfung, ob das Reißen der mikro-BLMs über den Poren von dem zur Funktionalisierung verwendeten Thiol abhängt, wurden die Siliziumsubstrate an Stelle von DPPE mit dem Octadekanthiol (ODT) funktionalisiert. Diese so veränderten Proben (Abb. 4.7) liefern ähnliche Ergebnisse wie die mikro-BLMs, die auf DPPE präpariert wurden. Jedoch ist anzumerken, dass mikro-BLMs auf ODT-funktionalisierten Substraten wesentlich schneller reißen als die auf DPPE funktionalisierten Substraten. Bereits in der ersten halben Stunde nach Membranbildung sind mehr als die Hälfte der mikro-BLMs über den Poren nicht mehr vorhanden (Abb. 4.7 (B)). Nach zwei Stunden ist im ausgewählten Bereich die Bedeckung der Poren auf nahe 0 % gesunken (Abb. 4.7 (E)).

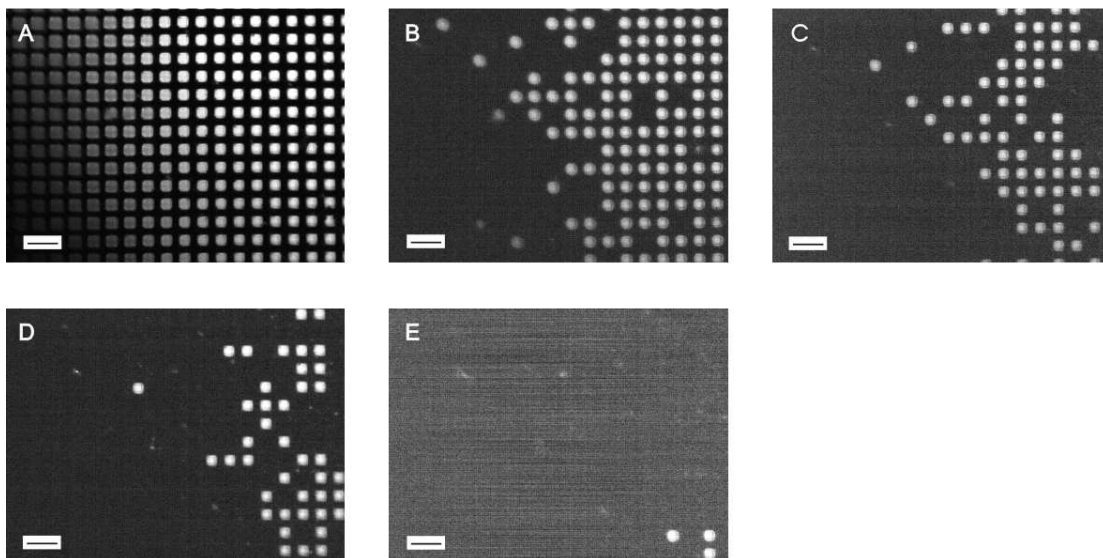


Abb. 4.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser, Funktionalisierung: ODT, 0,5 M KCl). Die Aufnahmen sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bildung der Membran aufgenommen und zeigen das Reißen der mikro-BLMs über den Porenbereichen (A) $t = 0$ h, (B) $t = 0,5$ h, (C) $t = 1,5$ h und (D) $t = 2$ h nach Membranbildung; Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Dieser Verlauf spiegelt sich auch das in Abb. 4.8 gezeigte Ergebnis der Pixelanalyse wieder. Die Bedeckung der Poren im ersten Bild wurde auf 100 % gesetzt. Innerhalb der ersten halben Stunde sinkt die Bedeckung der Poren auf 25 % und nimmt fast linear

innerhalb der nächsten 1,5 h auf fast 0 % ab. Ein exponentieller Abfall der Bedeckung wurde demnach nicht beobachtet

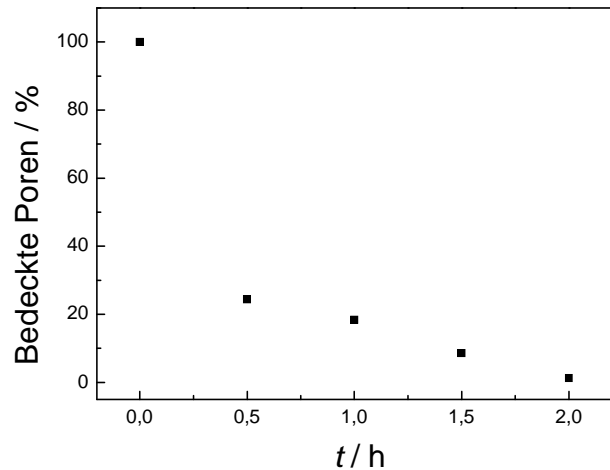


Abb. 4.8: Ergebnis der Pixelanalyse, der in Abb. 4.7 dargestellten Fluoreszenzbilder von mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 7 µm. Das erste Bild aus dieser Messung wurde auf 100 % bezüglich der Bedeckung normiert.

4.2.3 Stabilitätsmessung von porösen DPPTe funktionalisierten Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 2 µm

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, andere Porengrößen in die Betrachtung des Reißverhaltens der mikro-BLMs mit einzubeziehen. Dies war bei den Impedanzmessungen nicht möglich. Allerdings ergibt sich hier das Problem, dass die Probengeometrie der porösen Substrate anders geartet ist (vgl. Abb. 3.17) als bei dem porösen Substrat mit 7 µm Porendurchmesser. Da die einzelnen Porenbereiche durch große Festkörperbereiche unterteilt sind, ist der Einfluss des Lösungsmittels in den Porenbereichen wesentlich größer als bei den porösen Substraten mit durchgängiger poröser Fläche, da sich das Lösungsmittel auf den Festkörperbereichen sammelt. Lösungsmiteinflüsse sind in den nach Müller-Rudin präparierten mikro-BLMs immer gegeben, da bei dem Ausdünnprozess Reste in der Membran verbleiben und zur

Fluidität des Systems beitragen können. Durch die Wärmeentwicklung der verwendeten Quecksilberdampfampe des Fluoreszenzmikroskopes wurden diese dynamisch beeinflusst und bildeten eine neue Membran aus. Diese dynamischen Prozesse wirken sich auf das Ergebnis der Messungen zur Langzeitstabilität der mikro-BLMs aus. In Abb. 4.9 sind Fluoreszenzaufnahmen einer Messung von mikro-BLMs über die Dauer von 15 h dargestellt. Bild (A) zeigt eine homogene Fluoreszenz über den Poren. Bereits nach einer halben Stunde bildet sich in den Randbereichen ein heller Streifen aus, der als Lösungsmittel-Lipid-Fluorophor-Reservoir interpretiert werden kann (Abb. 4.9 (B)). Von diesem Reservoir läuft sofort nach Einschalten der Lampe eine Welle über den Porenbereich und überdeckt das poröse Substrat vollständig mit neuen mikro-BLMs. Daher ist auch nach 15 h keine Veränderung in der Bedeckung sichtbar.

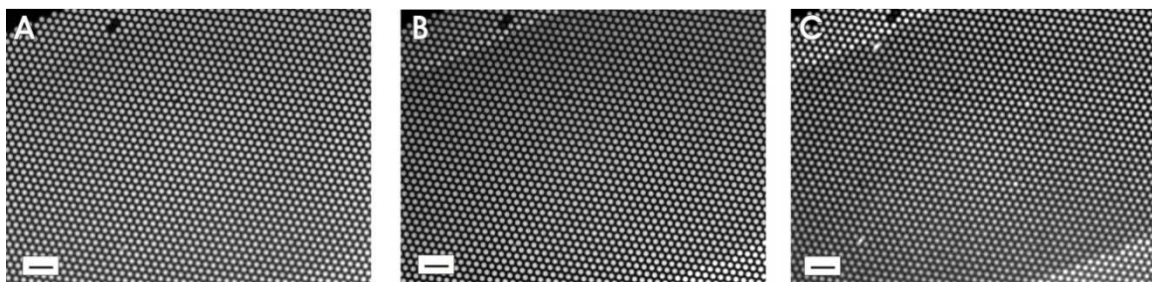


Abb. 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser, Funktionalisierung: DPTE, 0,5 M KCl). Die Aufnahmen sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bildung der Membran aufgenommen. (A) $t = 0$ h, (B) $t = 0,5$ h und (C) $t = 15$ h; der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 10 μm .

Durch den Austausch der Quecksilberdampfampe gegen eine die weniger Wärme im Bereich der Membran produziert, konnte der Einfluss der Dynamik des restlichen Lösungsmittels in den mikro-BLMs reduziert werden. In Abb. 4.10 wird der zeitliche Verlauf des Experiments an den mikro-BLMs auf den 2 μm großen Poren gezeigt. Zum Beginn der Messung in Bild (A) sind bereits einige Poren nicht mehr von einer mikro-BLM bedeckt und erscheinen daher schwarz in den Fluoreszenzaufnahmen. Schon nach 30 min (Abb. 4.10 (B)) ist eine Zunahme der schwarzen Bereiche erkennbar, das darauf schließen lässt, dass die Bedeckung der Poren weiter kontinuierlich abnimmt. Nach drei Stunden ist nur noch von vereinzelt mikro-BLMs über den Poren ein

Fluoreszenzsignal wahrnehmbar. Die restlichen Poren des Substrates lassen auf keinerlei Bedeckung mit einer mikro-BLM schließen (Abb. 4.10 (G)).

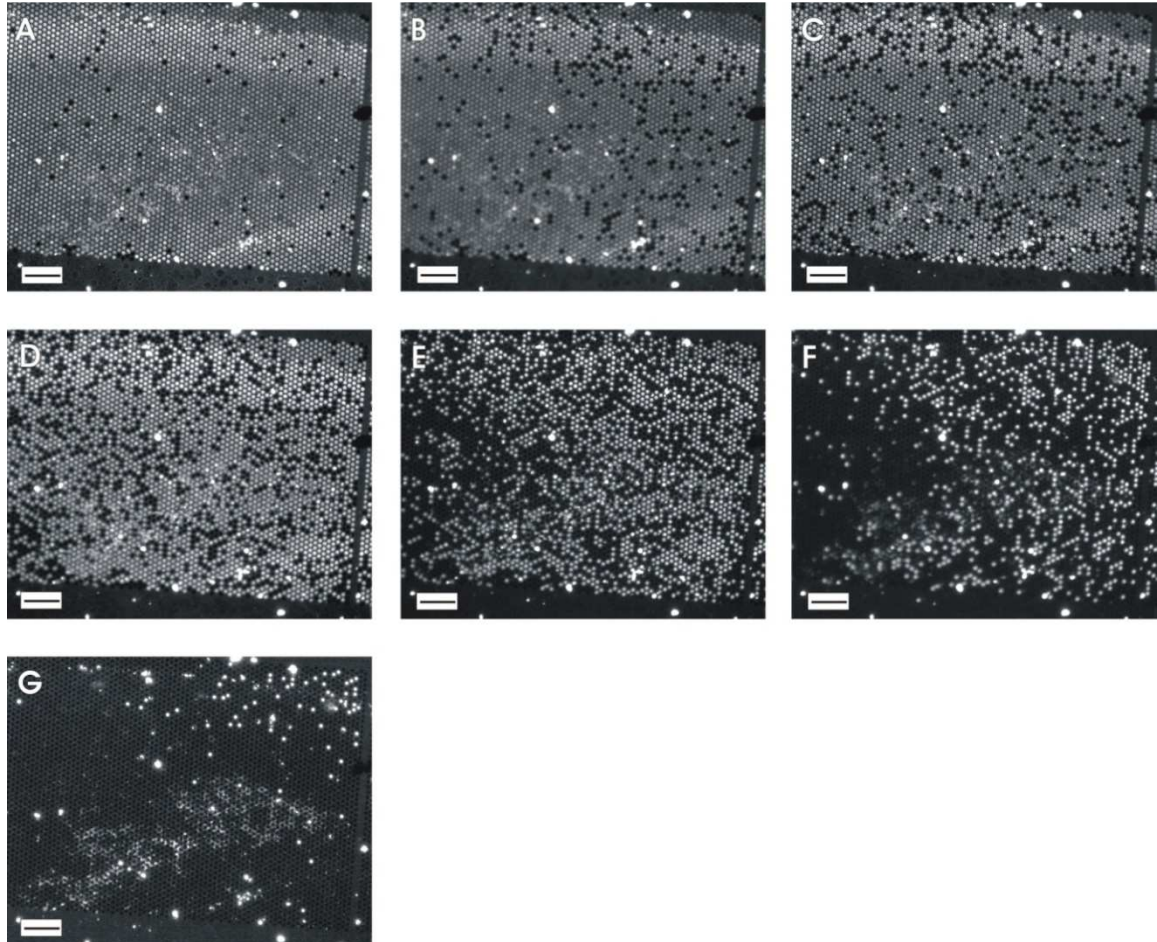


Abb. 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser, Funktionalisierung: DPTE, 0,5 M KCl). Die Aufnahmen sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bildung der Membran aufgenommen. (A) $t = 0$ h (B) $t = 0,5$ h (C) $t = 1$ h (D) $t = 1,5$ h; (E) $t = 2$ h; (F) $t = 2,75$ h; (G) $t = 3,25$ h; der Maßstabsbalken im Bild entspricht 20 μm .

Dieses Verhalten einer fast linearen kontinuierlichen Abnahme der Bedeckung zeigt sich auch in der dazugehörigen Pixelanalyse (Abb. 4.11). Innerhalb der ersten halben Stunde sinkt die Bedeckung auf etwa 79 % und fällt dann nahezu linear in den darauffolgenden drei Stunden auf ca. 2 % ab. Ein exponentieller Abfall, wie bei den mikro-BLMs auf dem Substrat mit dem 7 μm Porendurchmesser (Kapitel 4.2.1), kann hier nicht beobachtet

werden. Dies kann eventuell auf die größere Anzahl von mikro-BLMs in dem beobachteten Bereich zurückzuführen sein.

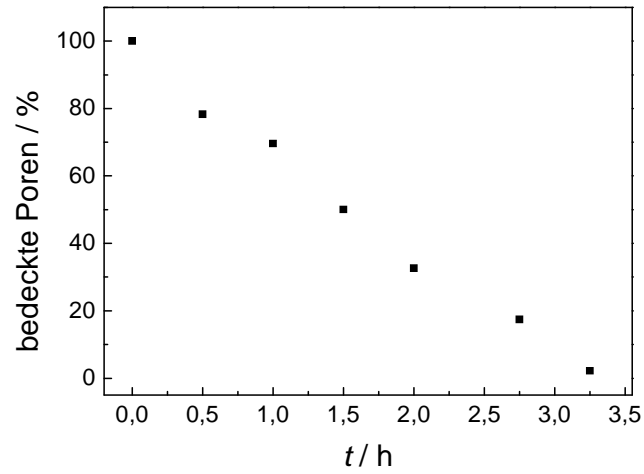


Abb. 4.11 Ergebnis der Pixelanalyse, der in Abb. 4.10 dargestellten Fluoreszenzmessung bezüglich des Reißens der mikro-BLMs über den Poren eines porösen Siliziumsubstrats mit einem Porendurchmesser von 2 μm . Das erste Bild aus dieser Messung ist auf 100 % bezüglich der Bedeckung normiert.

4.3 FRAP-Experimente an festkörperunterstützten Membranen

Zur Ermittlung der lateralen Mobilität von Lipiden in mikro-BLMs wurde die *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) Methode gewählt. Dafür wurde in den Strahlengang des Fluoreszenzmikroskopes ein Argon-Ionen-Laser zur Applikation eines kurzen Bleichpulses, wie es im Versuchsteil 3.2.3 näher beschrieben, eingekoppelt. Für die Validierung dieses Versuchsaufbaus für die FRAP-Messungen wurden zunächst mit den in dieser Arbeit verwendeten Lipidlösungen (DPhPC und DPhPC:DOPC 6:4 jeweils mit 0,2 mol% BODIPY-500/510 HPC dotiert) Experimente an festkörperunterstützten Membranen auf Silizium durchgeführt. Die Messungen der lateralen Mobilität der Lipide in den festkörperunterstützten Membranen konnten ebenfalls zum Verständnis der Diffusion der Lipide in mikro-BLMs auf den porösen Substraten herangezogen werden.

Zu Beginn eines jeden FRAP-Experimentes wurde sichergestellt, dass eine möglichst homogene Fluoreszenzverteilung und somit eine homogene Membran vorlag. Direkt nach dem Bleichpuls wurde eine Bildserie von 100 Bildern im Abstand von 1 s aufgenommen und die Veränderung der Fluoreszenz in dem gebleichten Bereich detektiert. Vor jeder FRAP-Serie wurde ein Bild als Referenz für die Ausgangsintensität der Fluoreszenz im Bleichfleck aufgenommen. Abb. 4.12 zeigt typische Fluoreszenzaufnahmen aus einer Bilderserie eines FRAP-Experimentes von einer festkörperunterstützte Membran, bestehend aus DPhPC zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Laserpuls. Auf den Aufnahmen sind hellere kleine Punkte auf der fluoreszierenden Membran zu erkennen. Diese hellen Punkte resultieren aus Vesikelansammlungen, die nach der Membranpräparation nicht entfernt werden konnten. Eine Beeinflussung auf die spätere Auswertung der FRAP-Serien durch die hellen Punkte war nicht gegeben.

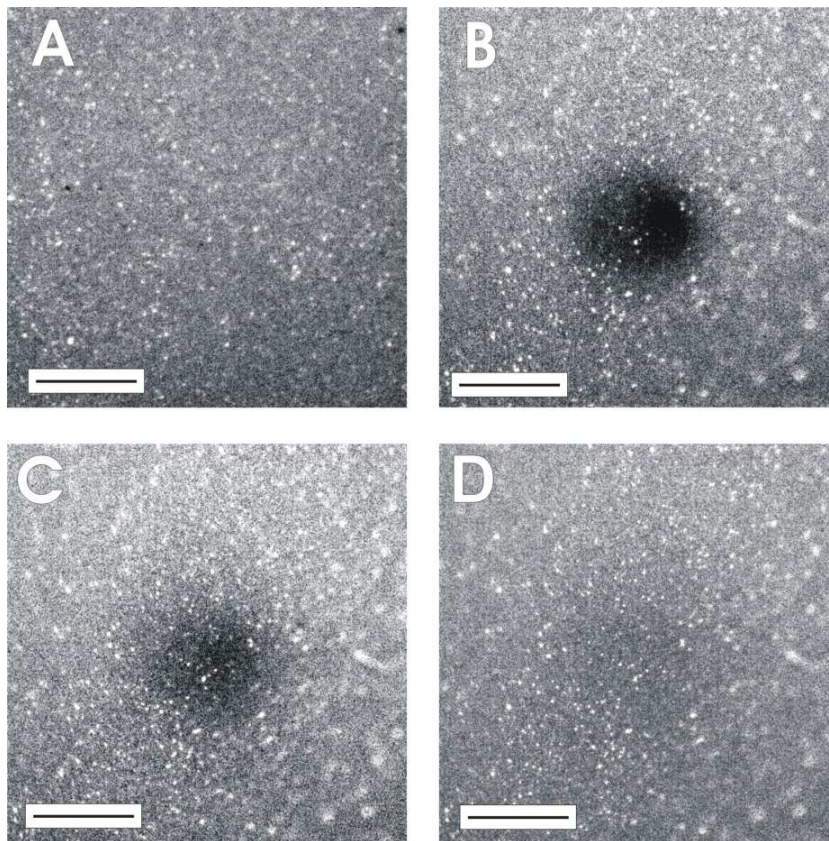


Abb. 4.12: Fluoreszenzaufnahmen einer FRAP-Messung an einer festkörperunterstützten Membran (DPhPC mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC dotiert, 1 mM CaCl_2 -Puffer (1mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 500 ms, Laserleistung 30 mW). (A) vorher (B) $t = 0$ s (C) $t = 15$ s und (D) $t = 50$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Bild (B) zeigt einen scharfen Bleichfleck direkt nach dem Bleichen. Dieser Bleichfleck wird als *region of interest* (ROI) bezeichnet; in diesem Bereich wird die Wiederherstellung der Fluoreszenz nach dem Bleichen beobachtet. Bereits nach 15 s ist eine Veränderung bezüglich der Fluoreszenzintensität in diesem Bleichfleck gut zu erkennen (C); der Rand des Flecks ist nicht mehr so scharf wie bei Bild (B). Das ist ein Zeichen für die stattfindende Diffusion der Lipide innerhalb der Membran. Nach 50 s in Bild (D) ist die Diffusion und somit die Steigerung der Fluoreszenzintensität im ROI weiter fortgeschritten. Es ist hier immer noch der ursprüngliche Bleichfleck schwach zu erkennen, allerdings ist auch sehr gut zu sehen, dass neue fluoreszenzmarkierte Lipide in die ursprünglich dunkle Stelle diffundiert sind.

Die Auswertung der teilweise in Abb. 4.12 gezeigten Bildserie ergibt einen *Recovery-Graph* aus dessen Kurvenanpassung sich der Diffusionskoeffizient D und der

immobile Anteil IA des gemessenen Systems ermitteln lässt. Abb. 4.13 zeigt zwei typische *Recovery*-Graphen für eine festkörperunterstützte Membran aus DPhPC mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC. Der Intensitätsanstieg nach dem Bleichen wird auf die ursprüngliche Fluoreszenzintensität im ROI vor dem Bleichen normiert. Um das allgemein auftretende Bleichen des Hintergrunds während der Messung zu eliminieren, wurde eine Hintergrundsubtraktion durchgeführt.

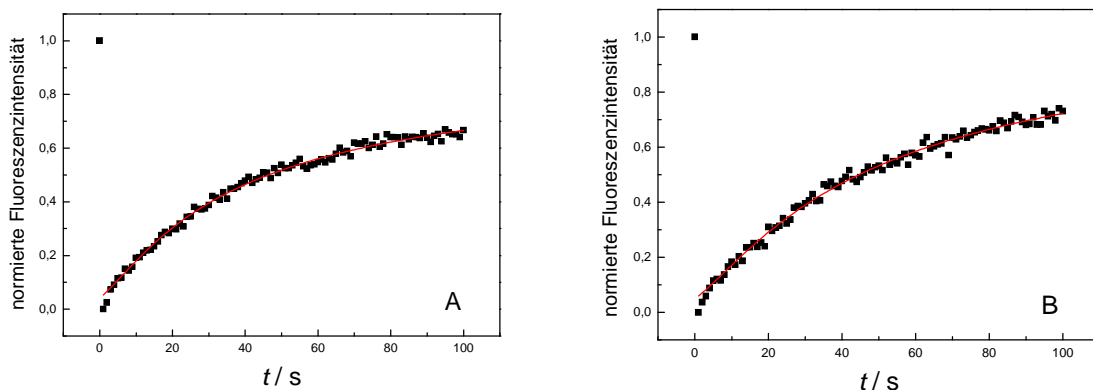


Abb. 4.13: *Recovery*-Graphen eines FRAP-Experiments an einer festkörperunterstützten Membran aus DPhPC mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC. Aus der Kurvenanpassung ergibt sich: (A) $D = (2,6 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (34 \pm 3) \%$ (B) $D = (3,1 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (28 \pm 3) \%$.

Der Diffusionskoeffizient aus der Kurvenanpassung im Graphen (A) liegt bei $D = (2,6 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $IA = (34 \pm 3) \%$ für die laterale Mobilität des DPhPC in der Membran. Aus der Datenanpassung in Graph (B) wird ein Diffusionskoeffizient von $D = (3,1 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und ein mobiler Anteil von $IA = (28 \pm 3) \%$ ermittelt. Um einen gemittelten Diffusionskoeffizienten für das festkörperunterstützte Membran-System aus dem Lipid DPhPC zu bestimmen, werden aus zwei unterschiedlichen Proben 10 Messungen gemittelt. Hieraus ergibt sich ein mittlerer Diffusionskoeffizient von:

$$D_{10} = (2,8 \pm 1,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

und ein mobiler Anteil von

$$IA_{10} = (33 \pm 4)\%$$

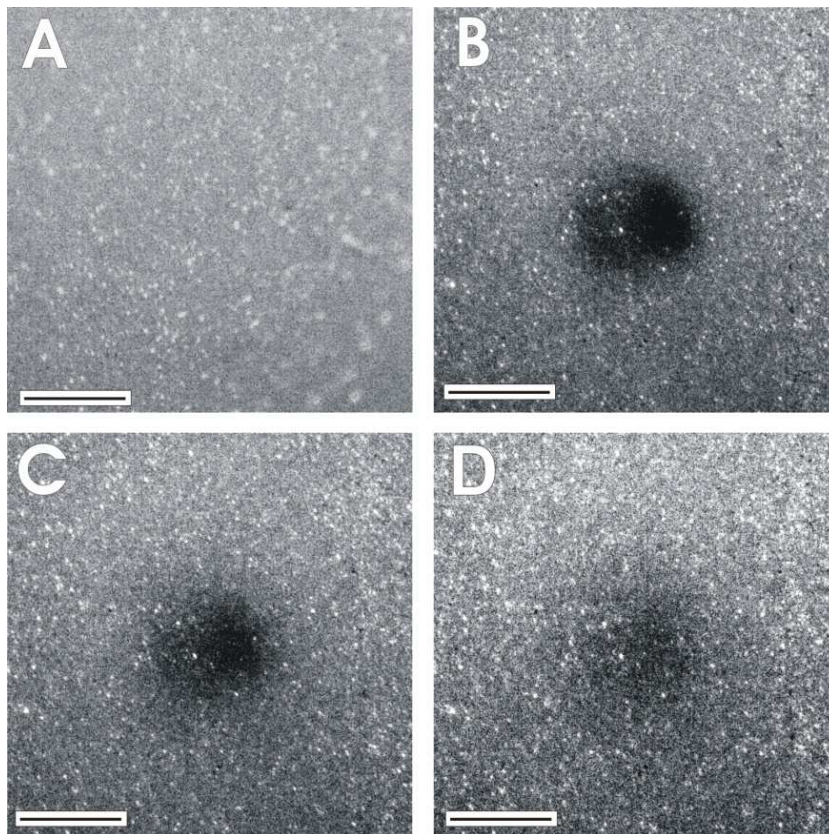


Abb. 4.14: Fluoreszenzaufnahmen einer FRAP-Messung an einer festkörperunterstützten Membran (DPhPC:DOPC 6:4 mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, 1mM CaCl₂-Puffer (1mM CaCl₂, 20 mM TRIS, 100 mM NaCl), pH 7,4) zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Bleichpuls. (A) vorher, (B) t = 0 s, (C) t = 15 s und (D) t = 50 s. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Es wurden ebenfalls FRAP-Messungen für die Lipidmischung DPhPC:DOPC (Verhältnis 6:4) mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC dotiert durchgeführt, um die erhaltenen Werte mit denen, die auf den porösen Substraten erhalten wurden, vergleichen zu können. Abb. 4.14 zeigt die zeitliche Abfolge einer FRAP-Messung an einer DPhPC:DOPC (6:4) Membran. Vor dem Laserpuls liegt eine vergleichbare Fluoreszenz wie bei der vorher geschilderten DPhPC-Membran vor (A). Direkt nach dem Laserpuls ist ein scharfer Bleichfleck in (B) zu erkennen. 15 s nach dem Bleichpuls ist ein Wiederanstieg der Fluoreszenz wahrzunehmen (Abb. 4.14 (C)). Bild (D) weist auf ein fast vollständiges *Recovery* im ursprünglichen Bleichfleck hin. Das ergab auch die Auswertung der einzelnen Bildserien. Zwei *Recovery*-Graphen dieser Auswertung sind exemplarisch in Abb. 4.15 gezeigt. Für die Datenanpassung des Graphen (A) ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von $D = (4,2 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und ein immobilier Anteil von

$IA = (19 \pm 3) \%$. Die Kurvenanpassung aus Graph B liefert einen Diffusionskoeffizient von $D = (3,6 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und einen immobile Anteil $IA = (18 \pm 2) \%$.

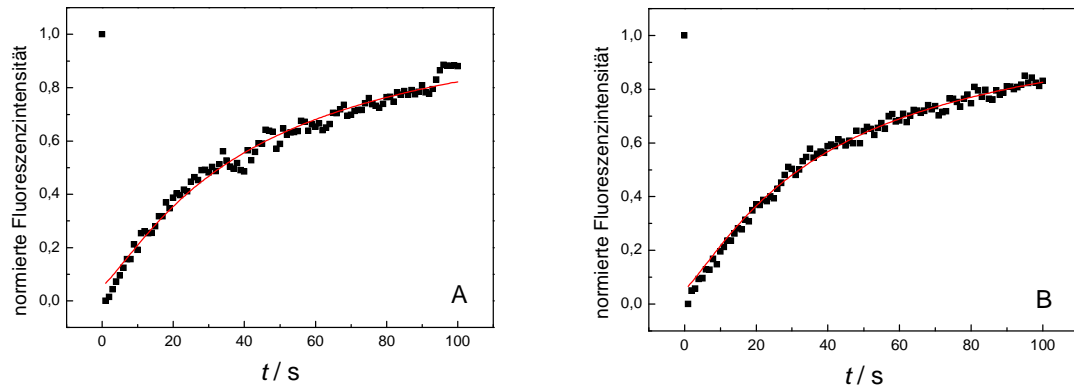


Abb. 4.15: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an einer festkörperunterstützten Membran aus DPhPC:DOPC (Verhältnis: 6:4; dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC; Puffer: 1 mM CaCl_2 , (1mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl), pH 7,4)). Die Datenanpassung ergab: (A) $D = (4,2 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (19 \pm 3) \%$ (B) $D = (3,6 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (18 \pm 2) \%$.

Aus 11 gemittelten Messungen an zwei unterschiedlichen Proben ergibt sich ein mittlerer Diffusionskoeffizient von:

$$D_{11} = (4,2 \pm 1,1) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

und ein mobiler Anteil von

$$IA_{11} = (16 \pm 3) \%$$

für festkörperunterstützte Membranen bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) auf reinem Silizium.

4.4 FRAP-Experimente an BLMs

Im Gegensatz zu festkörperunterstützten Membranen handelt es sich bei den *black lipid membranes* (BLM) um freitragende Membranen, die ein kleines Loch auf dem verwendeten Substrat überspannen. Der Vorteil der Präparation der freitragenden Membranen liegt darin, dass die Membran von beiden Seiten zugänglich ist und diese Modellmembran der natürlichen Zellmembran ähnlich ist. Dieses Membransystem stellt im Vergleich zu den festkörperunterstützten Membranen das andere Extrem zu den porenüberspannenden Membranen dar; die BLMs wurden in dieser Arbeit nach der gleichen Präparationsmethode wie die mikro-BLMs in Kapitel 4.2 hergestellt. Daher bot es sich an, diese freitragende Membran bezüglich der lateralen Geschwindigkeit sowie auch auf ihr Verhalten nach der Präparation genauer zu untersuchen.

Für die Messung des Diffusionskoeffizienten einer BLM, bestehend aus DPhPC (2 (w/V)% in *n*-Dekan) mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, wurde ein Siliziumsubstrat mit einem Loch mit einem Durchmesser von 1 mm verwendet, das von der Arbeitsgruppe Salditt, Institut für Röntgenphysik, Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt wurde. Über dieses Loch wurde unter Verwendung der Müller-Rudin-Technik eine Lipiddoppelschicht gespannt.

In Abb. 4.16 sind Fluoreszenzaufnahmen einer BLM, die sich über ein 1 mm Loch spannt, direkt nach der Präparation gezeigt. An dieser BLM wurde versucht, ein Bleichexperiment durchzuführen. Hierfür wurde an einer Stelle auf der BLM mit einer Laserleistung von 60 mW und einer Dauer von 1 s die Fluoreszenz gebleicht (Abb. 4.16 (A)). In den Folgeaufnahmen (B bis E) ist zu beobachten, dass der Bleichfleck nicht wie einer *Recovery*-Messung gleichmäßig nach allen Seiten auseinanderfließt, sondern er dreht sich aus dem auf den Bildern markierten ROI heraus (B und C) und zerfließt aufgrund dieser Drift (B bis E).

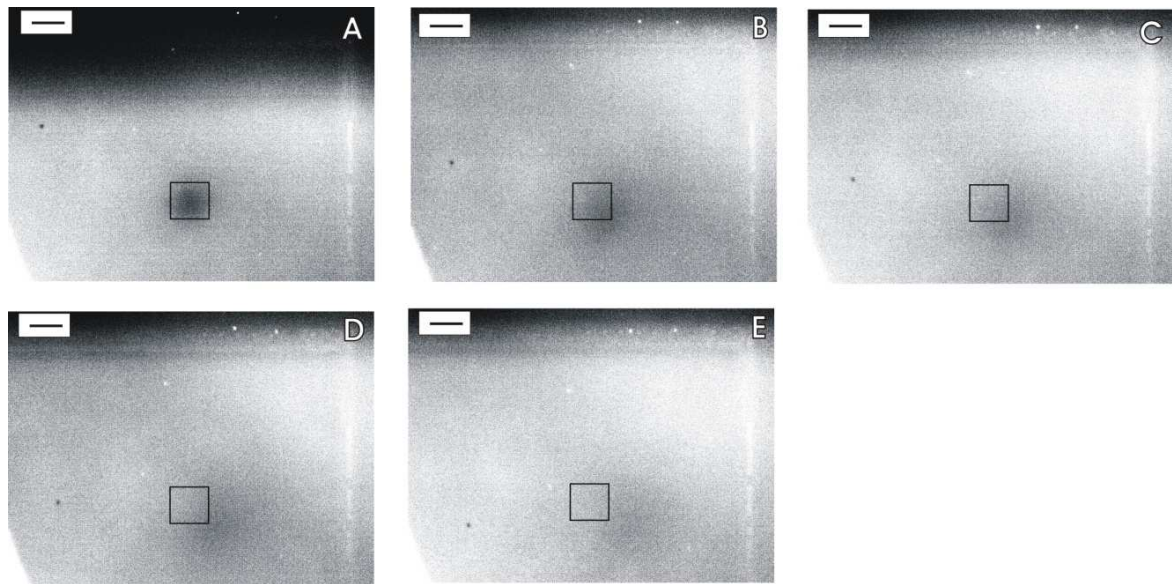


Abb. 4.16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines FRAP-Experimentes an einer BLM (DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, 0,5 M KCl) (A) bis (E) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (A) $t = 0$ s, (B) $t = 5$ s, (C) $t = 7$ s, (D) $t = 10$ s und (E) $t = 13$ s; der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm . Die Dynamik des Lösungsmittels bewirkt einen Drift des Bleichfleckes innerhalb der BLM.

Dieses in den Aufnahmen von Abb. 4.16 skizzierte Auseinanderfließen des Bleichfleckes kann den Lösungsmittelresten in der BLM zugeschrieben werden, die nach der Präparation, beziehungsweise bei einem nicht vollständigem Ausdünnen, in diesem System zu finden sind. Bei ausreichender Zeit zwischen der Präparation und dem Beginn einer FRAP-Messung kann sichergestellt werden, dass eine BLM mit möglichst wenig Lösungsmittel vorhanden ist und diese in Abb. 4.16 skizzierte Dynamik reduziert wird.

Die beiden Graphen eines FRAP-Experimentes an BLMs in Abb. 4.17 zeigen einen repräsentativen Kurvenverlauf für die beiden Extrema der Diffusionskoeffizienten, die bei den Messungen erhalten wurden. Aus der Kurvenanpassung ergeben sich bei (A) ein Diffusionskoeffizient von $D = (38 \pm 15) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und bei (B) $D = (54 \pm 24) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Diese Diffusionskoeffizienten liegen wesentlich höher als bei einer festkörperunterstützten Membran. Der immobile Anteil der BLM mit etwa 5 % bei Graph (A) und ca. 7 % bei Graph (B) weist ebenfalls auf eine höhere Mobilität bezüglich der lateralen Beweglichkeit innerhalb der BLM hin. Dies könnte auf die Anwesenheit von Lösungsmittelresten in einer BLM zurückzuführen sein, was auch den großen Fehler für die Diffusionskoeffizienten erklären könnte.

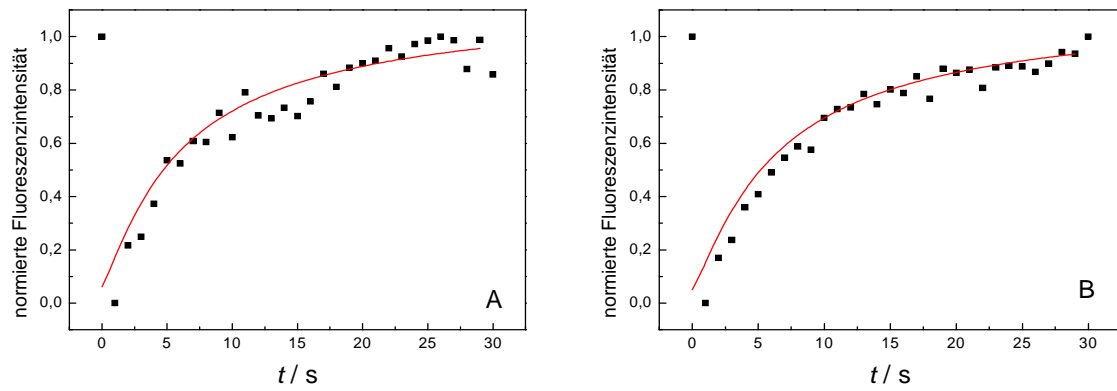


Abb. 4.17: Recovery-Graphen eines FRAP-Experimentes an einer BLM (DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, 0,5, M KCl-Lösung). Der Diffusionskoeffizient aus der Datenanpassung bei (A) beträgt $D = (38 \pm 15) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA \approx 5 \%$ und bei (B) $D = (54 \pm 24) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA \approx 7 \%$.

4.5 FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPSTE funktionalisierten Substraten

Eine Kombination aus festkörperunterstützten Membranen auf Siliziumsubstraten und einer BLM bietet die Präparation von mikro-BLMs auf einem porösen Substrat. Wie in Abschnitt 3.5.3 gezeigt wird, weist das hierfür verwendete poröse Siliziumsubstrat einen festkörperunterstützten Stegbereich und einen freitragenden Porenbereich für die Lipiddoppelschicht auf. Um die Fluidität und laterale Mobilität, die eine Voraussetzung für ein funktionelles Membransystem bilden, zu bestimmen, wurden FRAP-Experimente an diesen mikro-BLMs durchgeführt. So wurde zunächst die Mobilität von porenüberspannenden Membransystemen auf den mit dem Thiol DPSTE funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten untersucht, wie auch schon bei den Stabilitätsmessungen an den mikro-BLMs aus Kapitel 4.1 und 4.2.1. Die FRAP-Messungen erfolgten an Substraten mit Porengrößen von 2 μm und 7 μm .

4.5.1 FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPSTE funktionalisierten Substraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm

Die mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, wurden unter Verwendung der Müller-Rudin-Technik auf das poröse Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 7 μm aufgebracht. Danach wurden sie mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Wie in Kapitel 4.2 erläutert, wird die Fluoreszenz des Fluorophors auf den mit 180 nm Gold beschichteten und mit DPSTE funktionalisierten Stegen gelöscht. Es ist daher möglich, zwischen den hell fluoreszierenden von mikro-BLMs überspannten Poren und dem dunklen festkörperunterstützten Teil des Membransystems zu unterscheiden.

Nach Präparation der mikro-BLMs und dem Ausdünnprozess wird ein Laserpuls mit einer Dauer von 1 bis 3 s und einer Laserleistung von 50 mW auf die Probe appliziert und im Anschluss daran eine Bildserie mit 100 Bildern im Abstand von 1 s aufgenommen.

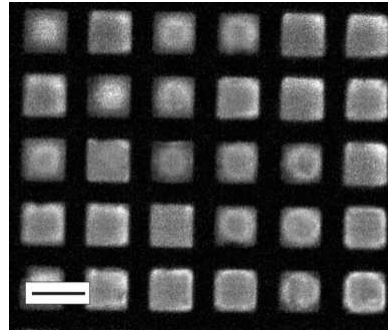


Abb. 4.18: Fluoreszenzaufnahme ohne Kontrastverbesserung der in Abb. 4.19 dargestellten FRAP-Messung.

Abb. 4.18 zeigt mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit 7 μm Porendurchmesser. Es ist eine homogene Fluoreszenz zu erkennen, das auf eine gleichmäßige Ausbildung einer Membran über den Poren schließen lässt. Die Auswertungen der FRAP-Serien erfolgten anhand unbearbeiteter Aufnahmen. Jedoch wurden die Aufnahmen in Abb. 4.19 zur Verdeutlichung des Bleichfleckes in den einzelnen Bildern kontrastverbessert.

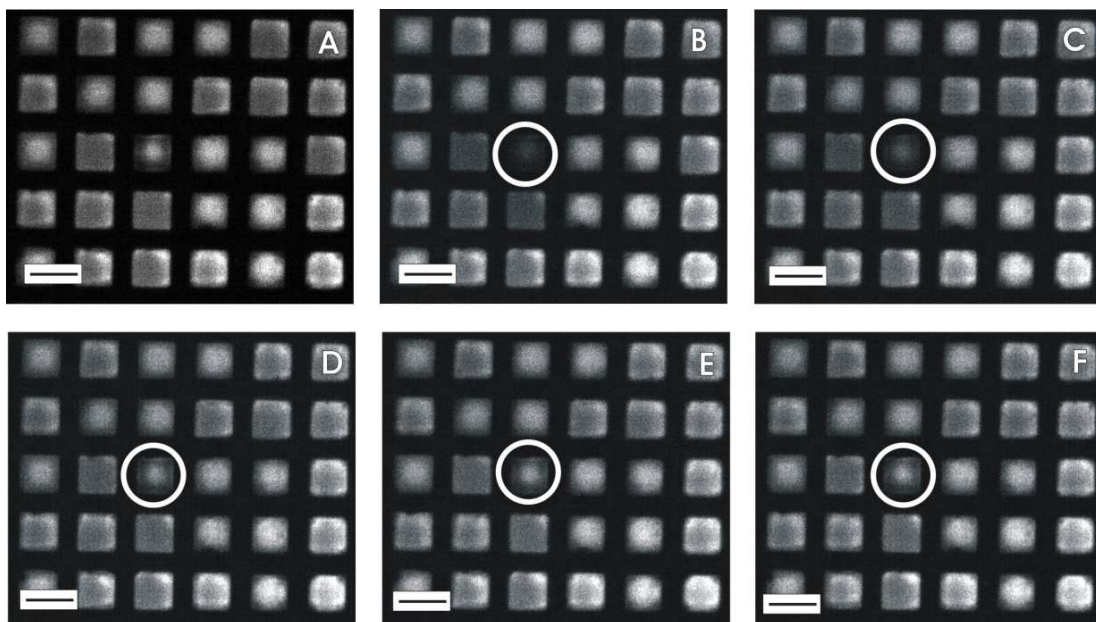


Abb. 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs bestehend aus DPHPC dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPTE; 0,5 M KCl). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 3 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck. (A) vor dem Bleichpuls, (B) $t = 0$ s, (C) $t = 10$ s, (D) $t = 50$ s, (E) $t = 75$ s und (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Ein typisches FRAP-Experiment an mikro-BLMs auf den $7\ \mu\text{m}$ Poren ist in Abb. 4.19 (A bis F) dargestellt. Bild (A) beschreibt den Zustand der Probenstelle vor dem Bleichen. Zum Zeitpunkt $t = 0\ \text{s}$ direkt nach dem Laserpuls in Abb. 4.19 (B) ist der Unterschied der Intensität im ROI (mit einem Kreis markiert) vor dem Bleichen zu erkennen. Die Pore in der Mitte des Bildes erscheint dunkler. Bereits nach 10 s ist eine Fluoreszenzintensitätsveränderung im ROI ersichtlich (Abb. 4.19 (C)). Das ist ein Anzeichen für Diffusion in der dort vorhandenen mikro-BLM. In den folgenden 90 s (D bis F) nimmt die Intensität weiter zu und es kommt zu einem fast vollständigen *Recovery*.

Für die Auswertung der *Recovery*-Kurve und den daraus resultierenden Diffusionskoeffizienten, die aus den Bildserien erhalten werden, ist es entscheidend, an welcher Stelle der Probe gebleicht wird und wie groß dieser Bleichfleck im Durchmesser ist. Hierauf wird allerdings später in Kapitel 4.9 gesondert bei den Finiten Elementen Simulationen genauer eingegangen.

Daher ist ein zweites FRAP-Experiment mit einem größeren Bleichfleck in Abb. 4.20 skizziert. Die Fluoreszenzbilder werden in den gleichen Zeitabständen, wie in Abb. 4.19 wiedergegeben. Der Bleichfleck bedeckt in Bild (B) etwa 4 Poren und nicht nur eine einzige Pore, wie bei der vorher gezeigten Messung. Bei einem Vergleich von Abb. 4.19 (C) und Abb. 4.20 (C), beide 10 s nach dem Bleichpuls, scheint die Fluoreszenzintensität im ROI in Abb. 4.20 höher zu sein als bei Abb. 4.19. Nach 100 s in (F) ist eine fast vollständige Wiederzunahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten.

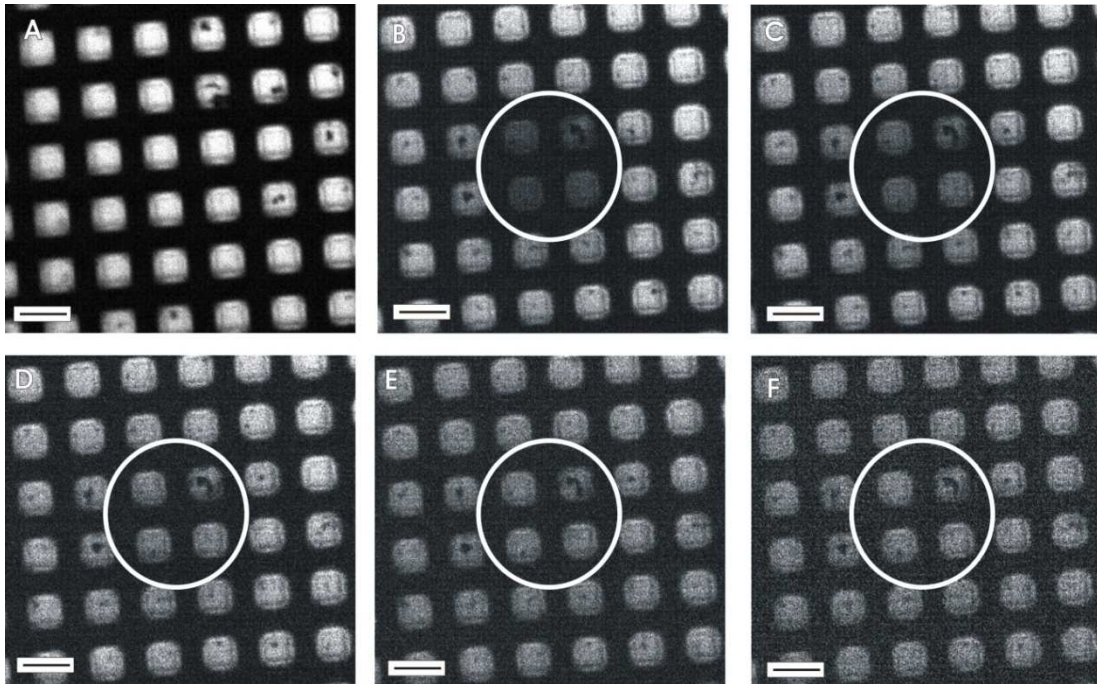


Abb. 4.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck. (A) vor dem Bleichpuls, (B) $t = 0$ s, (C) $t = 10$ s, (D) $t = 50$ s, (E) $t = 75$ s und (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Abb. 4.21 zeigt zwei typische Graphen, wie man sie aus der Auswertung der FRAP-Serien der mikro-BLMs auf den porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm erhält. Graph (A) entstammt aus einer FRAP-Messung mit einem großen Durchmesser des Bleichfleckes, wohingegen Graph (B) die Auswertung einer FRAP-Messung mit einer anderen Lage und einem kleineren Bleichfleckdurchmesser ist. Bei (A) liegt der Diffusionskoeffizient bei $D_{\text{eff}} = (17,8 \pm 7,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und aus der Datenanpassung bei (B) erhält man einen Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{eff}} = (16,2 \pm 2,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Von den Werten für die Diffusionsgeschwindigkeit ist kein großer Unterschied gegeben, jedoch ist ein großer Unterschied im immobilen Anteil der beiden Messungen gegeben. Im Graphen (A) kann der immobile Anteil zu 2 % bestimmt werden, wohingegen bei (B) der immobile Anteil zu 19 % ermittelt wurde. Dieser große Unterschied könnte auf die Lage und den Durchmesser des Bleichfleckes auf dem porösen Substrat zurückgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit für diesen Unterschied wäre auch mit Lösungsmittelresten innerhalb der mikro-BLMS zu erklären, da die

porenüberspannenden Membranen unterschiedlich gut nach der Präparation ausdünnen.

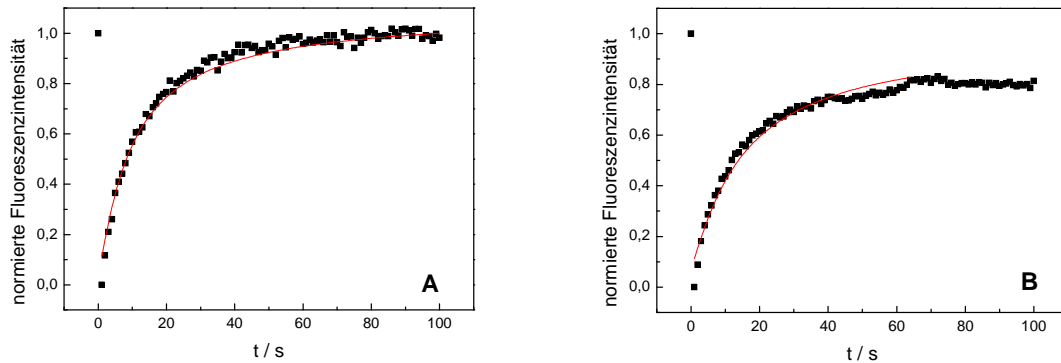


Abb. 4.21: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPSTE; 0,5 M KCl). Für die einzelnen Graphen ist jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben: (A) $D_{\text{eff}} = (17,8 \pm 7,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (2 \pm 2) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (16,2 \pm 2,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (19 \pm 1) \%$.

Die porenüberspannenden Membranen bilden ein Hybridsystem zwischen einer reinen festkörperunterstützten Membran und einer klassischen BLM, da das poröse Substrat sowohl festkörpergestützte Bereiche auf den Stegen, als auch freitragende Bereiche über den Poren bietet. Bei einem Vergleich der FRAP-Messungen der festkörperunterstützten Membranen (Kapitel 4.3) und der klassischen BLMs (Kapitel 4.4) ist ein unterschiedliches Diffusionsverhalten aufgrund der Werte für den Diffusionskoeffizienten und dem immobilen Anteil erkennbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich der Diffusionskoeffizient des Hybridsystems auf den porösen Substraten aus zwei unterschiedlichen Koeffizienten für die Diffusion zusammensetzt. Es kann daher angenommen werden, dass es sich hier um einen effektiven Diffusionskoeffizienten handelt, der die laterale Beweglichkeit der mikro-BLMs im Porenbereich und die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipidmonoschicht auf den funktionalisierten Stegbereichen beinhaltet.

Für den effektiven Diffusionskoeffizienten der mikro-BLMs auf dem porösen Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 7 μm ergibt sich aus 30 gemittelten Messungen ein Wert von:

$$D_{\text{eff},30} = (15,7 \pm 4,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_{30} = (14 \pm 3)\%$$

4.5.2 FRAP-Experimente an mikro-BLMs auf DPPTe funktionalisierten Substraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm

Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Porengröße wurden neben den porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm außerdem poröse Substrate mit einem Porendurchmesser von 2 μm für die FRAP-Messungen an den mikro-BLMs herangezogen. Die Verringerung der Porengröße bewirkt eine Zunahme der Stegbereiche im beobachteten Umfeld. Die Porosität beträgt bei den Substraten mit den 2 μm Porendurchmessern 48 % und wurde anhand von Elektronenmikroskopaufnahmen ermittelt. Es liegt somit eine Verringerung der Porosität der Probe vor, da Siliziumsubstrate mit Porendurchmessern von 7 μm eine Porosität von 53 % aufweisen.

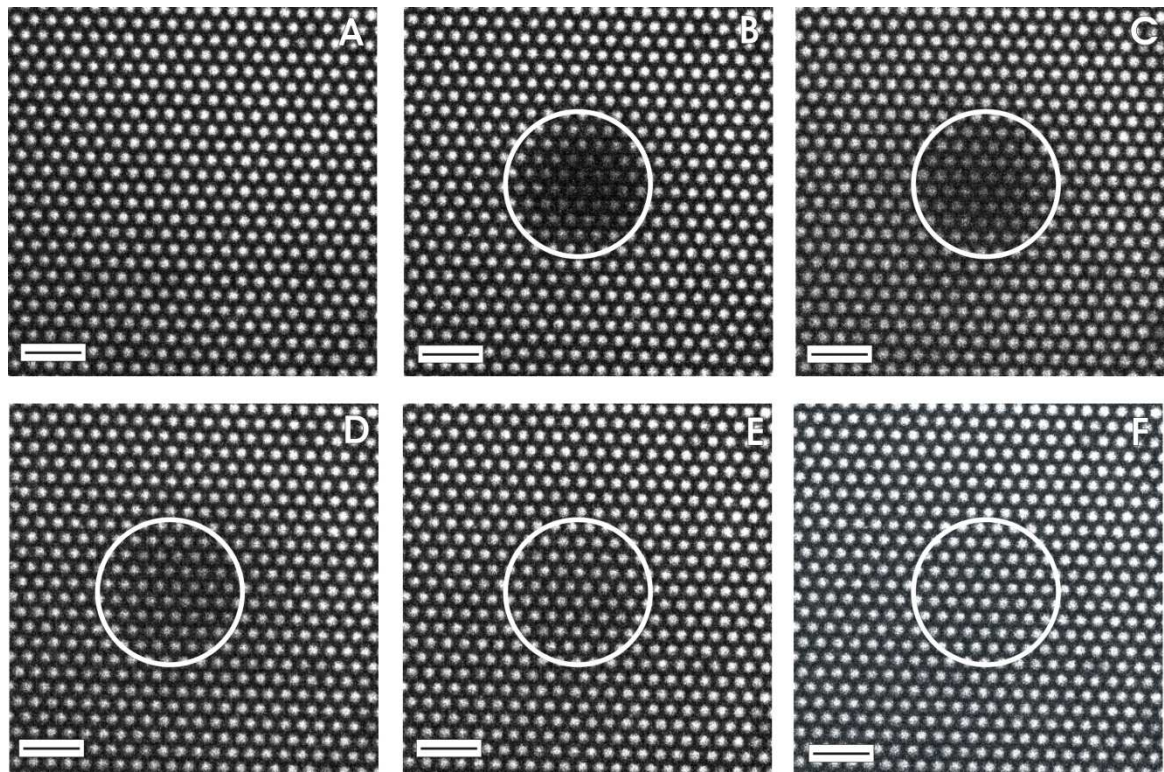


Abb. 4.22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 3 s; Laserleistung 50 mW) Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck. (A) vor dem Bleichpuls, (B) $t = 0$ s, (C) $t = 10$ s, (D) $t = 50$ s, (E) $t = 75$ s und (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Eine typische FRAP-Messung auf den porösen Siliziumsubstraten mit 2 μm Porendurchmesser ist in Abb. 4.22 (A) bis (F) dargestellt. Vor Beginn des FRAP-Experimentes liegt eine homogene Fluoreszenz im Porenbereich vor (A). Zum Zeitpunkt $t = 0$ s, direkt nach dem Bleichpuls (Dauer: 2 s; Laserleistung: 50 mW) ist ein scharfer Bleichfleck zu erkennen (B). Nach 10 s ist der Bleichfleck in (C) im Vergleich zu Aufnahme (B) nur leicht auseinandergelaufen. In Aufnahme (E) nach 75 s ist der ursprüngliche Bleichfleck hier nur noch schwach erkennbar. Nach 100 s in (F) ist eine fast vollständige Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität feststellbar.

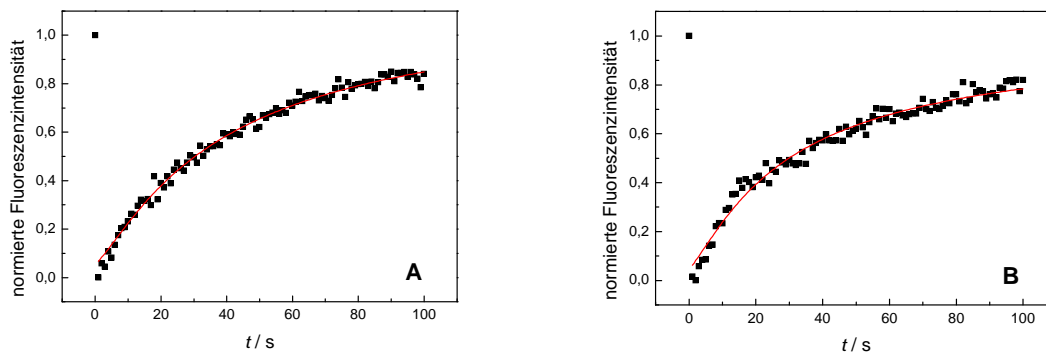


Abb. 4.23: *Recovery*-Graphen eines FRAP-Experiments an mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). Für die einzelnen Graphen ist jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben: (A) $D_{\text{eff}} = (10,7 \pm 4,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (16 \pm 2) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (6,0 \pm 2,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (23 \pm 6) \%$.

In Abb. 4.23 sind zwei repräsentative *Recovery*-Kurven für die FRAP-Messungen auf den porösen Siliziumsubstraten mit 2 μm Porendurchmesser wiedergegeben. Die Datenanpassung liefert für (A) einen Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{eff}} = (10,7 \pm 4,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $IA = (16 \pm 2) \%$. Für (B) ergeben sich die Werte von $D_{\text{eff}} = (6,0 \pm 2,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (23 \pm 6) \%$. Die Werte für den Diffusionskoeffizienten aus den beiden Graphen geben die Extrema an, die für dieses Membransystem ermittelt wurden. Hieraus ergab sich aus 30 gemittelten Messungen ein effektiver Diffusionskoeffizient von

$$D_{\text{eff},30} = (8,5 \pm 4,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_{30} = (24 \pm 5) \%$$

4.5.3 Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs

Die nachfolgende tabellarische Zusammenfassung liefert einen Überblick über die effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} mit zugehörigem immobilen Anteil IA , die im Kapitel 4.5 für die lösungsmittelhaltigen DPhPC mikro-BLMs ermittelt wurden.

Tabelle 4.1 zeigt die effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} und die immobilen Anteile IA abhängig von der Porengröße des porösen Substrates. Dieser Tabelle ist ebenfalls zu entnehmen, über wievielen Messungen D_{eff} und IA gemittelt wurden.

Tabelle 4.1: Effektive Diffusionskoeffizienten D_{eff} und immobile Anteile IA der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs aus DPhPC abhängig vom Porendurchmesser des porösen Substrates.

Porendurchmesser	$D_{\text{eff}} / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$IA / \%$	Anzahl der Messungen
7 μm	(15,7 \pm 4,6)	(14 \pm 3)	30
2 μm	(8,5 \pm 4,7)	(24 \pm 5)	30

4.6 FRAP-Messungen an porenüberspannenden lösungsmittelfreien Membranen

Im vorausgegangenen Kapitel wurden die Ergebnisse der FRAP-Messungen an mikro-BLMs, die aufgrund ihrer Präparation Lösungsmittel enthielten, beschrieben. Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die laterale Mobilität der mikro-BLMs zu untersuchen, wurde eine lösungsmittelfreie Präparation der mikro-BLMs angestrebt. Diese erfolgte über das Spreiten von unilamellaren Riesenvesikeln (GUV) der gewünschten Lipidzusammensetzung auf den porösen Siliziumsubstraten. Diese Substrate wurden vorher ebenfalls, wie auch für die Herstellung der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs, mit Thiolen funktionalisiert. Die GUVs wurden über Elektroformation hergestellt und erwiesen sich aufgrund ihres Durchmessers von 10 -200 μm für die Präparation durch Vesikelspreiten auf den porösen Substraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm als geeignet. Mit Hilfe dieser GUVs konnte ein flächendeckendes porenüberspannendes Membransystem auf den funktionalisierten porösen Substraten generiert werden, an dem laterale Mobilitätsmessungen durchgeführt werden konnten.

4.6.1 Untersuchung des Spreitverhaltens von GUVs auf einem Glassubstrat

Zur Klärung der Spreitbedingungen der GUVs wurden zunächst einige Versuche auf einem Glassubstrat durchgeführt. Um das Spreiten zu ermöglichen, wurden zum einen eine 100 mM CaCl_2 -Lösung und zum anderen eine 50%-ige Polyethylenglycol 6000 (PEG) Lösung verwendet. Beide Lösungen wurden in unterschiedlichen Endkonzentrationen zu einer Probe in einen calciumfreien TRIS-Puffer (0,1 M NaCl, 0,01 M TRIS, pH 7,4), in dem sich die ungespreiteten GUVs befanden, gegeben. Nach Zugabe einer dieser beiden Lösungen spreiteten die GUVs sofort auf den Glassubstraten. Abb. 4.24 zeigt das Ergebnis nach dem Spreiten der DPhPC:DOPC (6:4, 0,1 mol% Texas Red DHPE) GUVs. In Aufnahme (A) wurden die GUVs über die Zugabe von 33,3 mM PEG zum Spreiten gebracht. Bei Bild (B) erfolgte die Präparation durch die Verwendung von 90 mM CaCl_2 . In beiden Aufnahmen ist zu sehen, dass es zu keiner flächigen Bedeckung des

Glassubstrates mit einer Membran kam, da die verwendete Anzahl der GUVs zu gering war. Um eine vollständige Bedeckung zu erhalten, wäre eine größere Menge von Vesikeln nötig gewesen. An diesen Aufnahmen ist jedoch gut zu erkennen, dass die GUVs sich in einzelnen nahezu runden *Patches* anlagern. Aufgrund der Größe der GUVs, die zwischen 10 μm und 150 μm im Durchmesser liegen kann, ist davon auszugehen, dass ein solches *Patch* einem GUV entspricht. Die hellen Flecken in dem Membranbereich in Aufnahme (B) lassen sich durch den Spreitprozess der GUVs möglicherweise erklären. Die GUVs spreiten sobald sie in Kontakt mit einer Oberfläche kommen und lagern sich aus thermodynamischen Gründen zu größeren Flächen zusammen¹⁰¹. Die helleren Vesikel im Mittelpunkt und die Ausbuchtungen am Randbereich der gespreiteten GUVs sind Überbleibsel des Spreitprozesses. Die GUVs kommen unter Umständen zu schnell mit der Oberfläche in Kontakt durch das über CaCl_2 oder PEG induzierte spreiten und bilden diese Strukturen aus¹⁰².

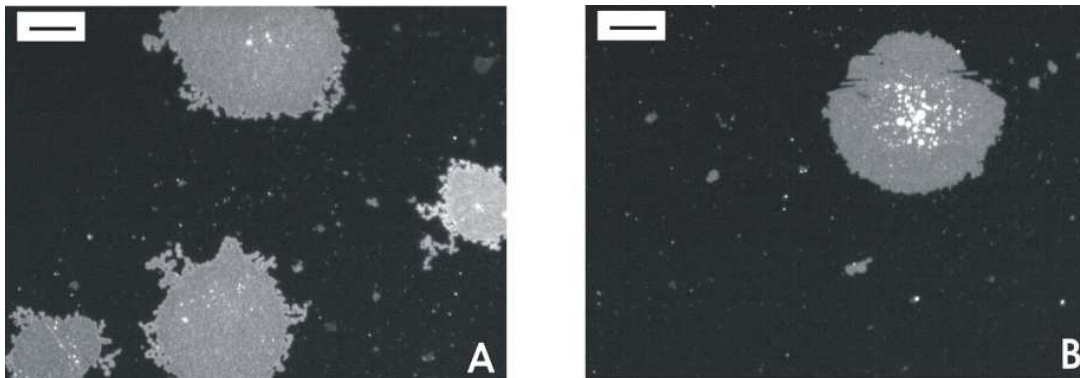


Abb. 4.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von auf einem Glassubstrat gespreiteten GUVs (DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,1 mol% TEXAS RED DHPE, CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). In (A) wurden die GUVs mit 33,3 mM PEG und in (B) mit 90 mM CaCl_2 gespreitet. Eine vollständige Flächenbedeckung konnte mit der verwendeten Vesikel-Konzentration nicht erreicht werden. Der Maßstabsbalken entspricht in den Aufnahmen 20 μm .

Bei diesen Versuchen konnte für die Zugabe von CaCl_2 ideale Endkonzentration von 90 mM und für PEG eine Konzentration von 33,3 mM ermittelt werden. Mit diesen Endkonzentrationen ließ sich ein schnelles und zuverlässiges Spreiten der GUVs auf der Substratoberfläche erzielen, das bei niedrigeren Konzentrationen nicht gegeben war.

4.6.2 FRAP-Experimente an aus GUVs präparierten porenüberspannenden Membranen auf CPEO3 funktionalisierten Substraten

Nach der Bestimmung der Spreitbedingungen auf den Glassubstraten werden GUVs der Mischung DPhPC:DOPC (6:4) und reinem DPhPC, beide jeweils mit 0,05 mol% BODIPY-500/510 HPC dotiert, über Elektroformation hergestellt. Diese beiden Lipide in den GUVs wurden verwendet, da es bekannt ist, dass sie gute stabile Membranen bilden¹⁰³ und mit dem DOPC neben dem synthetischen DPhPC ein natürlicher Bestandteil in den porenüberspannenden Membranen ist. Zur Herstellung der lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen wurden ausschließlich Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von 2 μm verwendet. Die porösen Substrate wurden vor der Membranpräparation zunächst mit einem Thiol funktionalisiert. Hierfür wurde das *Spacerlipid* CPEO3 in Betracht gezogen, da dieses *Spacer* sich günstig bei Spreitversuchen mit großen unilamellaren Vesikeln auf porösen Aluminiumsubstraten erwiesen hatte⁹⁶.

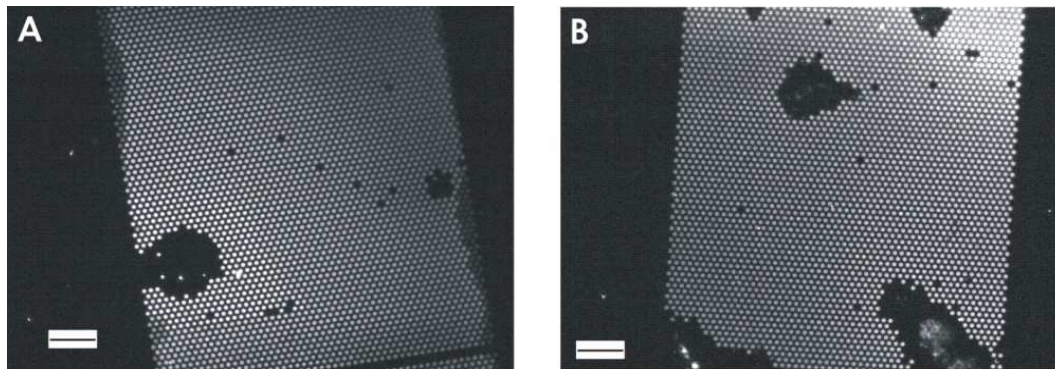


Abb. 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6: 4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC, (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) Präparation erfolgte mit 33,3 mM PEG; (B) Präparation erfolgte mit 90 mM CaCl_2 .

In Abb. 4.25 werden zwei Fluoreszenzaufnahmen von lösungsmittelfreien mikro-BLMs (DPhPC:DOPC (6:4)) nach dem Spreiten der GUVs gezeigt. In beiden Aufnahmen ist eine größtenteils flächige Bedeckung des porösen Substrates mit homogen fluoreszierenden mikro-BLMs erkennbar. Die nicht durch mikro-BLMs bedeckten Flächen erscheinen schwarz. Diese schwarzen Strukturen sind meist rundlich und können, auf einen Nebeneffekt, bedingt durch das Spreiten der GUVs, zurückgeführt werden. Die GUVs spreiten bei Oberflächenkontakt und können somit manchmal ein bereits bedecktes Areal über den Poren zerreißen. Der Unterschied der in Abb. 4.25 dargestellten Aufnahmen liegt in der Präparation. Bei (A) wurden die GUVs über die Zugabe von 33,3 mM PEG (Endkonzentration) zum Spreiten gebracht, wohingegen in (B) hierfür 90 mM CaCl_2 zugegeben wurden.

Eine typische FRAP-Messung für die mit PEG gespreiteten porenüberspannenden Membranen zeigt Abb. 4.26. Vor dem Bleichen (A) liegt eine homogene Fluoreszenzintensität im beobachteten Bereich vor. Kurz nach dem Bleichpuls in Bild (B) zum Zeitpunkt $t = 0$ s ist ein scharf ausgebildeter Bleichfleck zu erkennen. Nach 10 s ist der Bleichfleck zwar noch gut erkennbar, allerdings ist er schon in die Breite gelaufen. Das zeigt, dass eine Membran nach dem Spreiten vorhanden ist, die auch eine laterale Mobilität aufweist. Nach weiteren 40 s in Bild (D) beziehungsweise nach 75 s in (E) ist der Bleichfleck nur noch schwach sichtbar. Erst 100 s nach dem Bleichpuls hat die Fluoreszenz den Wert der Ausgangsintensität fast wieder erreicht (Abb. 4.26 (F)). Das lässt auf eine langsame laterale Mobilität innerhalb der porenüberspannenden Membranen schließen.

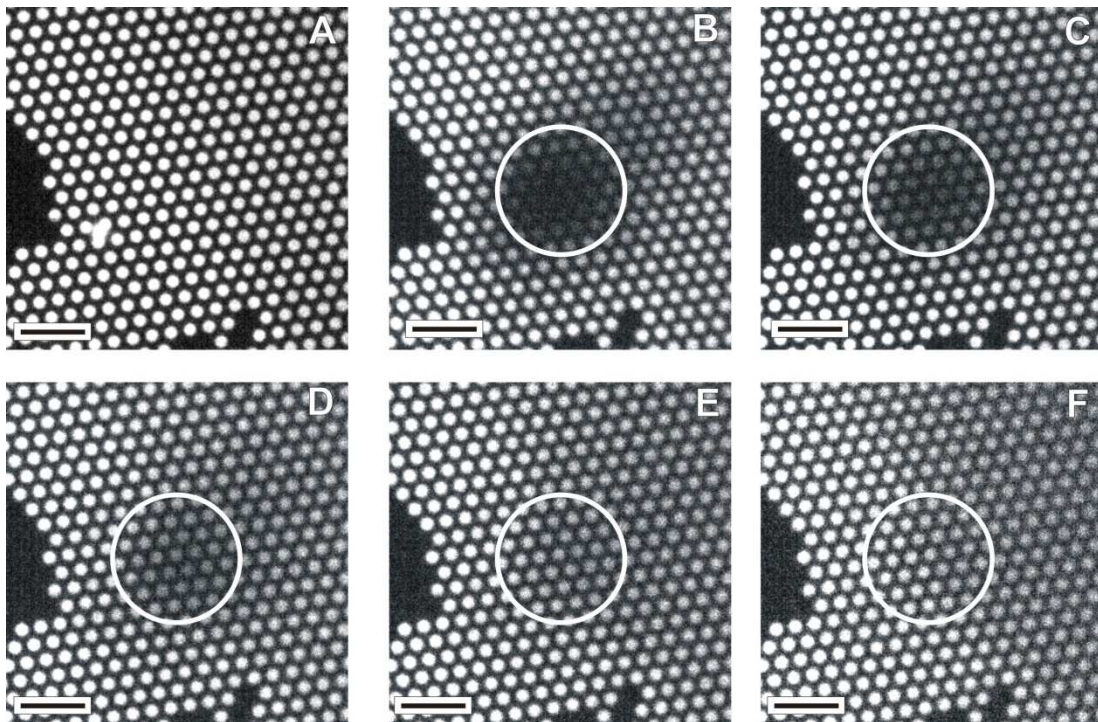


Abb. 4.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpulses: 1 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 10 μm .

Das spiegelt auch die *Recovery*-Kurve und der daraus resultierende effektiven Diffusionskoeffizient wieder. In Abb. 4.27 sind in (A) und (B) *Recovery*-Kurven an mit PEG präparierten mikro-BLMs aufgezeigt. Die *Recovery*-Kurven der FRAP-Messung an mit CaCl_2 gespreitet porenüberspannenden Membranen, sind in den Graphen (C) und (D) dargestellt. Bei beiden Präparationsmethoden ergeben sich für die effektiven Diffusionskoeffizienten und den immobilen Anteile äquivalente Ergebnisse. Für den effektiven Diffusionskoeffizienten wurden Werte zwischen $2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ermittelt. Der immobile Anteil kann im Bereich zwischen 20 % und 45 %, wie es auch den gezeigten *Recovery*-Kurven zu entnehmen ist, gefunden werden.

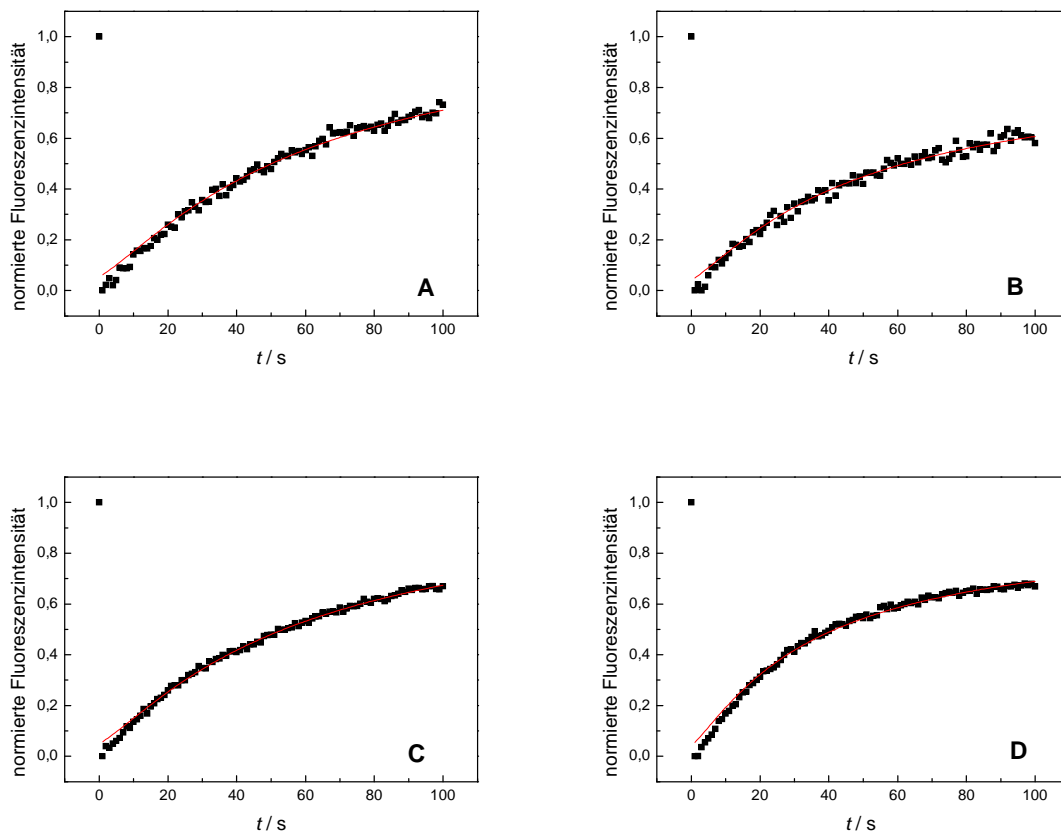


Abb. 4.27: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3). Bei den Graphen (A) und (B) wurde die porenüberspannende Membran mit 33,3 mM PEG präpariert. Bei (C) und (D) erfolgte die Präparation mit 90 mM CaCl_2 . Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (1,7 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (31 \pm 2) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (3,6 \pm 2,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (39 \pm 3) \%$ (C) $D_{\text{eff}} = (2,6 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (37 \pm 2) \%$ (D) $D_{\text{eff}} = (3,1 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (32 \pm 2) \%$.

Die Wahl der Präparationsmethode der porenüberspannenden Membranen hatte demnach keinen Einfluss auf die laterale Mobilität der Lipide in der Membran. Daher wurden der effektive Diffusionskoeffizient und der immobile Anteil für diese Lipidmischung aus beiden Präparationsmethoden gemittelt.

Aus 23 Messungen ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von:

$$D_{\text{eff},23} = (4,0 \pm 1,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_{23} = (30 \pm 4)\%$$

für die Lipidmischung DPhPC:DOPC (6:4).

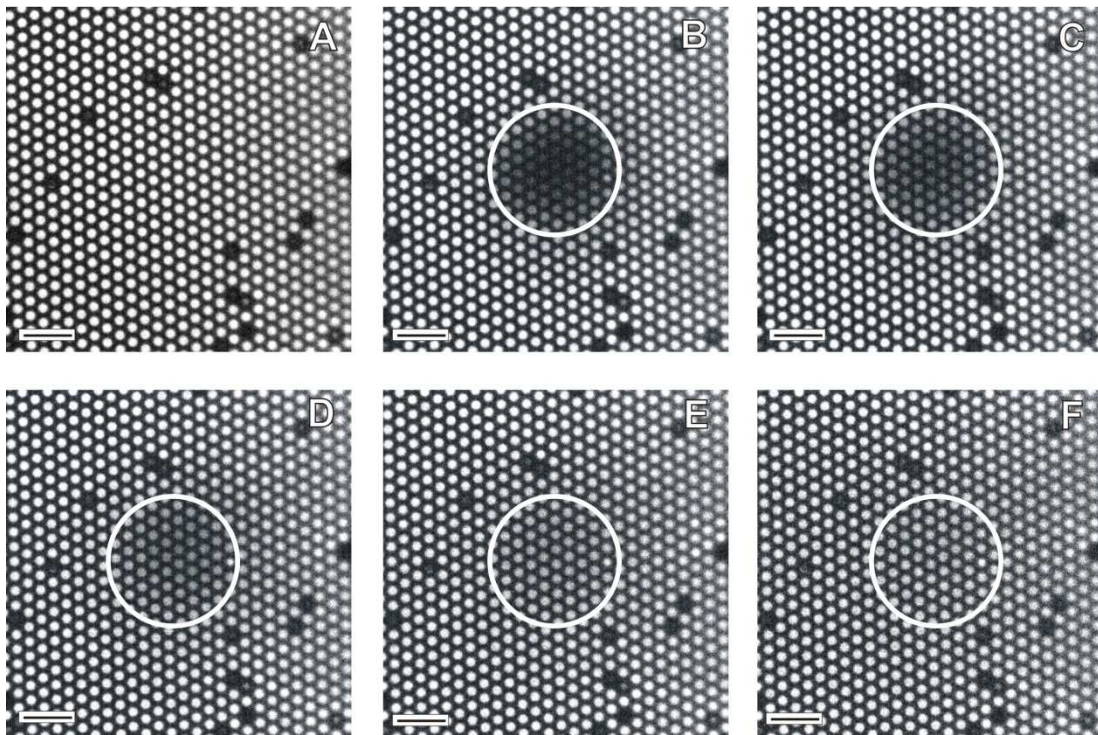


Abb. 4.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 1 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Neben der Lipidmischung DPhPC:DOPC (6:4) wurde auch reines DPhPC dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC zur Präparation der lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen verwendet. Eine exemplarische FRAP-Messung wird in Abb. 4.28 (A) bis (F) gezeigt. Vor Beginn der FRAP-Messung liegt wiederum eine homogene Fluoreszenz vor (A). Direkt nach dem Bleichpuls in (B) ist der Bleichfleck gut zu erkennen. 10 s nach dem erfolgten Laserpuls ist der Bleichfleck diffuser geworden. Es ist ebenso eine Zunahme der Fluoreszenzintensität ersichtlich (C). Nach 100 s in (F) ist der ursprüngliche Bleichfleck nur noch ganz schwach zu erkennen.

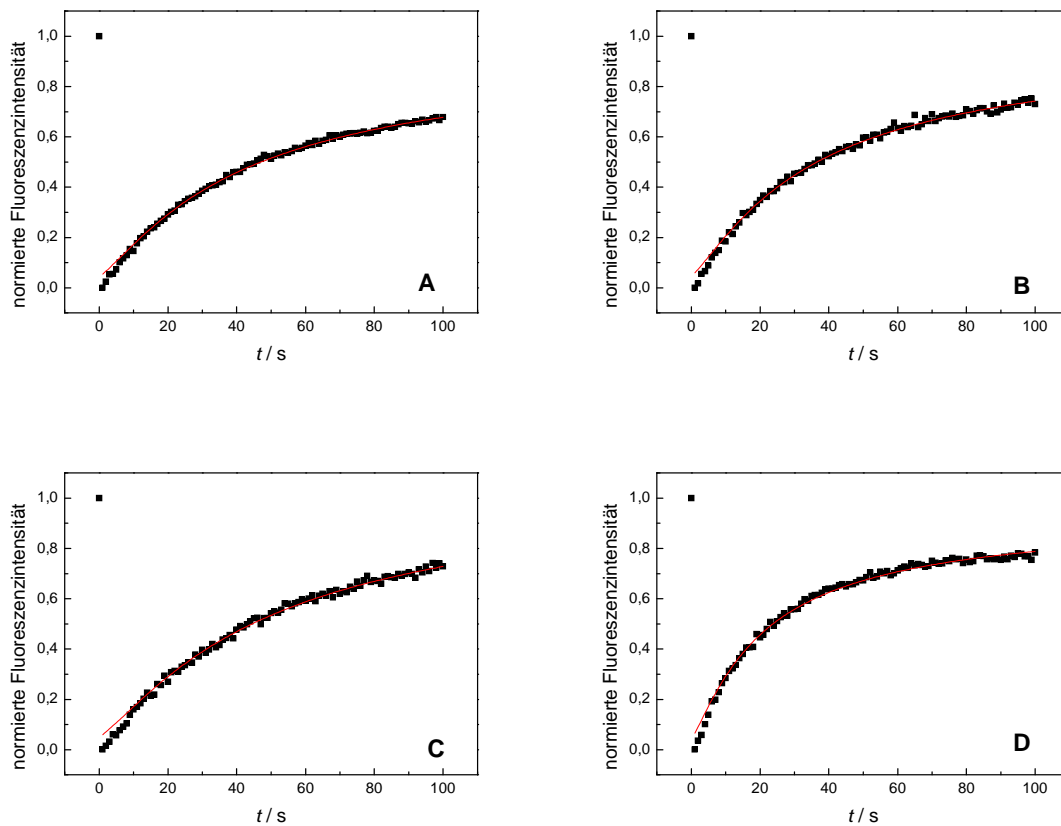


Abb. 4.29: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3). Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (5,4 \pm 1,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (33 \pm 2) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (11,3 \pm 3,4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (26 \pm 2) \%$ (C) $D_{\text{eff}} = (7,3 \pm 2,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (27 \pm 3) \%$ (D) $D_{\text{eff}} = (13,3 \pm 4,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (23 \pm 3) \%$.

Die Geschwindigkeit der lateralen Mobilität ist aus den in Abb. 4.29 dargestellten Recovery-Graphen zu entnehmen. Hier liegt der effektive Diffusionskoeffizient zwischen $5 - 13 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, während der immobile Anteil zwischen $15 - 33 \%$ ausmacht. Ob die porenüberspannenden Membranen mit PEG oder mit CaCl_2 gespreitet wurden, ist wie bei den porenüberspannenden Membranen aus DPhPC:DOPC (Verhältnis: 6:4) an keinem signifikanten Unterschied fest machbar. Daher wurden die Ergebnisse aus den beiden Präparationsmethoden gemittelt. Aus 27 Messungen ergibt sich somit ein effektiver Diffusionskoeffizient von:

$$D_{\text{eff},27} = (7,2 \pm 2,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_{27} = (24 \pm 5) \%$$

für die porenüberspannenden Membranen bestehend aus reinem DPhPC.

4.6.3 FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf DPPTTE funktionalisierten porösen Substraten

Neben dem *Spacer* CPEO3 wurde das Thiol DPPTTE zur Funktionalisierung des Substrates, vor Präparation der lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membran, verwendet. Diese Messungen dienen als direkter Vergleich zu denen mit Hilfe der Müller-Rudin-Technik präparierten lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs, basierend auf der DPPTTE-Funktionalisierung. Zum Spreiten wurden wiederum DPhPC:DOPC (6:4) und DPhPC GUVs, beide mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC dotiert, und CaCl₂ oder PEG als Fusiogen verwendet.

Abb. 4.30 zeigt Fluoreszenzaufnahmen einer FRAP-Serie an DPhPC:DOPC (6:4) mikro-BLMs. Auf diesen Aufnahmen sind Helligkeitsunterschiede in der Fluoreszenz erkennbar. Diese Helligkeitsunterschiede finden sich auch in den intakten mikro-BLMs. Die Bedeckung des porösen Substrates mit einer porenüberspannenden Membran ist nicht vollständig und weist viele Defektstellen auf (Abb. 4.30 (A)). Dies alles deutet auf ein unregelmäßiges Spreiten der GUVs auf den mit DPPTTE funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten hin. Dennoch reichte die Bedeckung aus, um FRAP-Messungen an diesem System durchführen zu können.

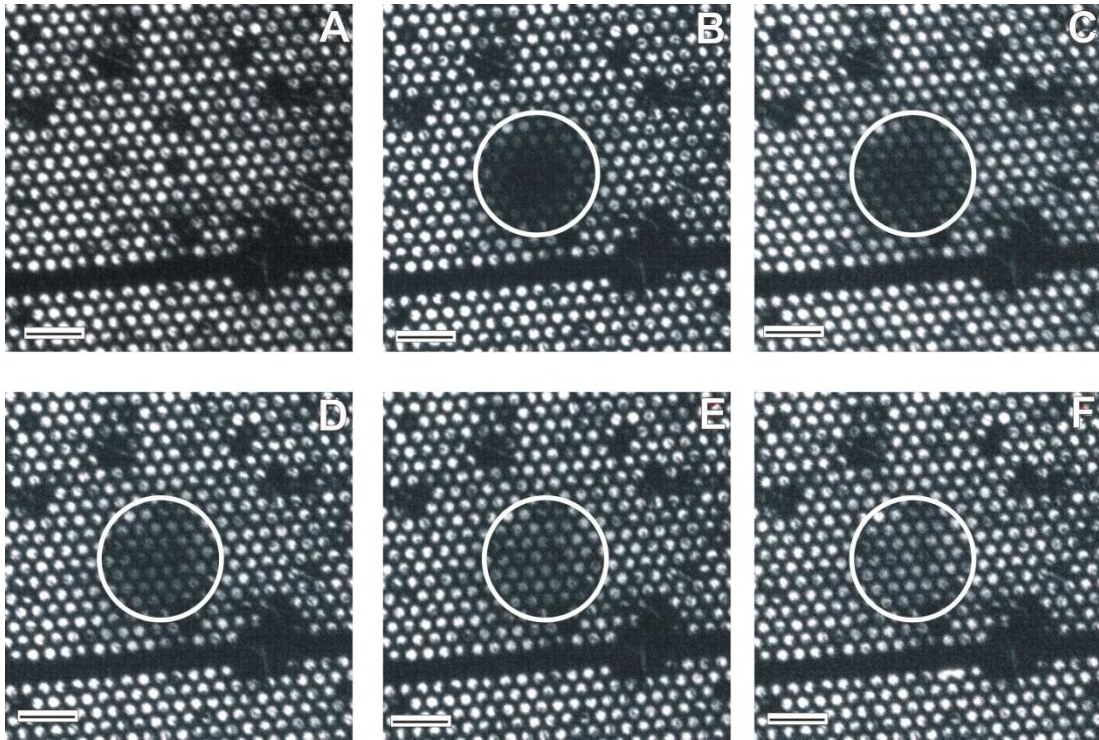


Abb. 4.30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPTE; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert die Lage des Bleichflecks. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Ähnlich der FRAP-Messungen an den Proben der gleichen Lipidmischung, die mit CPEO3 funktionalisiert sind, ist eine langsame Diffusion auf den Porenbereichen zu erkennen. Abb. 4.30 (B) zeigt einen gut zu erkennenden Bleichfleck nach dem Laserpuls. Der Bleichfleck ist nach 50 s in (D) weniger intensiv als in der Aufnahme (B). Nach 100 s (Abb. 4.30 (F)) ist bei den mit DPTE funktionalisierten Substraten in dem porenüberspannenden Bereich der Bleichfleck immer noch schwach zu sehen. Das lässt auf eine noch langsamere Diffusion als bei porenüberspannenden Membranen auf den mit CPEO3-funktionalisierten Substraten schließen. Das ist auch aus den *Recovery*-Graphen dieser Messungen zu entnehmen. In Abb. 4.31 sind zwei Graphen dieser Experimente zu sehen. Es ist zu erkennen, dass der immobile Anteil der GUV-Mischung auf DPTE funktionalisierten Substraten wesentlich höher liegt als in dem Fall der CPEO3-Funktionalisierung.

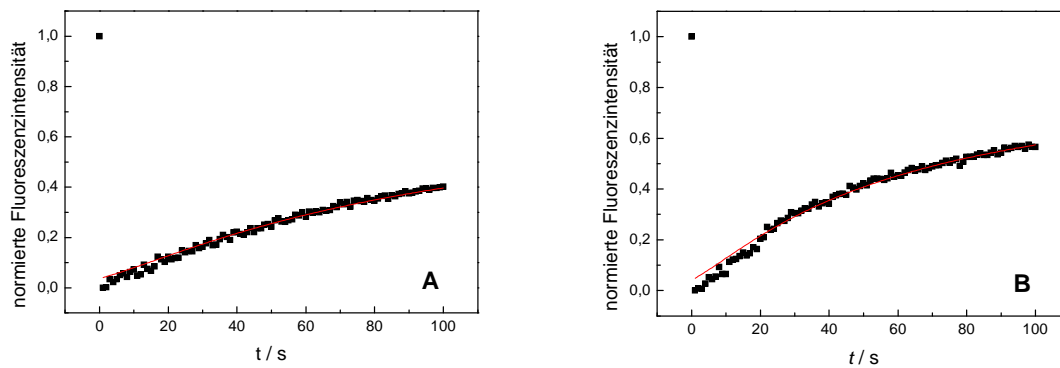


Abb. 4.31: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY-PC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPTE). Für die einzelnen Graphen ist jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (2,3 \pm 0,4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (59 \pm 3) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (3,1 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (44 \pm 4) \%$.

Der effektive Diffusionskoeffizient liegt zwischen 2 - 5 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und der immobile Anteil befindet sich im Bereich von 33 - 78 %. Aus 9 gemittelten Messungen ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von:

$$D_{\text{eff},9} = (2,4 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_9 = (51 \pm 3)\%$$

für die porenüberspannenden Membranen bestehend aus den Lipiden DPhPC:DOPC (Verhältnis: 6:4).

Eine FRAP-Messung an DPhPC porenüberspannenden Membranen auf den mit DPTE funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten mit 2 μm Porendurchmesser ist in Abb. 4.32 dargestellt. Auch hier ist die Homogenität der Fluoreszenzintensität nach dem Spreiten nicht gegeben. Bei den mikro-BLMs aus DPhPC ist das aber nicht ganz so stark zu erkennen wie bei den vorher gezeigten DPhPC:DOPC (6:4) mikro-BLMs. Eine *Recovery* ist anhand der Bilder (B) bis (F) erkennbar. Es sind Bereiche mit hellen und dunklen Stellen auf der Probe zu finden, die das Ergebnis der FRAP-Messung beeinflussen können.

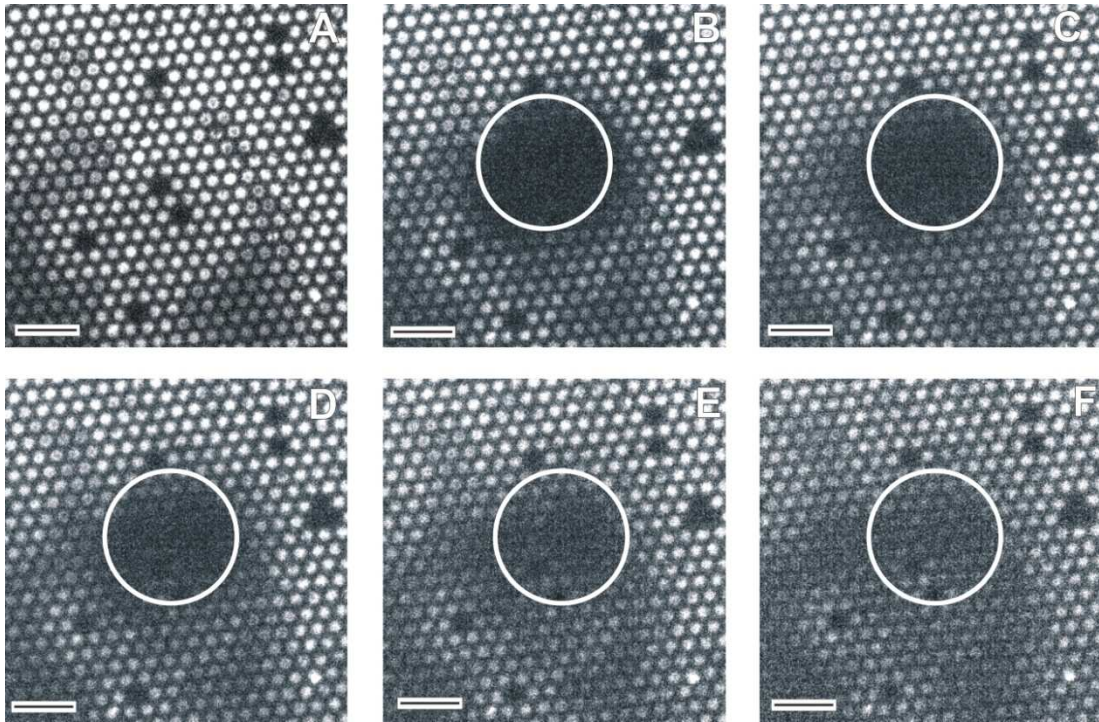


Abb. 4.32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW). Der Bleichfleck ist mit einem weißen Kreis gekennzeichnet (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 10 μm .

Die aus den FRAP-Experimenten erhaltenen Daten weisen in den *Recovery*-Graphen eine breite Streuung der Datenpunkte auf, wie in Abb. 4.33 (A) zu sehen ist oder erreichen aufgrund der schlechten Bildqualität keine Sättigung in der Intensitätswiederherstellung der Fluoreszenz. Diese Graphen wurden nicht zur Ermittlung des effektiven Diffusionskoeffizienten herangezogen, da sie einen zu großen Fehler für die Auswertung und spätere Mittelung bedeutet hätten.

Die effektiven Diffusionskoeffizienten, die zur Mittelung herangezogen wurden, liegen im Intervall von 3,0 - 4,7 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil zwischen 30 % - 60 %.

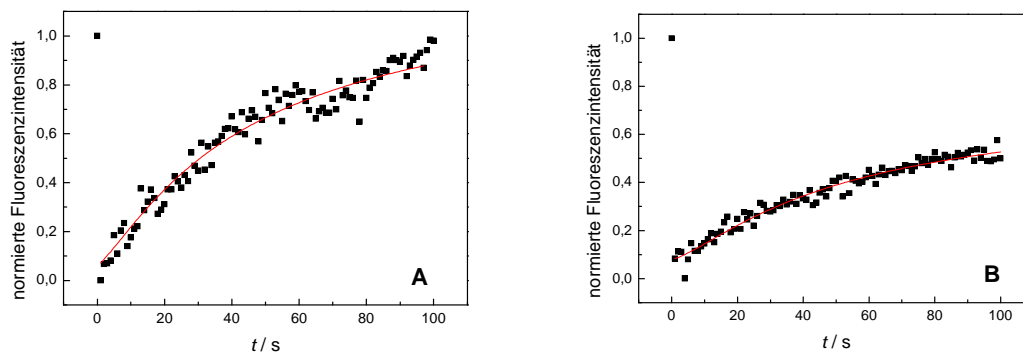


Abb. 4.33: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,05 mol% BODIPY-PC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,1 mM CaCl_2 -Puffer, pH 7,4). (A) $D_{\text{eff}} = (4,5 \pm 3,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (13 \pm 6) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (4,4 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (48 \pm 5) \%$.

Aus 10 Messungen ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient:

$$D_{\text{eff},10} = (4,0 \pm 1,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_{10} = (50 \pm 3)\%$$

für die porenüberspannenden Membranen bestehend aus dem Lipid DPhPC.

4.6.4 FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf unfunktionalisiertem Siliziumsubstrat

Um den Einfluss der Funktionalisierung des Substrates auf die laterale Beweglichkeit der Lipide in einer Membran zu untersuchen, wurden FRAP-Messungen an porenüberspannenden Membranen aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC auf porösen Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 2 μm durchgeführt. Das Siliziumsubstrat wurde vor dem Aufbringen der GUVs nicht funktionalisiert und auch nicht mit einer Titan-Gold-Schicht besputtert. Nach dem

Spreiten liegt eine homogene Fluoreszenz auf der Probe vor. Der Stegbereich erscheint heller als bei den funktionalisierten Substraten, da die Fluoreszenz auf den Stegen nicht mehr vom Gold gelöscht wird. Allerdings ist die Fluoreszenz dort immer noch dunkler als über den Poren, da das Silizium ebenfalls, wenn auch nicht so stark wie das Gold, die Fluoreszenz löscht. So können auch hier der Steg- und der Porenbereich visuell voneinander getrennt werden.

In Abb. 4.34 ist eine FRAP-Messung auf den unfunktionalisierten Substraten dargestellt. Auch hier ist eine laterale Diffusion in der Bildserie feststellbar. In (A) liegt eine homogene Fluoreszenz vor. Direkt nach dem Laserpuls (Dauer: 2 s, Laserleistung: 50 mW) ist der Bleichfleck gut definiert zu erkennen. Nach 10 s (C) ist der Bleichfleck immer noch gut zu sehen. Erst 50 s nach dem Laserpuls ist eine Diffusion der Membran über den Poren aufgrund der Zunahme der Fluoreszenzintensität ersichtlich. Nach 100 s in Bild (F) ist der Bleichfleck immer noch schwach erkennbar.

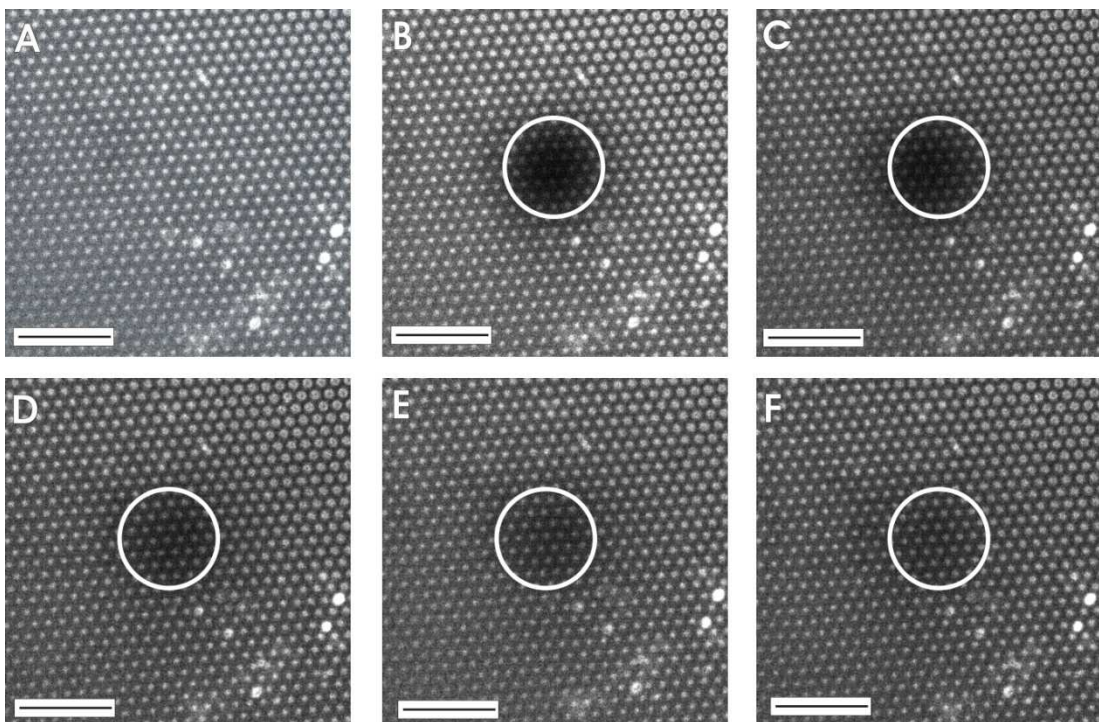


Abb. 4.34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW). Der Bleichfleck ist mit einem weißen Kreis markiert. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Eine Auswahl der *Recovery*-Kurven für das FRAP-Experiment der DPhPC:DOPC (6:4) Membran, gespreitet auf dem unfunktionalisierten porösen Substrat, findet sich in Abb. 4.35. Der immobile Anteil in diesem System liegt im Bereich von 30 % bis etwa 50 %, ersichtlich auch aus den FRAP-Kurven (A) und (B), bei denen im Mittel der immobile Anteil bei 35 % liegt. Der effektive Diffusionskoeffizient dieser Messungen ergibt ein Intervall von 3 - 4 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

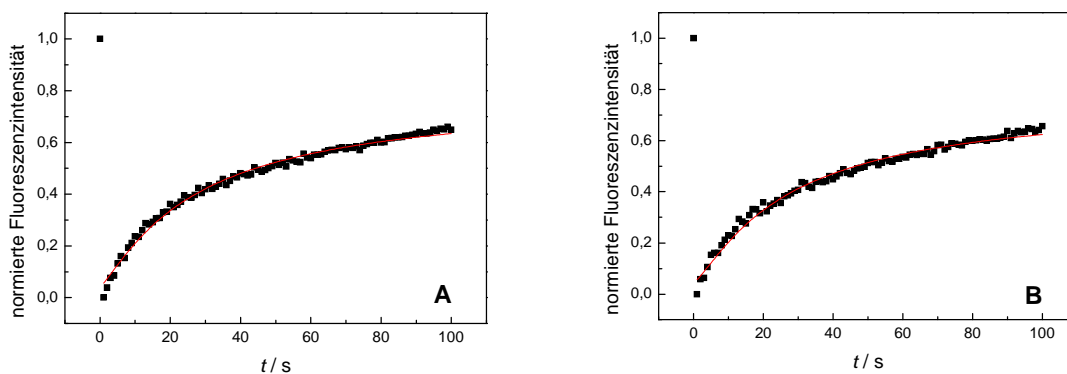


Abb. 4.35: *Recovery*-Graphen eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY-PC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser). Für die einzelnen Graphen ist jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (3,8 \pm 0,4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (35 \pm 3) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (3,1 \pm 0,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (38 \pm 4) \%$.

Aus den Experimenten konnten nur 8 Messungen zur Ermittlung des effektiven Diffusionskoeffizienten herangezogen werden, da ein Großteil der *Recovery*-Kurven nicht aussagekräftig war. Die *Recovery*-Kurven liefen nicht in die Sättigung, das lässt auf eine zu langsame Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide in der Membran schließen, die mit dem Messaufbau nicht ermittelt werden konnte. Dies könnte der fehlenden Funktionalisierung zuzuschreiben sein, da sich hier eine Lipiddoppelschicht ebenfalls auf den Stegbereichen ausbilden konnte und das poröse Substrat durchgängig von einer Lipiddoppelschicht bedeckt war. Hiermit liegt ein anderes Diffusionsverhalten als auf den funktionalisierten porösen Substraten vor.

Aus den 8 Messungen ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von:

$$D_{\text{eff},8} = (3,8 \pm 0,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_8 = (42 \pm 3) \%$$

für die porenüberspannenden Membranen aus DPhPC:DOPC (Verhältnis: 6:4) auf unfunktionalisiertem Siliziumsubstrat.

4.6.5 Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelfreien mikro-BLMs

Die nachfolgende tabellarische Zusammenfassung liefert einen Überblick der effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} mit ihrem dazugehörigen immobilen Anteil IA , die im Kapitel 4.6 für die lösungsmittelfreien mikro-BLMs ermittelt wurden.

In Tabelle 4.2 sind die effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} und der immobile Anteil IA der verwendeten Lipide DPhPC und DPhPC:DOPC (6:4) entsprechend der Funktionalisierung des porösen Siliziumsubstrates mit einem Porendurchmesser von 2 μm aufgeführt. Dieser Tabelle ist ebenfalls zu entnehmen, aus wie vielen Messungen D_{eff} und IA gemittelt wurden.

Tabelle 4.2: Effektive Diffusionskoeffizienten D_{eff} und immobile Anteile IA der lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC und DPhPC:DOPC (6:4) abhängig von der Funktionalisierung des porösen Siliziumsubstrates mit einem Porendurchmesser von 2 μm .

Lipide	Funktionalisierung	$D_{\text{eff}} / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$IA / \%$	Anzahl der Messungen
DPhPC	CPEO3	$(7,2 \pm 2,7)$	(24 ± 5)	27
	DPPTTE	$(4,0 \pm 1,9)$	(50 ± 3)	10
DPhPC:DOPC (6:4)	CPEO3	$(4,0 \pm 1,3)$	(30 ± 4)	23
	DPPTTE	$(2,4 \pm 1,0)$	(51 ± 3)	9
	keine	$(3,8 \pm 0,5)$	(42 ± 3)	8

4.7 FRAP-Experimente an porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden

Im Folgenden sollte nun die laterale Mobilität der Lipide in einer Membran auf den porösen Substraten gezielt beeinflusst werden. Zur Versteifung und somit zur Verlangsamung der Beweglichkeit eines Systems gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen die Zugabe von Cholesterin, zum anderen die Verwendung von polymerisierbaren Lipiden. Letztere bilden ein Netzwerk nach ihrer Polymerisierung aus und verlangsamen hiermit die Mobilität innerhalb der Membran. Sie hindern die anderen Lipide innerhalb der Membran, frei zu diffundieren¹⁰⁴. Die Verminderung der Beweglichkeit sollte über den Polymerisierungsgrad dieser Lipide eingestellt werden. Als polymerisierbares Lipid wurde 23:2 PC Diyen verwendet. Dieses Lipid weist vier Acetylengruppen in den Alkylketten auf (Abb. 3.19), die unter UV-Bestrahlung polymerisiert werden können.

4.7.1 Charakterisierung von 23:2 PC Diyen mit Hilfe der Filmwaagetechnik

Zur Charakterisierung des Phasenverhaltens des Lipides 23:2 PC Diyen wurde eine Isotherme der Lipidmonoschicht bei verschiedenen Temperaturen auf Wasser aufgenommen. In Abb. 4.36 sind die Isothermen für 20°C und 25°C dargestellt, wobei sich die Fläche pro Molekül auf den gemittelten Flächenbedarf aller Moleküle auf der Monoschicht bezieht. Der Fehler hier beträgt in etwa 2 Å².

Die Isotherme bei 20°C weist einen Knick bei einem Druck von 0,9 mN m⁻¹ bei einer Fläche von 97 Å²/Molekül auf, der den Phasenübergang zwischen gas-analog und flüssig-expandiert markiert. Im Bereich von 97 Å²/Molekül bis 56 Å²/Molekül befindet sich ein Plateau in der Isotherme. In diesem Plateau liegt eine Koexistenz von der flüssig-expandierten und der flüssig-kondensierten Phase vor. Der Knick zwischen 31 Å²/Molekül und 28 Å²/Molekül bei 31 mN m⁻¹ kann dem Übergang zwischen der flüssig-kondensierten und der fest-analogen Phase zugewiesen werden. Bei einem Druck von 45 mN m⁻¹ kommt es zum Filmkollaps.

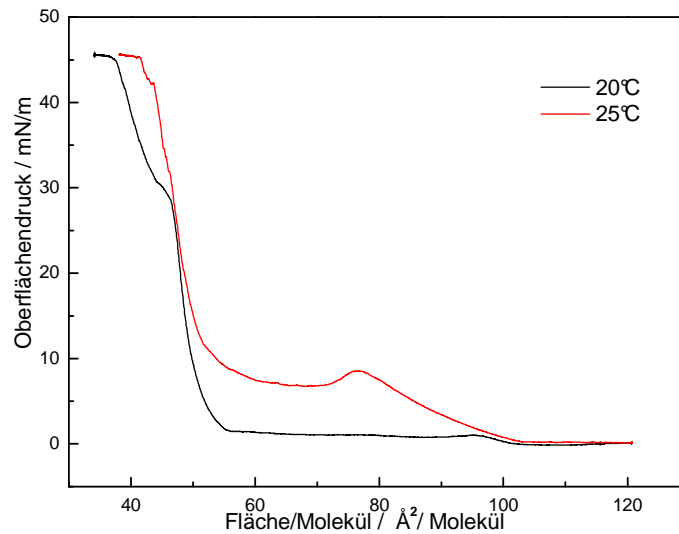


Abb. 4.36: Isothermen von 23:2 PC Diyen auf Reinstwasser gespreitet bei Temperaturen von 20°C (schwarz) und 25°C (rot).

Die Isotherme weist bei 25°C einen Knick bei einem Druck von $8,5 \text{ mN m}^{-1}$ und bei einer Fläche/Molekül von $77 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$ auf. Jedoch ist kein ausgeprägtes Plateau zu finden, das auf die Koexistenz zwischen der flüssig-expandierten und der flüssig-kondensierten Phase schließen lässt. Es kommt hier zu einer leichten Druckminderung trotz weiterer Komprimierung der Fläche. Das ist den meisten Diacetylenlipiden eigen, die eine ähnliche Lipidstruktur wie das 23:2 PC Diyen aufweisen¹⁰⁵. Diese Druckminderung trotz Flächenkompression resultiert aus der Bildung der kondensierten Phase und verschwindet bei Reduzierung der Kompressionsrate¹⁰⁶. Ein möglicher Phasenübergang von der flüssig-kondensierten zur fest-analogen Phase ist bei dieser Temperatur in der Isotherme nicht erkennbar.

Die Lage der Phasenübergänge und das geschilderte Verhalten des Lipids bei Druckerhöhung ist mit früheren veröffentlichten Daten über die Eigenschaften von Monoschichten aus polymerisierbaren Lipiden mit Diacetylengruppen an beiden Alkylketten vereinbar¹⁰⁷. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendete Substanz oberflächenaktiv und frei von Verunreinigungen ist.

Um zu untersuchen, wie sich das 23:2 PC Diyen mit einem anderen Lipid in einer Mischung verhält, wurden Fluoreszenzaufnahmen einer auf der Wasseroberfläche gespreiten Monoschicht bei unterschiedlichen Oberflächendrücken aufgenommen. Als Lipidmischung wurde DPhPC: 23:2 PC Diyen (3:1), dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC, verwendet, da diese beiden Lipide zusammen für die Präparation der porenüberspannenden Membranen herangezogen wurden.

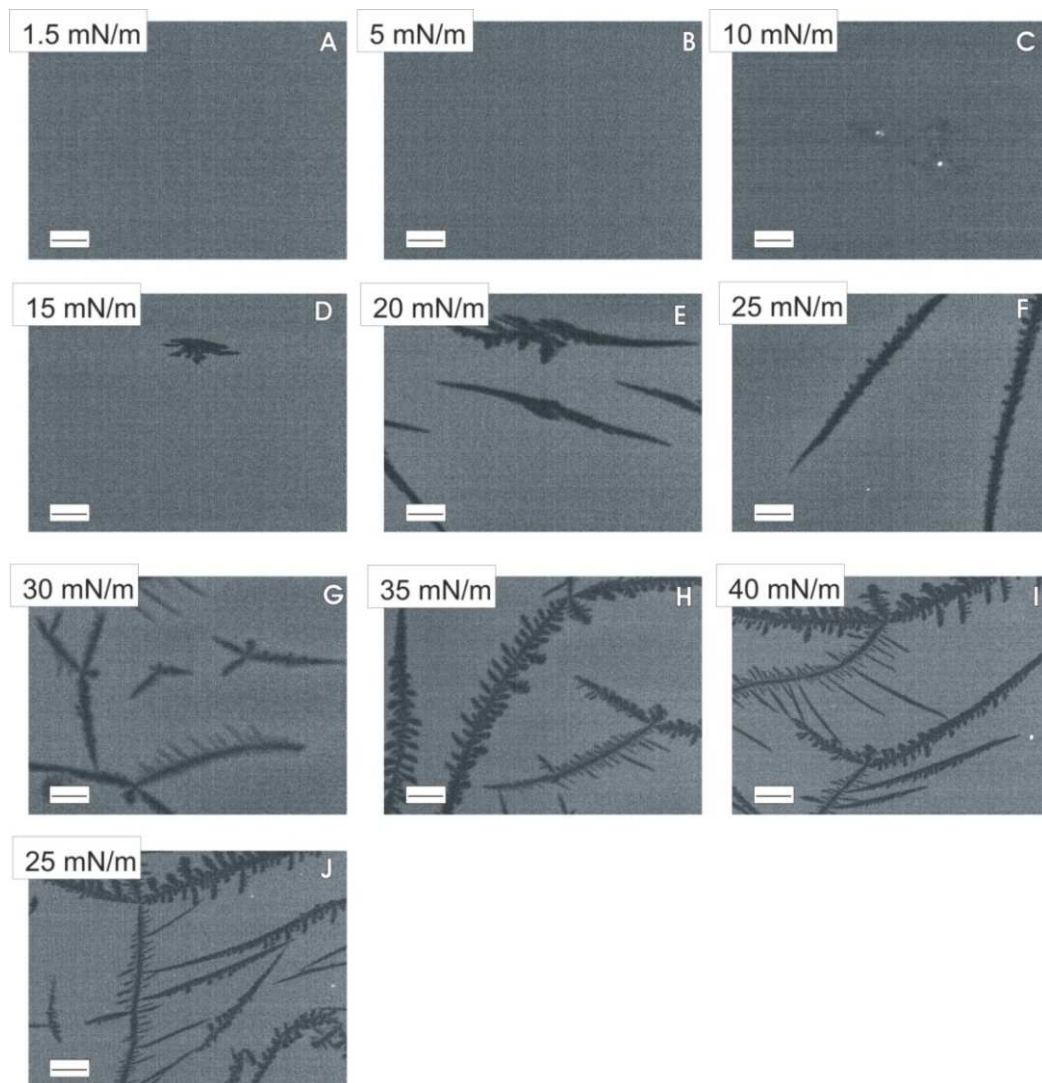


Abb. 4.37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Monoschicht DPhPC:23:2 PC Diyen (3:1) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC bei verschiedenen Oberflächendrücken. Der entsprechende Druck ist dem jeweiligen Bild zugeordnet. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 22°C durchgeführt. Von (A) bis (I) wurde der Druck stetig um 5 mN m^{-1} erhöht. Von Bild (I) nach (J) wurde expandiert. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht $50 \mu\text{m}$.

In Abb. 4.37 (A) bis (J) sind diese Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 22°C durchgeführt. Die zu dieser Lipidmischung gehörige Isotherme ist in Abb. 4.38 gezeigt. Während der Messung auf der Filmwaage wurde die Fläche komprimiert und so der Oberflächendruck erhöht.

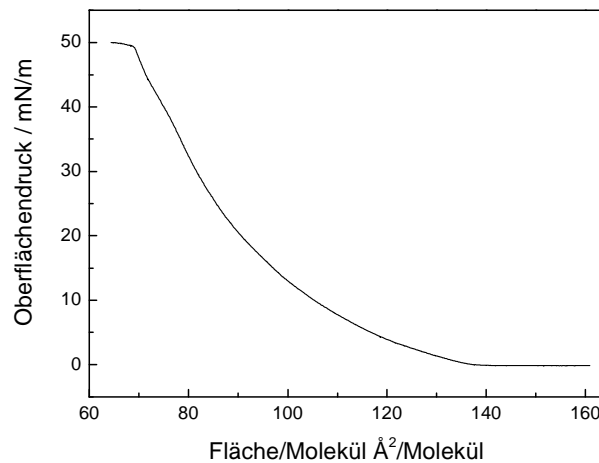


Abb. 4.38: Isotherme von DPhPC:23:2 PC Diyen (3:1) bei einer Temperatur von 22°C.

Bei einem Anfangsdruck von $1,5 \text{ mN m}^{-1}$ in Bild (A) liegt eine homogene Fluoreszenz vor. Die gleiche Homogenität der Fluoreszenz ist auch bei 5 mN m^{-1} zu finden (B). Erst bei einer weiteren Flächenkomprimierung ab einem Druck von 15 mN m^{-1} kommt es zur Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen. Deren Flächenanteil ist umso größer, je mehr die Fläche komprimiert wird und dadurch steigt der Oberflächendruck. Da die Isotherme (Abb. 4.38) keinen Phasenübergang in dem Druckbereich anzeigt, ist es anhand der Fluoreszenzaufnahmen nicht möglich zu sagen, ob hier eine Entmischung der beiden Lipide vorliegt oder ob es sich um eine Phasenseparation handelt. Die Bildung dieser dunklen Strukturen ist irreversibel, da es bei Verminderung des Drucks durch Flächenexpansion von 40 mN m^{-1} auf 25 mN m^{-1} keine Veränderung gab. Bei dieser Messung wurde keine Polymerisation der Diacetylenlipide vorgenommen.

4.7.2 Langmuir-Blodgett-Überträge mit diacetylenhaltigen Lipidmischungen

Zur Untersuchung des Polymerisierungsprozesses des Lipides 23:2 PC Diyen wurden Langmuir-Blodgett-Überträge durchgeführt. Die untere Monoschicht bestand aus dem Phospholipid DPPC. Die obere Monoschicht der Lipiddoppelschicht auf dem Glassubstrat wurde durch die Lipidmischung DPhPC: 23:2 PC Diyen (Verhältnis 3:1) gebildet. Es wurde bei einem Druck von 40 mN m^{-1} übertragen, um einen hochgeordneten Zustand für das 23:2 PC Diyen zu erreichen, der für eine erfolgreiche Polymerisierung unabdingbar ist. Die obere Monoschicht wurde mit 0,05 mol% des Fluorophors BODIPY 500/510 HPC dotiert; die untere Monoschicht war nicht fluoreszenzmarkiert. Die Untersuchung des Übertrages erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Vor der Bestrahlung der Probe mit UV-Licht war im Filtersatz für die BODIPY 500/510 HPC Fluoreszenz (FS 44) die Fluoreszenz der oberen Monoschicht zu beobachten.

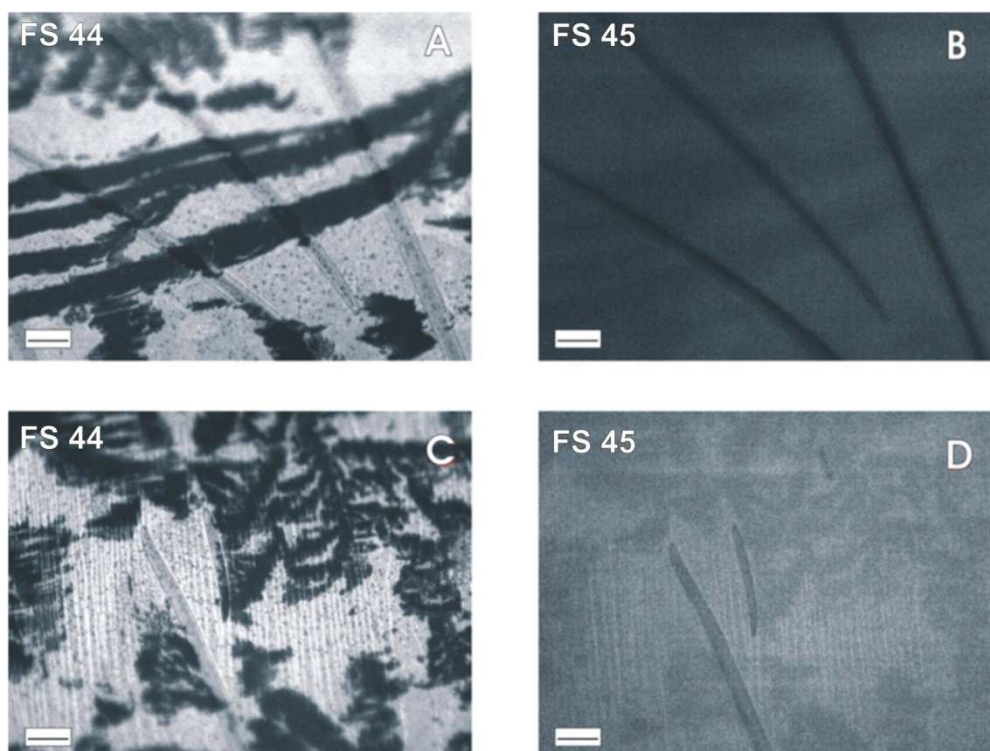


Abb. 4.39: Langmuir-Blodgett-Übertrag, untere Monoschicht DPPC, obere Monoschicht 23:2 Diyen PC mit 0,05 mol% BODIPY-PC dotiert; nach 5 min UV-Belichtung in entgaster 0,5 M KCl-Lösung. Die verwendeten Filtersätze sind in den Bildern angegeben. Bei den Aufnahmen (A) und (B) und bei den Aufnahmen (C) und (D) handelt es sich jeweils um die gleiche Probenstelle. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht $20 \mu\text{m}$.

In Abb. 4.39 sind nach dem Übertrag der oberen Monoschicht, wie auch bei den Filmwaagemessungen in Abb. 4.37, längliche dunkle Bereiche zu erkennen. Mit dem Filtersatz für die rötliche Fluoreszenz (FS 45) ist vor der UV-Bestrahlung kein Fluoreszenzsignal von der Probe zu detektieren. Vor der Polymerisierung wurde die 0,5 M KCl-Lösung gegen eine entgaste KCl-Lösung ausgetauscht, da die Polymerisation des 23:2 PC Diyen nur unter Sauerstoffausschluß erfolgt. Anschließend wurde für 5 min die Bestrahlung mit UV-Licht durchgeführt, das dazu führt, dass die Alkylketten der benachbarten Moleküle zu einem stabilen Netzwerk verknüpft werden. Dies ist als ein schwaches Fluoreszenzsignal, ebenfalls im Filtersatz für die rötliche Fluoreszenz, zu detektieren, was auf eine erfolgreiche Polymerisierung schließen lässt. Die rötliche Fluoreszenz folgt aus dem ausgedehnten konjugierten π -System, das unter der UV-Bestrahlung in den Regionen, in denen das 23:2 PC Diyen hochgeordnet vorliegt, entsteht. Diese Fluoreszenz ist auch in den Bereichen zu beobachten, die im Filtersatz für das BODIPY 500/510 HPC schwarz erschienen. Das lässt darauf schließen, dass sich auch hier das Lipid 23:2 PC Diyen befindet. Die Fluoreszenzaufnahmen (A) und (C) zeigen die BODIPY 500/510 HPC Fluoreszenz nach der UV-Bestrahlung. Die Bilder (B) und (D) wurden mit dem Filtersatz für die Detektion von rotem Fluoreszenzlicht aufgenommen und weisen eindeutig ein Signal im roten Spektralbereich auf.

4.7.3 Polymerisationsversuche an porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden

Da die verwendeten Diacetylenlipide nur mit Hilfe von Chloroform gelöst werden können und in *n*-Dekan unlöslich sind, wurde zunächst die Präparation der porenüberspannenden Membranen durch GUVs favorisiert. Aus den Lipidmischungen mit unterschiedlichen Verhältnissen der in Chloroform gelösten Lipide DPhPC und 23:2 PC Diyen wurden über die Elektroformationsmethode GUVs hergestellt. Damit wurde sichergestellt, dass in den porenüberspannenden Membranen nach erfolgtem Spreiten auf den porösen Siliziumsubstraten mit 2 μ m Porendurchmesser das 23:2 PC Diyen unpolymersiert vorlag. Wie auch bei der Präparation der porenüberspannenden

Membranen ohne Diacetylenlipiden wurde das Spreiten über den Poren mit Hilfe von 33,3 mM PEG oder 90 mM CaCl_2 induziert.

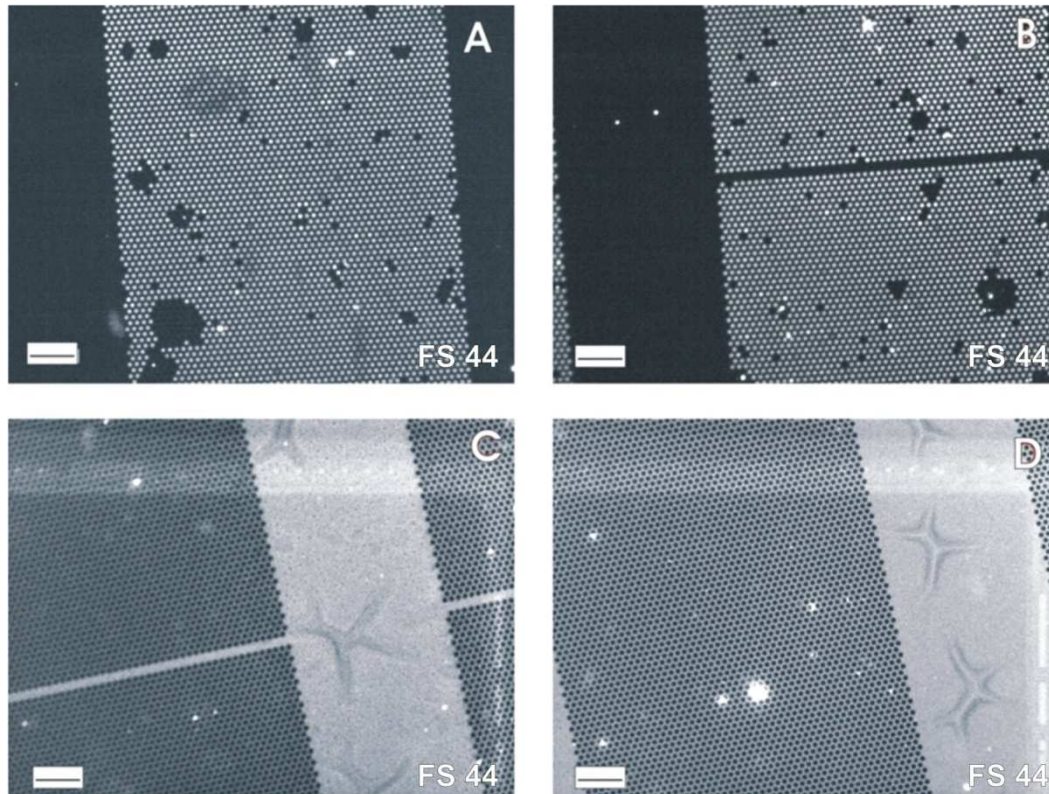


Abb. 4.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Polymerisationsversuches an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:PC Diyen (3:1) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4, entgast)). (A) und (B) zeigen die freistehenden Membranen direkt nach dem Spreiten. (C) und (D) zeigen das Ergebnis nach 3 min UV-Bestrahlung. Es ist keine Bedeckung der Poren mehr nachweisbar. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Zunächst wurden GUVs bestehend aus DPhPC: 23:2 PC Diyen (Verhältnis 3:1) auf den mit CPEO3 funktionalisierten porösen Substraten mit 2 μm Porendurchmesser gespreitet. Nach der erfolgreichen Präparation war eine gleichmäßige Bedeckung in den Porenbereichen festzustellen (Abb. 4.40 (A) und (B)). In den in Kapitel 4.7.4 gezeigten FRAP-Experimenten wird bestätigt, dass es sich um lateral bewegliche porenüberspannende Membranen vor der Polymerisierung des 23:2 PC Diyen handelt. Nach 3 minütiger UV-Bestrahlung ist keine Bedeckung der Poren in Abb. 4.40 (C) und (D) mehr ersichtlich. Dieses beobachtete plötzliche Reißen der porenüberspannenden

Membran könnte auf den Umordnungsprozesses, der durch die Polymerisation bei den Diacetylenlipiden ausgelöst wird, zurückzuführen sein.

Auf dieser Basis wurde der Anteil des 23:2 PC Diyen in den GUVs reduziert, um eine Bedeckung der Poren mit einer Membran auch nach der Bestrahlung mit UV-Licht zu erreichen. Allerdings kollabierten die Membranen nach UV-Einstrahlung auch bei einem Verhältnis von 19:1 der Mischung DPhPC: 23:2 PC Diyen. Durch die Verringerung der Bestrahlungszeit und die Reduzierung der UV-Leistung lässt sich, so Morigaki *et al.*¹⁰⁸, der Polymerisierungsgrad der Diacetylenlipide und damit zusätzlich auch die Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb einer porenüberspannenden Membran einstellen. Eine Verringerung der UV-Bestrahlungszeit auf wenige Sekunden und eine Reduzierung der eingestrahlten Leistung des UV-Lichtes reichten allerdings nicht aus, um eine porenüberspannende Membran mit einem polymerisierten Anteil zu erhalten.

Erst bei einem Mischungsverhältnis der Lipide DPhPC: 23:2 PC Diyen von 99:1 ist nach 3 min Bestrahlung mit UV-Licht eine Bedeckung von einzelnen Poren auf dem porösen Siliziumsubstrat zu finden. Die Fluoreszenzaufnahmen (A) und (B) in Abb. 4.41 zeigen die porenüberspannenden Membranen direkt nach dem Vesikelspreiten und in den beiden Bildern (C) und (D) nach 3 min UV-Bestrahlung. Die erhaltene Bedeckung ist allerdings nicht ausreichend, um die laterale Mobilität in der Membran zu messen. Auch kann bei diesem Mischungsverhältnis der Lipide nicht sichergestellt werden, dass das 23:2 PC Diyen nach der Polymerisation in den erhaltenen porenüberspannenden Membranen vorhanden ist, da, wie bei den vorherigen Fimwaagemessungen gezeigt, es bei einem bestimmten Druck zu einer Entmischung der Lipide kommen kann bzw. der Anteil des 23:2 PC Diyen gegenüber dem DPhPC zu gering ist.

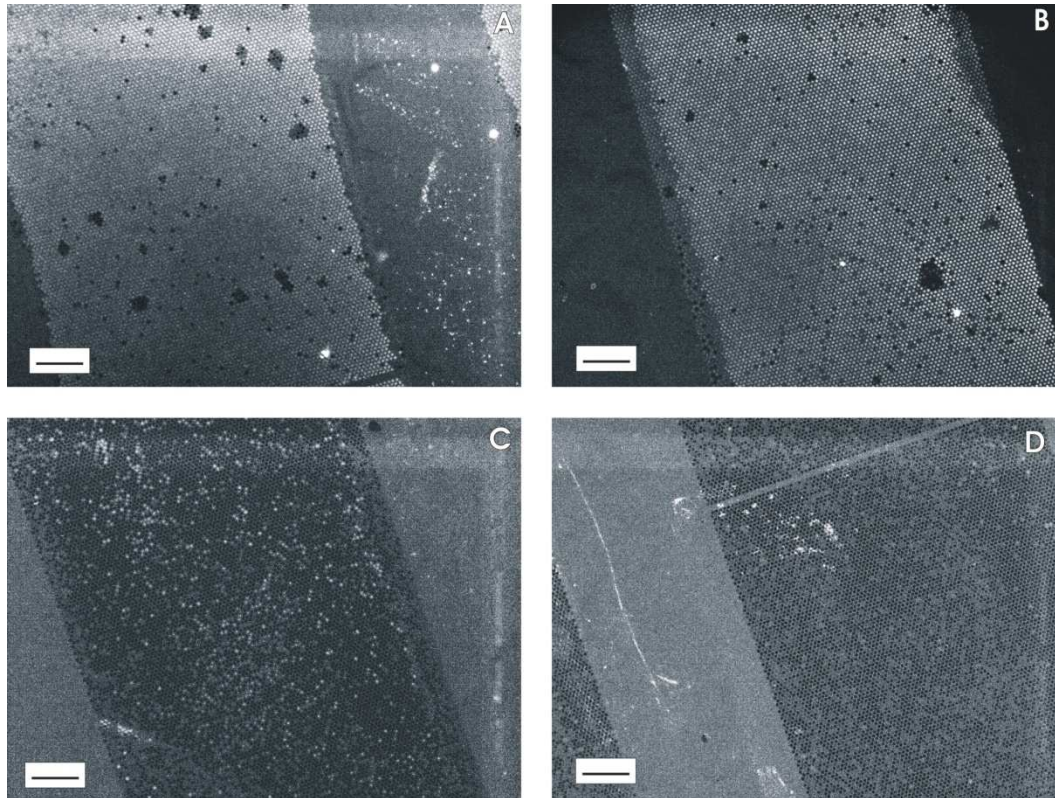


Abb. 4.41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Polymerisationsversuches an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:23:2PC Diyen (99:1) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 1,2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4, entgast)). (A) und (B) zeigen verschiedene Probenstellen vor der Polymerisation. (C) und (D) zeigen diese nach der Polymerisation durch 3 min Bestrahlung mit UV-Licht. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Da das System der lösungsmittelfreien mikro-BLMs eine zu geringe Fluidität für den Ausgleich des Umordnungsprozesses des 23:2 PC Diyen während der Polymerisierung aufweist, wurde auf die Präparation von mikro-BLMs über die Müller-Rudin-Technik zurückgegriffen. Damit sollte eine höhere Fluidität, bedingt durch das restliche Lösungsmittel nach dem Ausdünnprozess, in den mikro-BLMs erreicht werden, die ein Reißen der mikro-BLMs während der Bestrahlung mit UV-Licht verhindern sollte. Das Lösungsmittel in der *Painting*-Lösung wurde hierfür im Verhältnis *n*-Dekan:Chloroform 1:1 gemischt. Das Chloroform wurde zugegeben, da das 23:2 PC Diyen in *n*-Dekan unlöslich ist.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4.42 zeigen die mikro-BLMs auf dem mit DPTE funktionalisierten porösen Substrat mit 2 μm Porendurchmesser nach UV-Bestrahlung. In Bild (A) ist gut die hellere BODIPY 500/510 HPC Fluoreszenz zu erkennen. Bild (B)

wurde an der gleichen Stelle mit FS 45 aufgenommen. Auch hier ist ein Fluoreszenzsignal detektierbar, was auf eine erfolgreiche Polymerisation schließen lässt.

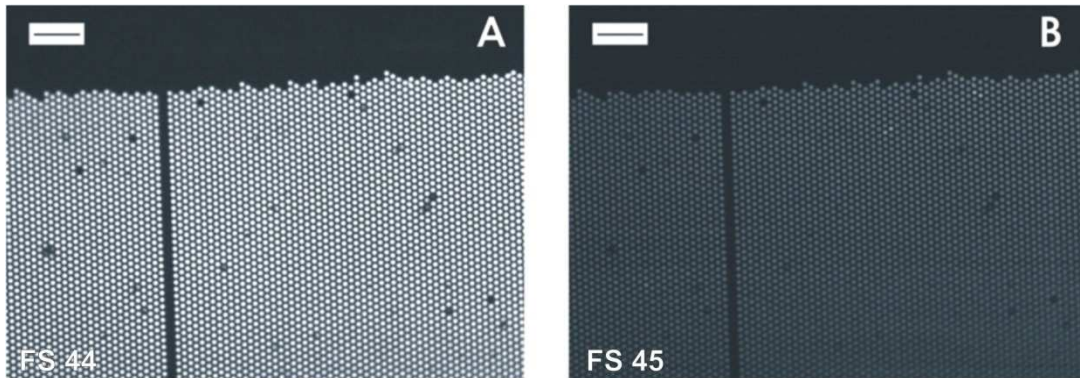


Abb. 4.42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 8 min UV-Bestrahlung an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs aus DPhPC:23:2PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). Das *n*-Dekan in der *Painting*-Lösung für die Präparation der mikro-BLMs wurde mit Chloroform im Verhältnis 1:1 versetzt. (A) Fs 44 geeignet für die BODIPY 500/510 HPC Fluoreszenz (B) Fs 45, für die rötliche Emission; der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Allerdings ist diese flächige Bedeckung bei diesem System mit den Diacetylenlipiden nur begrenzt für FRAP-Messungen nutzbar, da große Bereiche der porenüberspannenden Membranen während der UV-Bestrahlung gerissen sind. Die zu diesen lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs gehörigen FRAP-Messungen werden in Kapitel 4.7.5 beschrieben.

4.7.4 FRAP-Experimente an lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen mit Diacetylenlipiden unter Temperaturveränderung

Um das Reißen der mikro-BLMs während der UV-Bestrahlung zu verhindern, wurde die Probe vor der UV-Bestrahlung von 22°C auf 5°C herunter gekühlt und während der Bestrahlung bei 5°C gehalten. Nach der Polymerisierung wurde die Probe langsam wieder auf 22°C erwärmt. Diese Prozedur wurde angewandt, um die Beweglichkeit in der Membran zu begrenzen und somit ein geordnetes System zu erreichen, das nicht mit Membranzerstörung auf UV-Bestrahlung reagiert. Die porenüberspannenden

Membranen wurde über das Spreiten von GUVs, bestehend aus einer Lipidmischung aus den beiden Lipiden DPhPC und 23:2 PC Diyen im Verhältnis 19:1 und mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC dotiert, auf den 2 μm Poren des CPEO3 funktionalisierten porösen Substrates präpariert.

Abb. 4.43 (A) zeigt eine porenüberspannende Membran nach dem Vesikelspreiten mit Hilfe von 85 mM CaCl_2 bei einer Temperatur von $T = 22^\circ\text{C}$; die Membran erscheint bis auf kleine hellere Bereiche in der Fluorophorverteilung homogen zu sein. Aufnahme (B) wurde nach dem Herunterkühlen der Probe auf 5°C aufgenommen. Im Vergleich zu (A) ist die Fluorophorverteilung inhomogen. Auf der Probe sind größere helle Bereiche mit viel Fluorophor und dunklere Bereiche mit weniger Fluorophor zu erkennen. Nach erfolgter UV-Bestrahlung und dem langsamen Erwärmen der Probe auf 22°C lag diese Inhomogenität ebenfalls vor (C). Für die FRAP-Messungen nach der UV-Bestrahlung wurden Bereiche auf der Probe verwendet, die eine relativ gute Homogenität der Fluoreszenzintensität aufwiesen.

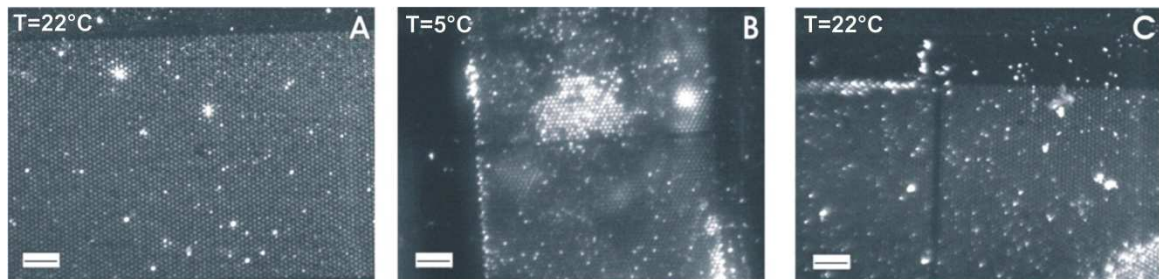


Abb. 4.43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Siliziumsubstrat mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3, 1 mM CaCl_2 -Puffer (1mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) Membran bei $T = 22^\circ\text{C}$ vor der Polymerisation)) (B) Membran bei $T=5^\circ\text{C}$ vor der Polymerisation. (C) Membran bei $T = 22^\circ\text{C}$ nach der Polymerisation. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm

Zur Berechnung des effektiven Diffusionskoeffizienten vor der Polymerisierung wurden 5 Messungen herangezogen, die folgenden Mittelwert lieferten (*Recovery-Graph* vgl. Abb. 4.45 (A)):

$$D_{\text{eff},5} = (7,9 \pm 2,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

und einem immobilen Anteil von:

$$IA_5 = (14 \pm 6) \%$$

Eine FRAP-Messung nach der Polymerisation ist in Abb. 4.44 dargestellt. Vor Beginn der FRAP-Messung liegt in Aufnahme (A) eine homogene Fluoreszenz vor. Direkt nach dem Laserpuls in (B) ist ein gut definierter schwarzer Bleichfleck zu erkennen. Erst 50 s danach in Aufnahme (D) ist eine Veränderung des Bleichfleckes feststellbar. Nach 100 s ist der ursprüngliche Bleichfleck immer noch zu sehen (F). Das lässt auf eine langsame laterale Diffusion nach erfolgter Polymerisation des 23:2 PC Diyen in den porenüberspannenden lösungsmittelfreien Membranen schließen.

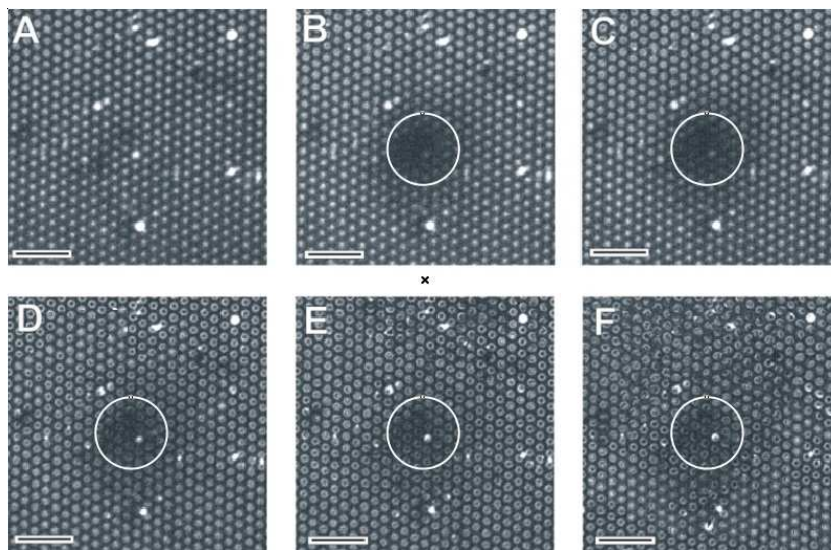


Abb. 4.44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,05 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: CPEO3; 1 mM CaCl_2 -Puffer (1 mM CaCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4)). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW) (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Aufgrund der Inhomogenität der Fluoreszenz auf der Probe konnten ebenfalls nur fünf Messungen nach der Bestrahlung mit UV-Licht herangezogen werden. Eine typische *Recovery*-Kurve aus diesen fünf Messungen wird in Abb. 4.45 (B) gezeigt. Wenn die dort

abgebildete *Recovery*-Kurve mit den Ergebnissen der FRAP-Messungen vor Polymerisation verglichen wird, ist erkennbar, dass der immobile Anteil nach erfolgter Polymerisation, wie erwartet, höher liegt. Der effektive Diffusionskoeffizient ist niedriger als vor der Polymerisation.

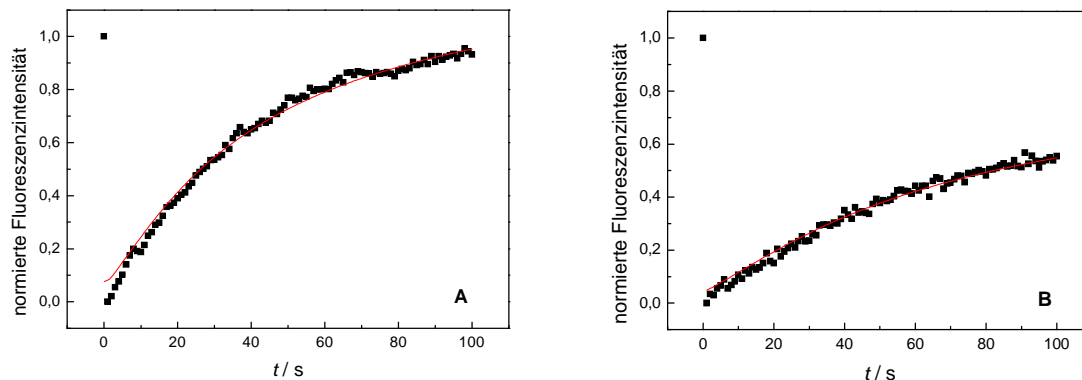


Abb. 4.45: *Recovery*-Graph eines FRAP-Experiments an lösungsmittelfreien mikro-BLMs aus DPhPC:23;2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0.05 mol% BODIPY-PC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser. Die Membran wurde über Vesikelspreiten von GUVs mit Hilfe von 85 mM CaCl_2 präpariert. (A) Vor UV-Bestrahlung: $D_{\text{eff}} = (9,3 \pm 2,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (7 \pm 3) \%$ (B) Nach UV-Bestrahlung: $D_{\text{eff}} = (3,0 \pm 0,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (46 \pm 4) \%$.

Nach der UV-Licht-Bestrahlung ergibt sich hier ein gemittelter effektiver Diffusionskoeffizient von:

$$D_{\text{eff},5} = (2,3 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_5 = (46 \pm 5)\%$$

Nach Polymerisation entspricht die laterale Diffusion in den porenüberspannenden Membranen etwa einem Drittel der Mobilität vor der Polymerisation. Ebenso ist der immobile Anteil um mehr als die Hälfte angestiegen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Polymerisation stattgefunden hat und somit die Membran in ihrer lateralen Mobilität eingeschränkt wurde.

4.7.5 FRAP-Experimente an mikro-BLMs mit Diacetylenlipiden

Eine weitere Möglichkeit, um nach der Polymerisation eine intakte Membran über den Poren zu erhalten, wurde durch die *Painting*-Technik realisiert. Zu diesem Zweck wurde, wie bereits in Kapitel 4.7.3 beschrieben, eine *Painting*-Lösung, bestehend aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1), mit einem Lösungsmittelgemisch aus *n*-Dekan und Chloroform im Verhältnis 1:1, verwendet

In Abb. 4.46 ist eine Auswahl der *Recovery*-Kurven aus den durchgeführten FRAP-Messungen vor UV-Bestrahlung dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass bei dieser Art von Präparation eine höhere laterale Mobilität aufgrund von Lösungsmitteln einfließen gegeben ist als in den lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf den porösen Materialien. Das ist besonders im Graphen (B) zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität liegt nach 100 s über der Ausgangsintensität vor dem Bleichpuls. Dies deutet darauf hin, dass hier eine Probe vorlag, die entweder nicht ausreichend ausgedünnt war oder an einer Stelle auf der Probe gemessen wurde, die zusätzliche Lösungsmittelreservoirs (vgl. Kapitel 4.2.3) aufwies.

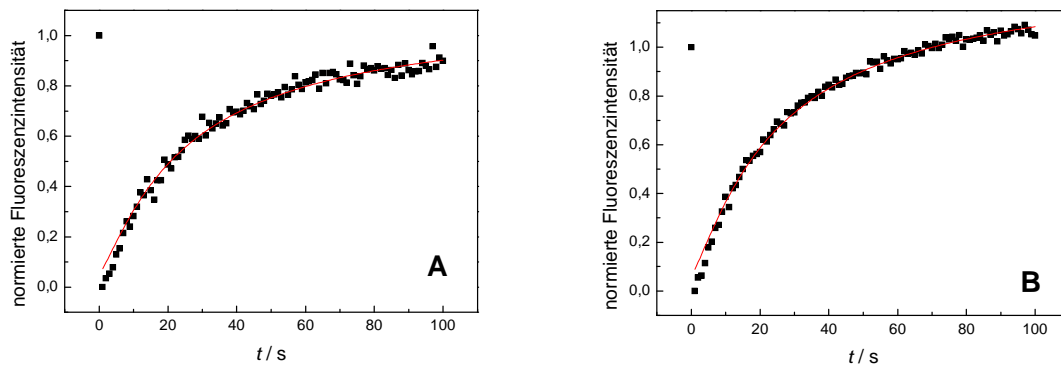


Abb. 4.46: *Recovery*-Graph eines FRAP-Experiments an mikro-BLMs aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,1 mol% BODIPY-PC vor Polymerisation. (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; 0,5 M KCl). Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (26,2 \pm 7,1) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (11 \pm 4) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (17,8 \pm 4,4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = 0 \%$.

Diese Lösungsmittelreste haben zudem die Eigenschaft, verstärkt das Fluorophor zu binden und somit steigert sich hier die Fluoreszenzintensität. Graphen, bei denen diese Effekte auftraten, wurden nicht zur Mittelung des effektiven Diffusionskoeffizienten herangezogen, da hier der keine homogene Membran garantiert werden konnte. Vor dem Polymerisieren wurde ein effektiver Diffusionskoeffizient aus 5 Messungen erhalten:

$$D_{\text{eff},5} = (29,2 \pm 8,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_5 = (11 \pm 4) \%$$

Nach 8-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht, um eine vollständige Polymerisation zu garantieren, war ausreichend Membranfläche für FRAP-Messungen vorhanden. Jedoch waren auch hier große Bereiche über den Poren kollabiert, da ein Umordnungsprozess aufgrund der stattfindenden Polymerisation erfolgte.

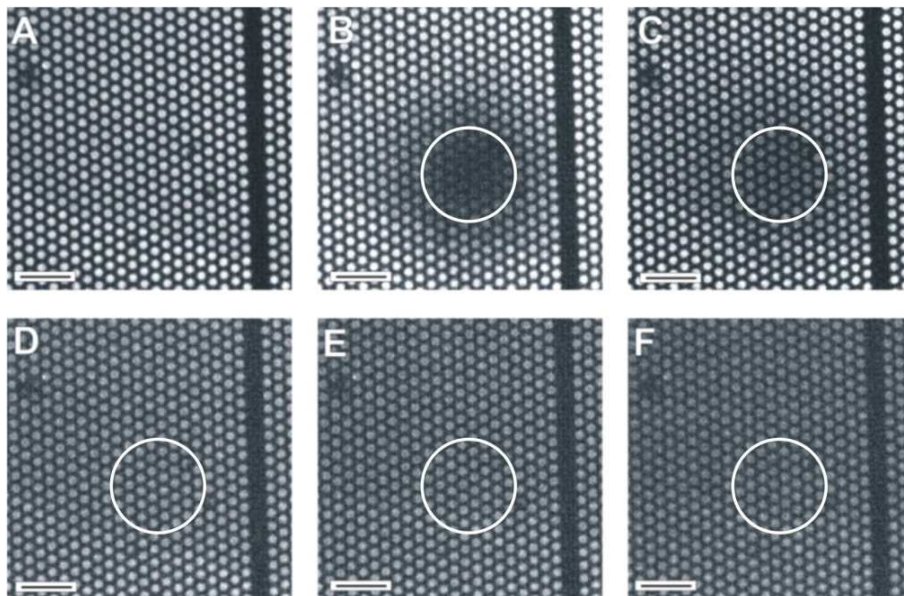


Abb. 4.47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 2 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert die Lage des Bleichflecks. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Eine exemplarische FRAP-Messung nach Polymerisierung ist in Abb. 4.47 gezeigt. Vor dem Bleichpuls liegt in Aufnahme (A) eine homogene Fluoreszenzverteilung vor. Der Bleichfleck direkt nach dem Laserpuls ist in Bild (B) gut zu erkennen. Da nach 100 s, im Gegensatz zu dem Experiment in Kapitel 4.7.4, der Bleichfleck nicht mehr erkennbar ist, ist die Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund der Erhöhung der lateralen Mobilität durch Lösungsmittelreste schneller als bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs nach UV-Bestrahlung. Allerdings ergibt sich aus den *Recovery*-Kurven (Abb. 4.48) eine Verlangsamung der lateralen Mobilität der mikro-BLMs im Vergleich zu der Diffusionsgeschwindigkeit vor Polymerisierung bei den lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs.

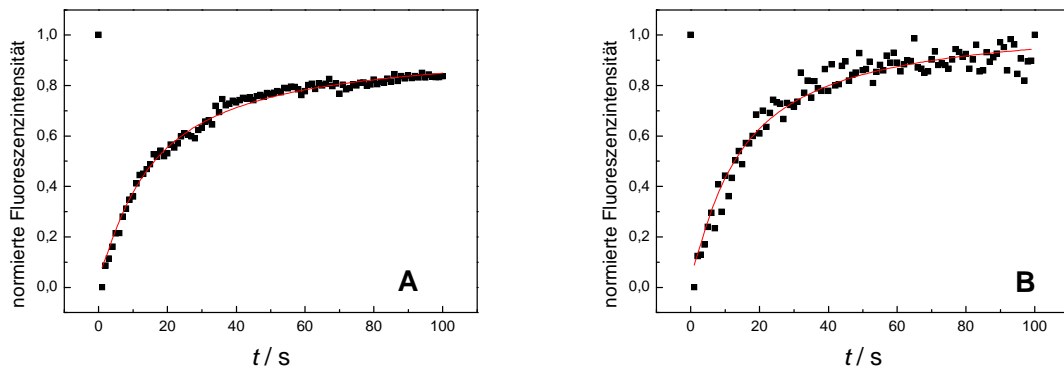


Abb. 4.48: *Recovery*-Graphen eines FRAP-Experiments an mikro-BLMs aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) dotiert mit 0,1 mol% BODIPY 500/510 HPC nach dem Polymerisieren. (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPTE; 0,5 M KCl). Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (16,8 \pm 5,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (17 \pm 1) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (16,8 \pm 15,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (10 \pm 5) \%$.

Aus fünf gemittelten Messungen ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient nach erfolgter Polymerisierung durch UV-Bestrahlung von:

$$D_{\text{eff},5} = (14,1 \pm 9,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

mit einem immobilen Anteil von:

$$IA_5 = (16 \pm 4)\%$$

4.7.6 Zusammenfassung der effektiven Diffusionskoeffizienten der porenüberspannenden Membranen mit einem Anteil von Diacetylenlipiden

Die nachfolgende tabellarische Zusammenfassung (Tabelle 4.3) liefert einen Überblick der effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} mit dazugehörigem immobilem Anteil IA , die für die lösungsmittelfreien und lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs aus DPhPC: 23:2 PC Diyen (Verhältnis: 19:1) ermittelt wurden.

Tabelle 4.3: Der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} und der immobile Anteile IA abhängig von der Funktionalisierung, Präparation, und Polymerisierung für freistehende Membranen aus DPhPC:23:2 PC Diyen (19:1) auf porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von $2\mu\text{m}$.

Polymerisierung	Präparations- technik	Funktional- isierung	$D / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$IA / \%$
unpolymerisiert	GUV	CPEO3	$(7,9 \pm 2,5)$	(14 ± 6)
polymerisiert	GUV	CPEO3	$(2,3 \pm 1,0)$	(46 ± 5)
unpolymerisiert	Müller-Rudin	DPSTE	$(26,8 \pm 8,0)$	(14 ± 4)
polymerisiert	Müller-Rudin	DPSTE	$(14,1 \pm 9,2)$	(18 ± 4)

4.8 FRAP-Messung an der oberen Monoschicht der porenüber-spannenden Membranen

In den bisher gezeigten FRAP-Messungen auf den porösen Substraten wurde vorausgesetzt, dass sich beide Lipidmonoschichten der mikro-BLMs frei bewegen können und somit zur lateralen Diffusion und zum *Recovery* beitragen. Jedoch liegt auf den Stegbereichen eine Funktionalisierung über ein Thiol (DPSTE oder CPEO3) vor. Dieses Thiol ist auf den mit Gold beschichteten Festkörperbereichen fest gebunden und könnte eine mögliche Diffusionsbarriere für die untere Lipidmonoschicht darstellen. Die Lipide dieser Monoschicht wären dann nur in ihrer lateralen Diffusion auf die einzelne Pore beschränkt. Die obere Lipidmonoschicht würde der Einschränkung durch die Funktionalisierung nicht unterliegen. Bei einem FRAP-Experiment wird nun allerdings aufgrund des Aufbaus mehr als nur eine Pore gebleicht. Daher müsste sich die laterale Diffusion einer Lipiddoppelschicht anders verhalten als die einer einzelnen Lipidmonoschicht. Um näher zu ergründen, welchen Anteil die obere Monoschicht zum *Recovery* leistet, wurde die Fluoreszenz des Fluorophors in der unteren Monoschicht der mikro-BLMs durch Zugabe von Kobalt-(II)-Chlorid (CoCl_2) in das untere Kompartiment einer Zwei-Kompartimenten-Kammer gelöscht. Das CoCl_2 besitzt die Eigenschaft, die Fluoreszenz des verwendeten Fluorophors durch Energieübertragung zu löschen⁷⁹. Somit kann keine Emission mit der CCD-Kamera des Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden. Die Präparation der mikro-BLMs auf den porösen Substraten erfolgt über die Müller-Rudin-Technik. Das Lipid, das verwendet wurde, ist DPhPC (2 (w/v)-% DPhPC in *n*-Dekan). Zur Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop wurde die Probe mit 0,5 mol% NBD-PE dotiert.

Abb. 4.49 zeigt eine Skizze für die Zugabe des CoCl_2 in die Kammer. Es bestand die Möglichkeit das CoCl_2 zur Oberseite der Membran oder zur Unterseite zu geben. Die Fluoreszenz beider Monoschichten konnte unabhängig von einander gelöscht werden.

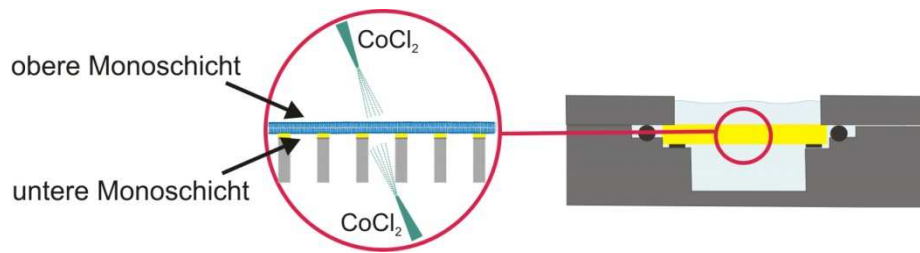


Abb. 4.49: Schematische Zeichnung der CoCl_2 -Zugabe für die Löschung der Fluoreszenzintensität bei den FRAP-Messungen in der Zwei-Kompartimenten-Kammer.

Zunächst wurde die Wirkung der Fluoreszenzlöschung durch das CoCl_2 an der oberen Monoschicht untersucht. In Abb. 4.50 (A) sind mikro-BLMs, mit NBD-PE dotiert, auf dem porösen Substrat zu erkennen. Es liegt eine helle Fluoreszenzintensität vor. In der Fluoreszenzaufnahme (B) ist die gleiche Probenstelle nach Zugabe von 24 mM CoCl_2 zu sehen. Während der Zugabe von CoCl_2 wurde die Probe nicht beleuchtet, um ein Bleichen des Fluorophors zu verhindern. Bei einem Vergleich der beiden Bilder ist der Einfluss der Fluoreszenzlöschung des CoCl_2 auf den Fluorophor NBD-PE ersichtlich.

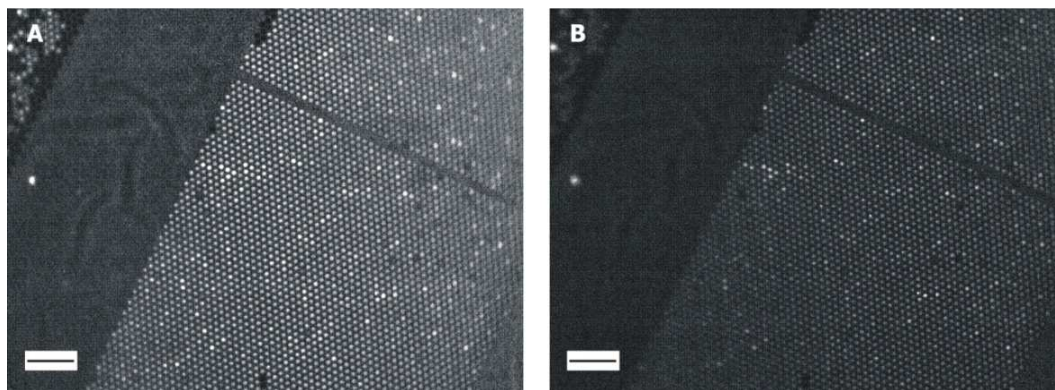


Abb. 4.50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,5 mol% NBD-PE (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl) (A) Die Fluoreszenzintensität vor Zugabe von CoCl_2 . (B) Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 24 mM CoCl_2 . Ein Vergleich dieser Aufnahmen zeigt Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, die durch die Löschung der NBD-PE-Fluoreszenz hervorgerufen werden. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht 20 μm .

Die Aufnahme (B) erscheint von der Intensität des Fluoreszenzsignales her wesentlich dunkler. Der beobachtete Quencheffekt ist bei Entfernung des CoCl_2 aus dem System durch Austausch des CoCl_2 gegen 0,5 M KCl-Lösung reversibel. Für die FRAP-Messungen der lateralen Mobilität der oberen Monoschicht wurde der Anteil der Fluoreszenz der

unteren Monoschicht durch die Zugabe von 22 mM CoCl_2 in das untere Kompartiment der Kammer gelöscht. Das CoCl_2 wurde durch Rühren in der unteren Kammer gleichmäßig verteilt. Zum Vergleich wurden Messungen der lateralen Mobilität vor und nach erfolgter Fluoreszenzlöschung durchgeführt.

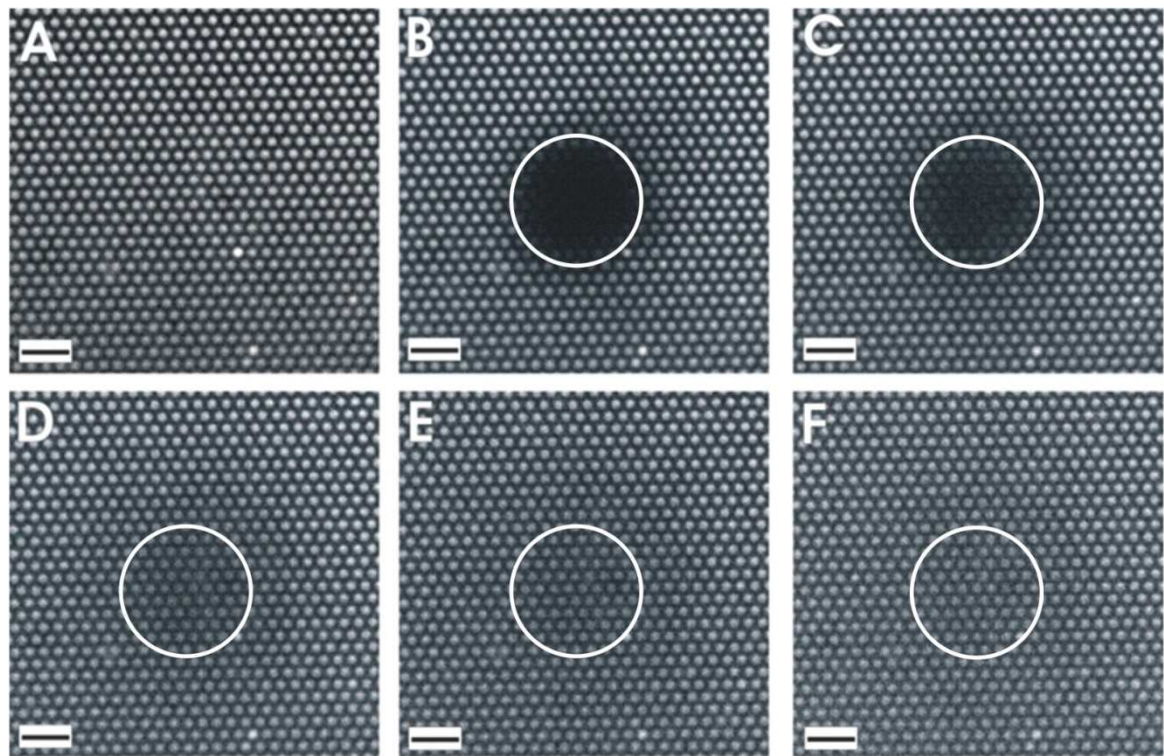


Abb. 4.51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,5 mol% NBD-PE (Substrat: poröses Silizium mit 2 μm Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPE; 0,5 M KCl). Hier liegt keine Zugabe von CoCl_2 vor. (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 1 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis markiert die Lage des Bleichfleckes. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0$ s (C) $t = 10$ s (D) $t = 50$ s (E) $t = 75$ s (F) $t = 100$ s. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

In Abb. 4.51 sind Fluoreszenzaufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,5 mol% NBD-PE, vor Zugabe von CoCl_2 zu sehen. Vor dem Bleichpuls (A) liegt eine homogene Fluoreszenz vor. Kurz nach dem Laserpuls in (B) ist der scharfe Bleichfleck zu erkennen, der in den folgenden Fluoreszenzaufnahmen (C bis F) weniger stark ausgeprägt ist als in (B), was auf eine Diffusion der Lipide schließen lässt. Nach 100 s (F) ist mit dem Auge kein Bleichfleck mehr zu erkennen.

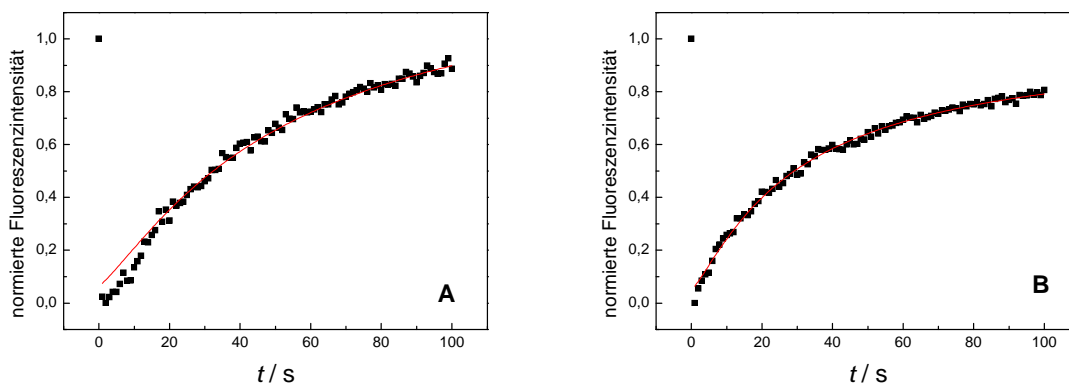


Abb. 4.52: *Recovery*-Graphen eines FRAP-Experiments an mikro-BLMs aus DPhPC dotiert mit 0,5 mol% NBD-PE auf porösem Siliziumsubstrat mit 2 μm Porendurchmesser. Die *Recovery*-Graphen wurden vor der Zugabe von CoCl_2 aufgenommen. Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (4,5 \pm 1,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (12 \pm 3) \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (9,2 \pm 1,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $IA = (21 \pm 2) \%$.

Eine Auswahl an *Recovery*-Kurven, die aus den FRAP-Messungen vor CoCl_2 -Zugabe stammen, sind der Abb. 4.52 zu entnehmen. Die Werte für den effektiven Diffusionskoeffizienten variieren in einem Bereich von 4 bis $13 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Der immobile Anteil liegt im Bereich von 8 % bis 28 %. Dies ist vergleichbar mit den FRAP-Messungen aus Kapitel 4.5.2. Diese Variation der Werte resultiert unter anderem aus den Lösungsmittelleffekten, die im Fall der mikro-BLMs, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, häufiger zu beobachten waren.

Nach den Vergleichsmessungen vor Zugabe von CoCl_2 wurde in das untere Kompartiment der Probenkammer 22 mM CoCl_2 gegeben und über Rühren homogen verteilt, damit eine Fluoreszenzlöschung in der unteren Lipidmonoschicht hervorgerufen wird. Danach wurden FRAP-Messungen von der oberen Monoschicht vorgenommen, da durch das *Quenchen* die Fluoreszenzinformation der unteren Monoschicht fehlt. Fluoreszenzaufnahmen einer FRAP-Messung nach CoCl_2 -Zugabe sind in Abb. 4.53 dargestellt. Vor dem Bleichpuls (A) liegt eine homogene Fluoreszenz vor. Kurz nach dem Laserpuls in (B) ist ein scharfer Bleichfleck in der Mitte der Aufnahme zu erkennen, der in den folgenden Fluoreszenzaufnahmen (C bis F) weniger stark ausgeprägt erscheint als in (B), was auf eine Diffusion der Lipide innerhalb der Membran schließen lässt. Nach 100 s (F) ist mit dem Auge kein Bleichfleck mehr zu erkennen.

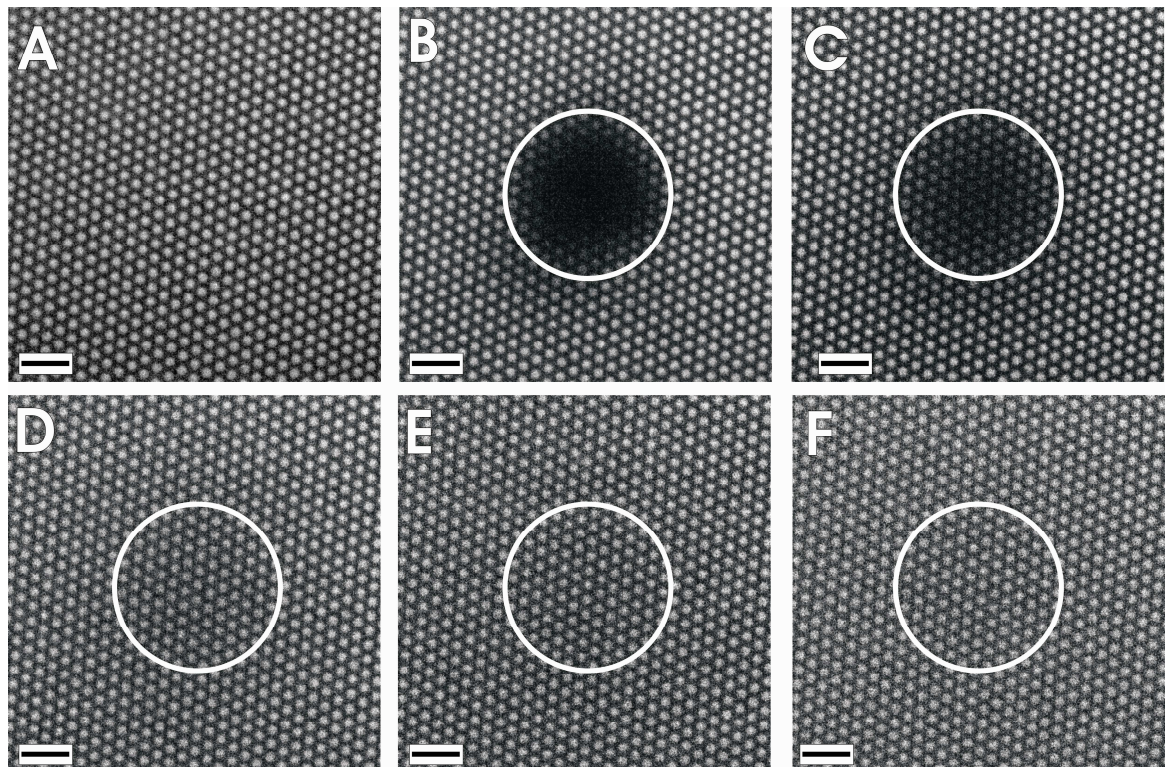


Abb. 4.53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FRAP-Messung an mikro-BLMs bestehend aus DPhPC dotiert mit 0,5 mol% NBD-PE (Substrat: poröses Silizium mit $2\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser; Funktionalisierung: DPPTe; 0,5 M KCl), nach Zugabe von 22 mM CoCl_2 in das untere Kompartiment der Messkammer. (A) bis (F) zeigen verschiedene Zeitpunkte nach dem Bleichpuls (Dauer des Bleichpuls: 1 s; Laserleistung 50 mW). Der weiße Kreis kennzeichnet die Lage des Bleichflecks. (A) vor dem Bleichpuls (B) $t = 0\ \text{s}$ (C) $t = 10\ \text{s}$ (D) $t = 50\ \text{s}$ (E) $t = 75\ \text{s}$ (F) $t = 100\ \text{s}$. Der Maßstabsbalken in den Bildern entspricht $10\ \mu\text{m}$.

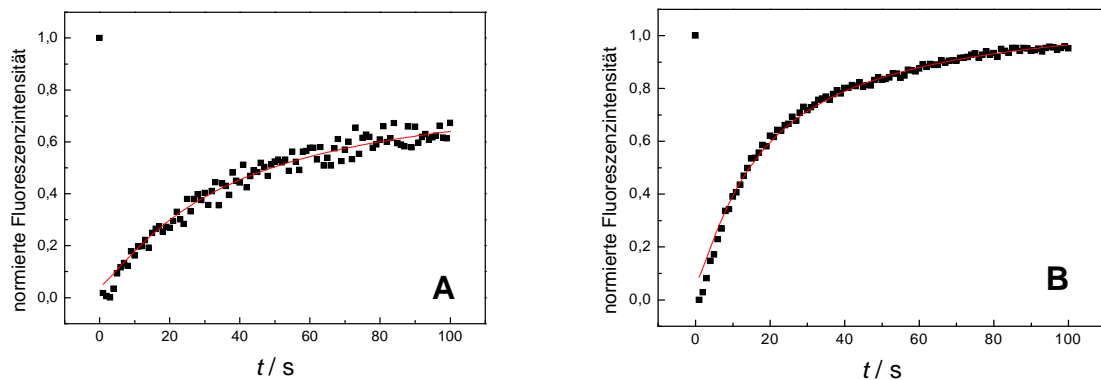


Abb. 4.54: Recovery-Graphen eines FRAP-Experiments an DPhPC-mikro-BLMs (Substrat: poröses Siliziumsubstrat mit $2\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser, Funktionalisierung: DPPTe). Die Recovery-Kurven wurden nach der Zugabe von 22 mM CoCl_2 in das untere Kompartiment der Messkammer aufgenommen. Für die einzelnen Graphen sind jeweils der effektive Diffusionskoeffizient D und der immobile Anteil IA angegeben. (A) $D_{\text{eff}} = (8,8 \pm 2,7)\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$ und $IA = (37 \pm 4)\ \%$ (B) $D_{\text{eff}} = (15,8 \pm 4,1)\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$ und $IA = (5 \pm 1)\ \%$.

Ein Vergleich mit der FRAP-Messung vor CoCl_2 -Zugabe (Abb. 4.51) zeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der lateralen Mobilität zu erkennen ist. Dies ist auch den *Recovery*-Kurven (Abb. 4.54) zu entnehmen.

Aus der Messung der lateralen Mobilität der oberen Monoschicht resultieren Werte für den effektiven Diffusionskoeffizienten zwischen 4 und $16 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ aus der Datenanpassung der *Recovery*-Kurven. Für den immobilen Anteil ergibt sich ein Bereich von 2% bis 37% .

Zur Überprüfung der Messwerte, ob die effektiven Diffusionskoeffizienten vor und nach der Zugabe von CoCl_2 miteinander korreliert werden können, wurde ein Signifikanztest an den Werten durchgeführt. Als Signifikanztest wird die ungepaarte Student-t-Verteilung gewählt. Dieser Test untersucht, ob die Annahme von zwei unabhängigen Messreihen erfüllt ist (Nullhypothese) und somit ein Vergleich von unterschiedlichen Messreihen zulässig ist.

Bei Annahme einer gleichen Abweichung wird der Testwert nach Gleichung (4.1) berechnet:

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\sigma^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (4.1)$$

σ^2 ist die Varianz; x_1 und x_2 stehen für die Mittelwerte aus den Stichproben, n_1 und n_2 sind die jeweilige Probengröße der beiden gegenübergestellten Gruppen, die zu diesem Test herangezogen werden und t ist die Student-t-Quantile mit n_1+n_2-2 Freiheitsgraden. Aus der Anzahl der Freiheitsgrade und dem so errechneten t-Wert ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit anzugeben, mit der zwei unabhängige Proben die Nullhypothese erfüllen und somit statistisch signifikant voneinander unterscheidbar sind¹⁰⁹.

Für die Durchführung des Signifikanztests wurden zum einen Werte für die Messungen vor der Fluorezenzlöschung und zum anderen Werte nach CoCl_2 -Zugabe aus vier verschiedenen Experimenten herangezogen.

Aus dem ungepaarten Student-t-Test ergeben sich folgende Werte bei 51 Freiheitsgraden:

Für die t-Quantile: $t = -1,91$

Für die Standardabweichung: $\sigma = 5,13$

Es errechnet sich daraus eine Wahrscheinlichkeit von 0,061, dass die Nullhypothese erfüllt ist. Somit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Zugabe, da bei einer Signifikanz die Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese nahe eins liegen müsste.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass zum *Recovery* nur die obere Monoschicht der mikro-BLMs beiträgt. Das heißt, dass die laterale Mobilität der mikro-BLMs und der lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen, sofern eine Funktionalisierung auf den Stegen vorliegt, nur von der oberen Monoschicht bestimmt wird. Diese Monoschicht kann sich ungehindert über den Stegbereich bewegen. Die untere Monoschicht ist aufgrund der Funktionalisierung über die Thiole auf den Stegen nur auf den Porenbereich beschränkt und kann somit nicht zum *Recovery* beitragen.

4.9 FEM-Simulationen zu den mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm

Aus den unter anderem in Kapitel 4.5.1 angeführten Ausführungen zu den FRAP-Messungen an mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC auf porösen, mit DPTE funktionalisierten, Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm , ging hervor, dass ein effektiver Diffusionskoeffizient beobachtet wird. Dieser effektive Diffusionskoeffizient setzt sich aus zwei unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten zusammen. Zum einen kann ein Koeffizient für die Diffusion der oberen Monoschicht im Porenbereich, zum anderen ein Koeffizient für die Diffusion der oberen Monoschicht auf den mit DPTE funktionalisierten Stegbereichen definiert werden. Die Finite Elemente Methode wurde herangezogen, um den Einfluss dieser beiden Diffusionskoeffizienten analysieren zu können.

Die für die Simulation angenommene Probengeometrie des porösen Substrates ist in Abb. 4.55 (A) skizziert. Die Porenkantenlängen betragen jeweils 7 μm .

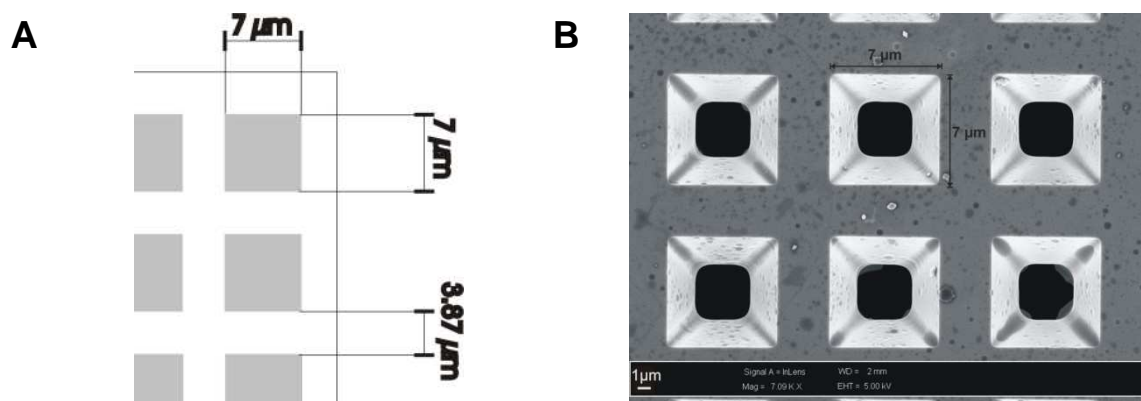


Abb. 4.55: (A) Probengeometrie der porösen Siliziumsubstrate mit 7 μm Porenkantenlänge für die Finite Elemente Simulation. (B) Vergrößerte Elektronenmikroskopaufnahme des porösen Siliziums mit einer Porenkantenlänge 7 μm . Der Maßstabsbalken beträgt 1 μm .

Die Stegbreite zwischen den einzelnen Poren wurde aus einer Elektronenmikroskopaufnahme ermittelt und auf den Wert 3,87 μm gesetzt. In Abb.

4.55 (B) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme des porösen Siliziumsubstrates dargestellt, das für die FRAP-Messungen an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs verwendet wurde. Den Simulationen wurde ein Array aus 8 x 8 Poren zugrunde gelegt.

Um eine genaue Beschreibung der Anfangssituation der einzelnen simulierten Messungen nach dem Bleichpuls zu erreichen, werden die aus den einzelnen FRAP-Messungen erhaltenen Gaußkurven des ersten Bildes im FEM-Programm angepasst. In Tabelle 4.4 sind vier ausgewählte FRAP-Experimente an DPhPC mikro-BLMs angeführt. Diese Tabelle beinhaltet die Information bezüglich der Halbwertsbreite ω der Gaußkurve des ersten Bildes der einzelnen FRAP-Serien und der aus der Kurvenanpassung der *Recovery*-Graphen bestimmte effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} . Des Weiteren sind die Angaben für die Anpassung der Gaußkurven in der Simulation an die experimentell bestimmten Gaußkurven aufgeführt. Hierbei handelt es sich um die Standardabweichung σ ($\sigma = \frac{\omega}{2\sqrt{2 \ln 2}}$) und die Bleichtiefe „B.D.“.

Tabelle 4.4: Halbwertsbreiten der Gaußkurve ω des ersten Bildes der FRAP-Serie und die effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} aus der Kurvenanpassung nach Axelrod des *Recovery*-Graphen. Die Gaußkurven der Simulation wurden den experimentellen über die Standardabweichung σ und der Bleichtiefe B.D. angeglichen.

Serie	ω [μm]	$D_{\text{eff}} / \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	σ	B.D.
01	$19,3 \pm 0,9$	$19,7 \pm 0,6$	18,0	0,46
02	$19,0 \pm 0,7$	$17,8 \pm 2,2$	8,7	0,56
03	$24,9 \pm 2,3$	$21,9 \pm 0,7$	11,5	0,55
04	$16,8 \pm 1,1$	$6,2 \pm 1,4$	8,45	0,58

Bei der Auswahl der Serien wurde darauf geachtet, dass das breite Spektrum an erhaltenen effektiven Diffusionskoeffizienten bei den *Recovery*-Messungen der mikro-BLMs auf den porösen Substraten mit einem Porendurchmessern von 7 μm berücksichtigt wird. Die *Recovery*-Graphen der vier exemplarischen FRAP-Messungen, die in Tabelle 4.4 aufgeführt sind, können Abb. 4.56 entnommen werden. Der aus der FEM-Simulation für zwei Diffusionskoeffizienten erhaltene Kurvenverlauf wird an die Kurvenanpassung nach Axelrod des *Recovery*-Graphen (Abb. 4.56 (A) bis (D), roter Kurvenverlauf) der jeweiligen FRAP-Messung aus Abb. 4.56 angepasst.

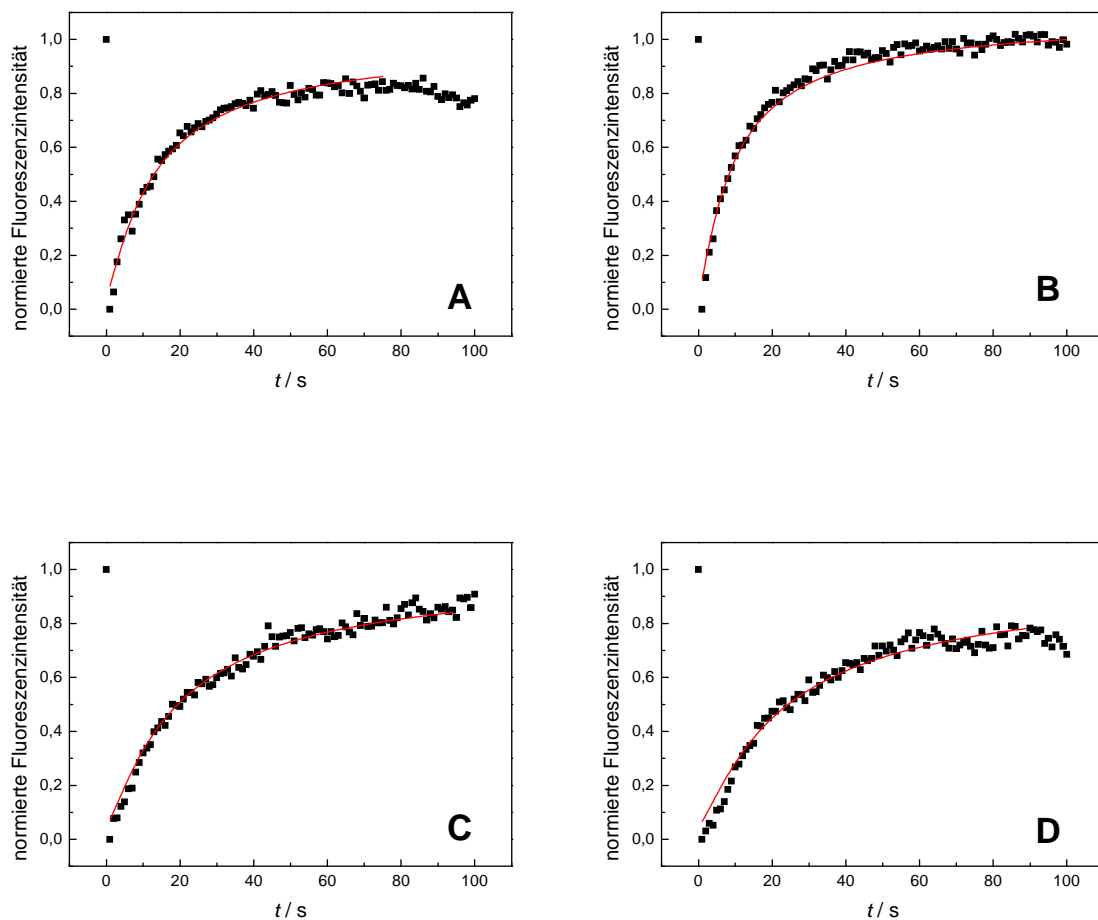


Abb. 4.56: *Recovery*-Graphen der FRAP-Messungen der in Tabelle 4.4 aufgeführten Serien. Die jeweilige Anpassung nach dem Modell Axelrod, das als Grundlage der Simulation dient, ist als rote Linie in den einzelnen *Recovery*-Graphen dargestellt. Die FRAP-Messungen wurden an mikro-BLMs aus DPhPC, dotiert mit 0,2 mol% BODIPY 500/510 HPC, durchgeführt. (Substrat: poröses Silizium mit 7 μm Porendurchmesser, Funktionalisierung: DPPTe; 0,5 M KCl) Für die jeweiligen Graphen ist der effektive Diffusionskoeffizient D angegeben. (A) Serie 01 mit $D_{\text{eff}} = (19,9 \pm 0,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (B) Serie 02 mit $D_{\text{eff}} = (17,8 \pm 2,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (C) Serie 03 mit $D_{\text{eff}} = (21,9 \pm 0,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (D) Serie 04 mit $D_{\text{eff}} = (6,2 \pm 1,4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Um in der Simulation ein möglichst genaues Abbild des Experimentes zu erhalten, ist die Betrachtung der Lage des Bleichflecks bezüglich der Gitterstruktur des porösen Substrates wichtig. Im Experiment wird die Fluoreszenz des Fluorophors in der Membran auf den Stegen durch das sich darauf befindliche Gold gelöscht. Die Information zum Wiederanstieg in der Fluoreszenzintensität ist im Bereich der Stege somit nicht gegeben. Lediglich das *Recovery* der Fluoreszenz der mikro-BLMs wird bei den Messungen beobachtet. Im Experiment, wie auch in der Simulation, existieren zwei mögliche Fälle bezüglich der Fluoreszenzlöschung auf den Stegbereichen. Im Experiment ist dies

abhängig von der Fokussierung auf der Probe. Je nach Fokussierung sind die Poren als Rechteck oder als Rechteck mit abgerundeten Ecken zu erkennen. In der Simulation wurden diese beiden Fälle nachgebildet, indem zwischen einer Fluoreszenzlöschung der Stege (Rechtecke) und einer Fluoreszenzlöschung der Stege und des Randbereichs der Stege (Rechtecke mit abgerundeten Ecken) unterschieden wurde.

In Abb. 4.57 sind die Fluoreszenzaufnahmen zum Zeitpunkt $t = 0$ s nach dem Bleichpuls der in Tabelle 4.4 aufgeführten Serien im Vergleich zu dem in der Simulation gewählten Ausgangspunkt dargestellt. Es wurde hier darauf geachtet, dass möglichst gleiche Anfangsbedingungen zwischen Experiment und Simulation im Bezug auf die Lage und Größe des Bleichflecks im Probengitter gewählt wurden. Die Parameter der Bleichfleckgröße und Bleichtiefe wurden durch das vorherige Angleichen der theoretischen und experimentellen Gaußkurve bestimmt. Die Lage des Bleichflecks im Gitter wurde manuell festgelegt. Ebenso wurde auch die Fokussierung des Fluoreszenzmikroskops in den einzelnen Serien berücksichtigt und zwischen den beiden oben für die Fluoreszenzlöschung geschilderten Optionen unterschieden. Abb. 4.57 (A) beschreibt die Serie 01 und repräsentiert den Fall eines Bleichflecks, der eine hohe Halbwertsbreite in der Gaußkurve aufweist. Des Weiteren ist die Fluoreszenz auf den Stegen und den Stegrändern von der Fluoreszenzlöschung betroffen, da im Experiment aufgrund der Fokussierung die Rechtecke abgerundet sind. Serie 02 ist in Abb. 4.57 (B) zu sehen. Der Bleichfleck ist von einer geringeren Halbwertsbreite als in Serie 01 bestimmt. Er bedeckt nur knapp zwei Poren und der Mittelpunkt der Gaußkurve befindet sich sehr wahrscheinlich nahe dem Stegbereich. Hier liegt ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung auf den Stegen und den Stegrändern vor. Bei Serie 03 in Abb. 4.57 (C) ist keine Fluoreszenzlöschung der Stegränder gegeben. Der Bleichfleck bedeckt sowohl in der realen Fluoreszenzaufnahme als auch in der Simulation gleichmäßig vier Poren. Der Mittelpunkt der Gaußkurve befindet sich somit genau auf dem Stegbereich. Serie 04 in Abbildung Abb. 4.57 (D) ist in etwa gleich der in Abbildung Abb. 4.57 (C). Jedoch liegt hier eine geringere Bleichtiefe vor und das Gaußprofil ist somit schwächer ausgeprägt. Hier sind ebenfalls die Stege und Stegbereiche von der Fluoreszenzlöschung des Fluorophors betroffen.

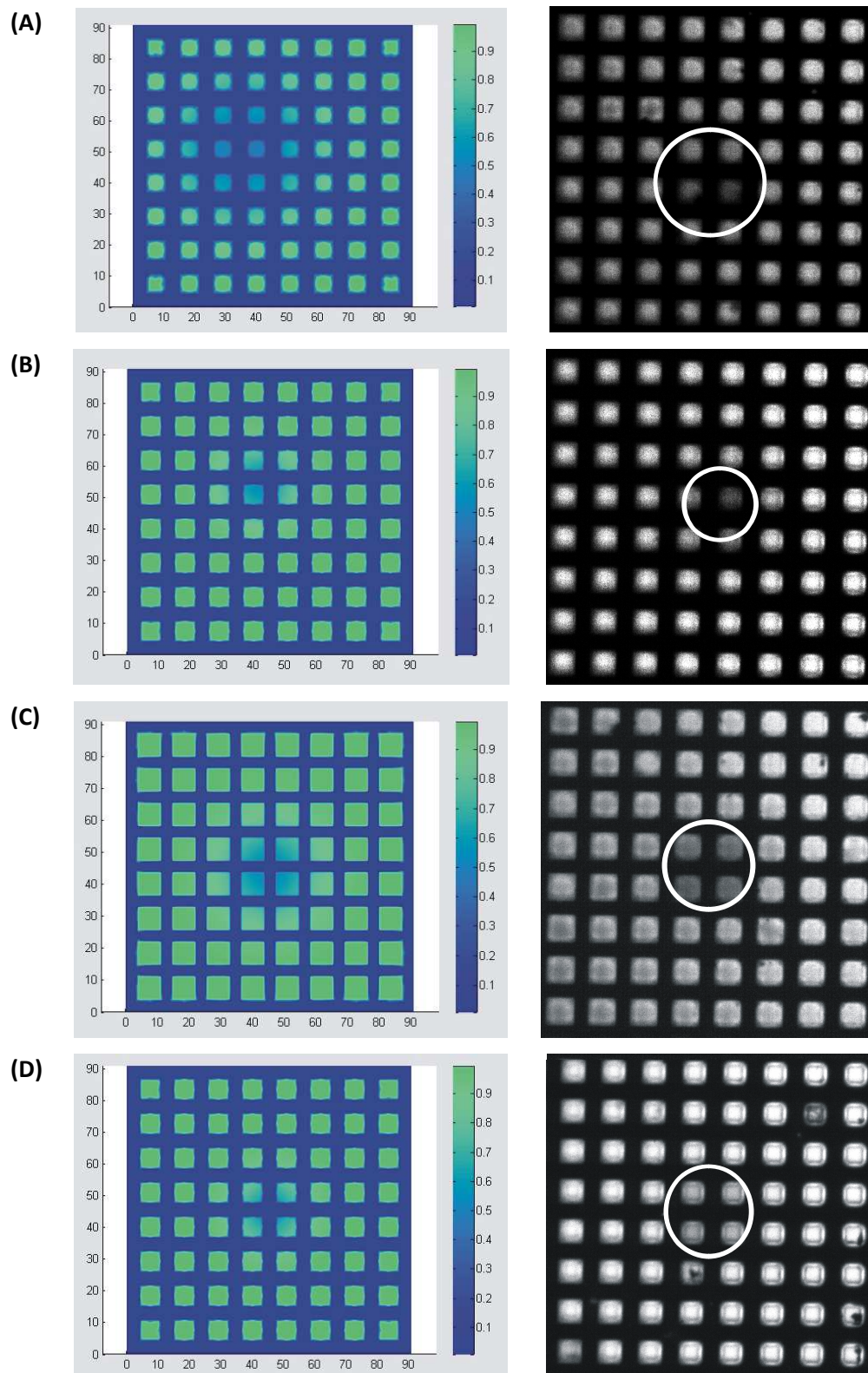


Abb. 4.57: Anpassung der Lage des Bleichflecks und der Fluoreszenzlöschung auf den Stegbereichen in der Simulation an die reale Messung. Links ist die Vorgabe der Simulation bezüglich der Lage und Breite des Bleichflecks gegeben. Der Bleichfleck ist als blauer Kreis in den Bildern der Simulation dargestellt. Rechts ist die erste Fluoreszenzaufnahme nach dem Bleichen der simulierten FRAP-Messungen gezeigt. Der weiße Kreis markiert den Bleichfleck in den Fluoreszenzaufnahmen. Die Werte für die zu den Serien gehörigen Halbwertsbreiten sind Tabelle 4.4 zu entnehmen. (A) Serie 01: Die Halbwertsbreite des Gaußförmigen Bleichfleckes ist sehr breit und daher ist der Bleichfleck über einen größeren Bereich im *Array* der Simulation definiert. Hier wurde eine Fluoreszenzlöschung auf den Stegen mit den Stegrändern angenommen. (B) Serie 02: Die Halbwertsbreite des Gaußförmigen Bleichfleckes ist

kleiner als bei (A). Der Mittelpunkt des Bleichfleckes liegt zwischen zwei Poren und dem Stegbereich. Hier wurde ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung der Stege und der Stegränder vorausgesetzt. (C) Serie 03: Der Bleichfleck, wie aus der realen Messung ersichtlich, ist auf vier Poren gleichmäßig verteilt. Hier liegt nur eine Fluoreszenzlöschung auf den Stegen vor. (D) Serie 04: Die Halbwertsbreite ist geringer als in (C). Die Bleichtiefe ist weniger stark ausgeprägt. Hier liegt bei einem Vergleich mit der realen Messung rechts eine Fluoreszenzlöschung auf den Stegen und Stegrändern vor.

In der Simulation wurde durch die Gaußkurve eine bestimmte Bleichtiefe vorgegeben. Diese Bleichtiefe war gleichzeitig der Startpunkt der *Recovery*-Kurve. Bei der Auswertung der Experimente wurde die Bleichtiefe im normierten *Recovery*-Graphen und der späteren Kurvenanpassung nach dem Modell von Axelrod nicht berücksichtigt. Die Kurve aus der Simulation war daher gegenüber der aus dem Experiment gestaucht. Damit die Kurvenverläufe aus der Simulation und dem Experiment miteinander verglichen werden konnten, wurden die Simulationskurven mit einem Streckungsfaktor multipliziert. Des Weiteren wurde die Kurvenanpassung aus den FRAP-Messungen und die Simulationskurve mit ihrem ersten Datenpunkt auf den Nullpunkt im Graphen gesetzt.

Anhand von Serie 01 soll erläutert werden, welche Variationsmöglichkeiten in den jeweiligen Simulationen betrachtet werden können, um eine möglichst gute Übereinstimmung der Simulation mit der Datenanpassung aus den FRAP-Messungen zu erhalten. Zunächst wurde der Diffusionskoeffizient im Porenbereich D_{Pore} mit $20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ konstant gehalten. Lediglich der Diffusionskoeffizient auf dem Stegbereich D_{Steg} wurde variiert. Der ROI mit einem Radius von $1 \mu\text{m}$ im Bezug auf den Bleichfleck wurde, wie in der Auswertung der FRAP-Messung, zentral auf eine gebleichte Pore des gesamten Bleichflecks positioniert (vgl. Abb. 4.58).

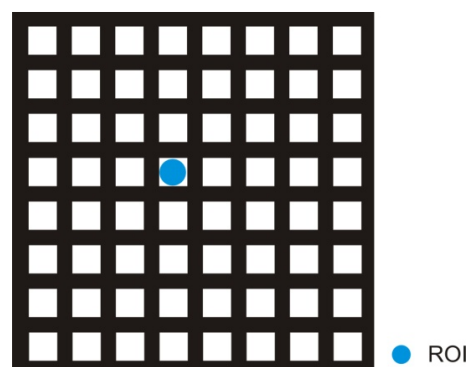


Abb. 4.58: Skizze des Probengitters bezüglich der Lage des ROI in der Simulation bei Serie 01.

a) Variation des Diffusionskoeffizienten D_{Steg} auf dem Stegbereich:

Die Simulationskurven bei konstantem D_{Pore} und variiertem D_{Steg} aus der Finiten-Elemente Methode sind in Abb. 4.59 dargestellt. Die Datenanpassung aus Serie 01 ist als gestrichelte Kurve gekennzeichnet. Eine gute Übereinstimmung zwischen Messung und Simulation ist bei SIM 04 (Abb. 4.59, blauer Kurvenverlauf) gegeben. Hier beträgt der Diffusionskoeffizient auf den Stegen $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Anhand des Verlaufs der Simulationskurven ist zu erkennen, dass D_{Steg} den unteren Bereich des Kurvenverlaufs maßgeblich beeinflusst. In der Kurve SIM 01 (grau) beträgt $D_{\text{Steg}} = 0,14 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Diese Simulationskurve hat nach wenigen Sekunden des Wiederanstiegs der Fluoreszenzintensität einen Knick und verläuft danach fast linear nach oben, ohne eine Sättigung zu erreichen. Erst bei einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten auf den Stegen ist eine bessere Kurvenanpassung der Simulation an die vorgegebene Datenanpassung zu erkennen.

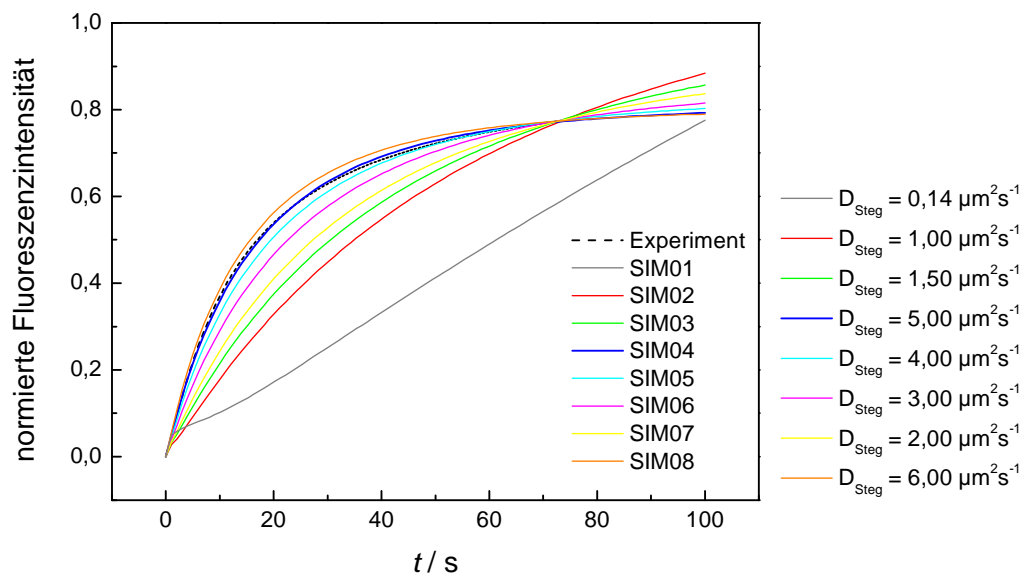


Abb. 4.59: Recovery-Kurven aus der FEM-Simulation für Serie 01. Der Diffusionskoeffizient D_{Steg} auf dem Stegbereich wird variiert, der im Bereich der Poren (D_{Pore}) wird konstant gehalten. Die Werte für D_{Steg} sind im Graphen für die einzelnen Simulationen angegeben. Eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment (---) ergab die Simulation Sim04 (blau) mit den Diffusionskoeffizienten $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

b) Variation des Diffusionskoeffizienten D_{Pore} über den Poren:

Im Folgenden wurde der Diffusionskoeffizient auf den Stegen konstant bei $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten, um den Einfluss des Diffusionskoeffizienten auf den Poren zu simulieren (Abb. 4.60). Aus dem Vergleich der Simulationskurven SIM 12 (Abb. 4.60, violett, $D_{\text{Pore}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) und SIM 11 (Abb. 4.60, blau, $D_{\text{Pore}} = 30 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) ist zu entnehmen, dass der Diffusionskoeffizient im Porenbereich erst im späteren zeitlichen Verlauf der *Recovery*-Kurve zum Tragen kommt. Er beeinflusst somit den Sättigungsbereich der *Recovery*-Kurve. Der zeitliche Verlauf in der Kurve direkt nach dem Bleichen wird nur schwach von ihm beeinflusst.

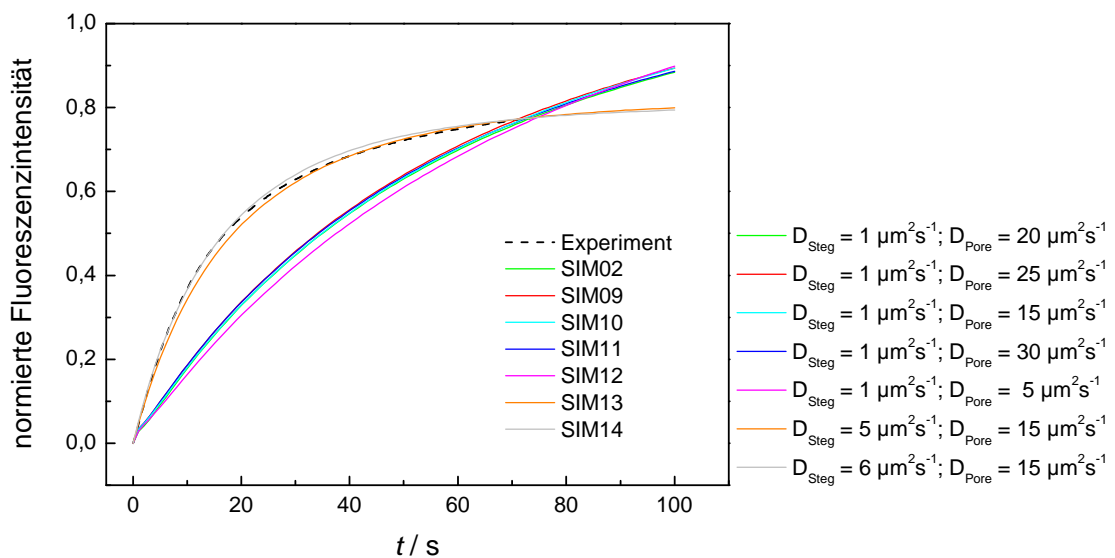


Abb. 4.60: *Recovery*-Kurven aus der FEM-Simulation für Serie 01. Bei den Simulationskurven SIM 02 und SIM 09 bis SIM 12 wird der Diffusionskoeffizient D_{Steg} konstant bei $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten, um den Einfluss des Koeffizienten D_{Pore} genauer zu untersuchen. Bei den Simulationskurven SIM 13 und SIM 14 wird der Koeffizient D_{Pore} konstant bei $15 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten, wohingegen D_{Pore} variiert wird, um den Einfluss dieses Koeffizienten zu verdeutlichen. Die Datenanpassung aus dem Experiment der Serie 01 ist als (---) im Graphen zu finden.

Zur Verdeutlichung dieses Zusammenspiels der beiden Diffusionskoeffizienten wurde bei SIM 13 und SIM 14 der Diffusionskoeffizient über den Poren konstant bei $D_{\text{Pore}} = 15 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten. Der Diffusionskoeffizient auf den Stegen wurde variiert. Bei SIM 13 (orange) betrug der Diffusionskoeffizient auf den Stegen $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und bei SIM 14 (grau) $D_{\text{Steg}} = 6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die Simulationskurven stimmen mit dem Verlauf der Kurvenanpassung nach Axelrod gut überein. Der spätere zeitliche Verlauf der

Simulationskurven geht wie bei der Datenanpassung aus dem Experiment, im Gegensatz zu der bei SIM 11 (Abb. 4.60, blau, $D_{\text{Pore}} = 15 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Steg}} = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), in die Sättigung über.

c) Variation der Position des ROIs:

Um den Einfluss der Position des ROIs auf dem Probenarray in Bezug auf den *Recovery* zu ermitteln, wurden verschiedene Positionen des ROIs definiert und entsprechende *Recovery*-Kurven simuliert. Die Simulationskurven wurden diesmal nicht in Relation zur Kurvenanpassung aus dem Experiment gesetzt (Abb. 4.62). Aus den beiden Simulationskurven SIM 04 und SIM 15 in Abb. 4.62 ist ersichtlich, dass die Lage des ROIs im Bleichfleck auf den porösen Strukturen den Verlauf der *Recovery*-Kurve nicht maßgeblich beeinflusst, solange der ROI so gesetzt ist, dass genügend Information vom Wiederanstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden kann. Beide Simulationskurven sind nahezu identisch. Die Simulationskurve SIM 04 (hellblau) spiegelt das *Recovery*-Verhalten wieder, bei dem der ROI in der Mitte einer Pore platziert wurde (Abb. 4.61 (A)). SIM 15 (schwarz) zeigt die Simulationskurve, bei der der ROI auf dem

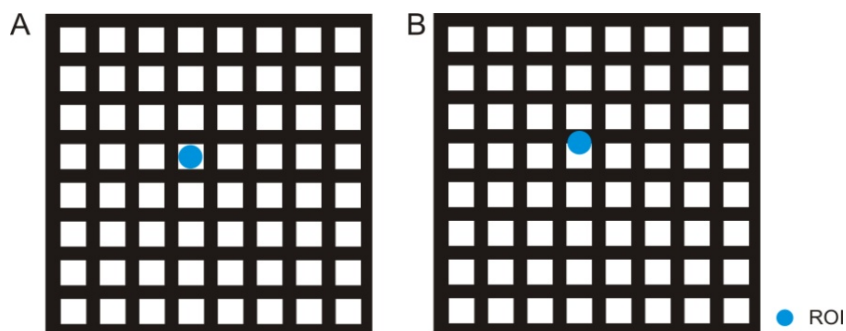


Abb. 4.61: Skizze des Probengitters zur Definition der Lage des ROIs im Gitter. (A) Lage des ROI bei SIM 04 (B) Lage des ROI bei SIM 15.

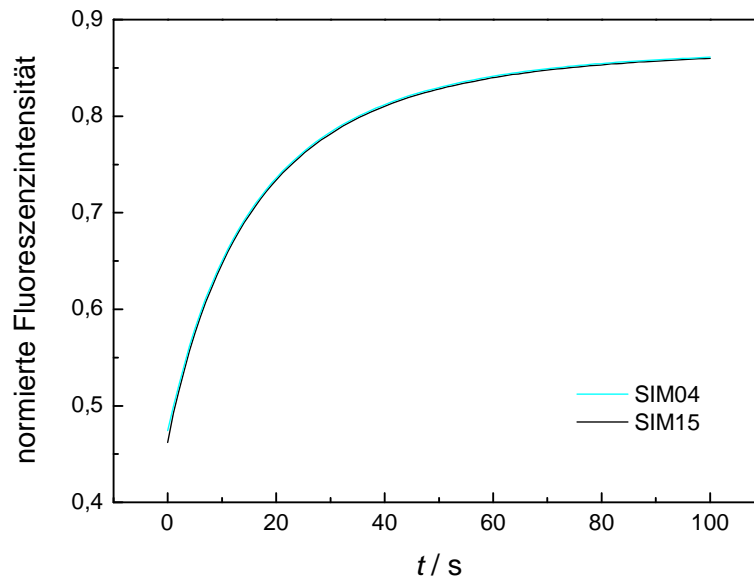


Abb. 4.62: Vergleich von zwei simulierten *Recovery*-Kurven. Bei SIM04 (blau) wurde der ROI auf den Porenbereich gesetzt; bei SIM 15 (schwarz) befindet sich der Mittelpunkt des ROI im Randbereich des Poren-/Stegbereichs. Die Diffusionskoeffizienten sind definiert als: $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$

Randbereich bei gleichbleibender Größe (Abb. 4.61 (B)) positioniert wurde. Bei einem Vergleich der beiden Kurvenverläufe ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf von SIM 15 minimal unterhalb von dem der Simulation SIM 04 liegt. Bei der Lage des ROIs direkt auf den Stegbereichen ist kein Signal zu detektieren, da hier eine Fluoreszenzlöschung vorliegt.

d) Variation des ROI-Radius:

Ein weiterer Einfluss auf den Verlauf der *Recovery*-Kurve ist durch die Größe des ROIs gegeben; der ROI beschreibt den Anteil des Bleichflecks, der zur Beobachtung des Fluoreszenzwiederanstieges im gebleichten Bereich herangezogen wird. Hierfür wurden die Diffusionskoeffizienten konstant bei $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten. Der Mittelpunkt des ROIs wurde ebenfalls konstant auf der Mitte einer Pore im Bleichfleck definiert, wie es in Abb. 4.61 (A) dargestellt ist.

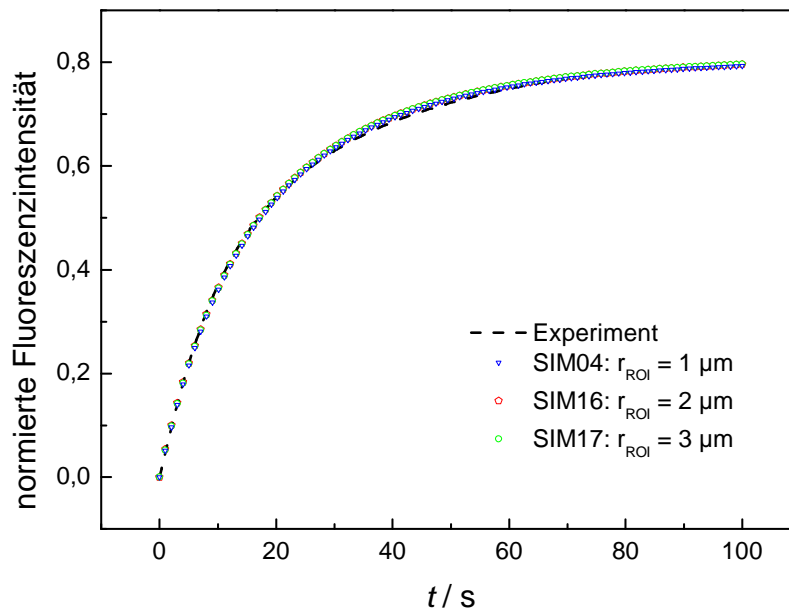


Abb. 4.63: Mit Hilfe der FE-Methode simulierte *Recovery*-Kurven mit variierten ROI-Größen. Die Diffusionskoeffizienten im Steg- und Porenbereich wurden konstant bei: $D_{\text{Steg}} = 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gehalten. Der Lage des ROI ist wie in Abb. 4.61 (A) gewählt.

Die simulierten Kurvenverläufe für drei unterschiedliche ROI-Größen (Radius: 1 μm (SIM04), 2 μm (SIM16) und 3 μm (SIM17)) (Abb. 4.63) zeigen keinen signifikanten Unterschied. Bei weiterer Erhöhung des ROI-Radius über die Größe des Bleichfleckes ist in der Simulation ein Wiederanstieg der Fluoreszenz nicht gegeben. Die Bereiche der ungebleichten Probenstellen und die nicht fluoreszierenden Stegbereiche wirken sich störend auf die Beobachtung des *Recovery*s aus. Der *Recovery* ist somit auf einen bestimmten Punkt beschränkt, in dem sich der Bleichfleck befindet und genügend Information des Fluoreszenzsignals beim *Recovery* detektiert werden kann.

Für die Serie 02 - Serie 04 wurde die FEM-Simulation analog zu der der Serie 01 durchgeführt. Daher werden im Folgenden für die einzelnen Serien nur noch die Ergebnisse dargestellt, die eine gute Übereinstimmung mit der Datenanpassung aus dem Experiment lieferten.

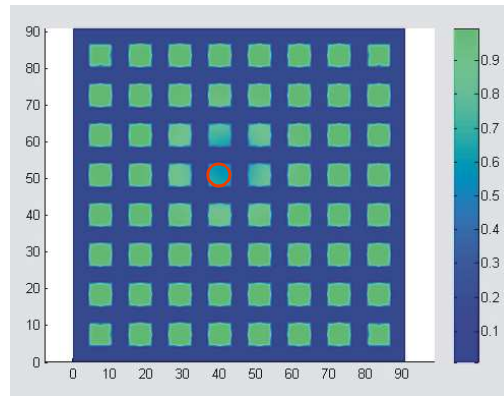


Abb. 4.64: Skizze zur Beschreibung der Lage des ROI im Bleichfleck bei Serie 02. Der ROI ist mit einem roten Kreis markiert.

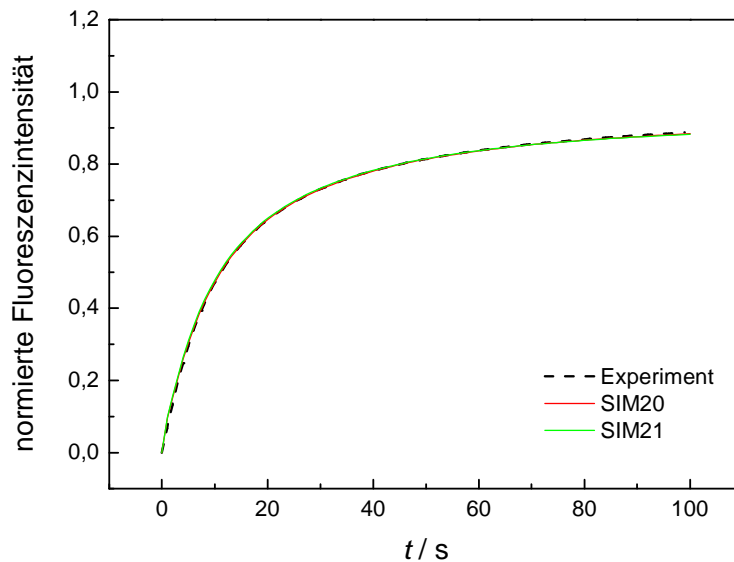


Abb. 4.65 Recovery-Kurven aus der FEM-Simulation für Serie 02 (---). Die beste Übereinstimmung zwischen Simulation und FRAP-Messung ergeben SIM 20 (rot, $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) und SIM 21 (grün, $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

In Serie 02 ist die Halbwertsbreite des Gaußprofils im Gegensatz zu der in Serie 01 geringer; das heißt, dass der Bleichfleck auf einen wesentlich kleineren Bereich beschränkt ist. Der ROI wurde hier in den Mittelpunkt der am stärksten gebleichten Pore gesetzt (Abb. 4.64). Der Radius des ROIs beträgt $1 \mu\text{m}$. Die Simulationskurven und die zugehörige Datenanpassung aus dem Experiment sind in Abb. 4.65 gezeigt. Die besten Simulationswerte für beide Diffusionskoeffizienten lieferten die Kurvenverläufe SIM 20 (rot) und SIM 21 (grün). Bei SIM 20 wurden die beiden Diffusionskoeffizienten gesetzt

als: $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. In der Simulationskurve SIM 21 wurden die Diffusionskoeffizienten angenommen als: $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Weiterhin wurde versucht, eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen der Simulation und dem Experiment für die in Abb. 4.56 dargestellte Datenanpassung der Serie 03 zu generieren. Bei Serie 03 ist der Bleichfleck gleichmäßig auf vier Poren verteilt. Der Mittelpunkt des Bleichflecks befindet sich direkt auf dem Stegbereich. Der ROI kann somit nicht auf den Mittelpunkt des Bleichflecks gesetzt werden, da sonst keine Information der Fluoreszenzwiederherstellung detektiert werden kann. Daher wurde der ROI auf den Mittelpunkt einer der gebleichten vier Poren gesetzt (Abb. 4.66). Der ROI-Radius betrug, wie auch bei Serie 02, $1 \mu\text{m}$.

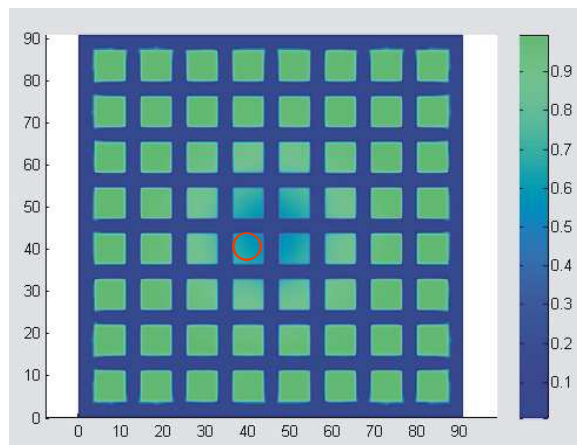


Abb. 4.66: Skizze zur Beschreibung der Lage des ROI im Bleichfleck bei Serie 03. Der ROI ist mit einem roten Kreis markiert.

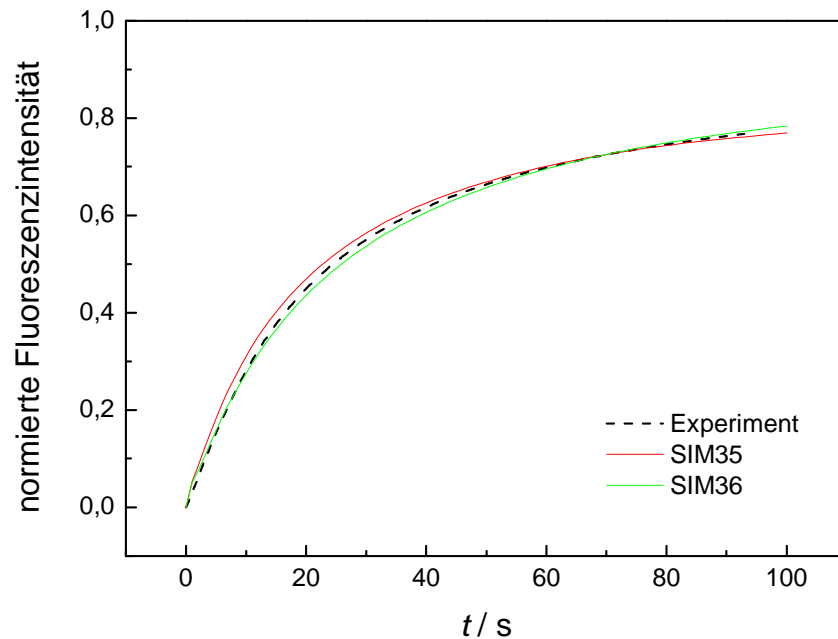


Abb. 4.67: Recovery-Kurven aus der FEM-Simulation für Serie 03 (---). Die beste Übereinstimmung zwischen Simulation und FRAP-Messung ergeben SIM 35 (rot, $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) und SIM 36 (grün, $D_{\text{Steg}} = 1,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

Die Simulationskurven zur zugehörigen Datenanpassung der Messung sind in Abb. 4.67 dargestellt. Die Kurvenverläufe SIM 35 (Abb. 4.67, rote Kurve) und Sim 36 (Abb. 4.67, grüne Kurve) liefern die beste Übereinstimmung mit der Kurvenanpassung der FRAP-Messung. Die beiden Diffusionskoeffizienten für SIM 35 sind definiert als: $D_{\text{Steg}} = 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Für SIM 36 betragen sie $D_{\text{Steg}} = 1,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Eine exakte Übereinstimmung ist hier jedoch nicht gegeben, da der eigentliche Mittelpunkt des Bleichflecks und somit der ROI ebenfalls direkt auf den Stegen liegen müsste. Der ROI wurde jedoch, wie gezeigt, auf eine der vier gebleichten Poren gesetzt. So ist eine genaue Übereinstimmung vor allem im mittleren Bereich des Kurvenverlaufs in der Simulation nicht gegeben.

Für die letzte der ausgewählten Serien, Serie 04, wurde ebenfalls eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen Simulationskurve und Kurvenanpassung aus dem Experiment angestrebt. Bei dieser Serie war die Lage des Bleichflecks, ähnlich der vorherigen Serie 03, über vier Poren gleichmäßig verteilt. Allerdings waren die

Bleichtiefe und die Halbwertsbreite der Gaußkurve geringer. Daher wurde der ROI, ähnlich dem der Serie 03, auf den Mittelpunkt einer der vier gebleichten Poren gesetzt. Der Radius des ROI betrug ebenfalls $1 \mu\text{m}$.

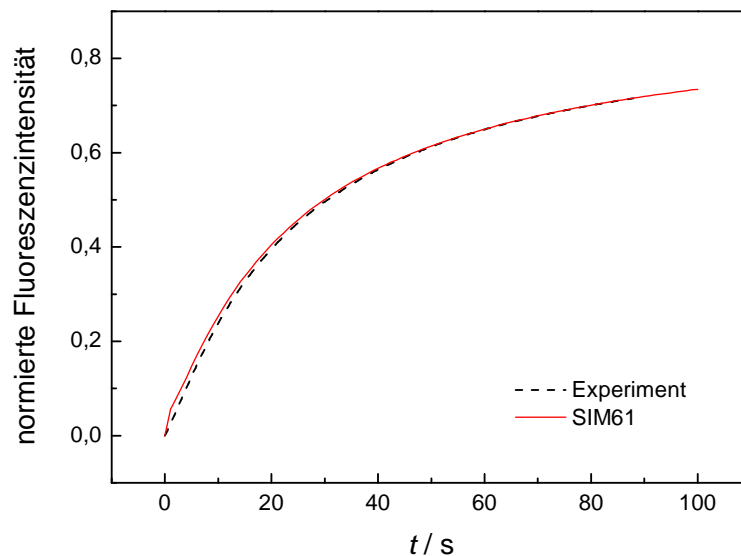


Abb. 4.68: Recovery-Kurven aus der FEM-Simulation für Serie 04 (----). Die beste Übereinstimmung zwischen Simulation und FRAP-Messung lieferte SIM 61 (roter Kurvenverlauf, $D_{\text{Steg}} = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

In Abb. 4.68 sind die Simulationskurven zur Datenanpassung nach dem Modell von Axelrod der Serie 04 dargestellt. Die beste Übereinstimmung der Simulation zur Messung liefert SIM 61 (Abb. 4.68, roter Kurvenverlauf) mit den Werten für die Diffusionskoeffizienten $D_{\text{Steg}} = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $D_{\text{Pore}} = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Hier konnte jedoch keine exakte Übereinstimmung im vorderen Bereich des Kurvenverlaufes erzielt werden, das darauf zurückzuführen ist, dass der Mittelpunkt des ROI nicht vollständig mit dem des Bleichfleckes in Übereinstimmung gebracht werden konnte.

Tabelle 4.5 fasst noch einmal die Werte zusammen, die am besten mit der Messung übereinstimmen und sich aus den Simulationen für die beiden Diffusionskoeffizienten auf dem Stegbereich und über den Poren für die effektive Diffusionskoeffizienten der ursprünglich hier gezeigten FRAP-Messungen ergeben.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der besten Simulationswerte für D_{Steg} und D_{Pore} im Bezug auf den effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} der hier zur FEM-Simulation herangezogenen FRAP-Messungen.

Serie	$D_{\text{eff}} / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$D_{\text{Steg}} / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$D_{\text{Pore}} / \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
01	(19,9 ± 0,6)	5	20
02	(17,8 ± 2,2)	2	20
		2	25
03	(21,9 ± 0,7)	2	20
		1,5	20
04	(6,2 ± 1,4)	1	20

Aus den durchgeführten Simulationen und der Auswahl der Ergebnisse der Simulationen, die hier in der Arbeit gezeigt wurden, kann geschlossen werden, dass der effektive Diffusionskoeffizient gut durch die beiden Diffusionskoeffizienten für den Steg- und Porenbereich beschrieben werden kann. Hierbei liegt der Diffusionskoeffizient für den Stegbereich höher als in der Literatur für die laterale Diffusion auf DPTE funktionalisierten Oberflächen beschrieben wird. Er beträgt je nach Lage, Größe und Bleichtiefe des Bleichflecks und des Ausdünnzustandes der mikro-BLM zwischen $0,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Dieser Wertebereich für die Diffusionsgeschwindigkeiten auf den Stegen kann unter anderem dem Lösungsmiteleinfluss auf die mikro-BLMs zugeschrieben werden. Für den Diffusionskoeffizienten der mikro-BLMs über den Poren ergibt sich ein Wertebereich von $10 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bis $30 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, der gut mit den Werten einer klassischen BLM in Übereinstimmung gebracht werden kann.

5 DISKUSSION

5.1 Stabilitätsmessungen an mikro-BLMs mittels der Impedanzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Die mikro-BLMs sind ein neuartiges Modellsystem für biologische Membranen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die physikalischen Eigenschaften von porenüberspannenden Membransystemen auf porösen Siliziumsubstraten mit Porendurchmessern im Mikrometerbereich hinsichtlich der Langzeitstabilität und der elektrischen Eigenschaften mittels Impedanzspektroskopie als integrale Methode untersucht. Die Präparation der mikro-BLMs, bestehend aus dem Lipid 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC), erfolgte über die *Painting*-Technik, die mit der Müller-Rudin-Methode³⁵ zur Herstellung von klassischen *black lipid membranes* (BLM) verglichen werden kann. Das poröse Siliziumsubstrat wurde vor der Präparation der porenüberspannenden Membranen mit Gold beschichtet und mit dem thioltragenden Phospholipid 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTe) funktionalisiert^{49, 110, 111}. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde herangezogen, um visuell die beobachtete zeitliche Veränderung des Membranwiderstands, die in der Impedanzspektroskopie detektiert wurde, auf der Probe lokal zu ergründen.

Untersuchung der Langzeitstabilität von mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit 7 µm Porendurchmesser mittels Impedanzspektroskopie

Die impedanzspektroskopischen Messungen erfolgten an porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 7 µm. Nach Bildung der Membran beträgt der Membranwiderstand mehr als 3 GΩ. Vom Impedanzgerät kann dieser Wert im beobachteten Frequenzbereich von 10⁻³ bis 10⁶ Hz nicht detektiert werden. Die

Kurvenanpassung für das Impedanzspektrum wird daher mit einer einfachen Serienschaltung, bestehend aus dem Ohmschen Elektrolytwiderstand und der Membrankapazität durchgeführt (Abb. 4.1 (A))¹¹². Das liefert unter der Einbeziehung der gesamten betrachteten porösen Fläche von 53 % bei den Siliziumsubstraten mit 7 µm Porendurchmesser eine spezifische Membrankapazität von $C_m = 0,7 \mu\text{F cm}^{-2}$, die gut mit den Werten aus früheren Arbeiten für mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC, übereinstimmt¹¹³. Die Porosität der Fläche wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der porösen Substrate ermittelt.

Die spezifische Membrankapazität der mikro-BLMs liegt in dem in der Literatur für klassische BLMs angegebenen Bereich von 0,4 bis 0,8 µF cm⁻²¹¹⁴. Die Variationsbreite der Membrankapazitäten bei den klassischen BLMs kann mit unterschiedlichen Präparationstechniken erklärt werden. Es sind zwei Arten der BLM-Herstellung zu unterscheiden, zum einen die Lösungsmittelfreie Präparation nach Montal-Müller³⁶ und zum anderen die Müller-Rudin-Technik³⁵ bei der die Präparation der BLM über ein Lipid-Lösungsmittel-Gemisch erfolgt. Bei einer „Müller-Rudin“-BLM befinden sich nach Membranbildung immer noch Reste des verwendeten Lösungsmittels im System. Die Lösungsmittelmoleküle lagern sich zwischen den Fettsäureketten ein und führen zu einer größeren Membrandicke. Diese Lösungsmittelreste tragen somit bei der Impedanzspektroskopie zu einem höheren Wert der spezifischen Membrankapazität bei¹¹⁴.

Da es sich bei den untersuchten porenüberspannenden Membranen um lösungsmittelhaltige mikro-BLMs handelt, ist der Wert der spezifischen Membrankapazität von $C_m = 0,7 \mu\text{F cm}^{-2}$ im oberen Bereich der klassischen BLMs zu finden. Diese gute Übereinstimmung der Werte für die Membrankapazität der mikro-BLMs und der klassischen BLMs liegt daran, dass bei beiden System die Poren mit einer Lipiddoppelschicht belegt sind. Diese Lipiddoppelschicht weist sowohl bei den klassischen BLMs als auch bei den hier untersuchten mikro-BLMs eine gute Isolatoreigenschaft auf. Das ist auch anhand der Höhe des Membranwiderstands der mikro-BLMs zu sehen, der über 3 GΩ liegt. Bei einer klassischen BLM liegt dieser etwa im Bereich von 10 GΩ^{115, 116}. Bei den Systemen der mikro-BLMs kann bei den Werten im Gigaohmbereich des Membranwiderstands ausgegangen werden, dass sie elektrisch

dicht sind. Der niedrigere Wert des Membranwiderstandes im Vergleich zu dem der klassischen BLMs ist auf den Unterschied der Größe der überspannten Poren, Lösungsmittelleffekte und die Oberflächenstruktur der porösen Siliziumsubstrate zurückzuführen.

Mit der Zeit sinkt der Membranwiderstand der porenüberspannenden Membranen und kann vom verwendeten Impedanzgerät detektiert werden. Die Kurvenanpassung des Impedanzspektrums wird mit einem Ersatzschaltkreis bestehend aus einer Parallelschaltung aus Membranwiderstand R_m und Membrankapazität C_m , die sich in Reihe zum Ohmschen Elektrolytwiderstand R_{el} befindet (Abb. 4.1 (B)), durchgeführt. Nach 2,2 h ergibt sich für den Membranwiderstand ein Wert von 2,7 G Ω . Die spezifische Membrankapazität steigt auf 1,0 $\mu\text{F cm}^{-2}$. Der Effekt der Erhöhung der spezifischen Membrankapazität konnte bei Messungen zum induzierten Reißen an negativ und und zwitterionisch geladenen BLMs aus den Lipiden DPhPC, 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DPhPS), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphatidylcholin (POPC) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (POPS) von Diederich *et al.* ¹¹⁷ ebenfalls beobachtet werden. Sie verwendeten hierbei die Elektroporationsmethode und erreichten dadurch eine gezielte Zerstörung einer BLM, die sich über eine 1 mm große Apertur spannte. Demnach wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung der spezifischen Membrankapazität mit dem Reißen der mikro-BLMs über einzelne Poren einhergeht. Der Membranwiderstand sinkt hingegen mit der Zeit. Dies wurde auch von Römer und Steinem an nano-BLMs mit einem Porendurchmesser von 280 nm auf porösem Aluminiumoxid impedanzspektroskopisch beobachtet ⁴⁸. Für den Abfall des Membranwiderstands wurde die Vermutung aufgestellt, dass dies die Folge eines individuellen Reißens von einzelnen nano-BLMs ist. Das mögliche Reißen der mikro-BLMs kann wie auch bei den klassischen BLMs über die laterale Spannung erklärt werden. So wurde bei den klassischen BLMs beobachtet, dass bei zu kleiner Spannung hohe Fluktuation in diesem System auftreten und bei zu hoher Spannung die BLM plötzlich reißt ¹¹⁸. Die elastischen Eigenschaften einer klassischen BLM wurden in den Arbeiten von Ovalle-Garcia und Ortega-Blake anhand *atomic force microscope* (AFM) Messungen untersucht ¹¹⁹. Die BLM aus *L*- α -Phosphatidylcholine wurde über ein Loch mit 15 μm Durchmesser gespannt. Über die AFM-Messungen konnte zum einen eine

BLM abgebildet werden und zum anderen war durch Erhöhung der Normalkraft ein induziertes Reißen der BLM möglich. Die bei diesen Untersuchungen der elastischen Eigenschaften einer BLM ermittelten Elastizitätskonstante betrug $(1,9 \pm 0,2) \text{ mN m}^{-1}$.

8,3 h nach Membranbildung über den Poren befindet sich der Membranwiderstand im $M\Omega$ -Bereich. Die Isolatoreigenschaften der Membran über den Poren haben sich weiter verringert. Das bedeutet eine Veränderung der Oberflächenbedeckung des porösen Substrates mit der Zeit, die in der Impedanzspektroskopie detektiert werden kann. Die Oberfläche wird inhomogener und daher liefert die Kurvenanpassung der Impedanzdaten mit dem Ersatzschaltbild aus Abb. 4.1 (B) keine gute Übereinstimmung mehr. Der ideale Kondensator wird daher im Ersatzschaltbild durch ein *constant phase element* (CPE) ersetzt (Abb. 4.1 (C)). Ein solches CPE-Element beschreibt ein verzweigtes Netzwerk von Kapazitäten und Ohmschen Widerständen^{70, 120}. Die Definition des CPE-Elements ist Gleichung (3.3) zu entnehmen. Der darin enthaltene Parameter α beschreibt die Abweichung vom idealen Verhalten eines Kondensators und liegt zwischen Null und Eins. Bei Eins liegt ein idealer Kondensator vor^{68, 121}. α konnte aus der Datenanpassung zu 0,92 bestimmt werden, was noch sehr nahe am Verhalten eines idealen Kondensators liegt. Allerdings ist daraus die Veränderung der Bedeckung der Oberfläche des porösen Substrates zu erkennen. Diese Inhomogenität der Oberfläche beruht auf einem möglichen Reißen der mikro-BLMs über den Poren.

Ein ähnliches Verhalten im Abfall des Membranwiderstandes ist auch bei den nano-BLMs, die sich über ein poröses Aluminiumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 280 nm spannen, in den Arbeiten von Römer *et al.* zu beobachten^{48, 112}. Eine genaue Betrachtung des Zeitfensters, in dem der Membranwiderstand nach Präparation der Membran um eine Größenordnung abgefallen ist, zeigt, dass die Membranen auf den großen Porendurchmessern im Mikrometerbereich im Gegensatz zu denen auf Porendurchmessern mit 280 nm schneller reißen. Hier ist zu schlussfolgern, dass, je kleiner die Poren sind, desto stabiler ist das System auf den porösen Substraten. Bei einer Abschätzung der Leitfähigkeitsänderung bei dem Reißen einer einzelnen porenüberspannenden Membran ergibt sich für die mikro-BLMs über den 7 μm Poren eine Änderung von $10^{-12} \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$ und bei den nano-BLMs über den 280 nm Poren eine Änderung von $10^{-13} \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$. Hieran ist zu erkennen, dass das Reißen einer einzelnen

nano-BLM bezüglich der Leitfähigkeit keine so große Änderung für das Gesamtsystem mit sich bringt, wie das Reißen einer einzelnen mikro-BLM, was sich auch in der Impedanzmessung zeigt. Bei BLMs auf einer porösen Fläche mit $1\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser, die über *Micropatterning* hergestellt wurden, konnte nach Favero *et al.* eine Langzeitstabilität von bis zu drei Tagen nachgewiesen werden ⁴⁴. Kleinere Poren sind demnach eine bessere Ausgangsposition für hochohmige und über einen längeren Zeitraum stabile Membranen. Dies ist ein Vorteil gegenüber klassischen BLMs, bei denen eine Stabilität aus der Literatur von etwa 50 h angegeben werden kann ¹²².

Bei porenüberspannenden Membranen auf porösen Siliziumsubstraten mit einer Oktadekanthiol (ODT)-Funktionalisierung anstelle einer DPPE-Funktionalisierung wurden ähnliche Ergebnisse erhalten ¹¹³. Der anfängliche Membranwiderstand liegt ebenfalls im Gigaohm Bereich und sinkt mit der Zeit ab. Als mittlere spezifische Membrankapazität der mikro-BLMs konnte ein Wert von $1,0\ \mu\text{F cm}^{-2}$ ermittelt werden.

In den impedanzspektroskopischen Messungen wurde nach 8,3 h die Datenanpassung mit einem Ersatzschaltkreis, der ein CPE anstelle eines Kondensators beinhaltete, durchgeführt. Die Datenanpassung mit dem Ersatzschaltbild mit einem Kondensator brachte keine genaue Übereinstimmung mehr. Als möglicher Grund wurden hier Inhomogenitäten der porenüberspannenden Membranen angeführt. Der visuelle Nachweis dieser in der Impedanz festgestellten Inhomogenität hinsichtlich der Abweichung vom idealen Verhalten eines Kondensators erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Reißprozess der mikro-BLMs, der für die Inhomogenitäten in der Impedanz verantwortlich war, wurde für die porösen Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von $7\ \mu\text{m}$ und den porösen Substraten mit Porendurchmessern von $2\ \mu\text{m}$ aufgezeichnet. Die kleinere Porengröße mit $2\ \mu\text{m}$ konnte in der impedanzspektroskopischen Untersuchung nicht herangezogen werden, da die Probengeometrie sich störend auf die Impedanzmessungen auswirkte.

Untersuchung der Langzeitstabilität von mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit 7 µm Porendurchmesser mittels Fluoreszenzmikroskopie

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, wurde das poröse Substrat mit Gold besputtert und mit dem Thiolipid DPPE funktionalisiert. Die darauf ausgedünnten mikro-BLMs waren für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen mit 0,1 mol% Texas Red DHPE dotiert. Im Fluoreszenzmikroskop ist eine räumliche Trennung des Stegbereichs und Porenbereiches, über den sich die mikro-BLMs spannen, möglich. Auf den funktionalisierten Stegbereichen wird die Fluoreszenz des sich in der Lipidmonoschicht befindlichen Fluorophors durch das Gold auf den Stegen gelöscht^{123, 124}. Daher erscheint der Stegbereich in den Fluoreszenzaufnahmen schwarz (Abb. 5.1).

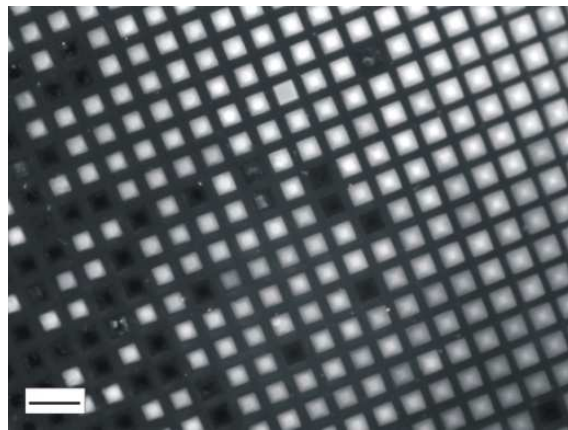


Abb. 5.1: Fluoreszenzaufnahme von mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 7 µm. Die Fluoreszenz des TexasRed DHPE wird auf den mit Gold besputterten Stegen gelöscht. Poren, über denen sich keine mikro-BLMs befinden, erscheinen ebenfalls schwarz. Der Maßstabsbalken im Bild entspricht 20 µm.

In den fluoreszenzmikroskopischen Messungen (vgl. Abb. 4.4) konnte bereits nach einer halben Stunde ein Reißen von einzelnen mikro-BLMs über den Poren festgestellt werden. Anhand der im Ergebnisteil gezeigten Fluoreszenzbilder (Abb. 4.4) ist gut zu erkennen, dass in der beobachteten Probenstelle die mikro-BLMs unabhängig voneinander gerissen sind. Jede mikro-BLM auf den porösen Substraten kann als einzelnes System betrachtet werden, mit dem ebenfalls einzeln gearbeitet werden kann. Diese Eigenschaft der mikro-/nano-BLMs auf porösem Substraten machten sich auch Böcker *et al.* in ihrer Arbeit an nano-BLMs auf porösem Silizium mittels *scanning ion*

conductance microscopy (SICM) zu nutze, indem sie die porenüberspannenden Membranen einzeln manipulieren konnten¹²⁵.

Bei einem Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten τ für den zeitlichen Abfall des Membranwiderstands, der aus der Pixelanalyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des zeitlichen Reißverhaltens der mikro-BLMs erhalten wurde, ergibt sich aus beiden Messmethoden ein ähnlicher Wert. Für die Geschwindigkeitskonstante τ aus dem zeitlichen Verlauf für die Membrankapazität und des Membranwiderstands ergibt sich ein Wert von 2,9 bis 3,3 h⁻¹. Die Pixelanalyse der Fluoreszenzaufnahmen liefert eine Geschwindigkeitskonstante τ von 1,4 bis 4,2 h⁻¹. Die größere Variationsbreite der Werte der Geschwindigkeitskonstanten aus den fluoreszenzmikroskopischen Analysen resultiert daraus, dass es sich hier nicht, wie bei der Impedanzspektroskopie um eine integrale Messmethode handelt, bei der der gesamte Bereich der präparierten mikro-BLMs über den Poren gemessen wird, sondern auf einen kleinen Bereich der Probe beschränkt ist. Somit kann auch nur eine Aussage über den beobachteten Bereich getroffen werden. Das lässt sich auch aus der Pixelanalyse des Reißverhaltens der mikro-BLMs schließen. Basierend auf dieser Pixelanalyse (s. Abb. 4.5) ist ersichtlich, dass nach den ersten drei Stunden etwa 70 % der mikro-BLMs gerissen sind. Bei einem Vergleich dieses Ergebnisses mit denen der Impedanzmessungen (s. Abb. 4.2), erscheint der Anteil der mit mikro-BLMs bedeckten Poren in der Fluoreszenzmikroskopie zu gering, um repräsentativ für die gesamte präparierte Probenfläche zu stehen. In der Fluoreszenzmikroskopie waren auf der Probe stabile Bereiche festzustellen, auf denen die mikro-BLMs flächendeckend vorhanden waren. Die beobachtete Fläche in der Fluoreszenzmikroskopie entspricht circa 3 % der Fläche bei den impedanzspektroskopischen Untersuchungen. So konnten nach mehreren Stunden Messzeit verschiedene Bedeckungszustände der mikro-BLMs auf dem porösen Substrat beobachtet werden (vgl. Abb. 4.6). Es ist somit ein entscheidender Punkt, an welcher Stelle der Probe in der Fluoreszenzmikroskopie das Reißen der mikro-BLMs beobachtet wird. Je nachdem verändert sich die Geschwindigkeitskonstante τ mit der das Reißen der mikro-BLMs zeitlich beschrieben werden kann. Es konnte hier die Vermutung von Römer und Steinem, dass der Abfall im Membranwiderstand bei den impedanzspektroskopischen Messungen an nano-BLMs auf ein individuelles Reißen der

nano-BLMs zurückzuführen ist ⁴⁸, erstmals visuell anhand der fluoreszenz-mikroskopischen Messungen nachgewiesen werden.

Die Abhängigkeit der Stabilität der mikro-BLMs über den Poren von der Funktionalisierung wurde ebenfalls näher untersucht. Das Substrat wurde mit dem Thiol ODT funktionalisiert. Zu beobachten war ein ähnlicher Reißprozess, wie auf den mit DPPTe funktionalisierten Substraten; jedoch lief dieser wesentlich schneller auf den mit ODT funktionalisierten Substraten ab, als auf den mit DPPTe funktionalisierten. Ein Grund für dieses schnellere Reißen der mikro-BLMs auf den ODT funktionalisierten Substraten könnte in der Struktur des ODT zu suchen sein. Gegenüber dem DPPTe weist das ODT eine größere Rigidität auf ¹²⁶, was dazu führen kann, dass die einzelnen Membranen stärker mechanisch miteinander gekoppelt sind. Das würde das schnellere Reißen der mikro-BLMs im beobachteten Gebiet in der Fluoreszenzmikroskopie erklären. Auch hier waren zum Ende des Experimentes Bereiche auf der Probe feststellbar, die vergleichbar mit den DPPTe funktionalisierten Substraten fast vollständige Bedeckung aufwiesen.

Untersuchung der Langzeitstabilität von mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten mit 2 µm Porendurchmesser mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte es, poröses Siliziumsubstrat mit einer anders gearteten Probengeometrie in die Untersuchung des Reißverhaltens und der Langzeitstabilität der mikro-BLMs mit einzubeziehen. Es war damit möglich, kleinere Porengrößen zu verwenden, über die die mikro-BLMs gespannt wurden. Die Probengeometrie (vgl. Abb. 3.17 (B)) erwies sich allerdings für impedanzspektroskopische Untersuchungen ungeeignet. Die Porösität der Siliziumsubstrate mit 2 µm Porendurchmesser wurde aus Elektronenmikroskopaufnahmen ermittelt und betrug 48 %. Sie war somit geringer als bei den Substraten mit 7 µm Porendurchmesser, hier lag die Porösität bei 53 %. Ebenso liegt bei den porösen Substraten mit 2 µm Porendurchmesser bedingt durch die Probengeometrie kein gleichmäßiges Ausdünnverhalten vor, wie es bei den porösen Siliziumsubstraten mit 7 µm Porendurchmesser und bei nano-BLMs mit einem

Porendurchmessern von 60 nm auf den porösen Aluminaten mittels Impedanzspektroskopie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte¹²⁷. Der Ausdünnprozess bei den nano-BLMs wurde über den Phasenwinkel nach dem Aufbringen eines Lipid-Lösungsmitteltröpfens auf das poröse Aluminat bei einer Frequenz von 10^6 Hz impedanzspektroskopisch verfolgt. Es war ein gleichmäßiges langsames Abklingen des Phasenwinkels bei dieser Frequenz festzustellen das auf ein erfolgreiches Ausdünnen der nano-BLMs schließen lässt. Da die porösen Aluminate, wie auch die porösen Siliziumsubstrate mit 7 μm Porendurchmesser, eine durchgängige poröse Fläche aufwiesen, war es dem verwendeten Lösungsmittel *n*-Dekan möglich gleichmäßig während des Ausdünnens aus dem entstehenden Membransystem in kürzester Zeit herauszudiffundieren. Bei den porösen Siliziumsubstraten mit 2 μm Porendurchmesser jedoch konnte beobachtet werden, dass sich ein Lösungsmittel-Lipid-Fluorophor-Gemisch an den Übergangsbereichen der porösen Flächen zu den Festkörperbereichen ansammelte. Diese Übergangsbereiche könnten mit Barrieren gleichzusetzen sein, die eine gleichmäßige Membranbildung behindern. Nissen *et al.* konnten zeigen, dass die Struktur einer Oberfläche das Spreitverhalten einer Membran maßgeblich beeinflusst¹²⁸. In ihren Experimenten wurde das Fließverhalten des Lösungsmittels auf Substraten mit einer hochgeordneten und einer ungeordneten Struktur der Oberflächen untersucht. Bei den ungeordneten Strukturen konnte festgestellt werden, dass die Front des Lösungsmittels im Gegensatz zu den geordneten Strukturen nicht gleichmäßig verlief. Für den Fall der porösen Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von 2 μm könnte dies bedeuten, dass eine gleichmäßige Membranbildung in den Porenbereichen nicht gegeben ist, da die Festkörperbereiche die poröse Bereiche unterbrechen und das Lösungsmittel sich in diesem Übergang vom porösen zum Festkörperbereich ansammelt.

Das Lösungsmittel-Lipid-Fluorophor-Gemisch wurde des Weiteren sehr stark von der Wärmeentwicklung durch die Beleuchtung der Probe beeinflusst und wies eine hohe Mobilität auf den Substraten auf. So konnte anfänglich kein Reißprozess auf den Porenbereichen festgestellt werden. Diese thermisch bedingte Mobilität des Lösungsmittels ist vergleichbar mit dem in der Impedanzspektroskopie durch Römer *et al.* festgestellte Verhalten des Membranwiderstands bei nano-BLMs auf

porösen Aluminaten⁴⁸. Es wurde hier ein erneuter Anstieg des Membranwiderstands nach zwischenzeitlich niedrigeren Werten beobachtet. Dieser Anstieg wurde dem restlichen Lösungsmittel in den nano-BLMs nach dem Ausdünnen zugeschrieben und als *self healing* gedeutet. Das heißt, dass bereits gerissene Poren durch Lösungsmittelreste in der Membran geschlossen werden können⁴⁸. Das *self healing*, das zur Bildung einer neuen porenüberspannenden Membran führt, konnte bei den porösen Siliziumsubstraten durch die thermisch erhöhte Beweglichkeit des Lösungsmittels nach Einschalten der Beleuchtungseinheit des Fluoreszenzmikroskops beobachtet werden. Da jedes Einschalten der Lichtquelle die Bildung von neuen porenüberspannenden Membranen zur Folge hatte, waren ein Ausdünnen und ein Reißen der mikro-BLMs nicht feststellbar.

Durch den Austausch der Quecksilberdampf Lampe, die sich direkt im Strahlengang des Mikroskopes befand, gegen ein anderes Modell, bei dem das Anregungslicht über einen Lichtleiter in den Strahlengang gekoppelt wurde, konnte das Aufheizen der Probe reduziert werden. Ebenso wurde versucht bei der Präparation der porenüberspannenden Membranen möglichst wenig Lösungsmittel auf die Probe zu übertragen. Somit waren auch bei den Substraten mit kleinerem Porendurchmesser eine Bildung der mikro-BLMs und ein später beobachtbares Reißen möglich. Wie bei den Substraten mit 7 µm Porendurchmesser war auch hier nach der Messung ein Unterschied in der Bedeckung der Poren mit mikro-BLMs abhängig von der Stelle auf der Probe zu sehen.

Die Pixelanalyse der Fluoreszenzaufnahmen der mikro-BLMs auf dem porösen Siliziumsubstrat mit 2 µm Porendurchmesser weist einen fast linearen zeitlichen Abfall in der Bedeckung des porösen Substrates mit den mikro-BLMs auf. Innerhalb der ersten halben Stunde nach dem Ausdünnen fällt die Bedeckung auf 79 % ab und sinkt weiter nahezu linear, so dass nach 3,5 h nach Messbeginn nur noch 2 % der ursprünglich fluoreszierenden Poren mit einer mikro-BLM bedeckt sind. Bei den Substraten mit 7 µm Porendurchmesser konnte ein exponentieller zeitlicher Abfall ermittelt werden. Dieser Unterschied in beiden zeitlichen Abfällen kann mit einer unterschiedlichen Anzahl von mikro-BLMs im beobachteten Bereich der Probe erklärt werden. Bei den Substraten mit kleineren Porendurchmessern zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mehr

bedeckte Poren als bei den Substraten mit Porendurchmessern von 7 μm . Ebenfalls ist die anders geartete Probengeometrie und Porenform bei den kleineren Porendurchmessern zu berücksichtigen, die durchaus einen Einfluss auf die mikro-BLMs ausüben können, wie es schon beim oben beschriebenen Ausdünnverhalten zu sehen war. Bei den Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop ist das Reißen der mikro-BLMs, wie auch auf den Substraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm , auf den beobachteten Bereich beschränkt. So fanden sich auch hier Bereiche mit einer hohen Bedeckungsrate der Poren.

Die Ergebnisse des langsamen Abfalls des Membranwiderstands über die Zeit in der Impedanzspektroskopie und der visuelle Nachweis des Reißprozesses der mikro-BLMs auf den porösen Siliziumsubstraten über die Fluoreszenzmikroskopie bestätigen, dass der Reißprozess nicht alle Probenregionen gleichermaßen betrifft. Die Langzeitstabilität der mikro-BLMs sowie der nano-BLMs ist von der Porengröße und von der Probengeometrie abhängig.

5.2 Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Messungen an artziellen Membranen ermöglichen es, die laterale Diffusion von Lipiden und integralen Proteinen in einer zweidimensionalen planaren Lipiddoppelschicht zu ermitteln⁸⁰. Daher eignete sich diese Messmethode, um die laterale Beweglichkeit der Lipide in den mikro-BLMs zu charakterisieren.

Da das System der porenüberspannenden Membranen im Zuge dieser Arbeit bezüglich der lateralen Diffusion zum ersten Mal untersucht wurde, ist ein direkter Vergleich mit Daten aus der Literatur nicht möglich. Ein System, das am ehesten hiermit im lateralen Diffusionsverhalten und auch in der Präparationstechnik³⁵ verglichen werden kann, sind die klassischen BLMs. Beide Membransysteme werden über die *Painting*-Technik hergestellt. Im Zuge dieser Arbeit wurde daher zunächst an einer klassische BLM, bestehend aus DPhPC, dotiert mit dem 0,2 mol% des Fluorophor BODIPY 500/510 HPC FRAP-Messungen durchgeführt. Direkt nach dem Aufbringen der Lipid-Fluorophor-Mischung, die in *n*-Dekan gelöst war, war zunächst eine FRAP-Messung an der entstehenden BLM aufgrund einer hohen Mobilität nicht möglich. Der Bleichfleck diffundierte infolge der Anwesenheit des *n*-Dekans aus dem Bereich des *region of interest* (ROI) heraus. Ein Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität durch Lipiddiffusion in der BLM konnte daher nicht beobachtet werden. Erst bei einer Wartezeit von 30 min bis zu 1 h lag eine ausgedünnte BLM vor. Das heißt, dass das zur Präparation verwendete organische Lösungsmittel aus dem Lipid-Lösungsmitteltropfen in das wässrige Medium und in den Randbereich des Loches, der sogenannten Plateau-Gibbs-Grenze (vgl. Abb. 1.3) diffundiert ist und sich eine Lipiddoppelschicht über das Loch im Substrat spannte. Danach war es erst möglich FRAP-Messungen an diesem System durchzuführen. Die Werte für den Diffusionskoeffizienten lagen zwischen 18 und 54 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Diese hohe Variation der Werte können dem Einfluss von Lösungsmittelresten in der BLM zugeschrieben werden. Die hohen Werte für Diffusionskoeffizienten sind durchaus für eine BLM vertretbar. So ergab sich z. B. ein

Wert von $32 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für die laterale Diffusion von einer fluiden „DPPC-BLM“ oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur bei Fahey *et al.*¹²⁹.

Dass die gemessene hohe laterale Beweglichkeit in einer BLM dem restlichen Lösungsmittel zugeschrieben werden kann, ist ersichtlich aus einem Vergleich von Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelhaltigen mit der lösungsmittelfreien Präparation. Sonnleitner *et al.* führte FRAP-Messungen an einer Müller-Rudin-BLM bestehend aus POPC und POPE (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamin) (Verhältnis 3:7) durch¹³⁰. Sie erhielten einen Wert von $(20,6 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für den Diffusionskoeffizienten der lösungsmittelhaltigen BLM. Ladha *et al.* hingegen erhielten für den Diffusionskoeffizienten an einer lösungsmittelfreien Montal-Müller-BLM bestehend aus POPC und DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) (Verhältnis: 7:3) einen Diffusionskoeffizienten von $(13,2 \pm 1,1) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ¹³¹. Der Vergleich der Diffusionskoeffizienten der beiden unterschiedlich präparierten BLMs zeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide bei den lösungsmittelhaltigen BLMs höher ist. Dieser Unterschied kann auf die Anwesenheit von Lösungsmittelresten zurückgeführt werden, welche die laterale Mobilität in einer BLM erhöhen, da der höhere Diffusionskoeffizient aufgrund der verwendeten Lipide eher bei der lösungsmittelfreien BLM zu erwarten wäre. Bei der Montal-Müller-BLM wurde eine Lipidmischung aus POPC und DOPE verwendet. DOPE benötigt in der BLM mehr Platz als POPE, da es bei beiden Fettsäureketten eine *cis*-Doppelbindung aufweist. Dieser erhöhte Platzbedarf führt zu einer höheren Diffusionsgeschwindigkeit, da die van-der-Waals Kräfte zwischen den Lipiden weniger stark ausgebildet werden können, als bei einer dichter gepackten Lipiddoppelschicht (vgl. Kapitel 1.3). Bei den in dieser Arbeit verwendeten BLMs aus DPhPC liegt ebenfalls ein erhöhter Platzbedarf aufgrund der Methylseitengruppen in den beiden Fettsäureketten vor. Allerdings wird auch bei den BLMs aus DPhPC die hohe Mobilität, wie auch bei den Montal-Rudin-BLMs von Sonnleitner *et al.*, durch das restliche Lösungsmittel nach Membranbildung mitbestimmt.

Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 7 μm

Bei den mikro-BLMs handelt es sich um BLMs, die sich über ein kleineres Loch auf einem porösen Substrat spannen. Auf diesem porösen Substrat befinden sich viele solcher BLMs. Hinsichtlich des Messaufbaus für die FRAP-Messungen, war es nicht möglich, die Größe des Laserspots auf eine mikro-BLM bestehend aus DPhPC zu fokussieren. Daher wurden bei den FRAP-Messungen mehr als eine mikro-BLM gebleicht und trugen auch somit zusammen zur Diffusionsgeschwindigkeit bei. Die Porengröße, über die sich die mikro-BLMs spannten, betrug 7 μm . Bei den FRAP-Messungen wurden ein aus 30 Messungen gemittelten Diffusionskoeffizienten von $(15,7 \pm 4,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(14 \pm 3) \%$ erhalten. Bei einem Vergleich der Diffusionskoeffizienten aus den FRAP-Messungen an BLMs^{130, 131} ist ersichtlich, dass dieser Wert geringer ist als der einer klassischen BLM. Demnach trägt noch ein zweiter Faktor zur Diffusiongeschwindigkeit bei. Dieser ist auf den funktionalisierten Stegbereichen des porösen Substrates zu finden. Auf den Stegen bildet sich eine Lipidmonoschicht auf der mit DPTE funktionalisierten Oberfläche aus. Diese funktionalisierte Oberfläche wirkt diffusionshemmend auf die Monoschicht und daher verlangsamt sich die Diffusiongeschwindigkeit des gesamten gemessenen Systems. Es liegt hier zum einen eine schnellere Diffusion im porenüberspannenden Bereich vor und zum anderen eine wesentlich langsamere Diffusion, vergleichbar mit der Diffusion auf festkörperunterstützten Membranen. Bei festkörperunterstützten Membranen wird die Mobilität der Membran durch das Substrat beschränkt und fällt daher geringer aus, als bei einer freistehenden Membran. Für den Diffusionskoeffizienten können je nach verwendeten Lipiden Werte zwischen 0,3 und 4 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ angegeben werden¹³²⁻¹³⁴. Dies lässt sich auch an den durchgeführten Messungen einer auf Siliziumdioxid präparierten DPhPC-Membran erkennen. Der Diffusionskoeffizient liegt hier bei $(2,8 \pm 1,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und ist etwa um einen Faktor 5 niedriger als der bei den mikro-BLMs auf dem porösem Silizium mit einem Porendurchmesser von 7 μm . Der immobile Anteil einer festkörperunterstützten Membran bestehend aus DPhPC liegt mit $(32 \pm 3) \%$ etwa um einen Faktor 2 höher als der der mikro-BLMs. Im immobilen Anteil, der aus den FRAP-Messungen erhalten wird, werden die Moleküle in einer Membran zusammengefasst,

die nicht zum Austausch zwischen dem gebleichten und dem ungebleichten Part der Membran beitragen. Diese Immobilität von Membranbausteinen kommt zum einen in nativen Membranen durch Wechselwirkungen der Lipide bzw. Proteine untereinander zustande, z. B. geladene Lipide, unterschiedliche Lipidstrukturen, Proteine, die eine geringe Diffusionsgeschwindigkeit besitzen, und zum anderen bei artifiziellen Membransystemen ohne Proteinanteil durch Wechselwirkung z. B. der Lipide mit dem Substrat^{80, 135, 136}. Der Unterschied im immobilen Anteil von einem Faktor 2, zwischen festkörperunterstützten Membranen und den mikro-BLMs kann dahingehend erklärt werden, dass die porenüberspannenden Membranen aufgrund ihrer Präparation Lösungsmittelreste zwischen den Lipiden aufweisen und daher mobiler sind. Durch das Lösungsmittel sind die Lipide in der Membran nicht mehr so dicht gepackt, das die Fluidität erhöht. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des geringeren immobilen Anteils ist die poröse Fläche selber. Das porenüberspannende System besitzt dadurch weniger Kontakt zur Oberfläche und ist dadurch etwas mobiler.

Aus dem Vergleich der Diffusion der Lipide in festkörperunterstützten Membranen und der in mikro-BLMs kann geschlussfolgert werden, dass die Diffusion der Lipide der mikro-BLMs durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipidmonoschichten auf den funktionalisierten Stegbereichen unter anderem mitbestimmt wird. Bei den mikro-BLMs liegt daher ein effektiver Diffusionskoeffizient vor, der sich aus dem Diffusionskoeffizienten für die mikro-BLMs über den Poren und dem Diffusionskoeffizienten der Lipidmonoschicht auf dem funktionalisierten Stegbereich zusammensetzt. Ein ähnliches zwei-Komponenten Verhalten der Diffusion konnte bei FRAP-Messungen an einer *tethered* Membran bei Han *et al.* festgestellt werden¹³⁷. Zur Bildung des Membransystems aus eggPC wurde ein synthetisiertes Cholesterinderivat benutzt, das unter UV-Licht an ein festkörperunterstütztes Substrat bindet. Über die Belichtung durch eine Photomaske konnte so eine gleichmäßige Struktur erzeugt werden. Diese Struktur wies, ähnlich der porösen Siliziumsubstrate, einen Bereich auf über den sich eine Lipiddoppelschicht spannen konnte. Auf den über UV-Bestrahlung an das Substrat gebundene Cholesterinderivat bildete sich eine Lipidmonoschicht aus. Die Mobilitätsmessungen in beiden Bereichen ergaben, dass die Diffusion der Lipiddoppelschicht zwischen den gebundenen Bereichen der Cholesterinderivate höher

lag als die Diffusion auf der Lipidmonoschicht. Das gleiche Diffusionsverhalten liegt bei dem in dieser Arbeit beschriebenen porenüberspannendem Membransystem vor. Eine langsamere Diffusion auf den mit einem Thiol funktionalisierten Stegbereichen und den schnelleren Diffusionsbereich in den Bereichen bei denen eine Lipiddoppelschicht über den Poren vorliegt.

Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 2 μm

Im Fall der porösen Siliziumsubstrate mit einem Porendurchmesser von 2 μm nimmt der Flächenanteil der Stegbereiche im Vergleich zu den Substraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm zu. Die Porosität wurde, wie auch bei den Substraten mit 7 μm Porendurchmesser, mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen bestimmt und beträgt 48 %. Der höhere Anteil der Stegbereiche spiegelt sich auch im effektiven Diffusionskoeffizienten wieder. Der effektive Diffusionskoeffizient beträgt $(8,5 \pm 4,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Der immobile Anteil liegt bei $(24 \pm 5) \%$. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die auf den Substraten mit einem Porendurchmesser von 7 μm erhalten wurden, ist der Diffusionskoeffizient um einen Faktor 2 reduziert. Im Gegenzug steigt der immobile Anteil etwa um den Faktor 1,6. Die Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit und der damit verbundenen Anstieg des immobilen Anteils auf den Substraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm resultiert unter anderem aus dem Anstieg des Anteils der Stegfläche. Ein weiterer Grund für die Erhöhung des immobilen Anteils beziehungsweise der Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit ist darin zu suchen, dass die Größe des Bleichflecks in den FRAP-Messungen unverändert bleibt. Bei den porösen Substraten mit kleineren Porendurchmessern werden demnach mehr Poren und somit auch mehr Stegfläche gebleicht. Die Stegfläche, die im Bleichfleck bei den porösen Substraten mit 2 μm Porendurchmesser zu finden ist, beträgt etwa 66 %, hingegen ist die Stegfläche im Bleichfleck beim porösen Substrates mit 7 μm Porendurchmesser mit etwa 53 % anzugeben. Dies wirkt sich auf die Diffusionsgeschwindigkeit verlangsamernd aus, da die funktionalisierte Stegfläche die

darauf befindliche Lipidmonoschicht langsamer diffundieren lässt, als die Lipiddoppelschicht in den Porenbereichen.

Laterale Mobilitätsmessungen der oberen Monoschicht an lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf porösem Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 2 μm

Da von einem effektiven Diffusionskoeffizienten ausgegangen werden kann, der sich aus zwei Diffusionskoeffizienten zusammensetzt, war es wichtig zu wissen, welchen Teil die obere Lipidmonoschicht zur lateralen Diffusionsgeschwindigkeit der porenüberspannenden Membranen beiträgt, wenn ein auf den Stegbereichen funktionalisiertes Substrat vorliegt. Zu diesem Zweck wurde bei mikro-BLMs bestehend aus DPhPC die Fluoreszenz des Fluorophors NBD-PE (0,5 mol%) der unteren Lipidmonoschicht durch die Zugabe von 22 mM CoCl_2 reversibel gelöscht⁷⁹. Die Fluoreszenzlöschung der unteren Monoschicht war fast vollständig, da nach der CoCl_2 -Zugabe nur noch circa 58 % der Ausgangsintensität vor der Zugabe vorhanden war (vgl. Abb. 5.2).

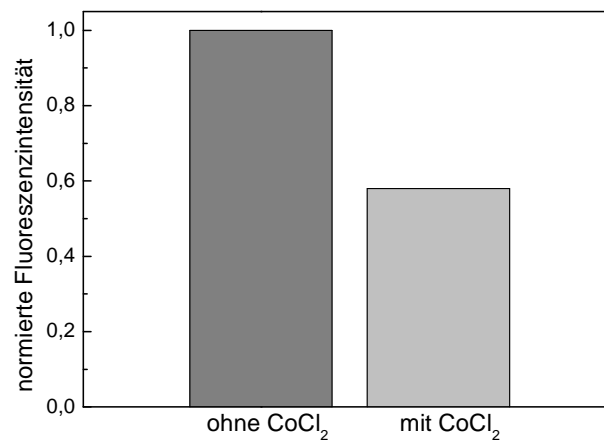


Abb. 5.2: Fluoreszenzlöschung durch die Zugabe von 22 mM CoCl_2 in das untere Kompartiment der Messkammer.

FRAP-Messungen vor und nach der Fluoreszenzlöschung wurden auf den mit DPPE funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 2 μm

durchgeführt. Vor der Fluoreszenzlöschung der unteren Monoschicht ergaben die FRAP-Messungen effektiven Diffusionskoeffizienten im Bereich von $(8,5 \pm 4,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und einen immobilen Anteil von $(24 \pm 5) \%$. Nach der Fluoreszenzlöschung der unteren Lipidmonoschicht konnte keine signifikante Änderung im Diffusionsverhalten und im immobilen Anteil nachgewiesen werden. Dies wurde auch durch einen Signifikanztest bestätigt. Für die porenüberspannenden Membranen auf funktionalisiertem porösem Siliziumsubstrat ergibt sich, dass die untere Monoschicht in Folge der Funktionalisierung über die Thiole nur in der Pore selber diffundieren kann. Ein Austausch mit der mikro-BLM in der benachbarten Pore findet nicht statt. Dieses Verhalten würde sich ändern, wenn auf den Stegbereichen keine Funktionalisierung vorliegen würde. Die untere Lipidmonoschicht könnte sich in diesem Fall frei über den Stegbereich bewegen und somit ebenfalls zum *Recovery* der Fluoreszenz im Bleichfleck beitragen. Der immobile Anteil der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs wäre ohne Funktionalisierung der Stegbereiche vor der Fluoreszenzlöschung niedriger, da beide Monoschichten zum *Recovery* beitragen würden. Nach der Fluoreszenzlöschung der unteren Lipidmonoschicht müsste die Mobilität abnehmen, da nur die obere Monoschicht zur Fluoreszenzwiederherstellung beisteuern würde. Der immobile Anteil wäre somit höher als vor der CoCl_2 -Zugabe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass zur lateralen Mobilität und somit zur Fluoreszenzwiederherstellung nach dem Bleichen mit dem Laser nur die obere Lipidmonoschicht bei vorhandener Funktionalisierung der Stegbereiche beiträgt.

FEM-Simulation zu den lateralen Mobilitätsmessungen von lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs

Da die Mobilitätsmessungen an den mikro-BLMs zeigen, dass ein effektiver Diffusionskoeffizient bestimmt werden konnte, der sich aus zwei Koeffizienten zusammensetzt, wurde die Finite Elemente Methode (FEM) herangezogen, um diese beiden Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Über die FEM war es nun möglich den Wertebereich der Diffusionskoeffizienten der oberen Monoschicht für den Steg- und für den Porenbereich des porösen Siliziumsubstrates mit einem Porendurchmesser von

7 μm zu ermitteln. So ergab sich für den Diffusionskoeffizienten der Lipidmonoschicht über den Poren ein Wertebereich von 10 bis 30 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Bei einem Vergleich mit den Diffusionskoeffizienten einer BLM nach Müller-Rudin, wie sie durch Sonnleitner *et al.* ($D = (20,6 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)¹³⁰ oder Fahey *et al.* ($D \approx 32 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)¹²⁹ ermittelt wurden, ergeben die aus der FEM-Simulation erhaltenen Werte für den Diffusionskoeffizienten eine gute Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Diffusionskoeffizienten für eine lösungsmittelhaltige BLM. Die Diffusionskoeffizienten der Monoschicht auf den funktionalisierten Stegen des porösen Substrates ergaben sich aus der FEM-Simulation zu 0,5 bis 5 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die Werte des Diffusionskoeffizienten für das Lipid DPhPC wurden von Shinoda *et al.* in einer *molecular dynamics* (MD)-Simulation in Abhängigkeit von der Salzkonzentration ermittelt¹³⁸. Hier ergaben sich Werte für den Diffusionskoeffizienten einer Lipiddoppelschicht aus DPhPC zwischen 4,8 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für eine Salzkonzentration von 0 M und 5,3 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für eine Salzkonzentration von 0,1 M und 1 M. Bei den vorgegebenen *Recovery*-Kurven aus dem Experiment, bei denen eine Kurvenanpassung über die FEM-Simulation vorgenommen wurde, wurde eine 0,5 M KCl-Lösung als Medium verwendet. Allerdings ist ein direkter Vergleich der MD-Simulationen von Shinoda *et al.* und den in dieser Arbeit durchgeführten FEM-Simulationen nicht möglich, da in der MD-Simulation von einer Lipiddoppelschicht ausgegangen wird. In der FEM-Simulation wurde nur die Diffusion der oberen Monoschicht betrachtet, die auf einem mit Thiol funktionalisierten Festkörper stattfand. Györvary *et al.* erhielten für DPPC Monoschichten auf silanisierten Oberflächen einen Diffusionskoeffizienten von 0,095 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für mit Hexamethyldisilan und 0,935 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für Decyldimethylsilan funktionalisierte Oberflächen¹³⁹. Da das Thiolipid DPPE auf den mit Gold besputterten Stegen verankert ist, verlangsamt es die laterale Diffusionsgeschwindigkeit der oberen Lipidmonoschicht^{137, 139}. Somit ist die untere Grenze für den gewählten Diffusionskoeffizienten auf den Stegen mit 0,5 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ sinnvoll gewählt. Die obere Grenze des Diffusionskoeffizienten auf den Stegen mit 5 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ erscheint gerechtfertigt, wenn der Einfluss des Lösungsmittelrests in Folge der Präparation berücksichtigt wird.

Weitere wichtige Aspekte bezüglich der Diffusionsgeschwindigkeiten, die anhand der FEM-Simulationen verdeutlicht werden konnten, sind die Lage, der Radius und die Bleichtiefe des auf die Probe applizierten Bleichflecks. Um einen möglichst geringen

Fehler für den Diffusionskoeffizienten in den FRAP-Messungen zu erhalten ist es nötig, den Radius des Bleichflecks möglichst klein zu halten. Ein zu großer Radius bedeutet für die gebleichten und ungebleichten Lipide ein zu langes Wegstück, das zurückgelegt werden müsste, um einen Anstieg der Fluoreszenzintensität im ROI zu erhalten. Die FRAP-Technik ist jedoch auf die Fluoreszenzstabilität des Fluorophors und somit auf kurze Diffusionszeiten beschränkt. Bei zu hoher Bleichtiefe liegt ein ähnliches Problem, wie bei dem zu großen Radius des Bleichflecks, vor. In der verwendeten FRAP-Theorie wurde von einem gaußförmigen Laserprofil des Bleichflecks ausgegangen⁵⁸. Bei zu langem Bleichen mit hohen Laserintensitäten liegt dieses Gaußprofil nicht mehr vor, sondern eine Stufenfunktion. Der detektierbare Intensitätsanstieg der Fluoreszenz beginnt demnach ebenfalls später. Im System der porenüberspannenden Membranen ist zusätzlich zu der Größe und der Bleichtiefe die Lage des Bleichflecks entscheidend. Da die FEM-Simulationen dem Experiment angeglichen wurden, war keine Fluoreszenzemission auf den Stegen gegeben. So konnte auf den Stegen keinerlei Information des *Recoverys* erhalten werden. Wenn nun der eigentliche Mittelpunkt des Bleichflecks auf einem der Stege lag, so brachte dies eine Veränderung bezüglich der Gaußkurve mit sich. Der ROI befand sich nicht im Mittelpunkt des Bleichflecks, sondern wurde in den Porenbereich des Bleichflecks gelegt, um die Fluoreszenzzunahme auslesen zu können. Dementsprechend veränderte dies das Aussehen der *Recovery*-Kurve bezüglich des Anstiegs und letztendlich des immobilen Anteils und der Diffusionskoeffizienten.

Da die FEM-Simulationen mit dem Experiment gut übereinstimmten, ließ sich aus ihnen schließen, welchen Beitrag die beiden Diffusionskoeffizienten zum *Recovery*-Graphen leisten. Aus den Simulationen wurde ersichtlich, dass der kleinere Diffusionskoeffizient die ersten 20 s des Anstiegs der Fluoreszenzintensität maßgeblich beeinflusste. Der größere Diffusionskoeffizient über den Poren trug erst im späteren Zeitbereich des *Recovery*-Graphen bei. Das Intervall von 20 bis 50 s wurde von beiden Diffusionskoeffizienten beeinflusst. Ein ähnlicher Kurvenverlauf konnte bei Simulationen von Multikomponenten-Diffusionen im Zuge einer mathematischen Betrachtungsweise von komplexen Diffusionsvorgängen bei FRAP-Experimenten durch Periasamy und Verkman beobachtet werden¹⁴⁰. Sie untersuchten hierbei unter anderem den Einfluss

den mehrere Komponenten, z. B. unterschiedliche Lipide oder unterschiedliche Oberflächen auf einem Substrat, auf den Kurvenverlauf der Diffusion ausüben. Bei ihrer Simulation für eine Zwei-Komponenten-Diffusion konnte der Kurvenverlauf ähnlich wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten FEM-Simulationen unterteilt werden.

Die FEM-Simulationen unterstützen die Hypothese, dass auf den porösen Substraten eine Zwei-Komponenten-Diffusion, unter der Verwendung einer einheitlichen Lipidmatrix, vorliegt. Der effektive Diffusionskoeffizient, wie er aus den FRAP-Experimenten erhalten wird, setzt sich aus einem größeren Diffusionskoeffizienten, ähnlich zu denen, die bei den klassischen BLMs gefunden wurden, über den Poren und einem kleineren Diffusionskoeffizienten, ähnlich zu denen, die bei festkörperunterstützten Membranen oder Lipidmonoschichten auf silanisierten Oberflächen gemessen wurden, zusammen.

5.3 Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelfreien mikro-BLMs

Ein weiteres System von porenüberspannenden Membranen auf porösen Siliziumsubstraten liefert das Spreiten von GUVs auf porösen Substraten mit 2 μm Porendurchmesser. Dieses System ist lösungsmittelfrei und wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf die laterale Mobilität untersucht. Wie im vorherigen Kapitel existieren auch hier bislang keine Veröffentlichungen aus anderen Arbeitsgruppen, die sich mit der lateralen Mobilität von lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen beschäftigen.

Optimierung der Spreitbedingungen von GUVs auf porösem Siliziumsubstrat

Zunächst wurden die Spreitbedingungen der riesigen unilamellaren Vesikel (GUV) zur Bildung einer planaren, lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membran auf dem porösen Substrat untersucht. Durch Zugabe von 90 mM CaCl_2 oder 33,3 mM PEG konnten Membranpatches über Spreiten der GUVs auf einem Glassubstrat hergestellt werden. Die GUVs bildeten Strukturen nach dem induzierten Spreiten, wie sie in Abb. 5.3 zu sehen sind.

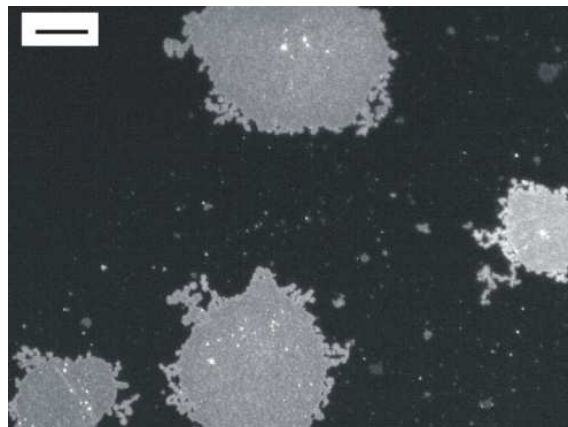


Abb. 5.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von auf einem Glassubstrat mit Hilfe von 33,3 mM PEG gespreiteten GUVs (DPhPC:DOPC (6:4) dotiert mit 0,1 mol% TEXAS RED DHPE). Der Maßstabsbalken entspricht in den Aufnahmen 20 μm .

Da die Konzentration der zugegebenen GUV-Lösung zu gering war, um flächendeckende Membranbereiche herzustellen, war es möglich, die Membranpatches einzelnen GUVs zuzuordnen. Bei einer Vesikelgröße von z. B. 20 μm Durchmesser werden etwa 40 μm breite Membranflecken auf dem Substrat nach dem Spreiten erhalten. Dies entspricht den in Abb. 5.3 zu sehenden *Patches*. Die Ausbuchtungen an den Membranpatches können eine Folge des induzierten Spreitprozesses sein. Die GUVs spreiten bei Kontakt mit der Oberfläche. Durch die Verwendung von PEG oder CaCl_2 wird der Spreitprozess beschleunigt und die GUVs kommen zu schnell mit der Oberfläche in Kontakt und bilden beim Spreitvorgang aufgrund der Geschwindigkeit, mit der sie mit der Oberfläche in Kontakt kommen, die runden Ausbuchtungen im Randbereich aus. Eine andere Erklärung für die Ausbuchtungen und die hellen Flecken auf den größeren Patches findet sich in den Studien von Hamai *et al.*¹⁰². In ihren Arbeiten zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bildung von Lipiddoppelschichten über das Spreiten von einzelnen GUVs auf einem Glassubstrat konnten sie feststellen, dass eine GUV-Probe unilamellare und multilamellare Vesikel enthielt. Die multilamellaren Vesikel enthielten kleinere Vesikel, die beim Spreiten des großen Vesikels an das wässrige Medium abgegeben wurden. Diese kleineren Vesikel lagern sich in der Nähe der größeren Membranbereiche oder direkt als helle Flecken auf den gespreiten GUVs an. Die porösen Substrate, auf denen die GUVs gespreitet werden sollten, wurden zunächst mit dem *Spacerlipid* CPEO3 funktionalisiert.

Bei Impedanzmessungen von nano-BLMs auf CPEO3 funktionalisierten porösen Aluminaten konnte von Schmitt *et al.* gezeigt werden, dass eine Monoschicht aus CPEO3 auf den Stegen eine gute Voraussetzung zum Spreiten von großen unilamellaren Vesikeln (LUV) auf porösen Substraten bildet. Die porenüberspannenden Membranen wiesen eine hohe Langzeitstabilität auf und es war möglich das Transmembranprotein Bacteriorhodopsin in die nano-BLMs zu insertieren und die Aktivität der Protonenpumpe dieses Proteins bei Lichtaktivierung zu messen⁹⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte auf den mit CPEO3 funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten eine schnelle Membranbildung nach Zugabe von CaCl_2 oder PEG beobachtet werden. Dieses System bildete eine gute Voraussetzung für die Messung der lateralen Mobilität der lösungsmittelfreien mikro-BLMs, da nach dem Spreiten der GUVs

eine homogen fluoreszierende flächendeckende Membran über den Poren des Substrates detektiert wurde.

Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten mit CPEO3-Funktionalisierung

Es wurden in dieser Arbeit lösungsmittelfreie mikro-BLMs bestehend aus DPhPC und DPhPC:DOPC (6:4) durch das Spreiten von GUVs auf CPEO3 funktionalisierten porösen Substraten präpariert. Die FRAP-Messungen an mit PEG und mit CaCl_2 gespreiteten mikro-BLMs lieferten keinen signifikanten Unterschied in der lateralen Mobilität der oberen Monoschicht. Bei den Diffusionsmessungen der lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC ergab sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von $(7,2 \pm 2,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(24 \pm 5) \%$. Dieser Diffusionskoeffizient für reine DPhPC mikro-BLMs liegt geringfügig über denen, die aus MD-Simulationen von Shinoda *et al.* für eine lösungsmittelfreie Lipiddoppelschicht in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im wässrigen Medium berechnet wurden¹³⁸. Bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) ergab sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von $(3,9 \pm 1,3) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(30 \pm 4) \%$. Demnach besitzen lösungsmittelfreie DPhPC:DOPC (6:4) mikro-BLMs eine kleinere Diffusionsgeschwindigkeit als mikro-BLMs aus DPhPC. Aus *resonance energy transfer* Messungen zur Bestimmung des lateralen Diffusionskoeffizienten des Lipids DOPC in einer festkörperunterstützten Membran bei $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ kann dieser zu $(6,9 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ angegeben werden¹⁴¹. Der Diffusionskoeffizient von DOPC ist in etwa gleich mit dem in dieser Arbeit ermittelten Diffusionskoeffizienten für lösungsmittelfreie mikro-BLMs aus DPhPC. Demnach müsste die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide in den porenüberspannenden Membranen aus DPhPC:DOPC (6:4) in etwa dem Wert der Lipide in den DPhPC mikro-BLMs entsprechen. Eine Möglichkeit für die Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit in den mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) könnte in einer Wechselwirkung des verwendeten *Spacer* CPEO3 mit dem DOPC gegeben sein. Das DOPC weist im Gegensatz zum DPhPC jeweils eine *cis*-Doppelbindung und somit einen Knick in den Fettsäureketten auf. Diese Knicke, die normalerweise aufgrund des

benötigten höheren Platzbedarfs des Lipids für höhere Diffusionsgeschwindigkeiten sorgen, könnten in diesem Fall mit dem Cholesterinrest des CPEO3 wechselwirken. Somit würde dies zu einer Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit führen. So konnten z. B. bei lateralen Diffusionsmessungen auf *tethered polymer-supported* Membranen aus POPC, das nur eine *cis*-Doppelbindung aufweist, Diffusionskoeffizienten zwischen $0,4$ und $1,8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gemessen werden. Als Abstandshalter für die Lipiddoppelschicht wurde ein PEG-Phospholipid verwendet, das kovalent an das Glassubstrat gebunden war¹⁴². Für POPC liegt der Diffusionskoeffizient in festkörperunterstützten Membranen bei $(5,0 \pm 0,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ¹⁴³. Demnach ist die laterale Mobilität von Lipiden in *tethered* Membranen durch einen *Spacer* eingeschränkt.

Ein Vergleich mit dem Wert von $(4,2 \pm 1,1) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ des in dieser Arbeit bestimmten Diffusionskoeffizienten einer festkörperunterstützten Membran aus DPhPC:DOPC (6:4) zeigt, dass der Diffusionskoeffizient der mikro-BLM geringer ist. Allerdings wurde in dem Fall der festkörperunterstützten Membran der Diffusionskoeffizient der Lipiddoppelschicht gemessen, bei den mikro-BLMs trug lediglich eine Lipidmonoschicht zur Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität bei. Des Weiteren unterstützt der verringerte Diffusionskoeffizient der DPhPC:DOPC (6:4) mikro-BLMs die Annahme, dass das *Spacerlipid* CPEO3 mit dem DOPC wechselwirkt und somit die Diffusion der Lipide in der Membran verlangsamt.

Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf porösen Siliziumsubstraten mit DPPE-Funktionalisierung

Neben den CPEO3-funktionalisierten Substraten wurden DPPE-funktionalisierte poröse Substrate für die Präparation der lösungsmittelfreien mikro-BLMs verwendet. Hierbei sollte die Frage des Einflusses der Funktionalisierung der Stegbereiche über einen *Spacer* oder ein Thiolipid auf die Mobilität geklärt werden. Bei den Mobilitätsmessungen der mikro-BLMs bestehend aus DPhPC und aus DPhPC:DOPC (6:4) konnte ein ähnliches Verhältnis beider Diffusionskoeffizienten, wie auf den CPEO3 funktionalisierten Substraten beobachtet werden. Die lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) waren mit einem Diffusionskoeffizienten von $(2,4 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und

einem immobilen Anteil von $(51 \pm 3) \%$ hinsichtlich der Diffusion der Lipide um einen Faktor 1,7 niedriger als die mikro-BLMs aus DPhPC mit einem Diffusionskoeffizienten von $(4,0 \pm 1,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und einem immobilen Anteil von $(50 \pm 3) \%$. Dies könnte ähnlich den lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf den CPEO3 funktionalisierten porösen Substraten auf eine Wechselwirkung der Lipide DPhPC und DOPC mit dem Thiolipid zurückgeführt werden. Der Vergleich der mikro-BLMs auf CPEO3 und DPSTE funktionalisierten porösen Oberflächen zeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit auf den porösen Substraten mit DPSTE-Funktionalisierung langsamer ist. Die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten der Lipide auf DPSTE und CPEO3 funktionalisierten Oberflächen kann über die prozentuale Belegung der Oberfläche erklärt werden. Die Oberflächenbelegung an CPEO3-funktionalisierten Goldoberflächen ermittelt aus einer Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Studie zeigte, dass weniger als 65 % der zur Verfügung stehenden Oberfläche bedeckt sind ¹⁴⁴. Bei DPSTE kann hingegen eine Oberflächenbelegung von 80-85 % angegeben werden ^{145, 146}. Demnach ist DPSTE nach erfolgter Chemisorption an die Goldoberfläche dichter gepackt als CPEO3. Die Lipidmonoschicht auf der funktionalisierten Oberfläche lässt sich, wie in Abb. 5.4 (A) gezeigt, vorstellen. Die DPSTE-Moleküle bieten für das DPhPC und DOPC keinen Freiraum, um sich zwischen die DPSTE-Moleküle einlagern zu können. Es bildet sich nur eine Lipidmonoschicht auf den Stegen aus.

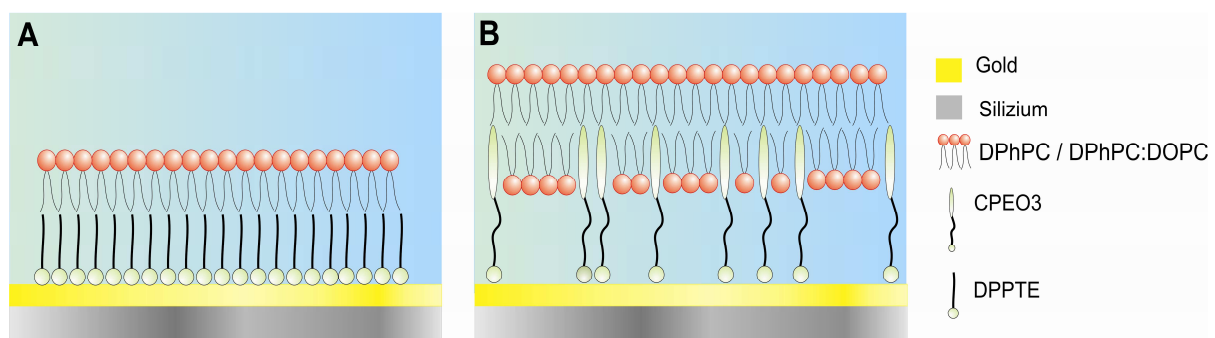


Abb. 5.4: Schematische Darstellung des Membranmodells auf den Stegbereichen. (A) Der Stegbereich wurde mit DPSTE funktionalisiert. Es bildet sich eine Lipidmonoschicht aus. (B) Der Stegbereich wurde über das *Spacerlipid* CPEO3 funktionalisiert. Die Bedeckung des Steges mit dem *Spacerlipid* ist nicht vollständig, so können sich in den Zwischenräumen Lipide anlagern, die zur lateralen Beweglichkeit ihren Beitrag leisten.

Beim CPEO3 könnte es sich aufgrund der geringeren Oberflächenbelegung wie in Abb. 5.4 (B) dargestellt verhalten. Das *Spacerlipid* bietet genug Freiraum, so dass sich die Membranlipide und das Fluorophor teilweise auch in die untere Lipidmonoschicht zwischen die *Spacerlipide* einlagern können. Diese Lipide bzw. das Fluorophor in der unteren Monoschicht trägt zur Fluoreszenzwiederherstellung nach dem Bleichen bei, der bei den porenüberspannenden Membranen auf DPTE funktionalisierten Substraten nicht gegeben ist. Somit ließe sich der hohe immobile Anteil von etwa 50 % bei den porenüberspannenden Membranen auf DPTE funktionalisierten Oberflächen und ein kleinerer mobiler Anteil von etwa 30 % bei den mikro-BLMs auf den mit CPEO3 funktionalisierten Oberflächen erklären. Das *Spacerlipid* bietet im Gegensatz zu dem verwendeten Thiolipid DPTE eine gute Voraussetzung für eine bewegliche Membran auf den Stegbereichen^{147, 148}.

Laterale Mobilitätsmessungen an lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf unfunktionalisierten porösen Siliziumsubstraten

Anders als bei den funktionalisierten Substraten verhält es sich bei der Präparation von mikro-BLMs bestehend aus DPhPC:DOPC (6:4) auf einem unfunktionalisierten porösen Siliziumsubstrat mit einem Porendurchmesser von 2 μm . Diese Substrate weisen demnach auf den Stegbereichen keine durch Thiole gegebenen Diffusionsbarrieren für die untere Lipidmonoschicht auf. Somit ist hier eine Diffusion beider Lipidmonoschichten gegeben, die beide zum Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität im Graphen beitragen. Es konnte aus den FRAP-Messungen ein Diffusionskoeffizient von $(3,8 \pm 0,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und ein mobiler Anteil von $(42 \pm 3) \%$ ermittelt werden. Der Wert des Diffusionskoeffizienten auf unfunktionalisiertem porösen Substrat liegt minimal unterhalb des Diffusionskoeffizienten von $(4,2 \pm 1,1) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ für die festkörperunterstützte Membran auf Siliziumsubstraten. Das gleiche Verhalten der Diffusionskoeffizienten lässt sich auch einer Arbeit von Worsfold *et al.* entnehmen¹⁴⁹. Hier wurde eine fluide Lipiddoppelschicht auf nanoporösem Silizium, mit Porendurchmessern von 20 nm und geschlossenem Boden, über *small unilamellar vesicles* erzeugt und FRAP-Messungen daran durchgeführt. Ein Vergleich des

Diffusionskoeffizienten mit dem, der in der gleichen Lipidmischung auf einem flachem Glassubstrat erhalten wurde, zeigte ebenfalls eine langsamere Mobilität auf dem nanoporösen Silizium. Dies wurde auf eine höhere Oberflächenrauheit des Substrates zurückgeführt. Dies würde den Unterschied im Diffusionskoeffizienten für festkörperunterstützte und porenüberspannende Membranen auf unfunktionalisierten porösen Substraten erklären, jedoch nicht den hohen immobilen Anteil der in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Bei Worsfold *et al.* betrug der immobile Anteil auf den mesoporösen Strukturen nur etwa 5-10 %.

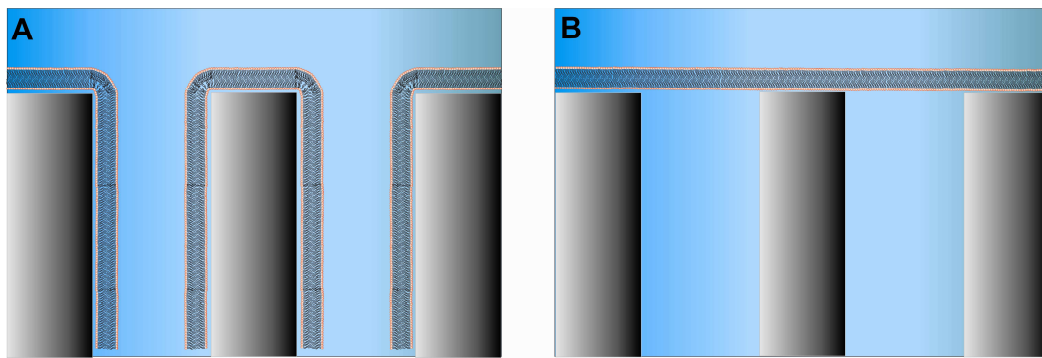


Abb. 5.5: Schematische Darstellungen der Membran nach dem Spreiten auf unfunktionalisierten porösen Siliziumsubstraten. (A) Die Lipiddoppelschicht spreitet nur auf den Stegen und in den Poren, ohne diese zu überspannen. (B) Die Membran spannt sich über die Poren und Stege des porösen Substrates.

Der hohe immobile Anteil von $(42 \pm 3) \%$ könnte damit erklärt werden, dass die homogene Fluoreszenz in den Aufnahmen (vgl. Abb. 4.34) nicht von porenüberspannenden Membranen herrührt. Die Lipiddoppelschicht könnte wie in Abb. 5.5 (A) die Poren nach dem Spreiten auskleiden, ohne die Poren selber zu überspannen. Das Fluoreszenzsignal der Probe wäre ähnlich, wie im Fall der porenüberspannenden Membran (Abb. 5.5 (B)). Der immobile Anteil wäre für den Fall (A) höher, da der Austausch der ungebleichten Lipide gegen die gebleichten Lipide nicht stattfinden kann. Ein Recovery wäre hier nicht detektierbar. Eine weitere Möglichkeit für den Unterschied im immobilen Anteil, wäre ein Mischsystem aus (A) und (B), das heißt, dass porenüberspannende und porenaukleidende Membranen auf dem porösen Substrat zu finden wären. Dieses System würde ein Teilrecovery erklären, wie es auch gemessen wurde.

5.4 Vergleich der Diffusionsmessungen von lösungsmittelfreien und lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs

Im Folgenden werden die Diffusionskoeffizienten an lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membran miteinander verglichen. Für die Gegenüberstellung werden nur die Werte für die effektiven Diffusionskoeffizienten und immobile Anteile auf den porösen Siliziumsubstrate mit 2 μm Porendurchmesser herangezogen. Bei den lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen liegt eine Funktionalisierung über das Thiolipid DPPTe, bzw. das *Spacerlipid* CPEO3 der mit Gold beschichteten Stegbereiche vor. Daher weisen beide Systeme ein ähnliches Diffusionsverhalten auf. Bei den lösungsmittelhaltigen sowie bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs trägt nur die obere Lipidmonoschicht zur Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen bei. Die untere Lipidmonoschicht ist in ihrer lateralen Beweglichkeit durch die Funktionalisierung der Stege auf die Porenbereiche beschränkt. Die Funktionalisierung der Stege mit dem *Spacerlipid* CPEO3 stellt wahrscheinlich hierbei eine Ausnahme dar. Die Oberflächenbelegung der CPEO3 funktionalisierten Oberflächen ist geringer als die bei DPPTe. Daher bietet die CPEO3 funktionalisierten Oberflächen genug Freiraum, dass sich Membranlipide teilweise als untere Lipidmonoschicht zwischen den *Spacerlipiden* anlagern können. Es findet sich somit bei den lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien eine Aufspaltung des ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten in zwei Diffusionskoeffizienten, einen für die Diffusion der oberen Lipidmonoschicht auf den Stegen und einen Diffusionskoeffizienten für die Lipide im Porenbereich.

Die Unterschiede der lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen finden sich bei gleicher Funktionalisierung der Stege mit dem Thiolipid DPPTe in den Werten, die für den Diffusionskoeffizienten und den immobilen Anteil erhalten wurden. Für die lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs ergibt sich ein effektiver Diffusionskoeffizient von $(8,5 \pm 4,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und ein mobiler Anteil von $(24 \pm 5) \%$. Bei der lösungsmittelfreien Präparation der mikro-BLMs ergeben sich bei den FRAP-Messungen ein effektiver Diffusionskoeffizient von $(4,0 \pm 1,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(50 \pm 3) \%$. Die Mobilität der Lipide in den lösungsmittelhaltigen

porenüberspannenden Membranen ist um etwa den Faktor 2 größer als die Mobilität der Lipide in den lösungsmittelfreien mikro-BLMs. Aufgrund der höheren lateralen Beweglichkeit der Lipide in den lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs liegt der immobile Anteil etwa um den Faktor 2 niedriger, als der bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs. Diese Diffusionskoeffizienten sind in Relation zu den klassischen BLMs zu setzen; auch hier wird zwischen lösungsmittelfreien und lösungsmittelhaltigen BLMs unterschieden. So wiesen auch hier die lösungsmittelfreien BLMs einen langsameren Diffusionskoeffizienten (POPC:DOPE $(13,2 \pm 1,07) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, ¹³¹) als die lösungsmittelhaltigen BLMs (POPC:POPE $(20,6 \pm 0,9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, ¹³⁰) auf. Dies bestätigt die Annahme, dass Lösungsmittelreste in einer BLM zu einer erhöhten lateralen Mobilität der Lipide führen, da die Lipide in der Membran durch die Lösungsmittel nicht mehr so stark gepackt sind. Die Verringerung der Packungsdichte der Lipide in der Membran führt zum Anstieg der Fluidität der Membran, vergleichbar mit Diffusionsverhalten bei Lipiden mit *cis*-Doppelbindungen in den Fettsäureketten. Den Effekt der Lösungsmittelreste, die anhand der klassischen BLMs zu sehen sind, können auch auf die in dieser Arbeit untersuchten porenüberspannenden Membranen auf den porösen Siliziumsubstraten projiziert werden. Die hier untersuchten lösungsmittelfreien mikro-BLMs weisen einen kleineren effektiven Diffusionskoeffizienten als die lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf. Der hohe immobile Anteil von 50 % bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf den mit DPPE funktionalisierten porösen Substraten unterstützt die Annahme, dass sich nur die obere Lipidmonoschicht frei bewegen kann und alleine zum *Recovery* in den FRAP-Messungen beiträgt. Der immobile Anteil der lateralen Beweglichkeit beider Lipidmonoschichten müsste sonst niedriger sein.

Die FRAP-Messungen an den lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen auf den mit CPEO3 funktionalisierten porösen Siliziumsubstraten ergaben für den effektiven Diffusionskoeffizienten einen Wert von $(7,2 \pm 2,7) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(24 \pm 5) \%$. Der Vergleich mit den Werten der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf DPPE funktionalisierten Substraten zeigt, dass der effektive Diffusionskoeffizient der lösungsmittelfreien mikro-BLMs sich minimal von dem der lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs unterscheidet. Der immobile Anteil bei

beiden Systemen ist gleich. Demnach muss bei den porenüberspannenden Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten ein weiteres Element zur lateralen Mobilität der Membran beitragen. Über *single molecule tracking* an *polymer-tethered* Membranen konnten Deverall *et al.* zeigen, dass die Konzentration des Lipopolymers (Diacetadecylamin [poly(Ethyloxazolin)8988], DODA-E₈₅), das auf dem Glassubstrat kovalent gebunden war, einen entscheidenden Einfluss auf den lateralen Diffusionskoeffizienten und den immobilen Anteil der Phospholipiddoppelschicht, bestehend aus 1-Stearoyl-2-oleoyl-3-glycero-phosphocholin (SOPC), ausübt. In Abwesenheit von DODA-E₈₅ konnte ein Diffusionskoeffizient von $2,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ des SOPC gemessen werden. Die Erhöhung der Konzentration des DODA-E₈₅ und somit die Erhöhung der Oberflächenbelegung mit dem Lipopolymer zeigte, dass der Diffusionskoeffizient sich erniedrigte und der immobile Anteil stieg. So konnte bei 40 mol% DODA-E₈₅ nur noch ein Diffusionskoeffizient von $0,03 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von 27 % für das SOPC gemessen werden¹⁵⁰. Dies unterstützt die Annahme aus Kapitel 5.3, dass die Oberflächenbedeckung des CPEO3 genügend Platzräume für die Einlagerung von den Lipiden DPhPC und DOPC als untere Monoschicht lässt. Diese Lipide in der unteren Monoschicht könnten zum *Gesamt-recovery* und somit zur Mobilität der porenüberspannenden Membranen beitragen. Bei den mit dem CPEO3 funktionalisierten Substraten kann daher nicht mehr davon ausgegangen werden, dass sich nur die obere Lipidmonoschicht über den Stegen bewegt, sondern auch ein geringer Austausch der unteren Lipidmonoschicht in den Poren über die Stegbereiche stattfindet. Bei den DPTE funktionalisierten porösen Substraten findet nur eine Diffusion der oberen Monoschicht statt.

5.5 Laterale Mobilitätsmessungen an mikro-BLMs mit Diacetylenlipiden

Das Einbringen dem Lipid 1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (23:2 PC Diyen) (vgl. Abb. 3.19) in die porenüberspannenden Membranen sollte zu einer gezielten Beeinflussung der lateralen Mobilität und einer Erhöhung der Stabilität in der Membran aufgrund der Polymerisation des Lipides durch UV-Bestrahlung führen^{99, 108, 151}. 23:2 PC Diyen besitzt die Eigenschaft unter Ausschluss von Sauerstoff und durch UV-Bestrahlung eine stabilisierende Netzwerkstruktur durch Polymerisation auszubilden. 23:2 PC Diyens emittiert vor UV-Bestrahlung im blauen Spektralbereich, bei Polymerisation verschiebt sich die Emission in den roten Spektralbereich. Diese Photopolymerisation findet nur in einem hochgeordneten Zustand der Diacetylenlipide statt^{152, 153}. Die Grundvoraussetzung des hochgeordneten Zustands für eine erfolgreiche Polymerisierung konnte auch den Experimenten an den in dieser Arbeit durchgeführten Langmuir-Blodgett-Überträgen mit DPhPC: 23:2 PC Diyens (3:1) entnommen werden. Die Polymerisierung des 23:2 PC Diyen erfolgte nur bei Monoschichten, die bei einem Druck von über 40 mN m^{-1} in der festanalogen Phase des Lipides aufgezogen wurden, da hier bei Raumtemperatur dieser hochgeordnete Zustand der Diacetylenlipide vorliegt. Bei Wegner¹⁵⁴ und Baughman¹⁵⁵ ist die Polymerisation der Diacetylenlipide als Bildung einer kristallinen Struktur unter Ausbildung von konjugierten Dreifachbindungen beschrieben (vgl. Abb. 5.6).

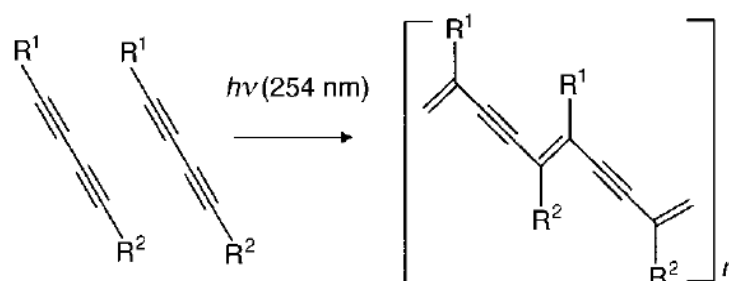


Abb. 5.6: Schematische Darstellung der Polymerisation der Diacetylenphospholipide.¹⁵⁶

Morigaki *et al.* konnten in ihren Arbeiten zur Strukturierung von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten durch lithographische Polymerisation von Diacetylenlipiden zeigen, dass polymerisiertes Diacetylen-Phosphatidylcholin als Diffusionsbarriere für fluide festkörperunterstützte Membranen dienen kann^{157, 158}. Auch konnten sie zeigen, dass abhängig von der UV-Dosis, die über Abstand und Dauer der Bestrahlung festgelegt wurde, unterschiedliche Polymerisierungsgrade des Diacetylen-Phosphatidylcholins erzeugt werden können, die bei geringer Photopolymerisation noch eine gewisse laterale Fluidität aufwiesen¹⁰⁸. Bei einer Verringerung der Fluidität einer Membran durch Polymerisation kommt es zu einer Versteifung des Systems, vergleichbar mit Cholesterin in einer Membran, das die Fluidität oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der Lipide vermindert und dadurch die Membranstruktur stabilisiert. Es wäre also möglich, ein stabileres Membransystem auf den porösen Siliziumstrukturen über Polymerisation der Diacetylenlipide zu erzeugen. So wiesen auch Shenoy *et al.* unter anderem anhand von Impedanzmessungen nach, dass die Membrankapazität sich nach Polymerisation von 1-Palmitoyl-2-10,12-tricosadiynoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamin (PTPE) erhöhte und somit auch die Isolatoreigenschaften und die Stabilität der Lipiddoppelschicht⁹⁹.

Für eine erfolgreiche Polymerisation von porenüberspannenden Membranen ist es wichtig zu wissen, wie sich das polymerisierbare Lipid während der Polymerisation verhält. Eine wesentliche Rolle in der Bildung von Vesikeln und Membranstrukturen spielt hierbei an welcher Stelle des Lipides sich der polymerisierbare Teil befindet. So ändert z. B. die Polymerisation der hydrophilen Region des Lipides die Eigenschaften der Kopfgruppe. Bei einer Polymerisation am Kettenende kommt es zum sogenannten *interlayer crosslinking*. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten 23:2 PC Diyen hingegen befinden sich die polymerisierbaren Gruppen in der Kettenmitte. Bei UV-Bestrahlung kommt es somit zum *mid-region crosslinking*. Dabei kann die Lipiddoppelschichtstruktur gestört werden^{97, 159, 160}. Diese Störung der Membranstruktur bei Polymerisation äußerte sich bei den Experimenten an den porenüberspannenden Membranen auf den porösen Siliziumsubstraten in einer Zerstörung der mikro-BLMs während der Bestrahlung mit UV-Licht bei Raumtemperatur, wobei die Dauer der Bestrahlung diesen Prozess nicht beeinflusste. Das kann unter

anderem auf die Dreifachbindungen in beiden C-Ketten des 23:2 PC Diyen zurückgeführt werden. Hier kommt es bei Lipidmischungen des 23:2 PC Diyen und nicht polymerisierbaren Lipiden möglicher Weise zu einer Phasenseparation, wie sie wahrscheinlich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Langmuir-Blodgett-Überträgen zu erkennen war. Dies hätte eine nichthomogene Membranausbildung auf den porösen Substraten zur Folge haben können. So konnten Shenoy et al. bei ihren Ionenstrommessungen der Ionenkanäle des *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL) und des *Bacillus anthracis* protective antigen 63, die in BLMs mit polymerisierbaren Anteil insertiert waren beobachten, dass in nur 5 % der Messungen die BLMs mit 23:2 PC Diyen eine Membran mit guten Isolatoreigenschaften ausbildeten. In 95 % der Fälle, war die Membran, bestehend aus 23:2 PC Diyen und DPhPC, nicht stabil, da das 23:2 PC Diyen die vorhandene Membranstruktur massiv störte⁹⁹. Diese Störung der Membran durch das 23:2 PC Diyen war in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei UV-Bestrahlung zu beobachten. Die Membran über den Poren wurde durch den Polymerisationsprozess des 23:2 PC Diyen zerstört.

Diacetylenlipide weisen eine komplexe thermische Phasenabhängigkeit auf¹⁶¹. Daher wurde in dieser Arbeit angedacht, die lösungsmittelfreien mikro-BLMs bestehend aus DPhPC: 23:2 PC Diyen (19:1) vor und während der UV-Bestrahlung auf 5 °C herunterzukühlen. Hierdurch sollte zum einen die Phasenseparation und zum anderen eine höhere Ordnung der Diacetylenlipide während Polymerisation erreicht werden^{155, 162}. Es war hiermit möglich, größere Flächen von zusammenhängenden lösungsmittelfreien mikro-BLMs nach UV-Bestrahlung zu erhalten. Der effektive Diffusionskoeffizienten vor UV-Bestrahlung beträgt $(7,9 \pm 2,5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und der immobile Anteil $(14 \pm 6) \%$. Nach UV-Bestrahlung konnte eine Verringerung des lateralen effektiven Diffusionskoeffizienten auf den Wert $(2,3 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und eine damit verbundene Erhöhung des immobilen Anteils auf $(46 \pm 5) \%$ festgestellt werden. Das wurde auf eine erfolgte Polymerisation zurückgeführt und konnte durch die Anwesenheit von einer Emission im rötlichen Spektralbereich mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden.

Ein weiterer Ansatz, um die Störung der Membranstruktur bei UV-Bestrahlung auszugleichen, war eine Erhöhung der Fluidität der porenüberspannenden Membranen.

Hierzu wurde eine *Painting*-Lösung mit dem Lösungsmittel *n*-Decan:CHCl₃ (1:1) verwendet, da 23:2 PC Diyen nur in CHCl₃ löslich ist. Müller-Rudin-BLMs mit einem gewissen Anteil von polymerisierbaren Lipiden wurden bereits von Benz *et al.* verwendet¹⁶³. Sie untersuchten den Einfluss der Leitfähigkeit von lipophilen Ionen abhängig vom Polymerisationsgrad von Dienoyllipiden in einer BLM. Sie stellten eine Erniedrigung der Leitfähigkeit der Ionen bei einer längeren UV-Bestrahlung und dem daraus resultierenden höheren Polymerisationsgrad fest.

Die Erhöhung der Fluidität konnte die Störung der Membranstruktur in den lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs, bestehend aus DPhPC: 23:2 PC Diyen (19:1), teilweise ausgleichen, so dass es auch hier möglich war, den Einfluss einer Polymerisation des 23:2 PC Diyens auf die laterale Mobilität innerhalb einer Membran zu untersuchen. Wie auch bei den lösungsmittelfreien mikro-BLMs ergaben sich eine Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten und eine Erhöhung des immobilen Anteils nach Bestrahlung mit UV-Licht. Vor UV-Bestrahlung konnte ein effektiver Diffusionskoeffizient von $(26,8 \pm 8,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit einem immobilen Anteil von $(14 \pm 4) \%$ ermittelt werden. Nach erfolgter UV-Bestrahlung verringerte sich der effektive Diffusionskoeffizient zu $(14,1 \pm 9,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und der immobile Anteil erhöhte sich auf $(18 \pm 4) \%$. Dies wurde einer erfolgten Polymerisierung zugeschrieben. Ebenfalls war es möglich, die Polymerisation über den Filtersatz für die rötliche Emission im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen (vgl. Abb. 4.42).

Allerdings ist die Polymerisation der lösungsmittelhaltigen und lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf den porösen Substraten und damit die Beeinflussung der lateralen Mobilität durch die Verwendung des polymerisierbaren Lipides 23:2 PC Diyen nicht exakt für den gesamten Bereich der Probe steuerbar. Dieses Lipid wirkt auf große Bereiche der porenüberspannenden Membran strukturzerstörend nach UV-Bestrahlung, so dass keine verlässlichen Messungen an diesem System durchführbar sind. Zur Versteifung bzw. kontrollierten Herabsenken der lateralen Mobilität und auch zur möglichen Erhöhung der Stabilität würde sich entweder die Verwendung eines Lipides mit polymerisierbarer Kopfgruppe oder von Cholesterin in der Membran besser eignen.

5.6 Modell des Membransystems der mikro-BLMs

Anhand der bisher diskutierten Ergebnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen und aus der Literatur ergibt sich folgende Modellvorstellung für die lösungsmittelfreien und lösungsmittelhaltigen porenüberspannenden Membranen. Die Stabilitätsmessungen mit Hilfe der Impedanzspektroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass jede mikro-BLM als eigenständiges freistehendes Membransystem gesehen werden kann. Die Membranen über den Poren reißen unabhängig voneinander und beeinflussen sich somit nur geringfügig über die Verbindung der oberen Monoschicht. Sie bieten somit ein stabiles Membransystem, bei dem es möglich ist, beide Seiten zu kontaktieren und längere Messungen, wie z. B. Ionentransporte durch die Membran, daran durchzuführen. Dieses eigenständige System pro mikro-BLM wird auch anhand der lateralen Diffusionmessungen bei vorhandener Funktionalisierung über Thiolipide erhalten. Die untere Monoschicht der sich in der Pore befindlichen Lipiddoppelschicht wechselwirkt nicht mit den anderen Monoschichten der umgebenden mikro-BLMs. Sie trägt somit auch nicht zur Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität bei. Lediglich die obere Monoschicht kann in diesem System ungehindert über alle Porenbereiche diffundieren.

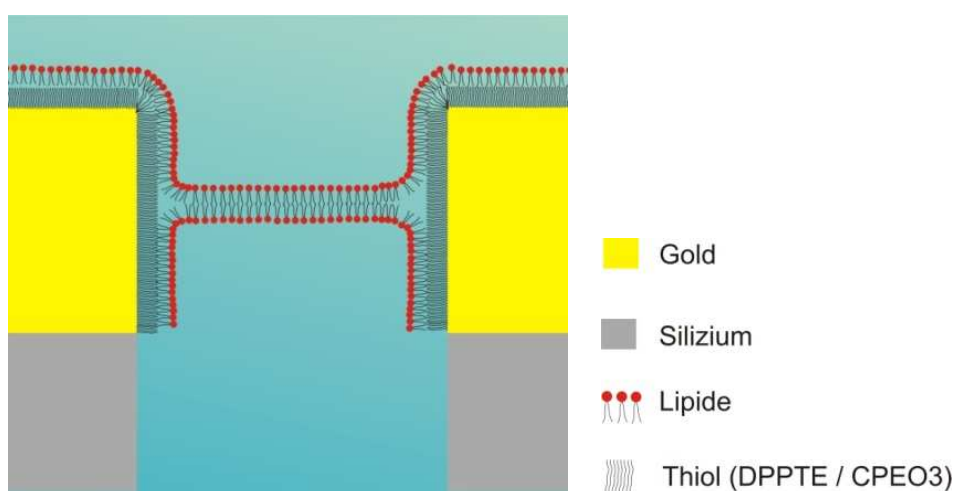


Abb. 5.7: Schematische Zeichnung der Modellvorstellung einer mikro-BLM.

In Abb. 5.7 ist ein mögliches Modell einer mikro-BLM auf einem funktionalisierten porösen Substrat über einer einzelnen Pore dargestellt. Die Thiol-Funktionalisierung haftet auf der Goldschicht und zieht sich auch in den Porenbereich hinein. Sie bietet hier eine Vorlage für die Bildung der porenüberspannenden Membran, die sich nach dem *Painten* oder nach dem Vesikelspreiten der GUVs im Porenbereich ausbildet. Die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit CPEO3 bietet zusätzlich ein höheres Maß an Mobilität für die Lipide innerhalb der Membran, da die Oberflächenbelegung weniger dicht ist als bei dem Thiolipid DPSTE. So können sich vereinzelt Lipide in die untere Monoschicht einlagern und ein zusätzliches laterales mobiles Reservoir bieten, das sich auch in den Diffusionskoeffizienten widerspiegelt.

Die Höhe der lateralen Mobilität spielt für biologische Membrankomponenten eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Zellprozesse, wie z. B. Peptidaggregation oder Zelladhäsion. Die nativen Zellmembranen bilden ein komplexes heterogenes System, das es erschwert biophysikalische Eigenschaften zu untersuchen. Ein Modellsystem für eine Zellmembran bieten die GUVs. Der Vorteil der GUVs liegt darin, dass die Lipiddoppelschicht völlig freitragend ist und mit keinem Substrat wechselwirkt. So konnte ein lateraler Diffusionskoeffizient von DOPC in der Lipiddoppelschicht der GUVs durch Przybylo *et al.* über *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) zu $(7,8 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ermittelt werden. Durch den Vergleich mit einer festkörperunterstützten Membran bestehend aus DOPC auf Glimmer konnten sie zeigen, dass der laterale Diffusionskoeffizient der GUVs doppelt so groß, wie der einer Membran, die auf einem Festkörper aufgebracht ist¹⁶⁴. Die in dieser Arbeit ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten der porenüberspannenden Membranen zeigen, dass die lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs auf DPSTE funktionalisierten Substraten und die lösungsmittelfreien mikro-BLMs auf CPEO3 funktionalisierten porösen Substraten ein fluides Modellsystem bieten. Diese Fluidität ist vergleichbar mit der lateralen Beweglichkeit der Lipide in GUVs. Somit stellen die porenüberspannenden Membranen ein geeignetes fluides künstliches Membransystem für die Beschreibung von nativen Membranen dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Langzeitstabilität und lateralen Beweglichkeit von mikro-BLMs (*black lipid membranes*) mit Hilfe der Impedanzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie. Mikro-BLMs sind ein neuartiges Hybridsystem auf Basis von porösem Silizium, das die Vorteile von festkörperunterstützten und freistehenden Lipiddoppelschichten vereint.

Es konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass mikro-BLMs unabhängig voneinander reißen, was sich in einem diskreten Abfall des Membranwiderstandes in der Impedanzspektroskopie äußert.

Zur Bestimmung der lateralen Mobilität der Lipide in den porenüberspannenden Membranen wurden *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Messungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Lösungsmittelreste in den porenüberspannenden Membranen, die über die *Painting*-Technik hergestellt wurden, einen großen Beitrag zur Fluidität des Systems leisten. Der Diffusionskoeffizient von lösungsmittelhaltigen mikro-BLMs aus 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) kann mit $(9 \pm 5) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und mit einem immobilen Anteil von $(24 \pm 5) \%$ angegeben werden. Im Gegensatz dazu weisen mikro-BLMs, die über das Spreiten von *giant unilamellar vesicles* (GUV) hergestellt wurden, einen um den Faktor 2 kleineren Diffusionskoeffizient bei gleicher Porengröße des Siliziumsubstrats und gleicher Funktionalisierung der Stegbereiche mit 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPE) auf. Diffusionsmessungen der oberen Lipidmonoschicht ergaben, dass nur die obere Monoschicht zum gemessenen Diffusionskoeffizienten beiträgt. Zusätzlich ergaben Finite-Elemente-Simulationen, dass der gemessene Diffusionskoeffizient sich aus zwei Anteilen zusammensetzt, zum einen die freie Diffusion der Lipide in den porenüberspannenden Bereichen und zum anderen die langsamere Diffusion der Phospholipide auf den Stegen.

Bei den lösungsmittelfreien porenüberspannenden Membranen wurde ein Vergleich zwischen dem Thiolipid DPPE und dem *Spacerlipid* Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) durchgeführt. Der Diffusionskoeffizient dieser mikro-BLMs war im Vergleich zu

den lösungsmittelfreien auf DPSTE funktionalisierten Substraten um einen Faktor 1,8 größer und der immobile Anteil war um den Faktor 2 bei den CPEO3 funktionalisierten Substraten geringer. Dies lässt sich auf die geringere Oberflächenbedeckung des CPEO3 zurückführen, die im Gegensatz zur DPSTE-Funktionalisierung genügend Zwischenräume für die Bildung einer beweglichen unteren Lipidmonoschicht bietet, so dass die Mobilität des Membransystems erhöht wird.

Durch das Einbringen von Diacetylenlipiden (23:2 PC Diyen) in die Membran und deren Polymerisation durch Bestrahlung mit UV-Licht konnte gezeigt werden, dass die laterale Mobilität der Membranlipide verringert wird.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, den Einfluss der Randbedingungen (Porengröße, Oberflächenfunktionalisierung) auf die laterale Mobilität und die Langzeitstabilität der porenüberspannenden Membranmatrix. Es konnte gezeigt werden, dass die mikro-BLMs ein geeignetes Modellsystem für biologische Membranen darstellen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lipowsky, R.; Sackmann, E., *Structure and Dynamics of Membranes: From Cells to Vesicles*. Elsevier: 1995; Vol. 1A.
2. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, 175, (23), 720-731.
3. Winter, R., Structure and Dynamics of Biomembrane Models. *Chem. Unserer Zeit* **1990**, 24, (2), 71-81.
4. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemie*. 5 ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg-Berlin, 2003.
5. Adam, G.; Lauger, P.; Stark, G., *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag: Berlin 2003.
6. Mohwald, H., Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, 41, 441-476.
7. Morigaki, K.; Tawa, K., Vesicle fusion studied by surface plasmon resonance and surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* **2006**, 91, (4), 1380-1387.
8. Wyart, Y.; Georges, G.; Demie, C.; Amra, C.; Moulin, P., Membrane characterization by optical methods: Ellipsometry of the scattered field *J. Membrane Sci.* **2008**, 318, (1-2), 145-153.
9. Fuchs, H., Atomic Force and Scanning Tunneling Microscopies of Organic-Surfaces. *J. Mol. Struct.* **1993**, 292, 29-47.
10. Janshoff, A.; Galla, H. J.; Steinem, C., Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angew Chem Int Ed Engl.* **2000**, 39, (22), 4004-4032.
11. Sackmann, E., Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* **1996**, 271, (5245), 43-48.
12. Hofmann, M.; Zgouras, D.; Samaras, P.; Schumann, C.; Henzel, K.; Zimmer, G.; Leuschner, U., Small and large unilamellar vesicle membranes as model system for bile acid diffusion in hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* **1999**, 368, (1), 198-206.
13. Macdonald, R. C.; Macdonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L. R., Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large, Unilamellar Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1061, (2), 297-303.
14. Zeidel, M. L.; Ambudkar, S. V.; Smith, B. L.; Agre, P., Reconstitution of Functional Water Channels in Liposomes Containing Purified Red-Cell CHIP28 Protein. *Biochemistry* **1992**, 31, (33), 7436-7440.
15. Tamm, L. K.; McConnell, H. M., Supported Phospholipid-Bilayers. *Biophys. J.* **1985**, 47, (1), 105-113.
16. Blodgett, K. B., Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, (1), 1007-1022.
17. Peterson, I. R., Langmuir-Blodgett films. *J. Phys. D* **1990**, 23, (4), 379-395.

18. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (1), 321-335.
19. Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L., Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, (8), 2358-2368.
20. Boden, N.; Bushby, R. J.; Clarkson, S.; Evans, S. D.; Knowles, P. F.; Marsh, A., The design and synthesis of simple molecular tethers for binding biomembranes to a gold surface. *Tetrahedron* **1997**, 53, (31), 10939-10952.
21. Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K., Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1103, (2), 307-316.
22. Florin, E.-L.; Gaub, H. E., Painted supported lipid membranes. *Biophys. J.* **1993**, 64, (2), 375-383.
23. Keller, C. A.; Kasemo, B., Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J.* **1998**, 75, (3), 1397-1402.
24. McConnell, H. M.; Watts, T. H.; Weis, R. M.; Brian, A. A., Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 864, (1), 95-106.
25. Nollert, P.; Kiefer, H.; Jähnig, F., Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophys. J.* **1995**, 69, (4), 1447-1455.
26. Hennessy, C.; Steinem, C., Pore-Spanning Lipid Bilayers Visualized by Scanning Force Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (33), 8085-8086.
27. Lu, X.; Ottova-Leitmannova, A.; Tien, H. T., Biophysical aspects of agar-gel supported bilayer lipid membranes: a new method for forming and studying planar bilayer lipid membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, 39, (2), 285-289.
28. Tien, H. T.; Ottova-Leitmannova, A., *Membrane Biophysics as viewed from experimental Bilayer Lipid Membranes (Planar Lipid Bilayers and Spherical Liposomes)* Elsevier, Amsterdam-New York, 2000.
29. Schiller, S. M.; Naumann, R.; Lovejoy, K.; Knoll, W., Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2003**, 42, (2), 208-211.
30. Raguse, B.; Braach-Maksyvtis, V.; Cornell, B. A.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Pace, R. J.; Wieczorek, L., Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* **1998**, 14, (3), 648-659.
31. Atanasov, V.; Knorr, N.; Duran, R. S.; Ingebrandt, S.; Offenhäusser, A.; Knoll, W.; Köper, I., Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces. *Biophys. J.* **2005**, 89, (3), 1780-1788.
32. Krishna, G.; Schulte, J.; Cornell, B. A.; Pace, R. J.; Osman, P. D., Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: Selectivity and Conductance. *Langmuir* **2003**, 19, (6), 2294-2305.
33. Bamberg, E.; Alpes, H.; Apell, H. J.; Bradley, R.; Harter, B.; Quelle, M. J.; Urry, D. W., Formation of Ionic Channels in Black Lipid-Membranes by Succinic Derivatives of Gramicidin-A. *J. Membrane Biol.* **1979**, 50, (3-4), 257-270.

34. Naumowicz, M.; Petelska, A. D.; Figaszewski, Z. A., Impedance analysis of a phosphatidylcholine-phosphatidylethanolamine system in bilayer lipid membranes. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (24), 5024-5028.
35. Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C., Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System. *Nature* **1962**, 194, (4832), 979-980.
36. Montal, M.; Mueller, P., Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**, 69, (12), 3561-3566.
37. Goran, R., Reflected laser light from a soap bubble - a demonstration experiment. *Phys. Educ.* **1992**, (5), 282-283.
38. Newton, I., Theory of light and colours (in soap bubbles). *n. A.* **1674**.
39. Hagge, S. O.; Wiese, A.; Seydel, U.; Gutschmann, T., Inner Field Compensation as a Tool for the Characterization of Asymmetric Membranes and Peptide-Membrane Interactions. *Biophys. J.* **2004**, 86, (2), 913-922.
40. Lakey, J. H.; Pattus, F., The voltage-dependent activity of *Escherichia coli* porins in different planar bilayer reconstitutions. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, (1-2), 303-308.
41. Fertig, N.; Klau, M.; George, M.; Blick, R. H.; Behrends, J. C., Activity of single ion channel proteins detected with a planar microstructure. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81, (25), 4865-4867.
42. Fertig, N.; Meyer, C.; Blick, R. H.; Trautmann, C.; Behrends, J. C., Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology. *Phys. Rev. E* **2001**, 64, (4), 040901.
43. Favero, G.; Campanella, L.; D'Annibale, A.; Santucci, R.; Ferri, T., Mixed hybrid bilayer lipid membrane incorporating valinomycin: improvements in preparation and functioning *Microchem J.* **2003**, 74, (2), 141-148.
44. Favero, G.; D'Annibale, A.; Campanella, L.; Santucci, R.; Ferri, T., Membrane supported bilayer lipid membranes array: preparation, stability and ion-channel insertion. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 460, (1), 23-34.
45. Drexler, J.; Steinem, C., Pore-Suspending Lipid Bilayers on Porous Alumina Investigated by Electrical Impedance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 11245-11254.
46. Hennesthal, C.; Drexler, J.; Steinem, C., Membrane-Suspended Nanocompartments Based on Ordered Pores in Alumina. *ChemPhysChem* **2002**, 3, 885-889.
47. Römer, W. Impedance Analysis and Single Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. Dissertation, Universität Regensburg, 2004.
48. Römer, W.; Steinem, C., Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina. *Biophys. J.* **2004**, 86, 955-965.
49. Schmitt, E. K.; Vroenenraets, M.; Steinem, C., Channel activity of OmpF monitored in nano-BLMs. *Biophys. J.* **2006**, 91, 2163-2171.
50. Klauda, J. B.; Roberts, M. F.; Redfield, A. G.; Brooks, B. R.; Pastor, R. W., Rotation of Lipids in Membranes: Molecular Dynamics Simulation, 31P Spin-Lattice Relaxation, and Rigid-Body Dynamics. *Biophys. J.* **2008**, 94, (8), 3074-3083.

51. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Lehrbuch der Biochemie*. 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
52. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces* 1ed.; Academic Press Oxford, 1985.
53. van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, 9, (2), 112-124.
54. Bergmann, L.; Schaefer, C., *Gase, Nanosysteme, Flüssigkeiten*. 2 ed.; Walter de Gruyter: Berlin, 2006; Vol. 5.
55. Hope, W.; Lohmann, W.; Markl, H.; Ziegler, H., *Biophysik*. 2 ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 1982.
56. Scherfeld, D.; Kahya, N.; Schwille, P., Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of Ternary Mixtures of Unsaturated and Saturated Phosphatidylcholines and Cholesterol. *Biophys. J.* **2003**, 85, (6), 3758-3768.
57. Internetquelle: <http://www.avantilipids.com/>.
58. Axelrod, D.; Koppel, D. E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W. W., Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys. J.* **1976**, 16, (9), 1055-1069.
59. Soumpasis, D. M., Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **1983**, 41, (1), 95-97.
60. Galla, H.-J.; Hartmann, W.; Theilen, U.; Sackmann, E., On two-dimensional passive random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes *J. Membrane Biol.* **1979**, 48, 215-236.
61. Saxton, M. J.; Jacobson, K., Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **1997**, 26, (1), 373-399.
62. Chen, Y.; Lagerholm, B. C.; Yang, B.; Jacobson, K., Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **2006**, 39, (2), 147-153.
63. Elson, E. L.; Magde, D., Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **1974**, 13, (1), 1-27.
64. Lenaz, G., Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Biosci Rep.* **1987**, 7, (11), 823-837.
65. Michalke, A.; Schürholz, T.; Galla, H.-J.; Steinem, C., Membrane activity of an anion channel from *Clavibacter michiganense* ssp. *nebraskense*. *Langmuir* **2001**, 17, 2251-2257.
66. Steinem, C.; Janshoff, A.; von dem Bruch, K.; Reihls, K.; Goossens, J.; Galla, H.-J., Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 45, 17-26.
67. Ende, D.; Mangold, K.-M., Impedanzspektroskopie. *Chem. Unserer Zeit* **1993**, 27, 134-140.
68. Brug, G. J.; Van der Eeden, A. L. G.; Sluyters-Rehbach, M.; Sluyters, J. H., The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 176, 275-295.
69. Diao, P.; Cui, X.; Gu, D.; Tong, R.; Zhong, B., Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and impedance. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 464, 61-67.
70. Sadkowsky, A., On the ideal polarisability of electrodes displaying cpe-type capacitance dispersion. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 481, 222-226.

71. Cole, K. S.; Cole, R. H., Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating-current characteristics. *J. Phys. Chem.* **1941**, 9, 341-351.
72. Schneider, W., Theory of the frequency dispersion of electrode polarization Topology of networks with fractional power frequency dependence. *J. Phys. Chem. B* **1975**, 79, (2), 127-136.
73. Crane, J. M.; Tamm, L. K., *Fluorescence Microscopy to Study Domains in Supported Lipid Bilayers*. Springer: 2007; Vol. 400, p 481-488.
74. Navarra, K. R. Development of the pressure-sensitive-paint-technique for advanced turbomachinery applications. Thesis for a Master of Science, 1997.
75. Internetquelle: <http://www.invitrogen.com/>.
76. Song, L. L.; Hennink, E. J.; Young, I. T.; Tanke, H. J., Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **1995**, 68, (6), 2588-2600.
77. Dreuw, A.; Flemming, G. R.; Head-Gordon, M., Role of electron-transfer quenching of chlorophyll fluorescence by carotenoids in non-photochemical quenching of green plants. *Biochem Soc Trans.* **2005**, 33, (4), 858-862.
78. Pikulik, L. G.; Gladchenko, L. F.; Kostko, M. Y., Fluorescence and internal conversion spectra for excited molecules in solutions *J Appl Spectros* **1965**, 2, (2), 160-166.
79. Scaglione, B. A.; Rintoul, D. A., A Fluorescence-Quenching Assay for Measuring Permeability of Reconstituted Lens MIP26. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **1989**, 30, (5), 961-966.
80. Almeida, P. F. F.; Vaz, W. L. C., *Handbook of Biological Physics, Chapter 6: Lateral Diffusion in Membranes*. Elsevier Science B. V.: 1995; Vol. 1
81. Koppel, D. E.; Axelrod, D.; Schlessinger, J.; Elson, E. L.; Webb, W. W., Dynamics of Fluorescence Marker Concentration as a Probe of Mobility. *Biophys. J.* **1976**, 16, (11), 1315-1329.
82. Müller, F. Numerical Simulations of Fluorescence Recovery After Photobleaching Experiments. Karl Franzens Universität Graz, Graz, 2005.
83. Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39 1848-1906.
84. Menke, M. Visualisierung und Charakterisierung der molekularen Anordnung von Annexin A2 auf Lipidmembranen. Dissertation, Universität Regensburg, 2005.
85. de Almeida, R. F. M.; Borst, J.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Visser, A. J. W. G., Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence. **2007**, 93, (2), 539-553.
86. Kahya, N.; Pécheur, E.-I.; de Boeij, W. P.; Wiersma, D. A.; Hoekstra, D., Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion. *Biophys. J.* **2001**, 81, (3), 1464-1474.
87. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S., Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 303-311.
88. Angelova, M. I.; Soleau, S.; Meleard, P.; Faucon, J. F.; Bothorel, P., Preparation of Giant Vesicles by External Ac Electric-Fields - Kinetics and Applications. *Progr. Colloid. Polym. Sci.* **1992**, 89, 127-131.

89. Bagatolli, L. A.; Gratton, E., Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **1999**, *77*, (4), 2090-2101.
90. Dimitrov, D. S.; Angelova, M. I., Lipid Swelling and Liposome Formation Mediated by Electric-Fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1988**, *19*, (2), 323-336.
91. Mathivet, L.; Cribier, S.; Devaux, P. F., Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys. J.* **1996**, *70*, (3), 1112-1121.
92. Lehmann, V.; Foll, H., Formation Mechanism and Properties of Electrochemically Etched Trenches in N-Type Silicon. *J. Electrochem Soc.* **1990**, *137*, (2), 653-659.
93. M. H. Klühr, A. S. C. A. E. K. H. T. S. K. D., Cover Picture: Partially Oxidized Macroporous Silicon: A Three-Dimensional Photonic Matrix for Microarray Applications (Adv. Mater. 23/2006). *Advanced Materials* **2006**, *18*, (23), NA.
94. Rocchia, M.; Borini, S.; Rossi, A. M.; Boarino, L.; Amato, G., Submicrometer functionalization of porous silicon by electron beam lithography. *Adv. Mat.* **2003**, *15*, (17), 1465-1469.
95. Vinegoni, C.; M., C.; Pavesi, L., *Silicon-Based Materials and Devices: Porouse silicon microcavities*. Academic Press: 2001; Vol. 2, p 123-102.
96. Schmitt, E. K.; Nurnabi, M.; Bushby, R. J.; Steinem, C., Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading. *Soft Matter* **2008**, *4*, 250-253.
97. Lopez, E.; O'Brien, D. F.; Whitesides, G. M., Structural Effects on the Photo-Polymerization of Bilayer-Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 305-307.
98. Neumann, R.; Ringsdorf, H.; Patton, E. V.; O'Brien, D. F., Preparation and characterization of long chain amino acid and peptide vesicle membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *898*, (3), 338-348.
99. Shenoy, D. K.; Barger, W. R.; Singh, A.; Panchal, R. G.; Misakian, M.; Stanford, V. M.; Kasianowicz, J. J., Functional reconstitution of protein ion channels into planar polymerizable phospholipid membranes. *Nano Lett* **2005**, *5*, (6), 1181-1185.
100. Day, D.; Ringsdorf, H., Polymerization of Diacetylene Carbonic-Acid Monolayers at Gas-Water Interface. *J. Polym. Sci. Polym. Lett* **1978**, *16*, 205-210.
101. Lipowsky, R.; Seifert, U., Adhesion of Vesicles and Membranes. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, *202*, 17 - 25.
102. Hamai, C.; Cremer, P. S.; Musser, S. M., Single giant vesicle rupture events reveal multiple mechanisms of glass-supported bilayer formation. *Biophys. J.* **2007**, *92*, (6), 1988-1999.
103. Rossi, F.; Ristori, S.; Rustici, M.; Marchettini, N.; Tiezzi, E., Dynamics of pattern formation in biomimetic systems *J Theor Biol* **2008**, *255*, (4), 404-412.
104. Sackmann, E.; Eggl, P.; Fahn, C.; Bader, H.; Ringsdorf, H.; Schollmeier, M., Compound membranes of linearly polymerized and cross-linked macrolipids with phospholipids: preparation, microstructure and applications. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1198-1208.
105. Wagner, D.; Hofmann, U. G.; Dorn, I.; Schmitt, L.; Tampé, R.; Gaub, H. E., Anomalous pH dependence of the coexistence pressure of the polymerizable two-chain N-lipid methyl-bis(pentacosadiinoyl-oxyethyl)-amine *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1997**, *26*, (3), 271-275.

106. Britt, D. W.; Hofmann, U. G.; Mobius, D.; Hell, S. W., Influence of Substrate Properties on the Topochemical Polymerization of Diacetylene Monolayers. *Langmuir* **2001**, *17*, (12), 3757-3765.
107. Johnston, D. S.; Mclean, L. R.; Whittam, M. A.; Clark, A. D.; Chapman, D., Spectra and Physical-Properties of Liposomes and Monolayers of Polymerizable Phospholipids Containing Diacetylene Groups in One Or Both Acyl Chains. *Biochemistry* **1983**, *22*, 3194-3202.
108. Morigaki, K.; Kiyosue, K.; Taguchi, T., Micropatterned composite membranes of polymerized and fluid lipid bilayers. *Langmuir* **2004**, *20*, (18), 7729-7735.
109. Bronstein, I. N.; Semendjajew, K. A.; Musiol, G.; Mühlig, H., *Taschenbuch der Mathematik*. 4 ed.; Verlag Harri Deutsch: Frankfurt/Main, 1999.
110. Horn, C.; Steinem, C., Photocurrents generated by bacteriorhodopsin adsorbed on nano-black lipid membranes. *Biophys. J.* **2005**, *89*, (2), 1046-1054.
111. Pilz, C. S.; Steinem, C., Modulation of the conductance of a 2,2'-bipyridine-functionalized peptidic ion channel by Ni²⁺. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **2008**, *37*, (6), 1065-1071.
112. Römer, W.; Lam, Y. H.; Fischer, D.; Watts, A.; Fischer, W. B.; Göring, P.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U.; Steinem, C., Channel activity of a viral transmembrane peptide in micro-BLMs: Vpu1-32 from HIV-1. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16267-16274.
113. Weiskopf, D.; Schmitt, E. K.; Klühr, M. H.; Dertinger, S. K.; Steinem, C., Micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates: Rupture process and lateral mobility. *Langmuir* **2007**, *23*, 9134-9139.
114. Benz, R.; Fröhlich, O.; Läger, P.; Montal, M., Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *394*, (3), 323-334.
115. Hanke, W.; Schlue, W. R., *Planar Lipid Bilayers: Methods and Applications (Biological Techniques Series)*. Academic P.,U.S: 1993.
116. Winterhalter, M., Black Lipid Membranes. *Curr. Opin. Coll. Int.* **2000**, *5*, 250-255.
117. Diederich, A.; Bahr, G.; Winterhalter, M., Influence of surface charges on the rupture of black lipid membranes. *Phys. Rev. E* **1998**, *58*, (4), 4883-4889.
118. Schuster, B., Biomimetic Design of Nanopatterned Membranes *Nanobiotech.* **2005**, *1*, (2), 153-164.
119. Ovalle-Garcia, E.; Ortega-Blake, I., Joining patch-clamp and atomic force microscopy techniques for studying black lipid membranes. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 093901.
120. Kerner, Z.; Pajkossy, T., Impedance of rough capacitive electrodes - the role of surface disorder. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 139-142.
121. Sadkowski, A., Time-Domain Responses of Constant Phase Electrodes. *Electrochim. Acta* **1993**, *38*, (14), 2051-2054.
122. Eray, M.; Dogan, N. S.; Liu, L., Highly stable bilayer lipid membranes (BLMs) formed on microfabricated polyimide apertures. *Biosens Bioelectr.* **1994**, *9*, (4-5), 343-351
123. Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J., Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotech.* **2001**, *19*, 365 - 370
124. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed.; Springer: 2006.

125. Böcker, M.; Muschter, S.; Schmitt, E. K.; Steinem, C.; Schäffer, T. E., Imaging and patterning of pore-suspending membranes with scanning ion conductance microscopy. *Langmuir* **2009**, *25*, 3022-3028.
126. Smith, M. B.; Tong, J.; Genzer, J.; Fischer, D.; Kilpatrick, P. K., Effects of Synthetic Amphiphilic α -Helical Peptides on the Electrochemical and Structural Properties of Supported Hybrid Bilayers on Gold. *Langmuir* **2006**, *22*, (4), 1919-1927.
127. Pilz, C. Modulation der Helix-Bündel-Bildung eines Bipyridin-funktionalisierten peptitischen Ionenkanals durch Komplexierung von Ni(II). Dissertation, Universität Regensburg, 2007.
128. Nissen, J.; Jacobs, K.; Radler, J. O., Interface dynamics of lipid membrane spreading on solid surfaces. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, (9), 1904-1907.
129. Fahey, P. F.; Webb, W. W., Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid crystals. *Biochemistry* **1978**, *17*, (15), 3046-3053.
130. Sonnleitner, A.; Schütz, G. J.; Schmidt, T., Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2638-2642.
131. Ladha, S.; Mackie, A. R.; Harvey, L. J.; Clark, D. C.; Lea, E. J.; Brullemans, M.; Duclohier, H., 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.* **1996**, *71*, (3), 1364-1373.
132. Brozell, A. M.; Muha, M. A.; Sanii, B.; Parikh, A. N., A class of supported membranes: formation of fluid phospholipid bilayers on photonic band gap colloidal crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, (1), 62-63.
133. Dertinger, T.; von der Hocht, I.; Benda, A.; Hof, M.; Enderlein, J., Surface sticking and lateral diffusion of lipids in supported bilayers. *Langmuir* **2006**, *22*, (22), 9339-9344.
134. Lopez, A.; Dupou, L.; Altibelli, A.; Trotard, J.; Tocanne, J. F., Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D. *Biophys. J.* **1988**, *53*, (6), 963-970.
135. Swift, S. R.; Trinkle-Mulcahy, L., Basic principles of FRAP, FLIM and FRET. *Proc. Royal Mic. Soc.* **2004**, *39*, 3-10.
136. White, J.; Stelzer, E., Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 61-65.
137. Han, X.; Pradeep, S. N.; Critchley, K.; Sheikh, K.; Bushby, R. J.; Evans, S. D., Supported bilayer lipid membrane arrays on photopatterned self-assembled monolayers. *Chemistry* **2007**, *13*, (28), 7957-7964.
138. Shinoda, K.; Shinoda, W.; Mikami, M., Molecular dynamics simulation of an archaean lipid bilayer with sodium chloride. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 643-650.
139. Györvary, E.; Wetzler, B.; Sleytr, U. B.; Sinner, A.; Offenhäusser, A.; Knoll, W., Lateral diffusion of lipids in silane-, dextran- and S-layer-supported mono- and bilayers. *Langmuir* **1999**, *15*, 1337-1347.
140. Periasamy, N.; Verkman, A. S., Analysis of fluorophore diffusion by continuous distributions of diffusion coefficients: application to photobleaching

- measurements of multicomponent and anomalous diffusion. *Biophys. J.* **1998**, 75, (1), 557-567.
141. Kusba, J.; Li, L.; Gryczynski, I.; Piszczek, G.; Johnson, M.; Lakowicz, J. R., Lateral diffusion coefficients in membranes measured by resonance energy transfer and a new algorithm for diffusion in two dimensions. *Biophys. J.* **2002**, 82, (3), 1358-1372.
142. Wagner, M. L.; Tamm, L. K., Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophys. J.* **2000**, 79, (3), 1400-1414.
143. Köchy, T.; Bayerl, T. M., Lateral diffusion coefficients of phospholipids in spherical bilayers on a solid support measured by resonance² relaxation. *Phys. Rev. E* **1993**, 47, (3), 2109-2116.
144. Williams, L. M.; Evans, S. D.; Flynn, T. M.; Marsh, A.; Knowles, P. F.; Bushby, R. J.; Boden, N., Kinetics of the Unrolling of Small Unilamellar Phospholipid Vesicles onto Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1997**, 13, (4), 751-757.
145. Nakamura, N.; Huang, H.-X.; Qian, D.-J.; Miyake, J., Quartz Crystal Microbalance and Electrochemical Studies on a Viologen Thiol Incorporated in Phospholipid Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002**, 18, (15), 5804-5809.
146. Wieder, H. Festkörperunterstützte Lipid-Modellmembranen auf Gold zur Rekonstitution von Membranproteinen. Dissertation Universität Mainz, Mainz, 2000.
147. Jenkins, A. T. A.; Bushby, R. J.; Boden, N.; Evans, S. D.; Knowles, P. F.; Liu, Q.; Miles, R. E.; Ogier, S. D., Ion-Selective Lipid Bilayers Tethered to Microcontact Printed Self-Assembled Monolayers Containing Cholesterol Derivatives. *Langmuir* **1998**, 14, (17), 4675-4678.
148. Jenkins, A. T. A.; Bushby, R. J.; Evans, S. D.; Knoll, W.; Offenhausser, A.; Ogier, S. D., Lipid Vesicle Fusion on μ CP Patterned Self-Assembled Monolayers: Effect of Pattern Geometry on Bilayer Formation. *Langmuir* **2002**, 18, (8), 3176-3180.
149. Worsfold, O.; Voelcker, N. H.; Nishiya, T., Biosensing Using Lipid Bilayers Suspended on porous Silicon. *Langmuir* **2006**, 22, 7078-7083.
150. Deverall, M. A.; Gindl, E.; Sinner, E.-K.; Besir, H.; Ruehe, M.; Saxton, M. J.; Naumann, C. A., Membrane Lateral Mobility Obstructed by Polymer-Tethered Lipids Studied at the Single Molecule Level. *Biophys. J.* **2005**, 88, 1875-1886.
151. Meller, P.; Peters, R.; Ringsdorf, H., Microstructure and lateral diffusion in monolayers of polymerizable amphiphils. *Colloid & Polymer Science* **1989**, 267, 97-107.
152. Johnston, D. S.; Sanghera, S.; Pons, M.; Chapman, D., Phospholipid polymers—Synthesis and spectral characteristics. *Biochim Biophys Acta* **1980**, 602, (1), 57-69.
153. O'Brien, D. F.; Whitesides, T. H.; Klingbiel, R. T., The photopolymerization of lipid-diacetylenes in bimolecular-layer membranes. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **1981**, 19, (3), 95-101.
154. Wegner, G., Topochemical reactions of monomers with conjugated triple bonds. III. Solid-state reactivity of derivatives of diphenyldiacetylene. *J. Polym. Sci. B: Pol. Let.* **1971**, 9, (2), 133-144.

155. Baughman, R. H., Solid-state polymerization of diacetylenes. *J. Appl. Phys.* **1972**, 43, (11), 4362-4370.
156. Morigaki, K.; Baumgart, T.; Offenhäusser, A.; Knoll, W., Strukturierung festkörpergestützter Lipiddoppelschichten durch lithographische Polymerisation eines Diacetylen-Lipids. *Angew. Chemie* **2001**, 113, (1), 184-186.
157. Morigaki, K.; Baumgart, T.; Jonas, U.; Offenhausser, A.; Knoll, W., Photopolymerization of Diacetylene Lipid Bilayers and Its Application to the Construction of Micropatterned Biomimetic Membranes. *Langmuir* **2002**, 18, (10), 4082-4089.
158. Morigaki, K.; Schonherr, H.; Frank, C. W.; Knoll, W., Photolithographic Polymerization of Diacetylene-Containing Phospholipid Bilayers Studied by Multimode Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2003**, 19, (17), 6994-7002.
159. Singh, A.; Schnur, J. M., *Polymerizable phospholipids*. New York, 1993; p 223-291.
160. Yager, P.; Schoen, P. E., Formation of Tubules by a Polymerizable Surfactant. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1984**, 106, 371-381.
161. Singh, A.; Schnur, J. M., Polymerizable phospholipids: a novel class of biomaterials. *Polym. Adv. Technol.* **1994**, 5, (7), 358-373.
162. Lopez, E.; O'Brien, D. F.; Whitesides, T. H., Effects of membrane composition and lipid structure on the photopolymerization of lipid diacetylenes in bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* **1982**, 693, (2), 437-443.
163. Benz, R.; Elbert, R.; Prass, W.; Ringsdorf, H., Polymerization in black lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* **1986**, 14, (2), 83-92.
164. Przybylo, M.; Sykora, J.; Humpolíčková, J.; Benda, A.; Zan, A.; Hof, M., Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions. *Langmuir* **2006**, 22, (22), 9096-9099.

A ANHANG

A.1 Symbolverzeichnis

α	Koeffizient des CPE (<i>constant phase element</i>)
Π	lateraler Druck
∇	Nablaoperator
φ	Phasenverschiebung
$\Im(Z)$	Imaginärteil der Impedanz (Blindwiderstand)
$\Re(Z)$	Realteil der Impedanz (Wirkwiderstand)
τ_D	charakteristische Diffusionszeit
τ	Geschwindigkeitskonstante
$ Z $	Betrag der Impedanz
A	Fläche, Parameter des CPE
C	Kapazität
c	Konzentrationsverteilung
c'	erste Ableitung der Konzentrationsverteilung nach dem Ort
c''	zweite Ableitung der Konzentrationsverteilung nach dem Ort
c_0	Angangskonzentration
c_{bleich}	Konzentrationsverteilung bedingt durch das Bleichen
c_{diff}	Konzentrationsverteilung bedingt durch die Diffusion

C_m	Membrankapazität
D	Diffusionskoeffizient
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient
D_{Pore}	Diffusionskoeffizient des Porenbereiches
D_{Steg}	Diffusionskoeffizient des Stegbereiches
e^x	Exponentialfunktion
F	Fläche
f	Frequenz
h	Plancksches Wirkungsquantum (= $4,14 \cdot 10^{-15}$ eV)
I	Intensität
i	komplexe Einheit
P	Laserleistung
R	Ohmscher Widerstand
r	Ortsvariable
R_{el}	Elektrolytwiderstand
R_m	Membranwiderstand
S	Signalstärke
S_0	Grundzustand
S_1	angeregter Singulettzustand
T	Temperatur
t	Zeit
T_1	Triplett-Zustand

U	Spannung
Z	Impedanz
γ	Oberflächenspannung
ν_A	Frequenz des Anregungsphotons
ν_F	Frequenz des emittierten Photons bei Fluoreszenz
ν_P	Frequenz des emittierten Photons bei Phosphoreszenz
σ	Standardabweichung
ω	Halbwertsbreite der Gaußkurve

A.2 Abkürzungsverzeichnis

23:2 PC Diyen	1,2-Bis(10,12-tricosadiynoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
BLM	<i>black lipid membrane</i>
BODIPY 500/510 HPC	2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCD	<i>charge coupled device</i>
CHCl ₃	Chloroform
CoCl ₂	Kobalt(II)chlorid
CPE	<i>constant phase element</i>
CPEO3	Cholesterylpolyethylenoxythiol
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPhPS	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanol
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
Fs	Filtersatz
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hg	Quecksilber
ITO	Indium-Titanoxid
NaCl	Natriumchlorid
NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadekanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz
NH ₃	Ammoniak
ODT	Octadekanthiol
PEG	Polyethylenglycol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylcholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphoethanolamin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
ROI	<i>region of interest</i>
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl-3-glycero-phosphorcholin
Texas Red DHPE	1,2-Dihexadekanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UV	Ultraviolett

A.3 Chemikalien

β-BODIPY® 500/510 C12-HPC	Molecular Probes (Eugene, USA)
1-Oktanthiol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
23:2 PC Diyen	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Ammoniak, 32 %	VWR International (Darmstadt)
Argon	Air Liquide (Düsseldorf)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPhPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Ethanol, reinst.	Service GmbH (Dortmund)
Isopropanol, reinst.	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mucosol®	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
<i>n</i> -Dekan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Sauerstoff	Air Liquide (Düsseldorf)
Schwefelsäure, 95-97%	Merck (Darmstadt)
Texas Red® DHPE	Invitrogen (Eugene, USA)

TRIS

Merck (Darmstadt)

Wasserstoffperoxid, 30 %

Carl-Roth GmbH (Karlsruhe)

A.4 Materialien

Au-Target	Elektronen Optik Service (Dortmund)
Eppendorfpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Hämatokritwachs	Schütt (Göttingen)
ITO-Floatglasssubstrate	PGO (Iserlohn)
Kalrez O-Ringe	DuPont Dow Elast. (Newark, USA)
Kupferklebeband, leitfähig	PGO (Iserlohn)
Mikroliterspritze	Hamilton (Bonaduz, CH)
Parafilm	American National Can (Chicago, USA)
Pinsel Stärke 5	Herlitz (Berlin)
Platindraht	Good Fellow (Cambridge, UK)
Polycarbonatmembran	Armantis (Mannheim)
Reagenzgläser	VWR International (Darmstadt)
Siliziumwafer	Si-Mat (Landsberg/Lech)
Silizium, porös, 7 μm	Infineon (München)
Silizium, porös, 2 μm	Fluxion (Eindhoven, Niederlande)
Teflonklebefolie	Kleinfeld (Gehrden)
Ti-Target	Elektronen Optik Service (Dortmund)

A.5 Geräte

Impedanzspektroskopie

Impedanz/Gain-Phase Analyzer SI 1260 Solartron Instr. (Farnborough, USA)

Dielectric Interface 1296 Solartron Instr. (Farnborough, USA)

Sputter-Anlage

Sputter Coater 108 auto Cressington (Watford, USA)

Thickness Controller mtm 20 Cressington (Watford, USA)

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskop, AxioTech Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

CCD Kamera AxioCam HRm Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

Filterset 44 (BP475/49 FT500 BP530/50) Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

Filterset 45 (BP560/40 FT585 BP630/75) Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

Objektiv 40x/0,80/w Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

Objektiv 63x/0,95/w Carl Zeiss GmbH (Göttingen)

Argon-Ionen-Laser JDS Uniphase Corporation (Milpitas, USA)

Filmwaage

RK 1 Standard Langmuir Trough Riegler & Kirstein GmbH (Potsdam)

Thermostat VWR™ VWR International (Darmstadt)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle

Prof. Dr. Claudia Steinem für die interessante Aufgabenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und die uneingeschränkte Unterstützung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Christoph Schmidt für die Übernahme der Betreuung am III. Physikalischen Institut in Göttingen.

Prof. Dr. Andreas Janshoff vom Institut für Physikalische Chemie und seinem Arbeitskreis für die fachlichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Workshops.

Allen aktuellen, sowie ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima.

Florian Müller für die Bereitstellung seines FEM-Programms „FRAPSim“ und Holger Adam für die Erstellung des Auswertetools für die FRAP-Messungen in IGOR®.

Ines, Ruth, Sabine und Svenja für das Korrekturlesen und das unermüdliche Suchen nach Rechtschreibfehlern.

Ingo Mey für seine Diskussionsbereitschaft, konstruktives Korrekturlesen und die aufbauenden Worte während des Schreibens.

André Beerlink, aus dem Arbeitskreis Salditt vom Institut für Röntgenphysik in Göttingen, u. a. für seine Einführung in die „Welt der GUVs“ und die fachlichen Diskussionen.

Den technischen Angestellten, insbesondere Jutta und Michaela für die stete Hilfsbereitschaft und die unterstützenden Arbeiten.

Daniel, Philip, Nadine, Melli, Karin und Torben für die schöne Zeit in Göttingen und ihre Freundschaft.

Meinen Freunden aus der Studienzeit Steffi, Markus, Andi, Joe, ... die Zeit mit euch ist jedesmal ein Ereignis, das man nicht missen möchte.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Opa, dafür, dass sie immer hinter mir gestanden und an mich geglaubt haben; ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen. Es ist gut zu wissen, dass ihr immer da seid.

Veröffentlichungen

Publikationen:

Weiskopf, D., Schmitt, E.K., Klühr, M. H., Dertinger, S. K., Steinem, C. (2007) Micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates: Rupture process and lateral mobility. *Langmuir* **23**, 9134 -9139

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

Posterpräsentationen:

Rupturing and FRAP experiments of micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates, Workshop „*Mechanical and electrical properties of artificial and cellular membranes*“, März 2008, Gomadingen

Rupturing and FRAP experiments of micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates, 6th EBSA & British Biophysical Society Congress, Juli 2007, London

Rupturing- and FRAP-experiments on micro-BLMS, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2006, Mainz

Determination of diffusion coefficients on micro-BLMs by FRAP measurements, Workshop „*Dynamics of artificial and biological membranes*“, März 2006, Gomadingen

Lebenslauf

Name Daniela Vera Weiskopf
Geboren 31. Januar 1979 in Dettelbach
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

Sep 1985 – Jul 1989 Volksschule Mainbernheim
Sep 1989 – Jun 1999 Egbert-Gymnasium, Münsterschwarzach
Allgemeine Hochschulreife am 25. Juni 1999

Studium

Okt 1999 – Apr 2005 Studium der Physik an der Julius-Maximilians-Universität.
Würzburg
Vordiplom im Fach Physik am 29. Mai 2002
Apr 2004 – Apr 2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für technische Physik unter
Anleitung von Prof. Dr. Alfred Forchel
Diplom im Fach Physik am 01. April 2005

Tätigkeiten

Jun 2005 – Mär 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Analytische
Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität
Regensburg
Apr 2006 – Feb 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische
und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität,
Göttingen

Förderungen

Jun 2005 – Mär 2005 Stipendiatin des Graduiertenkollegs GRK640 *Sensory
photoreceptors in natural and artificial systems* der
Deutschen Forschungsgemeinschaft

Dissertation

Beginn der Dissertation am 01. Juni 2005 am Institut für Analytische Chemie, Chemo-
und Biosensorik an der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia
Steinem.

Weiterführung der Dissertation am 01. April 2006 am Institut für Organische und
Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität, Göttingen unter der Anleitung von
Prof. Dr. Claudia Steinem.